

UNIVERSITATEA „ALEXANDRU IOAN CUZA” DIN IAȘI

FACULTATEA DE BIOLOGIE

ȘCOALA DOCTORALĂ DE BIOLOGIE

**Impactul nicotinei și al derivaților nicotinici asupra
afecțiunilor neurodegenerative. Studii pe modele animale
ale bolii Alzheimer**

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Conducător de doctorat:

Prof. univ. dr. habil. Lucian HRIȚCU

Student-doctorand:

Răzvan Ștefan BOIANGIU

IAȘI

2021

UNIVERSITATEA „ALEXANDRU IOAN CUZA” DIN IAȘI

Rectorat

Nr. _____ din _____;

Doamnei/Domnului

.....

Vă informăm că în data de 29.06.2021, ora 14:00, în sistem online pe platforma Microsoft Teams (<https://tinyurl.com/26nh2kp4>), va avea loc susținerea publică a tezei de doctorat intitulată: **“Impactul nicotinei și al derivaților nicotinici asupra afecțiunilor neurodegenerative. Studii pe modele animale ale bolii Alzheimer”** elaborată de domnul Boianțu Răzvan Ștefan, în vederea obținerii titlului științific de doctor în domeniul fundamental **Biologie**.

Comisia de doctorat are următoarea componență:

Președinte	
Prof. univ. dr. habil. Luminița Bejenaru	Facultatea de Biologie, Universitatea Alexandru Ioan Cuza din Iași, România
Conducător științific	
Prof. univ. dr. habil. Lucian Hrițcu	Facultatea de Biologie, Universitatea Alexandru Ioan Cuza din Iași;
Referenți	
Prof. dr. Silvana Andreescu	Departamentul de Chimie și Științe Biomoleculare, Universitatea Clarkson, Potsdam, New York, Statele Unite ale Americii;
Prof. univ. dr. habil. Marius Mihășan	Facultatea de Biologie, Universitatea Alexandru Ioan Cuza din Iași, România;
Prof. univ. dr. habil. Paul Corneliu Boișteanu	Facultatea de Zootehnie, Universitatea de Științe Vieții “Ion Ionescu de la Brad” Iași, România

Cu această ocazie vă transmitem rezumatul tezei de doctorat și vă invităm să participați la susținerea publică.

Rectorat

CUPRINS

CUVINTE CHEIE.....	1
PARTEA TEORETICĂ	3
INTRODUCERE.....	3
CAPITOL 1. BOALA ALZHEIMER.....	5
1.1. Etiopatologie	5
1.2. Neuropatologie.....	7
1.3. Aspecte neuropsihiatrice	9
1.4. Factori de risc.....	10
1.5. Tratament	12
1.6. Factori cognitivi, antioxidanți și inflamatori în boala Alzheimer.....	14
CAPITOL 2. NICOTINA ȘI DERIVAȚII NICOTINICI.....	17
2.1. Nicotina.....	17
2.2. Cotinina	19
2.3. 6-Hidroxi-L-nicotina	21
CAPITOL 3. MODELE ANIMALE ALE BOLII ALZHEIMER	23
3.1. Modele de rozătoare ale bolii Alzheimer	23
3.2. Modele de pește zebură ale bolii Alzheimer	24
PARTEA EXPERIMENTALĂ.....	29
CAPITOL 4. MATERIALE ȘI METODE	29
4.1. Evaluarea performanțelor cognitive ale șobolanilor.....	29
4.2. Evaluarea performanțelor cognitive ale peștilor zebură.....	35
4.3. Evaluarea parametrilor biochimici din probele de creier prelevate de la animalele de laborator tratate cu nicotină și derivați nicotinici.....	39
4.4. Evaluarea expresiei genice a unor markeri moleculari prin RT-qPCR	42
4.5. Analiza statistică a datelor experimentale	42
CAPITOL 5. REZULTATE ȘI DISCUȚII.....	43

5.1. Efectele cognitive ale nicotinei și derivaților nicotinici asupra modelului amiloidic al bolii Alzheimer indus de peptida A β ₂₅₋₃₅	43
5.2. Andocarea moleculară a nicotinei și a derivaților nicotinici la receptorii nicotinici ai acetilcolinei	49
5.3. Efectele nicotinei și derivaților nicotinici asupra activității acetilcolinesterazei la modelul amiloidic al bolii Alzheimer indus de peptida A β ₂₅₋₃₅	59
5.4. Efectele nicotinei și derivaților nicotinici asupra statusului oxidativ la modelul amiloidic al bolii Alzheimer indus de peptida A β ₂₅₋₃₅	59
5.5. Efectele nicotinei și derivaților nicotinici asupra markerilor genetici la modelul amiloidic al bolii Alzheimer indus de peptida A β ₂₅₋₃₅	61
5.6. Corelații Pearson între parametrii comportamentali și biochimici	65
5.7. Efectele cognitive ale nicotinei și derivaților nicotinici la modelul de pește zebă al bolii Alzheimer indus prin imersie în scopolamină	65
5.8. Efectele nicotinei și derivaților nicotinici asupra stării asemănătoare anxietății la modelul de pește zebă al bolii Alzheimer indus prin imersie în scopolamină	68
5.9. Efectele nicotinei și derivaților nicotinici asupra activității acetilcolinesterazei la modelul de pește zebă al bolii Alzheimer indus prin imersie în scopolamină	70
5.10. Efectele nicotinei și derivaților nicotinici asupra stresului oxidativ la modelul de pește zebă al bolii Alzheimer indus prin imersie în scopolamină	71
5.11. Efectele nicotinei și derivaților nicotinici asupra markerilor genetici la modelul de pește zebă al bolii Alzheimer indus prin imersie în scopolamină	73
5.12. Corelații Pearson între parametrii comportamentali, biochimici și genetici...	76

CONCLUZII 79

BIBLIOGRAFIE	81
--------------------	----

ACTIVITATEA ȘTIINȚIFICĂ	103
-------------------------------	-----

Articole publicate in extenso din subiectul tezei de doctorat	103
---	-----

Articole publicate in extenso în timpul studiilor doctorale.....	103
--	-----

Articole publicate în rezumat	105
-------------------------------------	-----

Participări la manifestări științifice.....	106
---	-----

CUVINTE CHEIE

1. 6-hidroxi-L-nicotină
2. beta-amiloid (*engl.* amyloid beta, A β);
3. acetilcolinesterază (*engl.* Acetylcholinesterase, AChE);
4. boala Alzheimer (*engl.* Alzheimer's Disease, AD);
5. apolipoproteina E (*engl.* apolipoprotein E, APOE);
6. proteina precursor a amiloidului (*engl.* amyloid precursor protein, APP);
7. proteina asociată citoscheletului cu activitate reglată (*engl.* activity-regulated cytoskeleton-associated protein, ARC);
8. factorul neurotrofic derivat din creier (*engl.* brain-derived neurotrophic factor, BDNF);
9. cotinină (*engl.* cotinine, COT);
10. interleukina 1 β (*engl.* interleukin 1 β , IL-1 β);
11. intracerebroventricular (i.c.v.);
12. intraperitoneal (i.p.);
13. receptorii muscarinici ai acetilcolinei (*engl.* muscarinic acetylcholine receptors. mAChRs);
14. protein kinaza mitogen activată (*engl.* mitogen-activated protein kinase, MAPK);
15. malondialdehidă (*engl.* malondialdehyde, MDA);
16. receptorii nicotinici ai acetilcolinei (*engl.* nicotinic acetylcholine receptors, nAChRs);
17. ghemuri neurofibrilare de proteină tau (*engl.* neurofibrillary tangles of protein tau, NFTs);
18. nicotină (*engl.* nicotine, NIC);
19. testul de recunoaștere a obiectului nou (*engl.* novel object recognition test, NOR);
20. neuropeptidul Y (*engl.* neuropeptide Y, NPY);
21. testul de scufundare în bazinul nou (*engl.* novel tank diving test, NTT);
22. labirintul cu brațe radiale (*engl.* radial arm maze, RAM);
23. reacția de polimerizare în lanț cantitativă în timp real (*engl.* Real Time – quantitative Polymerase Chain Reaction, RT-qPCR)
24. scopolamină (*engl.* scopolamine, SCOP);
25. superoxid dismutază (*engl.* superoxide dismutase, SOD);

PARTEA TEORETICĂ

INTRODUCERE

Boala Alzheimer (AD) este o tulburare neurodegenerativă progresivă care afectează peste 50 de milioane de oameni din întreaga lume, fiind cea mai răspândită formă de demență și a cincea cauză de deces (1). Asociația Alzheimer (2) a raportat că, doar în SUA, una din 10 persoane cu vârsta de peste 65 de ani suferă de demență Alzheimer. Pe măsură ce populația crește și îmbătrânește, numărul persoanelor afectate de demență, și a aparținătorilor lor va crește (1).

AD este asociată cu deficite de memorie și declin cognitiv, deși mai multe simptome neuropsihiatrice, respectiv anxietate, depresie și apatie, au fost observate în stadiile incipiente ale bolii (3,4). Neuropatologia AD este caracterizată prin acumularea intra- și extracelulară a peptidei beta-amiloidice (A β), formarea intracelulară de ghemuri neurofibrilare din proteină tau (*engl.* neurofibrillary tangles of protein tau, NFTs) hiperfosforilată și degenerarea neuronilor colinergici acompaniată de o reducere a nivelurilor de acetilcolină (ACh) (5–7). Chiar dacă agentul etiologic este necunoscut, în ultimele decenii au apărut mai multe ipoteze cu privire la patogenеза AD. Ipoteza cascadei amiloidice (8) postulează că neurodegenerarea din AD este provocată de o acumulare anormală de plăci senile din A β în diferite zone ale creierului, care acționează ca un declanșator patologic al unei cascade care include insuficiența sinaptică, disfuncție neuronală și moarte celulară (9). În prezent, se consideră în general că un dezechilibru între producția și eliminarea de A β este un factor inițiator al AD (10). Ipoteza colinergică a AD se concentrează pe degenerarea neuronilor colinergici din nucleul bazal a lui Meynert, care sunt implicați în funcția cognitivă, contribuind astfel la pierderea de memorie prezentată de pacienții cu AD (5,11).

Transmisia colinergică se realizează prin intermediul receptorilor nicotinici ai acetilcolinei (nAChRs) și receptorilor muscarinici ai acetilcolinei (mAChRs), două familii de receptori de care se atașează ACh și care sunt implicați în procesele cognitive, fiind afectați în AD (12). Prezența lor în neuronii colinergici indică implicarea în funcții cognitive superioare, inclusiv memorie și învățare (12,13). Având în vedere că receptorii nAChRs sunt implicați în patogenеза AD (14), utilizarea modulatorilor pentru a crește disponibilitatea ACh și pentru a evita moartea neuronilor colinergici din proencefal reprezintă o nouă strategie terapeutică pentru AD (15).

Nicotina (NIC), alcaloidul izolat din frunzele plantei de tutun (*Nicotiana tabacum*), promovează funcția ACh prin legarea la receptorii nAChRs din creier, îmbunătățind performanțele în mai multe domenii ale funcțiilor cognitive, inclusiv atenția, memoria de lucru și învățarea (16,17). În plus, NIC reduce stresul oxidativ (18), diminuează neuroinflamația (19) și previne agregarea A β în creier (20). Cu toate acestea, utilizarea terapeutică a NIC a fost limitată din cauza efectelor secundare cardiovasculare (21), dependenței create (22), precum și a publicității negative asociate fumatului (23).

Având în vedere efectele sale pozitive asupra sistemului nervos central (SNC), NIC reprezintă o bază puternică pentru dezvoltarea de noi agenți terapeutici ai AD sub forma derivaților nicotinici care nu provoacă efectele secundare ale NIC.

La mamifere, aproximativ 80-85% din NIC este metabolizată în cotinină (COT) de către enzimele hepatice, cum ar fi citocromul P450 2A6 (CYP2A6) (24). Comparativ cu NIC, COT este mai puțin eficientă în traversarea barierei hematoencefalice (BBB), însă prezintă un profil de siguranță bun, nu creează dependență, nu determină efecte cardiovasculare sau comportamentale la om, are un timp de înjumătățire mai lung (19-20 vs. 2 ore) și toxicitate mult mai mică (24,25).

6-Hidroxi-L-nicotina (6HLN) este primul intermediar metabolic identificat în calea de degradare a NIC codificată de megaplasmidul pAO1 din bacteria Gram pozitivă, *Paenarthrobacter nicotinovorans* (26,27). Degradarea NIC începe cu hidroxilarea inelului piridinic al NIC de către enzima nicotin-dehidrogenaza (NDH), rezultând 6HLN. În timpul consumului de NIC, 6HLN se acumulează în mediu pentru o scurtă perioadă (28), după care inelul piridinic este oxidat în continuare de 6-hidroxi-L-nicotin oxidaza (6HLNO), rezultând 6-hidroximetilmiosmină (27,29).

Scopul prezentei lucrări de doctorat a fost acela de a evalua impactul NIC, COT și 6HLN asupra aspectelor cognitive, biochimice și moleculare utilizând două modele animale diferite ale AD: modelul de șobolan al AD indus prin infuzia cerebrală a peptidului A β ₂₅₋₃₅ și modelul de pește zebură al AD indus prin imersie în scopolamină (SCOP). Astfel, obiectivul general al lucrării a fost îndeplinit prin realizarea principalelor obiective specifice:

1. Evaluarea efectelor NIC și a derivaților nicotinici asupra performanțelor cognitive și asupra stărilor de anxietate și depresie ale modelului amiloidic de demență;
2. Evaluarea potențialului de legare al NIC și al derivaților nicotinici de subtipul $\alpha 7$ și $\alpha 4\beta 2$ al receptorilor nAChRs;
3. Evaluarea potențialului antiacetilcolinesterazic al NIC și al derivaților nicotinici în creierul modelului amiloidic al AD;
4. Evaluarea efectelor NIC și a derivaților nicotinici asupra statusului oxidativ în creierul modelului amiloidic de demență;
5. Evaluarea expresiei genice a unor markeri moleculari în creierul modelului amiloidic de demență tratat cu NIC și derivați nicotinici;
6. Evaluarea potențialului pro-cognitiv al NIC și a derivaților nicotinici la modelul de pește zebură al AD indus de SCOP;
7. Evaluarea potențialului antiacetilcolinesterazic al NIC și al derivaților nicotinici în creierul modelului de pește zebură al AD indus de SCOP;
8. Evaluarea potențialului antioxidant al NIC și al derivaților nicotinici în creierul modelului de pește zebură al AD indus de SCOP;
9. Evaluarea efectelor NIC și a derivaților nicotinici asupra expresiei genice a unor markeri moleculari în creierul peștilor zebură tratați cu SCOP.

CAPITOL 1. BOALA ALZHEIMER

Demența este un sindrom, de obicei de natură cronică sau progresivă, caracterizat prin deteriorarea mai multor funcții corticale superioare, inclusiv memoria, gândirea, orientarea, înțelegerea, calculul, capacitatea de învățare, limbajul și judecata. Conștiința nu este afectată. Deteriorarea funcției cognitive este acompaniată, și ocazional precedată, de afectarea controlului emoțional, a comportamentului social sau a motivației (30).

AD este o boală degenerativă a creierului, care a fost descrisă pentru prima dată în 1906, dar abia după 70 de ani a fost recunoscută ca fiind cea mai comună formă de demență și o cauză majoră de deces. Doar atunci, AD a devenit o direcție importantă de cercetare. Cercetarea care a urmat a dezvăluit multe lucruri, inclusiv faptul că AD debutează cu câțiva ani înaintea apariției simptomelor tipice demenței Alzheimer. În AD, neuronii din zone specifice ale creierului sunt deteriorați și distruși, inclusiv acei neuroni care permit unei persoane să efectueze funcții de bază precum mersul pe jos și înghițirea. Numeroase studii experimentale sunt în desfășurare cu privire la modificările biologice precise din AD care duc la apariția simptomelor acestui tip de demență, de ce boala și simptomele ei progresează mai repede la unele persoane comparativ cu altele și modul în care boala poate fi prevenită, încetinită sau oprită. Persoanele aflate în stadiile finale ale bolii sunt imobilizate la pat și necesită îngrijire permanentă. În cele din urmă, AD este fatală (2).

1.1. Etiopatologie

1.1.1. Ipoteza colinergică

Ipoteza colinergică a fost prima teorie propusă pentru a explica AD și de atunci, a dus la dezvoltarea singurelor medicamente aprobate în prezent pentru tratamentul AD, în forma ușoară până la cea moderată. Această teorie s-a bazat pe faptul că în creierul pacienților cu AD se observă frecvent o pierdere a activității colinergice, iar studiile efectuate pe oameni și primat au sugerat un rol al acetilcolinei (ACh) în învățare și memorie (31).

Investigația biochimică sistematică a creierului afectat de AD a arătat o scădere a activității colin acetiltransferazei (ChAT) și acetilcolinesterazei (AChE) în cortexul cerebral și în toate celelalte zone, sub valorile normale în comparație cu creierul normal (9,32). În 1976, Bowen et al. (33) au raportat o activitate redusă a enzimei ChAT în cortexul cerebral. Studiile in vitro au demonstrat că A β inhibă neurotransmisia colinergică (34,35). Alte studii au arătat că reducerea numărului de nAChRs și mAChRs ai ACh localizați în terminațiile colinergice presinaptice scade funcția cognitivă (36).

1.1.2. Ipoteza proteinei tau

Din punct de vedere neuropatologic, AD este definită prin prezența leziunilor intraneuronale provocate de NFTs (37). Proteinele tau se găsesc în special în neuroni și

aparțin familiei de proteine asociate microtubulilor (38). Proteinele tau joacă un rol important în asamblarea microtubulilor și stabilizarea rețelei de microtubuli din neuron. Cea mai importantă caracteristică a proteinei tau este reprezentată de prezența unui domeniu de legare a microtubulilor (MBD) care este înalt conservat și localizat la capătul C-terminal. Acest domeniu este format din 18 aminoacizi dispuși într-o succesiune de 3 sau 4 repetiții. Domeniul este implicat în polimerizarea și stabilizarea microtubului (9). Capătul N-terminal al proteinei tau constă în aminoacizi cu caracter puternic acid urmată de o regiune cu caracter bazic, bogată în prolină denumită și domeniu de proiecție. Domeniul de proiecție poate interacționa cu elemente de citoschelet și cu membrana plasmatică (39).

Capacitatea de legare a proteinei tau la microtubuli poate fi reglată eficient după traducere prin modularea fosforilării serinei sau a treoninei. Domeniul de legare la microtubuli al proteinei tau constă din patru secvențe repetitive (R1-R4) de serină (S) și treonină (T) urmate de prolină (P). Acești aminoacizi sunt hiperfosforilați de kinaza glicogen sintazei 3 β (GSK3 β), kinaza dependentă de ciclină 5 (CDK5) și de activatorul acesteia subunitatea p25 sau protein kinaza mitogen activată (MAPK). În mod similar, protein kinazele care nu sunt direcționate asupra prolinei, cum ar fi protein kinaza B (Akt), Fyn, protein kinaza A (PKA), protein kinaza Ca²⁺-calmodulină 2 (CaMKII) și kinazele de reglare a afinității microtubulilor (MARK) sunt de asemenea implicate în hiperfosforilarea proteinei tau. Hiperfosforilarea proteinei tau reduce afinitatea acesteia față de microtubuli (40).

În condiții patologice a fost observată o creștere anormală a nivelului de proteine tau hiperfosforilate în citosol (41). Proteinele tau hiperfosforilate polimerizează în filamente elicoidale și filamente drepte denumite ghemuri neurofibrilare. Pierderea funcției normale a proteinei tau duce la o perturbare patologică a funcțiilor structurale și de reglare ale citoscheletului. Acest lucru afectează funcțiile normale celulare ale neuronilor, cum ar fi menținerea morfologiei adecvate, transportul axonal, disfuncția sinaptică și neurodegenerarea (42).

1.1.3. Ipoteza cascadei amiloidice

Ipoteza cascadei amiloidice postulează că neurodegenerarea din AD este cauzată de acumularea anormală a plăcilor de A β în diferite zone ale creierului. Conform acestei ipoteze, acumularea plăcilor de A β acționează ca un declanșator patologic al unei cascade care include leziuni neuritice, formarea de NFTs care duce la disfuncții neuronale și moarte celulară în AD (9,43). Dovezile genetice, biochimice și patologice susțin ipoteza cascadei amiloidice care postulează că agregarea plăcilor de A β este cauza primară a AD.

Peptidele A β sunt componentele principale de natură proteică care intră în alcătuirea plăcilor de A β . Aceste peptide sunt fragmente alcătuite din 39-43 de aminoacizi care derivă proteolitic din acțiunea enzimatică secvențială a β -secretazei (BACE1) și γ -secretazei asupra proteinei precursora a amiloidului (APP) care este

distribuită frecvent transmembranar (9). Lungimea peptidului A β variază la capătul C-terminal conform modului de clivare al APP. Izoforma A β_{1-40} este cea mai răspândită, urmată de A β_{1-42} care are o natură hidrofobă și agregă cu o viteză mai mare decât A β_{1-40} (44,45). În plăci, peptidele A β aflate în conformație β -pliată se assemblează și polimerizează în structuri distincte, inclusiv fibrile, protofibrile și oligomeri polimorfici. Depozitarea A β și formarea plăcilor difuze duc la activarea locală a microgliilor și astrocitelor, eliberarea de citokine și un răspuns inflamator. De asemenea, modificările biochimice și structurale multiple în axonii, dendritele și corpurile celulare neuronale sunt caracterizate prin pierderea sinapselor și a neuronilor și atrofie cerebrală în AD (9).

1.2. Neuropatologie

1.2.1. Ghemurile neurofibrilare

În articolul de pionierat a lui Alois Alzheimer (1907), care a descris un singur caz al bolii care în cele din urmă va purta numele său, a remarcat prezența incluziunilor fibroase anormale în citoplasma pericarială a neuronilor piramidali. Aceste incluziuni au fost numite ghemurile neurofibrilare (NFTs) ale lui Alzheimer și până în prezent sunt considerate leziuni cardinale microscopice asociate bolii și reprezintă o cerință pentru efectuarea diagnosticului patologic. NFTs sunt foarte greu de observat cu coloranți morfologici tradiționali utilizați de patologi, cum ar fi hematoxilina și eozina. În general, una dintre cele mai variate tehnici de colorare prin impregnare cu argint, cum ar fi tehnica modificată Bielschowski sau Gallyas, sau colorantul pe baza fluorocromului tioflavină S este utilizată în mod frecvent pentru a vizualiza NFTs. În plus, există un număr de abordări imunohistochimice utilizate pentru a vizualiza NFTs. Aceste abordări utilizează în cea mai mare parte anticorpi direcționați împotriva proteinei tau care este fosforilată anormal (45,47).

Natura NFTs a fost studiată extensiv în ultimele decenii, și s-au descoperit multe informații despre componentele sale structurale. Din punct de vedere ultrastructural, NFTs sunt compuse din fibrile anormale cu diametrul de 10 nm care apar în perechi și sunt înfășurate în mod elicoidal cu o periodicitate de 80 nm (45). Pe baza acestor observații, astfel de structuri sunt denumite, în general, perechi de filamente elicoidale. Componenta principală a NFTs este proteina tau asociată microtubulilor. Proteina tau din NFTs este fosforilată anormal cu grupări fosfat atașate la situsuri foarte specifice pe moleculă (48). Există o serie de alți constituenți de natură proteică asociați cu NFTs, cum ar fi ubiquitina, colinesteraze, și A β , însă proteina tau este considerată a fi constituențul esențial din majoritatea structurilor NFTs (45).

1.2.2. Plăcile senile

Cealaltă leziune patologică cardinală întâlnită la pacienții care suferă de AD este reprezentată de placa senilă sau neuritică. Plăcile senile sunt acumulări extracelulare, compuse în principal din peptida A β pliată anormal cu 40 sau 42 de aminoacizi (A β_{1-40} și A β_{1-42}), doi subprodusi ai metabolismului APP. Configurația β -

pliată predominantă a acestei peptide îi conferă capacitatea de a se lega de colorantul roșu de Congo și să producă birefringență în lumină polarizată (45).

Creierile persoanelor în vârstă sau care suferă de AD pot conține, de asemenea, mai multe forme de plăci cu A β și uneori, nomenclatura utilizată pentru aceste leziuni în literatură poate fi confuză. Placa senilă sau neuritică are un nucleu central din A β dispus radial și înconjurat de o coroană de neurite formate anormal (sau procese neuronale, fie dendrite sau axoni). Aceste neurite anormale și distrofice sunt colorate puternic cu aceiași coloranți (impregnare cu argint) utilizați pentru identificarea NFTs și, din punct de vedere ultrastructural, aceste structuri conțin corpuri dense, profiluri membranoase și pachete de filamente elicoidale împerecheate. La periferia plăcii neuritice, se întâlnesc frecvent de la una până la mai multe celule microgliale și, mai puțin frecvent, astrocite reactive. Indiferent dacă aceste celule microgliale sunt implicate activ într-o cascadă patogenică neuroinflamatoare sau reacționează la prezența constituenților acestor leziuni, aceasta rămâne o problemă intens dezbătută (45).

Peptida A β este derivată din APP, o glicoproteină transmembranară foarte conservată (49). Porțiunea A β a APP este formată prin acțiunea a două secretaze, care scindează peptida de 4 kDa la capetele terminale amino și carboxil, și este apoi eliberată și acumulată în țesuturile cerebrale (8). Scindarea capătului carboxil este neregulată, obținându-se forme mai lungi (având un total de 42 sau 43 de aminoacizi) și tendința de a se depune în plăcile senile, și o formă mai scurtă (care conține 40 de aminoacizi) care tinde să se acumuleze în leptomeninge, cortexul cerebral și în vasele de sânge cerebrale (angiopatie congofilică). S-a demonstrat că nucleeele plăcilor senile conțin multe alte proteine, cum ar fi glicoproteine cu heparan sulfat, apolipoproteina E (APOE), proteinele complementului și α -1-antichimotripsină (45).

1.2.3. Degenerarea sinaptică

AD poate fi în primul rând o tulburare de insuficiență sinaptică (50). Sinapsele din hipocamp încep să scadă la pacienții cu deficit cognitiv minor (MCI), la care profilul sinaptic rămas, prezintă creșteri compensatorii în mărime (51). În cazurile moderate de AD, există o reducere de aproximativ 25% a veziculelor presinaptice cu proteina sinaptofizină (52). Odată cu avansarea bolii, sinapsele se pierd disproporțional în raport cu neuronii, și această pierdere este bine corelată cu demența (53). Îmbătrânirea, în sine, provoacă pierderi sinaptice (54), care afectează în special regiunea dentată a hipocampusului (55). Transmisia bazală a impulsurilor unice și potențarea de lungă durată (LTP), un indicator experimental al formării memoriei la nivel sinaptic, sunt deteriorate la modelele de șoareci ai AD care prezintă plăci și după ce A β a fost aplicată pe secțiuni de creier (56). În urma acestei deteriorări, moleculele de semnalizare importante pentru memorie sunt inhibitate. Întreruperile eliberării neurotransmițătorilor presinaptici și a curenților ionici ai receptorilor de glutamat (57) apar parțial ca urmare a endocitozei receptorilor N-metil-D-aspartat (NMDAr) (58) și receptorilor acidului α -amino-3-(5-metil-3-oxo-1,2-oxazol-4-il) propanoic (AMPAr) (59) de suprafață. Aceasta din urmă,

slăbește în continuare activitatea sinaptică prin inducerea unei scăderi de durată a curenților după un antrenament cu stimuli de înaltă frecvență. O schimbare similară a echilibrului dintre potențare și depresie în sinapse apare odată cu îmbătrânirea normală. A β intraneuronal poate declanșa aceste deficite sinaptice chiar mai devreme (60).

1.2.4. Epuizarea neurotrofinelor și neurotransmițătorilor

Neurotrofinele promovează proliferarea, diferențierea și supraviețuirea neuronilor și a celulelor gliale și mediază învățarea, memoria și comportamentul. Nivelurile ridicate de receptori pentru neurotrofine din neuronii colinergici din creierul bazal sunt reduse drastic într-un stadiu avansat al AD. Injectarea NGF poate salva neuronii bazali la modelele animale (61), și un studiu aflat în prima fază a tratamentului cu gena NGF în AD a arătat o îmbunătățire a cogniției și a metabolismului cerebral (62). În AD și MCI, nivelurile BDNF, un membru al familiei neurotrofinelor, sunt reduse (63), această descoperire fiind repetată experimental cu oligomeri de A β ₁₋₄₂ (64). Tratamentul cu BDNF la rozătoare și primare non-umane susține supraviețuirea neuronală, funcția sinaptică și memoria (65), sugerându-se astfel că înlocuirea BDNF ar putea reprezenta o altă opțiune pentru tratamentul AD (66).

Deficitul de proiecții colinergice din AD a fost asociat cu acumularea de A β și proteină tau. Receptorii nAChRs presinaptici care aparțin subtipului $\alpha 7$ sunt esențiali pentru procesarea cognitivă, și nivelurile acestora cresc în AD timpuriu (67) și scad mai târziu (68). Studiile experimentale au arătat că A β se leagă de receptorii $\alpha 7$ nAChRs, afectând eliberarea ACh și menținerea LTP (69). Nivelul receptorilor mAChRs sau cuplarea receptorilor sunt reduse în creierul pacienților cu AD. Stimularea farmacologică a receptorilor mAChRs postsinaptici de tip 1 (M1) activează protein kinaza C (PKC), favorizând procesarea APP pe calea non-amiloidogenică (70). Mai mult decât atât, activarea nAChRs sau M1 limitează fosforilarea proteinei tau (71,72). Deși inhibitorii de colinesterază îmbunătățesc neurotransmisia și oferă o ușoară ameliorare paliativă în AD, aceștia își pierd eficiența în timp. Utilizarea agonștilor și a modulatorilor receptorilor $\alpha 7$ nAChRs este în curs de investigare. Studiile clinice cu agonști selectivi pentru M1 au arătat îmbunătățiri ale cogniției (73) și niveluri scăzute de A β în lichidul cefalorahidian (LCR) (74), dar acești agenți sunt toxici.

1.3. Aspecte neuropsihiatrice

1.3.1. Depresia

Depresia se găsește în 16% din studiile AD bazate pe populație și la 44,3% în studiile realizate în spitale (75). Depresia este un predictor al progresiei de la cogniție normală la MCI și de la MCI la demență. Cu toate acestea, nu este clar dacă simptomele depresive reprezintă un factor de risc sau manifestarea timpurie a AD sau ambele. S-a demonstrat că prezența MCI în depresie prezice dezvoltarea ulterioară a AD (76). S-a observat o neuropatologie mai severă la pacienții cu AD și depresie, comparativ cu

martorii sănătoși. De asemenea, acești pacienți au prezentat pierderi severe de receptori pentru serotonină care pot avea implicații pentru tratament (77).

1.3.2. Anxietatea

Anxietatea este o complicație semnificativă a demenței, dar nu a primit prea multă atenție față de alte caracteristici psihiatrice, cum ar fi depresia și simptomele psihotice (78,79). Anxietatea poate fi asociată în special cu AD (80,81). Există niveluri mai mari de anxietate în AD decât la persoanele cu deficiențe non-cognitive (82). Anxietatea din AD este asociată cu depresie, melancolie, iritabilitate, agresivitate evidentă și manie (83).

1.4. *Factori de risc*

1.4.1. Factori de risc genetici

AD este de obicei clasificată în funcție de vârsta de debut. Majoritatea (>95%) pacienților care dezvoltă această boală au o vârstă de peste 65 de ani (așa numitul AD cu debut tardiv, LOAD), iar între 1 și 5% din cazurile de AD prezintă un debut prematur, de obicei în jurul vârstei de 50 de ani (așa numitul AD cu debut timpuriu, EOAD). LOAD și EOAD nu pot fi deosebite din punct de vedere clinic. Cu toate acestea, EOAD este în general mai severă decât LOAD și este asociată cu o rată de progresie mai rapidă. Mai mult decât atât, cele două forme de AD sunt asociate cu tipare diferite de epidemiologie genetică (84).

1.4.1.1. *Boala Alzheimer cu debut timpuriu (EOAD)*

Trei gene au fost ferm implicate în patofiziologia EOAD, și anume gena *APP* și genele presenilinelor (*PSEN1* și *PSEN2*), care codifică proteine implicate în clivarea APP și generarea de A β . Mutațiile legate de AD pentru aceste trei gene pot fi considerate biomarkeri de diagnostic ai acestei boli: aceste mutații prezintă o penetranță ridicată (>85%), majoritatea prezentând moștenire autozomală dominantă și duc cu siguranță la agregarea A β și la un debut timpuriu al bolii (84).

Mutațiile din gena *APP* reprezintă mai puțin de 0,1% din cazurile de AD. Cele mai moștenite mutații dominante cu sens greșit din *APP* afectează procesarea proteinei codificate, întrucât mutațiile sunt poziționate în apropierea sau în exonii care codifică A β (exonii 16 și 17 ai *APP*) (84). În plus față de aceste mutații dominante, spectrul de mutații al *APP* se extinde la două mutații recesive (care doar provoacă boala în stare de homozigot), precum și duplicări ale locusului *APP*, subliniind importanța dozării genei *APP* în AD (84).

În prezent, în *PSEN1* au fost identificate 182 de mutații diferite asociate AD din 401 de familii, în timp ce doar 14 mutații asociate AD din 23 de familii au fost detectate în *PSEN2* (84). Majoritatea mutațiilor legate de AD din *PSEN1* și *PSEN2* sunt substituții ale unei singure nucleotide, dar au fost descrise și mici inserții și deleții. Presenilinele sunt implicate funcțional în clivajul proteolitic al APP mediat de γ -

secretază (85). Mutațiile din *PSEN1* și *PSEN2* afectează acest clivaj și determină o creștere a raportului $A\beta_{1-42}/A\beta_{1-40}$. Această creștere poate apărea fie printr-o creștere a nivelurilor de $A\beta_{1-42}$ așa cum este demonstrat în plasmă sau în mediul cu fibroblaști de la purtătorii mutației *PSEN* (86), sau o scădere a nivelurilor de $A\beta_{1-40}$, ceea ce sugerează un mecanism de pierdere a funcției și nu unul de câștig de funcție.

Pe scurt, toate cele trei gene cauzale a AD contribuie la susținerea unei căi patologice comune a AD, cu un rol crucial pentru $A\beta$. Conform acestei ipoteze amiloidice, procesele neurodegenerative din AD sunt consecința unui dezechilibru între producția și eliminarea $A\beta$, ceea ce sugerează că alte gene implicate în aceste căi pot fi, de asemenea, factori de risc pentru această boală (84).

1.4.1.2. Boala Alzheimer cu debut tardiv (LOAD)

Genele implicate în LOAD cresc riscul de apariție a bolii și nu sunt moștenite pe cale mendeliană. Rudele de gradul I ale pacienților cu LOAD prezintă un risc dublu de apariție al acestei boli pe durata vieții decât persoanele care nu au rude de gradul I afectate de AD (87). În plus, AD apare mai frecvent în gemenii monoziagoți decât în cei dizigoți (88), ceea ce sugerează o contribuție genetică substanțială la această tulburare. În cel mai mare studiu despre demență realizat pe gemeni, care a implicat 11884 participanți din Suedia cu vârste de peste 65 de ani, au fost identificate 395 de perechi de gemeni în care fie unul sau ambii gemeni aveau AD (88). Acest studiu a demonstrat o ereditate de 58-79% pentru LOAD, în funcție de modelul care a fost utilizat în analiza datelor.

În 1993, două grupuri independente de cercetători au raportat o asocierie între alela $\epsilon 4$ a apolipoproteinei E (*APOE*) și AD (89,90). *APOE- $\epsilon 4$* are cel mai puternic impact asupra riscului de a dezvolta LOAD. Gena *APOE* este situată pe cromozomul 19, este formată din 4 exoni și codifică APOE (299 de aminoacizi) care acționează ca un transportor de colesterol în sânge și creier (2,91). Fiecare persoană moștenește de la fiecare părinte una dintre cele trei izoforme ale genei (*APOE- $\epsilon 2$* , $\epsilon 3$ sau $\epsilon 4$). Forma $\epsilon 3$ este cea mai comună urmată de $\epsilon 4$ și $\epsilon 2$, ultima fiind rar întâlnită. Purtătorii alelei $\epsilon 4$ prezintă un risc mai mare de a dezvolta AD comparativ cu cei care au alela $\epsilon 3$, în timp ce purtătorii alelei $\epsilon 2$ ar putea reduce riscul de apariție al bolii (2). Homozigoții cu alela $\epsilon 4$ a genei *APOE* dezvoltă AD la o vârstă mai mică față de heterozigoți. Genotiparea *APOE* nu este specifică și sensibilă, însă poate avea un rol adjuvant în realizarea unui diagnostic al AD în cazul persoanelor care prezintă simptome clinice (92). Spre deosebire de moștenirea unei mutații genetice care provoacă AD, moștenirea genei *APOE- $\epsilon 4$* nu garantează faptul că o persoană va dezvolta această boală (2,92). Mecanismele care guvernează toxicitatea APOE în țesutul cerebral nu sunt pe deplin elucidate. Unele mecanisme propuse includ: toxicitatea specifică izoformei, agregarea $A\beta$ mediată de *APOE- $\epsilon 4$* și hiperfosforilarea proteinei tau mediată de *APOE- $\epsilon 4$* (91).

1.4.2. Factori de risc non-genetici

1.4.2.1. Vârsta

Vârsta este unul din cei mai importanți factori de risc, întrucât marea majoritate a persoanelor cu AD au peste 65 de ani. Procentul persoanelor cu demență Alzheimer crește dramatic odată cu vârsta: 3% din persoanele cu vârsta cuprinsă între 65 și 74 de ani, 17% din persoanele cu vârsta cuprinsă între 75 și 84 de ani și 32% din persoanele cu vârsta de peste 85 de ani prezintă demență Alzheimer (93). Este important de remarcat faptul că AD nu este o parte normală a procesului de îmbătrânire (94), iar vârsta înaintată nu este suficientă pentru a provoca demența Alzheimer (2).

1.4.2.2. Istoricul familial

Un istoric familial al AD nu este necesar pentru ca un individ să dezvolte boala. Cu toate acestea, persoanele care au un părinte, frate sau soră cu AD sunt mai susceptibili de a dezvolta boala față de cei care nu au nici o rudă de gradul întâi cu AD (95). Cei care au mai mult de o rudă de gradul întâi cu AD prezintă un risc și mai mare (2). Un studiu amplu, bazat pe populație, a constatat că a avea un părinte cu demență crește riscul independent de factorii de risc genetici cunoscuți, cum ar fi *APOE-ε4* (96).

1.4.2.3. Diabetul de tip 2

În studiile observaționale, s-a constatat că diabetul de tip 2 (T2D) aproape dublează riscul de AD. Mecanismele care asociază T2D și LOAD nu sunt cunoscute, dar ar putea include mecanisme cerebrovasculare și non-cerebrovasculare (97). Diabetul de tip 2 este un factor de risc pentru accidentul vascular cerebral și este însoțit de alți factori de risc vasculari, inclusiv hipertensiune și dislipidemie. Observațiile din studiile de patologie conform cărora T2D este asociat cu infarcte, dar nu patologia AD la persoanele cu LOAD, sugerează că prezența infarctelor poate reprezenta mecanismul principal care leagă T2D de LOAD (84).

1.5. Tratament

Niciunul dintre tratamentele farmacologice (medicamente) disponibile astăzi pentru AD nu poate încetini sau opri deteriorarea și distrugerea neuronilor care cauzează simptomele AD și care face ca această boală să fie letală. Agenția Americană pentru Alimente și Medicamente (US FDA) a aprobat cinci agenți terapeutici pentru tratamentul AD printre care se enumără galantamina, donepezilul și tacrina (în prezent tratamentul este întrerupt în SUA). Aceste medicamente îmbunătățesc temporar simptomele prin creșterea cantității de neurotransmițători din creier, dar nu modifică evoluția bolii. Eficacitatea acestor medicamente variază de la o persoană la alta și are o durată limitată (98,99).

1.5.1. Inhibitori ai colinesterazei

Inhibitorii colinesterazei sporesc funcția colinergică în AD la nivelul neuronului colinergic postsinaptic. Această clasă farmaceutică reduce degradarea ACh indusă de acetilcolinesterază (AChE) în spațiul sinaptic, crește timpul de persistență a ACh în spațiul intrasinaptic și facilitează interacțiunea dintre ACh și receptori colinergici postsinaptici. Inhibitorii de colinesterază sunt utilizați în primul rând ca tratament simptomatic pe termen lung pentru AD. Dovezile obținute în urma studiilor științifice fundamentale, studiilor clinice (100) și de imagistică (101) au sugerat că inhibitorii de colinesterază ar putea reduce prelucrarea APP și să asigure un anumit grad de neuroprotecție (102,103).

1.5.1.1. Tacrina (tetrahydroaminoacridin)

Tacrina (9-amino-1,2,3,4-tetrahydroacridin, THA) a fost descrisă în 1961 ca un inhibitor reversibil al AChE și butirilcolinesterazei (BuChE). Acesta a fost primul medicament aprobat de Agenția Americană pentru Alimente și Medicamente (în 1993) ca tratament pentru forma ușoară și moderată a AD. Cu toate acestea, efectele secundare grave, cum ar fi hepatotoxicitatea, au dus la retragerea sa de pe piață (98,99). THA inhibă AChE și determină o creștere a nivelului de ACh prin prevenirea hidrolizei după eliberarea acesteia în sinapse. THA îmbunătățește funcțiile cognitive și deficitelor comportamentale la pacienții cu AD la o doză de 80 până la 160 mg/zi. Similar cu fizostigmina, THA este un puternic inhibitor al AChE și BuChE cu o concentrație inhibitorie maximă 50% (IC_{50}) de 10^{-7} M, dar provoacă hepatotoxicitate. În plus, timpul de înjumătățire scurt (3-5 ore) al acestui medicament necesită administrarea unei doze zilnice de 4 ori mai mare care poate fi intolerantă pentru unii pacienți (104). Totuși, un număr mare de pacienți (aproximativ 50% dintre pacienții tratați cu THA) au fost retrași din studiile clinice, din cauza creșterilor nivelurilor de transaminaze asociate cu administrarea de THA (98,105).

1.5.1.2. Donepezil

Donepezilul (DNP) este un medicament anticolinesterazic reversibil, selectiv aprobat de US FDA. Este un medicament mai eficient decât THA, cu o selectivitate de 1000 de ori mai mare pentru AChE decât pentru BuChE (98,106). Se atașează în mod reversibil, inactivează colinesterazele, previne hidroliza ACh și crește concentrația acestui neurotransmițător în sinapsele colinergice. Rata de eliminare este scăzută, iar timpul de înjumătățire plasmatic este ridicat (70 ore). Acest medicament necesită o administrare zilnică și s-a dovedit a fi mai bun decât THA și fizostigmina (98,104). DNP este un medicament bine tolerat, însă există câteva efecte secundare minore, cum ar fi greață, vărsături, constipație, diaree, amețeli și insomnii (98).

1.5.1.3. *Galantamina*

Galantamina (GAL) este un alcaloid terțiar izolat din *Galanthus nivalis* L. (Amaryllidaceae). Acest compus prezintă un mecanism dual unic asupra sistemului colinergic deoarece acționează ca un inhibitor competitiv, selectiv și reversibil al AChE și este un modulator pozitiv alosteric (PAM) al receptorilor nAChRs, îmbunătățind funcția colinergică și memoria la pacienții cu AD (98,99). GAL prezintă efecte mai slabe dar mai puțin toxice decât THA și fizostigmina (99). Studiile clinice randomizate multicentrice au arătat că acest medicament este bine tolerat și îmbunătățește semnificativ funcția cognitivă la pacienții cu AD (98,107). Este bine absorbită atunci când este administrată pe cale orală și prezintă o selectivitate de 50 de ori mai mare pentru AChE față de BuChE (98). Funcția cognitivă a fost îmbunătățită la pacienții cu AD cărora li s-au administrat pe cale orală 5 mg de GAL, de 3 ori pe zi timp de 2-3 luni.

1.6. *Factori cognitivi, antioxidanți și inflamatori în boala Alzheimer*

1.6.1. *Neuropeptidul Y*

Neuropeptidul Y (NPY), o peptidă de 36 de aminoacizi cu mai multe resturi de tirozină izolată pentru prima dată de Tatemoto *et al.* (1982) din creierul de porc, este exprimată în întregul corp, inclusiv în creier. NPY a fost implicat în reglarea funcțiilor biologice și patofiziologice importante, cum ar fi tensiunea arterială, secrețiile neuroendocrine, comportamentul de hrănire, excitabilitatea neuronală, neuroplasticitatea și memorie (109). Dovezile indică o pierdere a NPY în hipocampusul și cortexul cerebral al pacienților cu AD (110,111), care rezultă probabil dintr-o neurodegenerare răspândită care apare în aceste regiuni cerebrale, odată cu evoluția bolii. Reducerile nivelurilor de NPY în plasmă, LCR și creierul pacienților cu AD au stârnit interesul pentru relația acestui neuropeptid cu AD (112,113). Curând după aceea, a fost descrisă o corelație negativă între nivelurile NPY din LCR și durata bolii (114). În paralel, s-a constatat că neuronii corticali care exprimă NPY sunt grav deteriorați în timpul AD (110).

1.6.2. *Factorul neurotrofic derivat din creier*

Factorul neurotrofic derivat din creier (BDNF) este un membru important din familia neurotrofinelor de factori de creștere, împreună cu NGF și neurotrofinele 3, 4/5 și 6. Acesta reglează supraviețuirea, diferențierea și plasticitatea neuronală prin activarea receptorului tirozin kinazei B (TrkB) și a receptorului cu afinitate mică pentru neurotrofine p75NTr (115). Semnalizarea redusă a BDNF prin TrkB duce la deteriorarea memoriei spațiale (115,116), în timp ce supra-expresia TrkB îmbunătățește memoria (117). S-a constatat că nivelurile de ARNm și proteină BDNF sunt reduse în probele de creier prelevate post-mortem de la pacienții cu AD (115,118). În studiul elaborat de Peng *et al.* (2005), s-a arătat că nivelurile reduse de BDNF au fost raportate deja în stadiul de MCI al bolii și că sunt corelate cu funcția cognitivă. De asemenea, pe lângă nivelurile scăzute de ligand, în unele rapoarte s-au constatat niveluri scăzute de ARNm

și proteină TrkB în creierile afectate de AD, dar neschimbate în altele (120). În schimb, s-a constatat că nivelurile receptorului trunchiat TrkB.T1 sunt crescute (120).

1.6.3. Proteina timpurie de răspuns la creștere 1

Proteina timpurie de răspuns la creștere 1 (EGR1) mediază efectele experiențelor timpurii ale vieții asupra vulnerabilității sau rezistenței AD. EGR1 este un factor de transcriere care este implicat puternic în procesele care stau la baza activității neuronale, de la neurotransmisie și plasticitate sinaptică la procese de ordin superior, cum ar fi învățarea și memoria, și la răspunsul la stres emoțional și recompensă (121). Expresia EGR1 este indusă în neuroni de plasticitatea sinaptică dependentă de activitatea de învățare. Expresia EGR1 prezintă un interes deosebit în modelarea rezervei cerebrale în AD, deoarece este supra-exprimit în timpul stadiilor non-simptomatice ale AD, dar nu și în cele simptomatice (122,123), și are o expresie scăzută în șoarecii bătrâni cu deficite cognitive (124,125). Efectele EGR1 pot contracara toxicitatea sinaptică mediată de Aβ. La pacienții cu patologie AD, dar care nu prezintă declin cognitiv, EGR1 poate fi supra-exprimit pentru a crește plasticitatea sinaptică ca o tentativă de a compensa neuropatologia indusă de Aβ. După ce a fost atins un anumit prag, EGR1 nu mai este capabil să compenseze suficient, având în vedere consecințele sinaptotoxice ale Aβ. Prin urmare, se presupune că deteriorarea cognitivă asociată stadiului simptomatic al AD începe (121).

1.6.4. Proteina asociată citoscheletului reglat prin activitate

Mai multe potențiale gene țintă ale EGR1 au fost implicate în vulnerabilitatea AD, printre care se enumeră și gena de răspuns imediat *ARC* (*ARG3.1*) care codifică proteina asociată citoscheletului reglat prin activitate (ARC) și care este activată de expresia EGR1 (126). ARC este esențială pentru consolidarea memoriei (127) și este exprimată abundent în dendrite, densitatea postsinaptică (128) și nucleu (129). ARC este o proteină post-sinaptică specifică neuronului, care este exprimată selectiv în neuronii pozitivi pentru CaMKII (130). O serie de descoperiri sugerează că Arc poate contribui la deficitele cognitive și la modificările plasticității sinaptice dependente de Aβ prezente în AD. De fapt, s-a demonstrat că formele oligomerice ale Aβ induc expresia Arc (131). Legarea sinaptică a Aβ a fost capabilă să inducă o expresie continuă a Arc în câteva minute, ducând la difuzia ectopică a proteinei de-a lungul dendritei (131). Intrigant este faptul că unele modele de șoareci ale AD prezintă o scădere a numărului de celule care exprimă Arc din cortex (132), o expresie redusă a ARNm care codifică Arc în urma unui comportament explorator (132,133) și niveluri scăzute de ARNm al proteinei Arc în regiunile creierului care conțin Aβ (134). Luând în considerare toate aceste date, se sugerează că expresia răspândită a proteinei Arc din cauza expunerii acute la Aβ ar putea fi paralelă cu reducerea semnalizării Arc la animalele transgenice care supra-produc continuu Aβ. Deteriorarea sinaptică în stadiu timpuriu poate fi explicată prin scăderea

dependentă de vârstă a expresiei ARNm al proteinei Arc și, prin urmare, modificarea transportului dendritic la unii șoareci transgenici (125).

1.6.5. Factorul nuclear 2 legat de factorul eritroid 2

Factorul nuclear 2 legat de factorul eritroid 2 (NRF2) este un factor de transcriere care reglează expresia genelor implicate în protecția celulară împotriva deteriorărilor cauzate de agenții oxidanți, electrofili și inflamatori și în menținerea homeostaziei funcției mitocondriale, a statusului redox celular și a proteinelor (135). S-a raportat că expresia nucleară a NRF2 este scăzută în AD și o meta-analiză recentă a seturilor de date cu cipuri ADN (*engl.* microarray) a identificat 31 de gene ale elementelor de răspuns antioxidant (*engl.* antioxidant response elements, ARE) cu expresie redusă la pacienții cu AD (136). În mod similar, la modelele transgenice de șoarece ale AD, s-a demonstrat că pierderea NRF2 crește nivelurile de A β și proteină tau fosforilată (137,138), crește activarea glială, markerii stresului oxidativ și neurodegenerarea și exacerbează declinul cognitiv (137). În schimb, s-a dovedit că activarea NRF2 este benefică în modelele de AD. Un studiu recent a constatat că activarea NRF2 de către sulforafan reduce secreția de amiloid și normalizează eliberarea de citokine de către astrocitele afectate de AD derivate din celule stem pluripotente umane (139).

1.6.6. Interleukina-1 β

Există dovezi clinice și preclinice care arată că citokina inflamatorie interleukina-1 β (IL-1 β) joacă un rol central în inducerea neuroinflamației patologice a AD (140,141). Există o expresie crescută a IL-1 β în microgliile care se grupează în jurul plăcilor amiloidice la modelul de șoarece APPSwe/PS1 Δ E9 (APP/PS1) al AD (141), și șoarecii la care lipsește antagonistul endogen al receptorului IL-1 prezintă o activare microglială crescută și deteriorare neuronală după injecția intracerebroventriculară (i.c.v.) a A β (142). De asemenea, dovezile sugerează că IL-1 β poate afecta în mod direct atât amiloidogeneza cât și tautopia, evenimente importante în patogeneza AD. S-a demonstrat că IL-1 β poate crește expresia de APP și producția de A β în astrocite (143) și poate induce fosforilarea proteinei tau prin calea MAPK-p38 pentru a forma NFTs (144). Mai mult decât atât, utilizând un model animal al AD (șoarece cu gena pentru amid-hidrolaza acidului gras inactivată – 5xFAD/FAAH^{-/-}), Aparicio *et al.* (2018) au demonstrat o creștere a nivelurilor de ARNm a mai multor citokine importante, inclusiv IL-1 β , care a fost asociată cu o scădere semnificativă a APP, a plăcilor neuritice îmbogățite cu amiloid, precum și a nivelurilor de A β ₁₋₄₀ și A β ₁₋₄₂. În cele din urmă, acest mediu inflamator intensificat a fost acompaniat, în mod paradoxal, de o scădere a astrocitozei și microgliozei și de o performanță comportamentală îmbunătățită asociată memoriei (145).

CAPITOL 2. NICOTINA ȘI DERIVAȚII NICOTINICI

2.1. Nicotina

Nicotina (NIC, (*S*)-3-(1-metil-2-pirolidinil)-piridina) este un alcaloid prezent în frunzele plantei de tutun (*Nicotiana tabacum* L.), unde reprezintă până la 2-8% din masa uscată a frunzelor și într-un grad mai scăzut la alte plante din familia *Solanaceae* precum vinete, tomate și cartofi unde acționează ca insecticid natural (146).

2.1.1. Proprietățile chimice și farmacologice ale nicotinei

Din punct de vedere chimic, NIC este un compus heterociclic alcătuit dintr-un inel piridinic și unul pirolidinic (fiecare inel fiind o amină terțiară), are un centru activ (apare ca stereoisomeri *R* și *S*) și este relativ solubilă în apă. Cu toate acestea, se separă preferențial în solvenți organici, putând fi astfel ușor de extras din soluții apoase. Doar 0,1-0,6% din conținutul total de NIC din tutun apare sub forma izomerului (*R*), în mare parte fiind prezent izomerul (*S*). În stare pură, compusul este un lichid de culoare galben-pal sau maro-închis și atunci când este încălzit capătă un miros de pește. Alcaloidul este o bază slabă, cu punctul de topire de -79°C și cel de fierbere de 247°C (147). Valoarea constantei de aciditate (pK_a) a atomului de azot din nucleul piridinic este de 3,04, în timp ce valoarea pK_a a azotului pirolidinic este de 7,84 la 25°C. Cu aceste caracteristici, aproximativ 23% din NIC este neionizată la pH fiziologic și astfel, este capabilă să traverseze rapid membranele biologice (146,148). Absorbția NIC poate avea loc prin cavitatea bucală, piele, plămâni, vezica urinară și tractul gastrointestinal. Un factor cheie care reglează traficul NIC prin membranele biologice este reprezentat de pH-ul mediului (146). În mediu acid, NIC este în stare ionizată și nu traversează rapid membranele. De exemplu, din cauza pH-ului acid al sucului gastric, NIC este absorbită în cantități mici atunci când este înghițită și ajunge în stomac. Fumul de tutun care rezultă din pipe și trabucuri este mai alcalin ($pH \geq 6,5$) și ca rezultat, NIC este în mare parte neionizată, fiind bine absorbită în cavitatea bucală (146,149). Fumul de tutun din țigări este mai acid ($pH = 5,5-6$) și reduce dramatic absorbția NIC din cavitatea bucală (deoarece NIC este ionizată la acest pH) astfel încât, fumătorii trebuie să inhaleze fumul de țigară în plămâni. Principala cale de absorbție a NIC este prin intermediul alveolelor pulmonare. Fluidul alcalin ($pH = 7,4$) de pe suprafața interioară a plămânilor poate tampona fumul acid la un pH neutru pe suprafața mare a alveolelor, permițând NIC să fie absorbită în circulația pulmonară (plămânii pot de asemenea să acționeze ca un depozit pentru NIC) (146,149).

2.1.2. Efectele cognitive ale nicotinei

Sistemul nicotinic colinergic din creier este implicat în mai multe aspecte ale unor boli mintale importante, cum ar fi AD, boala Parkinson (PD), tulburarea hiperactivă cu deficit de atenție (ADHD) și schizofrenie. Atât studiile clinice cât și cele efectuate pe animale susțin rolul receptorilor nAChRs în învățare, memorie și cogniție.

NIC este agonistul prototipic al receptorilor nAChRs, care ar putea îmbunătăți cogniția prin efecte directe asupra atenției și prin interacțiunea cu receptorii nAChRs presinaptici pentru facilitarea eliberării neurotransmițătorilor care sunt implicați în memorie și învățare: ACh, glutamat, dopamină, norepinefrină, serotonină și GABA. Mai multe studii au demonstrat că NIC sporește atenția și îmbunătățește procesul de învățare. De asemenea, s-a demonstrat că NIC și derivații nicotinici prezintă efecte neuroprotective, care sunt probabil mediate de stimularea receptorilor $\alpha 7$ nAChRs. Pentru evaluarea eficacității NIC și a posibilității utilizării acesteia în tratamente pentru îmbunătățirea performanțelor cognitive, acest alcaloid a fost administrat prin plasturi și injecție pacienților cu tulburări cognitive. Această strategie a fost folosită pentru demonstrarea eficacității tratamentului cu NIC în mai multe populații diferite, inclusiv adulți normali nefumători, pacienți cu AD, pacienți schizofrenici, și adulți cu ADHD. De asemenea, modelele animale au fost utilizate pentru a determina eficacitatea tratamentului cu NIC în vederea îmbunătățirii funcțiilor cognitive și pentru a determina mecanismului de acțiune al acestui alcaloid. În cele din urmă, studiile clinice și cele pe animale au furnizat informații pentru dezvoltarea tratamentelor bazate pe NIC pentru disfuncția cognitivă (150).

2.1.3. Efectele nicotinei în neuroinflamație

Studiile preclinice au arătat că administrarea de NIC reduce neuroinflamația în creier (151). Această acțiune poate fi mediată de efectele administrării sistemice de NIC în prevenirea proliferării celulelor T în țesutul periferic și infiltrarea acestora în creier. În plus, NIC modifică producția de TNF- α , IL-1 β , IL-6, MIP-2/CXCL2, MIP 1 α /CCL3 și eotaxină/CCL11 în celulele T helper (celule Th). Toți acești factori pot defavoriza inflamația (151–153). Microgliile sunt macrofagele rezidente ale creierului și servesc la medierea imunității innăscute a sistemului nervos. Studiile au demonstrat că administrarea de NIC scade activarea microgliilor într-un mod semnificativ. Având în vedere că degenerarea neuronilor colinergici odată cu înaintarea în vârstă este însoțită de o activare sporită a microgliilor, acest lucru sugerează un mecanism de neuroprotecție (154). În plus, NIC reduce producerea anumitor citokine inflamatorii (cum ar fi IL-6 și TNF- α) în astrocite, defavorizând astfel neuroinflamația din creier (155).

2.1.4. Efectele nicotinei asupra β -amiloidului

Dovezile acumulate au arătat că atât tratamentul cu NIC pe termen scurt cât și cel pe termen lung reduce semnificativ depunerile de A β și acumulările de plăci în creierul șoarecelui transgenic (156). Această reducere a densității plăcilor de A β include atât depunerile parenchimale cât și cele vasculare. Au fost raportate mai multe mecanisme responsabile de acest fenomen. În special, administrarea de NIC crește cantitatea totală de APP în LCR care probabil defavorizează amiloidogeneza datorită intensificării procesului de eliminare. Cu toate acestea, nu este clar dacă efectele NIC asupra eliminării A β sunt directe (157) sau asociate cu creșterea fluxului LCR. De

asemenea, NIC poate favoriza descompunerea fibrilelor amiloidice, interferând astfel în acumularea plăcilor de A β (20,158). Funcțiile colinergice îmbunătățite de către agonismul NIC față de receptorii nAChRs ar putea, de asemenea, să contribuie la reducerea depunerilor de A β cu implicarea particulară a receptorilor din subtipul $\alpha 7$. S-a sugerat că o interacțiune directă între A β și receptorii $\alpha 7$ nAChRs are ca rezultat creșterea activării MAPK indusă de A β și ulterior, fosforilarea proteinei receptoare pentru legarea AMPc (CREB) cu efect de atenuare, în aval, a depunerilor de A β (20,159).

2.1.5. Efectele nicotinei asupra stresului oxidativ

Deși proprietățile NIC în ceea ce privește stresul oxidativ și neuroprotecție sunt controversate și ar putea fi complicate de curbele doză-răspuns sub formă de U inversat (18,160), mai multe studii au raportat efectele antioxidante ale NIC asupra tulburărilor neurodegenerative cum ar fi AD și PD (161,162). S-a demonstrat că administrarea de NIC, în anumite circumstanțe, poate reduce peroxidarea lipidică indusă de ROS *in vivo* și *in vitro* (18,163). Acest lucru poate rezulta din capacitatea NIC de a chelata Fe²⁺ prin atomul de azot din nucleul piridinic și astfel, să inhibe reacția Fenton care este implicată în formarea radicalilor liberi de hidroxil (163). Alte studii au confirmat capacitatea NIC de a chelata fierul și de a preveni reacția Fenton și, de asemenea, s-a sugerat că NIC se poate lega de Fe²⁺ din enzima pro-inflamatorie tromboxan-sintaza împiedicând astfel funcționarea acesteia (161,164). Aceste studii contradictorii pot reflecta o multitudine de factori implicați, cum ar fi doza de NIC (ridicată sau scăzută), alegerea enantiomerului și efectele specifice regiunii cerebrale (18,165). S-a constatat că efectele NIC asupra stresului oxidativ sunt dependente de doză, întrucât se pot observa efecte antioxidante la doze mici (10 μ M) și o exacerbarea a stresului oxidativ la o doză mare (1 – 10 mM) (18). Cu toate acestea, se pare că o concentrație de NIC de 0,8 μ M a fost suficientă pentru a induce stresul oxidativ (166). Mai mult decât atât, s-a raportat că modificările induse de NIC în expresia unor gene asociate sistemului antioxidant diferă între regiunile creierului (165).

2.2. Cotinina

Cotinina (COT, (S)-1-metil-5-(3-piridinil)-2-pirolidinonă) este un alcaloid identificat în frunzele plantei de tutun și principalul metabolit al NIC. Aproximativ 80% din NIC este metabolizată în ficat și transformată în COT prin enzimele citocromului P450 2A6 (CYP2A6) și citocromului P450 2A5 (CYP2A5) la om și respectiv la șoarece (167,168).

2.2.1. Proprietățile farmacologice ale cotininei

Forma fiziologic activă a COT, izomerul S(-), se acumulează în organism ca urmare a expunerii la tutun. Rata metabolică a sintezei COT este determinată genetic. De exemplu, s-a demonstrat că indivizii care exprimă o formă trunchiată de CYP2A6

(adică, CYP2A6*4) produc niveluri mai scăzute de COT comparativ cu indivizii care exprimă alela normală (169). Alelele care exprimă formele polimorfe ale genei care codifică CYP2A6, cu activitate enzimatică scăzută sau înaltă, sunt distinct reprezentate în diferite grupuri etnice. Expresia distinctă a diferitelor forme ale CYP2A6 poate explica metabolismul variabil al COT observat la persoane de diferite origini etnice (170). Pe lângă factorii genetici, consumul de alimente poate influența, de asemenea, producția de COT (170), deoarece s-a demonstrat că sucul de grepfrut inhibă activitatea CYP2A6 (146).

Deși este mai puțin eficientă decât NIC în traversarea BBB (171,172), COT este aproape complet absorbită când este administrată oral. Profilul farmacocinetic al COT administrată oral sau intravenos a fost investigat la om. În ciuda similarității structurale cu NIC, COT are proprietăți farmacologice diferite. COT este de 100 de ori mai puțin toxică decât NIC, are un $t_{1/2}$ mai îndelungat (20-24 de ore comparativ cu 2 ore, $t_{1/2}$ al NIC) și nu provoacă dependență la om (173). Această discrepanță între prezența scurtă și prelungită a NIC și respectiv a COT în sânge, sprijină argumentul conform căruia COT ar putea sta la baza efectelor prelungite ale NIC în SNC.

2.2.2. Efectele cognitive ale cotininei

Într-un studiu amplu realizat de Echeverria *et al.* (2011), impactul COT asupra tulburărilor cognitive a fost evaluat la șoarecii transgenici (Tg6799 5xFAD) care dezvoltă AD foarte rapid prin exprimarea a cinci mutații care apar în AD familială, dintre care trei sunt în gena *APP* (mutația suedeză K670N și M671L, mutația londoneză V717I și mutația Florida I716V) și două în gena *PSEN1* (M146L, L286V). Acești șoareci prezintă multe caracteristici ale patologiei AD, inclusiv acumularea intraneuronală de A β , dezvoltarea de plăci senile, reducerea nivelurilor de proteină de densitate postsinaptică 95 (PSD95), proteină tau hiperfosforilată, deficite de memorie și simptome non-cognitive, cum ar fi comportamentul asemănător depresiei (175). Tratatamentul cronic cu COT (2,5 mg/kg, prin gavaj) administrat înainte și după dezvoltarea AD a îmbunătățit memoria de lucru și referință. De asemenea, COT a diminuat depunerea plăcilor de A β în cortex și hipocamp prin reducerea numărului și a mărimii acestora și prin scăderea nivelurilor de A β insolubil (174,176). Mai mult decât atât, tratamentul a stimulat activarea căii Akt și a inhibat GSK3 β prin fosforilare, susținând astfel supraviețuirea neuronală și plasticitatea sinaptică, procese care stau la baza memoriei și învățării în hipocampus și cortexul șoarecilor transgenici (174). Ulterior, efectele COT au fost investigate și atunci când tratamentul a fost administrat la același model de șoarece, dar în stadii mai avansate ale dezvoltării patologiei AD și într-o doză dublă. Astfel, Patel *et al.* (2014) au demonstrat că COT ameliorează efectele patologiei asemănătoare AD prin îmbunătățirea performanțelor memoriei spațiale și de lucru în testul labirintului de apă cu brațe radiale (RAWM) și prin reducerea comportamentului asemănător depresiei în testul înotului forțat a lui Porsolt. În hipocampus și cortexul entorinal al șoarecilor testați, s-a observat și un nivel scăzut al

încărcăturii cu A β . În plus, s-a constatat că COT crește expresia PSD95 și astfel, poate susține plasticitatea sinaptică (177).

2.2.3. Efectul cotininei asupra neuroinflamației

Un studiu anterior efectuat pe culturi primare de monocite izolate din sânge uman, a demonstrat că pre-tratamentul cu COT timp de două ore a blocat răspunsul inflamator provocat de bacteriile Gram negative și a suprimat dramatic producția de citokine precum TNF- α . COT a blocat mai mult de 80% din eliberarea citokinei TNF- α indusă de *Porphyromonas gingivalis*. Acest efect a fost blocat de α -BTX (2 mg/ml) sugerându-se astfel că acest efect anti-inflamator al COT este mediat de receptorii $\alpha 7$ nAChRs. Mai mult decât atât, s-a constatat că efectul este dependent de activitatea PI3K și este însoțit de activarea Akt și inhibarea GSK3 β prin fosforilarea serinei din poziția 9 (situs de fosforilare a Akt) (178). De asemenea, o activare similară a Akt și o inhibare a GSK3 β a fost identificată în omogenatele de creier ale unor șoareci transgenici tratați cu COT (174). Efectul anti-inflamator al COT a fost independent de NF- κ B dar a fost însoțit de stimularea eliberării IL-10 (178). Efectele anti-inflamatorii ale COT au implicat activarea receptorilor Toll-like (TLR).

2.2.4. Efectul cotininei asupra agregării β -amiloidului

S-a demonstrat anterior că COT poate inhiba atât oligomerizarea cât și fibrilizarea A β (174). Două studii influente realizate *in vitro*, au arătat că COT se leagă de A β cu o afinitate ridicată (179) și inhibă agregarea acestuia în fibrile (180). Recent, o analiză de microscopie de forță atomică efectuată asupra procesului de formare a fibrilelor de A β_{1-42} , în condiții care favorizează acest proces, cum ar fi temperatura (37°C) și concentrația ridicată (interval milimolar), a confirmat că COT inhibă agregarea A β_{1-42} *in vitro*. O analiză ulterioară a efectului COT asupra oligomerizării A β_{1-42} , utilizând tehnici imunochimice, a arătat că COT inhibă oligomerizarea A β_{1-42} *in vitro* (181).

2.3. 6-Hidroxi-L-nicotina

Mai multe specii bacteriene, inclusiv *Paenarthrobacter nicotinovorans*, sunt adaptate să utilizeze NIC drept unică sursă de carbon și azot. Abilitatea bacteriei Gram pozitive, *Paenarthrobacter nicotinovorans*, de a degrada NIC se datorează unei căi catabolice codificată de magaplasmidul pAO1, descris anterior de Igloi și Brandsch în 2003. Prima reacție din calea de degradare a NIC este mediată de o enzimă trimeră numită nicotin-dehidrogenaza (NDH, EC 1.5.99.4) care hidroxilează inelul piridinic al D/L-nicotinei ducând astfel la formarea 6-hidroxi-L-nicotinei (6HLN, (S)-5-(1-metil-2-pirolidinil)-1H-2-piridinonă) și respectiv a 6-hidroxi-D-nicotinei (6HDN). Pe parcursul metabolizării NIC, 6HD/LN se acumulează temporar în mediul de cultură (28). Izomerul L este în continuare dehidrogenat de 6-hidroxi-L-nicotin oxidaza (6HLNO, EC 1.5.3.5), formându-se astfel 6-hidroxi-metilmiosmină.

2.3.1. Efectele cognitive ale 6-hidroxi-L-nicotinei

Două studii anterioare au arătat că 6HLN ar putea interacționa cu receptorii nAChRs. Prin utilizarea unor experimente de andocare *in silico*, Hrițcu *et al.*, (2013) și Mihășan *et al.* (2013) au evaluat potențialul 6HLN de a se atașa de proteina de legare a acetilcolinei (AChBP, *engl.* Acetylcholine Binding Protein). Această proteină este produsă de celulele gliale ale melcului *Lymnaea stagnalis* și are proprietăți farmacologice similare cu subtipul homomeric $\alpha 7$ al receptorilor nAChRs. La momentul publicării celor 2 studii, AChBP era structura 3D model utilizată pentru a furniza detalii cu privire la posibilul mecanism de acțiune a diversilor liganzi ai receptorilor nAChRs. Constatările lor au sugerat că 6HLN s-ar putea lega de receptorii nAChRs cu o afinitate mai mare comparativ cu NIC, datorită unei legături suplimentare de hidrogen formată între gruparea hidroxil a 6HLN și reziduul Y185 din componența receptorului. Același grup de cercetători a evaluat efectele administrării cronice de 6HLN asupra memoriei spațiale la șobolani normali din rasa Wistar utilizând teste specifice dependente de hipocamp, cum ar fi testul labirintului Y sau testul labirintului cu brațe radiale. Memoria spațială, în special memoria pe termen scurt și cea de lucru, a fost îmbunătățită de tratamentul cu 6HLN, fără a afecta memoria de lungă durată (182). Mai mult decât atât, aceiași parametri comportamentali au fost evaluați când 6HLN a fost administrată la șobolani cu deficite de memorie induse de scopolamină (SCOP) (184), un antagonist al receptorilor muscarinici ai acetilcolinei, sau clorisonamină (CHL) (185), un antagonist al receptorilor nAChRs. Tratamentul cu SCOP sau CHL la animalele de laborator este frecvent utilizat pentru a induce un model experimental al AD. Administrarea de 6HLN la șobolani tratați cu SCOP sau CHL a îmbunătățit memoria de lucru în testul labirintului Y și ambele tipuri de memorie (memoria de lucru și de referință) în testul labirintului cu brațe radiale. Acest lucru sugerează că 6HLN ar putea reprezenta o alternativă terapeutică viabilă pentru îmbunătățirea memoriei (184,185).

2.3.2. Efectele 6-hidroxi-L-nicotinei asupra stresului oxidativ

Prima dovadă a efectului antioxidant al 6HLN a fost demonstrată *in vivo* de Hrițcu *et al.* (2013). Aceștia au măsurat nivelul unor produși rezultați în urma peroxidării lipidice, cum ar fi MDA, și au evaluat activitatea enzimelor de apărare, cum ar fi SOD și GPX la șobolani masculi normali din rasa Wistar. Administrarea cronică de 6HLN a crescut semnificativ activitatea specifică a enzimelor SOD și GPX și, de asemenea, a scăzut nivelul de MDA în cortexul temporal. În plus, proprietățile antioxidante ale 6HLN și NIC au fost comparate prin metode computaționale, modelarea QSAR utilizată arătând că 6HLN ar putea fi un antioxidant mai bun decât NIC (183). Recent, s-a demonstrat că 6HLN crește activitatea specifică a SOD, GPX și catalazei (CAT) și diminuează nivelul de MDA și glutation redus (GSH) din omogenatele de hipocamp ai șobolanilor tratați cu SCOP sau CHL, sugerând astfel că 6HLN ar putea fi un compus puternic cu posibile aplicații în terapia AD (184,185).

CAPITOL 3. MODELE ANIMALE ALE BOLII ALZHEIMER

3.1. *Modele de rozătoare ale bolii Alzheimer*

Modelele animale joacă un rol important în cercetarea efectuată asupra AD. Aceste modele animale ar putea să nu reproducă cu precizie condițiile anatomice ale bolii în creierul uman, dar din punct de vedere biochimic acestea sunt foarte asemănătoare (186). În comparație, modelele de șoarece sunt considerate a fi mult mai bune față de cele nevertebrate din punct de vedere al funcțiilor motorii și de memorie, neuroanatomiei și sistemului endocrin. Nu există un model animal disponibil care să imite toate anomaliile cognitive, comportamentale, biochimice și histopatologice observate la pacienții cu AD (187). Totuși, reproducerea parțială a neuropatologiei AD și a deficitelor cognitive a fost realizată prin abordări farmacologice și genetice (188). Un model eficient și acceptabil este acela care imită patologia bolii, care poate reproduce complexitatea comportamentului uman la rozătoare și care poate duce la dezvoltarea unei terapii mai sigure și mai eficientă (189). Semnele distinctive neuropatologice ale AD sunt reprezentate de depozitarea extracelulară a plăcilor senile, formarea răspândită a NFTs, neuroinflamația cronică și pierderea neuronilor colinergici. Astfel, aceste situații patogene trebuie să fie imitate de diferite modele animale ale AD (187). Modelele de rozătoare ale AD pot fi clasificate în modele spontane, induse chimic, transgenice și alte tipuri diferite (190).

3.1.1. **Modele spontane**

Pierderea memoriei este o caracteristică principală a vârstei înaintate, prin urmare, animalele în vârstă pot servi ca un model natural al demenței și al deficitelor de memorie. Modelele spontane au fost clasificate în două tipuri: model de demență indus de îmbătrânire (AID) și model de șoarece cu senescență accelerată (SAM) (190).

3.1.2. **Modele induse chimic**

Manipularea căilor neuronale centrale sau a neurotransmițătorilor prin mijloace chimice formează baza acestor modele.

3.1.2.1. *Deficite de memorie induse de scopolamină*

Este bine documentat faptul că sistemul colinergic joacă un rol central în funcția de memorie (191). Scăderea funcției sistemului colinergic central poate induce aspecte ale demenței, cum ar fi pierderea memoriei și dezorientarea, așa cum este observată în AD (Chen *et al.*, 2014). S-a sugerat că pierderea neuronilor colinergici apare de obicei în zonele creierului care sunt asociate cu memoria și învățarea, cum ar fi hipocampusul, nucleul bazal al lui Meynert și cortex (193) și, prin urmare, estimarea numărului și a vitalității neuronilor colinergici prin tehnica de colorare cu violet de crezil (Nissl) la diverse modele animale sugestive pentru demență poate avea o importanță imensă pentru cercetarea în curs în acest domeniu. Se consideră că o reducere a

activității colinergice este asociată cu deficite cognitive. Pacienții cu AD prezintă pierderi semnificative de neuroni colinergici corticali și o deteriorare a funcțiilor colinergice centrale (194). S-a demonstrat că blocarea funcției colinergice centrale induce pierderea memoriei (195). SCOP, un medicament anticolinergic bine-cunoscut, este utilizată frecvent ca un medicament standard pentru deficite cognitive în scop experimental. S-a raportat că SCOP blochează situsurile de legare pentru ACh ale receptorilor mAChRs în cortexul cerebral și are ca rezultat eliberarea excesivă a ACh care dăunează nervilor hipocampici și care cauzează deteriorări ale memoriei la șoareci într-o manieră dependentă de doză (196).

3.1.2.2. Deficite de memorie induse de peptidul β -amiloid ($A\beta$)

Plăcile de $A\beta$ reprezintă o caracteristică a AD și s-a observat că administrarea peptidei $A\beta$ induce pierderea memoriei (197). S-a demonstrat că injectarea acută sau infuzia continuă de $A\beta$ în creier cauzează disfuncție cerebrală urmată de neurodegenerare și de deteriorarea memoriei și a învățării, semne similare cu cele din AD (198). Infuzia de $A\beta$ în cel de-al treilea ventricul al creierului de șobolan, timp de 14 zile, determină o acumulare a acestei proteine în diverse zone precum hipocamp și cortex cerebral (188,199). Acest model este extrem de specific pentru examinarea medicamentelor utilizate în AD.

3.1.3. Modele animale transgenice

Așa cum s-a menționat anterior, câteva mutații genetice au fost asociate cu modificările patologice care au loc în creier pe parcursul AD familială. Dar, pentru a înțelege progresia AD, cercetătorii au dezvoltat animale transgenice (șoareci) care pot exprima aceste proteine mutante (187). Cu ajutorul modelelor transgenice și naturale, va fi utilă extrapolarea informațiilor privind dezvoltarea și progresia bolii asemănătoare cu AD la animale la ceea ce se întâmplă de fapt la om (200). Modelele transgenice pentru AD utilizează animale modificate genetic pentru a obține trăsături care imită simptomele AD. Acestea sunt generate fie prin modificarea compoziției genetice, fie prin modificarea genei pe poziția specifică pe cromozom (187,200). AD poate fi modelată ușor la șoarece. Modelul de șobolan transgenic nu este dezvoltat și acceptat pe scară largă.

3.2. Modele de pește zebură ale bolii Alzheimer

Peștii zebură (*Danio rerio*) sunt mici, rezistenți la apă dulce, originari din India și păstrați de obicei în acvariile de casă. Inițial, ei au fost utilizați ca organism model pentru studierea dezvoltării vertebratelor. Cu toate acestea, în ultimul deceniu, modelul de pește zebură a devenit din ce în ce mai folosit pentru investigarea unei mari varietăți de boli umane (201,202). Peștele zebură este un model de vertebrat remarcabil pentru analiza completă a funcțiilor unice ale genelor, împreună cu căile de semnalizare ale acestora în timpul dezvoltării și neurodegenerării (201,203). Astfel de studii au fost

posibile deoarece, peștele zebură prezintă mai multe avantaje distincte care îl fac un model animal versatil față de alte modele de vertebrate. Datorită simplității habitatului lor natural, este mult mai ușor ca peștii zebură să fie menținuți într-un laborator decât să fie simulate condițiile esențiale pentru mamifere. Astfel, peștele zebură poate fi crescut într-un mod rentabil. Timpul scurt de reproducere al acestora (3-5 luni) sporesc ritmul progresului experimental. Peștii zebură prezintă fertilizare externă, iar modul lor de dezvoltare facilitează observarea și manipularea experimentală a embrionilor. În plus, aceștia depun un număr mare de ouă, variind între 200 și 300, asigurându-se astfel o aprovizionare cu animale pentru lucrările de cercetare (203). Unul dintre avantajele unice ale peștelui zebură este reprezentat de claritatea optică inegalabilă a embrionilor, care permite vizualizarea genelor individuale (marcate fluorescent) pe tot parcursul procesului de dezvoltare, prin tehnici imagistice non-invasive (203,204). Această transparență a embrionului ajută la manipulările genice. Datorită dimensiunilor mici ale larvelor, se poate efectua cu ușurință o selecție cu randament ridicat a compușilor neuroactivi.

3.2.1. Similaritatea neuroanatomică

Cercetările au arătat un nivel ridicat de conservare între organizarea creierului la peștele zebură și om (205). S-a raportat un grad mare de similaritate între căile neuroanatomice (203,206) și neurochimice (207) ale acestora. Paliul medial, dorsal și lateral al peștilor zebură este similar cu amigdala, izocortexul și respectiv hipocampusul de la alte vertebrate (203). Encefalul peștelui zebură cuprinde proencefalul, mezencefalul și rombencefalul (diencefal, telencefal și cerebel). Similar cu creierul mamiferelor, creierul peștelui zebură adăpostește principalele circuite de neurotransmițători excitatori glutamatergici și inhibitori GABAergici (208) împreună cu receptorii colinergici muscarinici (209). În plus, aceștia au neurotransmițătorii GABA, glutamat, serotonină, dopamină, histamină, ACh (210) și enzimele necesare pentru sinteza și metabolismul acestora (211,212). Similaritatea există chiar și la nivel celular, deoarece tipurile celulare precum astrocitele (213), microglia (214), oligodendrocitele, celulele Purkinje din cerebel (215), neuronii motori (216) și cu mielină (217), sunt similare cu celulele umane. Studiile suplimentare privind tiparele neuronale din măduva spinării la peștele zebură adult, diferențierea neuronală și dezvoltarea rețelei coloanei vertebrale stabilesc similaritatea lor cu vertebratele de ordin superior (218).

3.2.2. Peștele ca model neurofarmacologic

Cercetătorii au investigat învățarea non-asociativă în cazul larvelor peștilor zebură pe baza răspunsurilor cognitive și comportamentale ale AD. Larvele de șapte zile după fertilizare au fost expuse la o serie de stimuli acustici, față de care larvele au prezentat o reducere semnificativă a răspunsului de tresărire (219). Un alt grup a injectat A β ₁₋₄₂ în ventriculul rombencefalului la embrionii peștilor zebură la 24 de ore după

fertilizare. Aceștia au observat deficite cognitive semnificative la embrioni, cu o creștere a nivelului de proteină tau fosforilată la reziduurile țintă ale GSK3 β la larvele de 5 zile după fertilizare (220). Embrionii de pești zebură expuși la clorură de trimetiltin (TMT) au prezentat toxicitate neurocomportamentală, în special apoptoză la nivelul cozii, modulări ale răspunsului fotomotor și frecvenței flexiunilor cozii (221). Foarte recent, a fost dezvoltat un alt model farmacologic al AD prin adăugarea acidului okadaic (222). S-a constatat că atât plăcile de A β cât și fosforilarea proteinei tau cresc odată cu creșterea concentrațiilor de acid okadaic. De asemenea, au fost observate deficite de memorie și învățare la acești pești (222). Peștii zebură tratați cu aluminiu în mediu acid au prezentat un comportament asemănător condiției AD în care, activitatea locomotorie a acestora și capacitatea de învățare au fost abrogate (223). Mai mult decât atât, s-a raportat că injecția intraventriculară de A β ₁₋₄₂ în creierul embrionului duce la pierderi de memorie și deficite cognitive împreună cu o fosforilare crescută a proteinei tau (220,224). Prin urmare, peștele zebură este un model puternic pentru cercetare în domeniul neurofarmacologiei.

3.2.3. Peștele zebură ca model neurogenetic

3.2.3.1. Presenilinele

Genele implicate în FAD au fost studiate pe larg în ultimii 25 de ani însă, înțelegerea noastră asupra funcțiilor normale ale acestora este încă departe de a fi completă. Genele *PSEN* joacă roluri importante în dezvoltare. Peștii zebură (ca model bine caracterizat pentru studiile de biologie a dezvoltării) au fost utilizați pentru a investiga funcțiile normale ale acestor gene. Genele *psen1* și *psen2* sunt exprimate ubicuitar la embrionii peștilor zebură (225,226) sugerând o funcție importantă a acestor gene în timpul dezvoltării. Injecția de MOs pentru a reduce expresia genei *presenilin*, a evidențiat fenotipuri similare și diferite în comparație cu șoarecii care au avut gena pentru presenilină inactivată (*Psen1*^{-/-}). Șoarecii *Psen1*^{-/-} mor în timpul dezvoltării. Pentru a depăși acest aspect, s-au dezvoltat modele de șoareci cu gena *Psen1* inactivată condițional (227). Embrionii peștilor zebură injectați cu MOs care blochează traducerea *psen1*, sunt viabili și prezintă fenotipuri similare (228,229) cu șoarecii *Psen1*^{-/-}, cum ar fi formarea aberantă de somite și defecte ale căii de semnalizare Notch (201,230). Este interesant faptul că un pește zebură mutant (descoperit prin TILLING) la care lipsește activitatea *Psen1* este viabil. Acest pește mutant a fost utilizat pentru a studia sistemul histaminergic al creierului (231). Acest sistem este esențial în medierea funcțiilor cognitive afectate în AD. Analiza numărului de neuroni histaminergici din creierul peștilor zebură *psen1*^{-/-} a arătat că *psen1* din peștii zebură este un reglator al dezvoltării neuronilor histaminergici (231). Acest pește mutant va fi un instrument valoros pentru analiza suplimentară a funcției *psen1* la peștele zebură (201).

3.2.3.2. Proteina precursoră a β -amiloidului

Genele de la peștii zebură co-ortologe cu gena umană *APP*, *appa* și *appb*, au o expresie răspândită și suprapusă începând cu jumătatea perioadei de gastrulație a embrionului în curs de dezvoltare. La 24 de ore după fertilizare, ambele gene sunt exprimate în prozencefalul în curs de dezvoltare și alte țesuturi, însă doar *appb* este exprimată în măduva spinării (232). Într-un studiu realizat pe pești zebură de Lee și Cole (2007), o secțiune din secvența reglatoare a *appb* a fost fuzionată cu *GFP* (gena pentru proteina cu fluorescență verde). Spre deosebire de alte studii de expresie, aceștia au observat expresia *appb* în vascularizația în curs de dezvoltare a embrionilor. Recent, Liao *et al.* (2012) au izolat integrări transpozonice de "prindere în capcană" a genei (*engl.* gene trapping) care conțineau secvența genei *RFP* (gena care codifică proteina cu fluorescență roșie) în genele *appa* și *aplp2* (*engl.* amyloid beta precursor-like protein 2). Capcanele genice au provocat fuziunea dintre RFP și domeniile extracelulare ale ambelor proteine codificate (*Appa* și respectiv *Aplp2*). Proteinele fuzionate ale acestor gene au fost acumulate în vascularizație. Cu toate acestea, nu s-au detectat moleculele de ARN matur ale acestor gene în celulele endoteliale ale vascularizației. În schimb, s-au detectat molecule de ARN matur în celulele neuronale. Acest lucru sugerează faptul că aceste proteine sunt sintetizate în celulele neuronale și apoi se acumulează în vascularizație (201).

3.2.4. Descoperirea de medicamente neurospecifice folosind modelul de pește zebură

Au fost realizate mai multe abordări pentru descoperirea potențialilor compuși terapeutici care exploatează claritatea optică a embrionilor și larvelor de pește zebură. Datorită dimensiunii reduse a embrionilor și a larvelor, descoperirea de medicamente cu un randament ridicat poate fi realizată folosind acest model (235). Până în prezent, foarte puține studii care au implicat descoperirea de medicamente neurologice au fost efectuate la peștii zebură, majoritatea studiilor fiind efectuate în afara sistemului nervos. De asemenea, evaluarea mai multor compuși psihoactivi a fost efectuată folosind peștele zebură (236,237). În ciuda faptului că nicotina (238) și etanolul (239) afectează dezvoltarea sistemului nervos, s-a observat că amfetamina, cocaina, morfina, etanolul și nicotina provoacă un comportament asociat anxietății sau recompensei la peștii zebură (203). S-a raportat că nicotina prezintă efecte de îmbunătățire a cogniției într-o paradigmă de învățare la peștele zebură (Levin *et al.*, 2006).

PARTEA EXPERIMENTALĂ

CAPITOL 4. MATERIALE ȘI METODE

4.1. Evaluarea performanțelor cognitive ale șobolanilor

4.1.1. Cazarea și întreținerea șobolanilor

În acest studiu au fost utilizați aproximativ 70 de șobolani (*Rattus norvegicus*) masculi adulți din rasa Wistar, ce au avut la începutul experimentului, o vârstă de 4 luni și o greutate de 350 ± 10 g. Șobolanii au fost achiziționați de la Unitatea de creștere a animalelor de laborator, Institutul Cantacuzino din București. Rozătoarele au fost acomodate în laboratorul B108 din cadrul Unității utilizatoare de animale în scopuri științifice ce aparține Facultății de Biologie a Universității "Alexandru Ioan Cuza" din Iași. Laboratorul este controlat termic (temperatura este menținută constant la 22°C), are ciclul lumină/întuneric de 12 ore (începând cu ora 8:00 dimineața), o umiditate de 50% și ventilație artificială.

Animalele au fost tratate în conformitate cu normele instituționale de bioetică care sunt menționate în Legea nr.43/2014 privind protecția animalelor utilizate în scopuri științifice din România și toate procedurile au fost realizate în conformitate cu Directiva 2010/63/UE a Parlamentului European și a Consiliului din 22 septembrie 2010 privind protecția animalelor utilizate în scopuri științifice.

4.1.2. Inducerea modelului amiloidic de demență prin infuzia stereotaxică a fibrilelor de A β ₂₅₋₃₅ în hipocampusul de șobolan

Șobolanii au fost aneșteziați prin administrarea i.p. a soluției de pentobarbital de sodiu (50 mg/kg, greutate corporală). Scalpul animalelor a fost tuns cu o mașină electrică și dezinfectat cu alcool iodat. Animalele au fost fixate în aparatul stereotaxic cu nasul orientat la 11° sub planul zero și scalpul a fost ulterior secționat pe linia mediană cu un bisturiu pe o distanță de 2-2,5 cm. Țesutul conjunctiv care aderă la periost a fost îndepărtat identificându-se astfel bregma și lambda. Craniul animalului a fost perforat până la duramater cu o freză dentară conform coordonatelor din atlasul stereotaxic a lui Paxinos și Watson (2007): 1,5 mm lateral față de linia mediană, 0 mm anterior-posterior și 7,4 mm dorsoventral pe suprafața cortexului. După perforarea craniului, a fost introdus acul microseringii Hamilton și s-a administrat drept-unilateral și gradual (1 μ L/min) un volum de 4 μ L de soluție de A β ₂₅₋₃₅ 0,5 mg/mL. La animalele din lotul de control, s-a injectat soluție salină în locul celei de A β ₂₅₋₃₅. După administrarea soluției de A β , acul seringii a fost extras lent și s-a suturat tegumentul. Post-operator, s-a administrat antibiotic pentru a evita posibile infecții. În urma operației chirurgicale, șobolanilor li s-a acordat o perioadă de repaus de două săptămâni și o atenție deosebită, aceștia fiind manipulați zilnic. Procentul de supraviețuire a fost de aproximativ 95%.

4.1.3. Repartizarea animalelor în loturi experimentale și administrarea tratamentelor

Un număr total de 66 de șobolani a fost repartizat aleatoriu în 11 loturi experimentale (6 animale/lot) conform tabelului 1. De asemenea, programul InVivoStat v4.1.0 (242) și pachetul statistic bazat pe R au fost folosite pentru a confirma că numărul de 6 animale pe lot este adecvat pentru analiza statistică. Pe baza unui prag de semnificație de 0,05, puterea de a detecta o modificare relevantă din punct de vedere biologic de 20% față de control este de 100%.

După perioada de recuperare postoperatorie de două săptămâni, animalele au fost pre-tratate timp de 7 zile prin injecție i.p. cu doze de 0,3 și 0,7 mg/kg (greutate corporală, g.c.) de NIC, COT și 6HLN. Mai mult decât atât, acest tratament a fost aplicat și în perioada efectuării testelor comportamentale, cu 30 de minute înainte de antrenament sau testare, până în ziua eutanasierii (30 zile). Soluția de DNP a fost administrată acut în doză unică de 5 mg/kg, g.c., i.p., cu 30 de minute înainte de efectuarea testului labirintului Y, testului de recunoaștere a obiectului nou și testului labirintului cu brațe radiale. Soluția de BSP a fost administrată acut în doză unică de 1 mg/kg, g.c., i.p. cu 30 de minute înainte de efectuarea testului în câmp deschis și testului în labirintul în cruce suspendat. Soluția de IMP a fost administrată acut în doză unică de 10 mg/kg, g.c. cu 30 de minute înainte de efectuarea testului înotului forțat.

4.1.4. Testele comportamentale utilizate pentru analiza performanțelor cognitive a șobolanilor tratați cu nicotină și derivați nicotinici

Comportamentul animalelor în testele cognitive a fost înregistrat cu o cameră video-digitală Logitech C922 Pro HD Stream, iar filmele au fost analizate utilizând programul ANY-maze v6.3 (Stoelting Co., IL, SUA). După efectuarea testelor comportamentale, șobolanii au fost eutanasiați iar creierele întregi au fost îndepărtate. Hipocampusul a fost precis excizat și folosit mai departe pentru testele biochimice și moleculare.

4.1.4.1. Testul labirintului Y

Memoria de recunoaștere spațială pe termen scurt și activitatea locomotorie au fost evaluate utilizând testul labirintului Y dezvoltat de Jackson (1943) și modificat de Boiangiu *et al.* (2020). Aparatul folosit este confecționat din Plexiglas și constă în trei brațe (35 cm lungime, 25 cm înălțime și 10 cm lățime) notate A, B și C și o zonă centrală sub forma unui triunghi echilateral. La 30 de minute după injecția i.p. a nicotinei și a derivaților nicotinici, șobolanii au fost plasați la capătul unui braț și lăsați să se miște liber prin labirint timp de 8 minute. Intrarea în braț a fost luată în considerare atunci când toate membrele animalului erau situate în braț. Comportamentul de alternare spontană reprezintă intrarea succesivă în toate cele trei brațe (notată în seturi de triplete: ABC, BCA, ACB, CAB, CBA și BAC). Comportamentul de alternare spontană reflectă memoria spațială de lucru, care este o formă de memorie pe termen scurt.

Tabel 4.1. Repartizarea șobolanilor în grupurile experimentale, tratamentele și testele comportamentale aplicate

Lot	N*	Administrare i.c.v.	Administrare i.p.	Testare comportamentală
Control (fals operat)	6	Soluție salină NaCl 0,9%	Soluție salină NaCl 0,9%	Toate testele comportamentale
A β_{25-35}	6	Suspensie A β_{25-35}	Soluție salină NaCl 0,9%	Toate testele comportamentale
DNP + A β_{25-35}	6	Suspensie A β_{25-35}	Soluție DNP 5 mg/kg, g.c.	Testul labirintului Y Testul labirintului cu brațe radiale Testul de recunoaștere a obiectului nou
IMP + A β_{25-35}	6	Suspensie A β_{25-35}	Soluție IMP 10 mg/kg, g.c.	Testul înotului forțat
BSP + A β_{25-35}	6	Suspensie A β_{25-35}	Soluție BSP 1 mg/kg, g.c.	Testul în câmp deschis Testul în cruce suspendat
NIC 0,3 mg/kg + A β_{25-35}	6	Suspensie A β_{25-35}	Soluție NIC 0,3 mg/kg, g.c.	Toate testele comportamentale
NIC 0,7 mg/kg + A β_{25-35}	6	Suspensie A β_{25-35}	Soluție NIC 0,7 mg/kg, g.c.	Toate testele comportamentale
COT 0,3 mg/kg + A β_{25-35}	6	Suspensie A β_{25-35}	Soluție COT 0,3 mg/kg, g.c.	Toate testele comportamentale
COT 0,7 mg/kg + A β_{25-35}	6	Suspensie A β_{25-35}	Soluție COT 0,7 mg/kg, g.c.	Toate testele comportamentale
6HLN 0,3 mg/kg + A β_{25-35}	6	Suspensie A β_{25-35}	Soluție 6HLN 0,3 mg/kg, g.c.	Toate testele comportamentale
6HLN 0,7 mg/kg + A β_{25-35}	6	Suspensie A β_{25-35}	Soluție 6HLN 0,7 mg/kg, g.c.	Toate testele comportamentale

N* – număr de animale

4.1.4.2. Testul în câmp deschis

Pentru a controla posibilele efecte senzomotorii induse de NIC și derivații nicotiniici, a fost evaluat comportamentul șobolanilor în cadrul testului de explorare a unui câmp deschis (OFT). Câmpul deschis este reprezentat de o arenă cu dimensiunile de 72 cm x 72 cm, înconjurată de pereți înalți de 36 cm, aparatul fiind fabricat integral din placaj de lemn. Podeaua arenei a fost împărțită în 16 pătrate egale cu linii negre. Animalele au fost plasate individual în centrul arenei și lăsate să exploreze arena timp de 5 minute (245,246). O camera video digitală a fost poziționată deasupra arenei și a fost utilizată pentru a înregistra comportamentul în timpul testării pentru analiza ulterioară. S-au înregistrat o serie de parametri, inclusiv: numărul de linii traversate, numărul de intrări în pătratul central, timpul petrecut în pătratul central etc.

4.1.4.3. Testul de recunoaștere a obiectului nou

Testul de recunoaștere a obiectului nou (NOR) utilizează preferința naturală a șobolanilor sau a șoarecilor pentru obiectele noi și este utilizat pentru a evalua modificările cognitive la modelele animale ale unor tulburări de dezvoltare a sistemului nervos și neurodegenerative sau cele induse de anumite medicamente (246). La 24 de ore de la explorarea în OFT, șobolanii au fost antrenați și evaluați în testul NOR. Evaluarea comportamentului în testul NOR a avut loc în aceeași arenă utilizată pentru OFT. Astfel, explorarea arenei în OFT a fost considerată ca fiind sesiunea de habituație (T_0) în testul NOR. Testul NOR a fost împărțit în două sesiuni, a câte 5 minute fiecare: sesiunea de familiarizare (T_1) și sesiunea de testare sau de alegere (T_2). Pe parcursul sesiunii T_1 , animalul a fost lăsat liber să exploreze două obiecte identice care au fost plasate în două colțuri opuse ale aparatului, iar în timpul sesiunii T_2 , unul dintre obiecte a fost înlocuit cu un obiect nou, necunoscut. La sfârșitul sesiunii T_1 , șobolanii au fost plasați înapoi în cușca de cazare, iar după 4 ore s-a efectuat sesiunea T_2 . Acest test se bazează exclusiv pe dorința înnăscută a rozătoarelor de a explora obiectul nou față de cel familiar. Astfel, o rozătoare care își amintește obiectul familiar (F) va petrece mai mult timp explorând obiectul nou (N).

4.1.4.4. Testul labirintului în cruce suspendat

Labirintul în cruce suspendat (EPM) este utilizat frecvent pentru studierea nivelului de anxietate la rozătoare (247). EPM a fost utilizat pentru a evalua efectele anxiolitice sau anxiogene ale NIC și a derivaților nicotiniici. Aparatul constă în 4 brațe din Plexiglas dispuse în formă de ”+” și o zonă centrală cu dimensiunile de 10 cm x 10 cm. Două brațe sunt deschise și au dimensiunile de 50 cm x 10 cm (lungime x lățime), iar celelalte două sunt închise de pereți cu înălțimea de 40 cm. Labirintul este ridicat la 50 cm de podea și aranjat astfel încât brațele deschise să fie opuse una față de cealaltă. O creștere a activității șobolanului în brațele deschise (durata și/sau intrările) reflectă un comportament anxiolitic. Timpul petrecut în zona centrală nu a fost contorizat. Având în vedere că acest test este utilizat pentru a investiga stările de anxietate ca și

componentă a proceselor cognitive, el a fost efectuat o singură dată (248). În acest test s-au înregistrat următorii parametri: numărul de intrări în brațele deschise și închise și timpul petrecut în brațele deschise și închise (secunde).

4.1.4.5. Testul înotului forțat

Testul înotului forțat (FST) sau testul de înot a lui Porsolt este un test comportamental al rozătoarelor utilizat pentru evaluarea medicamentelor antidepresive și eficacitatea antidepresivă a unor compuși noi și pentru manipulări experimentale care vizează interpretarea sau prevenirea stărilor depresive (249). În prima zi de desfășurare a testului (antrenamentul), șobolanii au fost plasați într-un bazin cilindric cu diametrul de 30 cm și înălțimea 59 cm care a conținut apă la temperatura de 26°C. Înălțimea coloanei de apă în cilindru a fost de 25 cm. Animalele au fost lăsate să înoate timp de 15 minute după care au fost scoase din apă, uscate și transferate în cuștile de depozitare (248). După 24 de ore, șobolanul a fost supus testului propriu-zis timp de 6 minute unde s-a înregistrat timpul de imobilitate și cel de mobilitate.

4.1.4.6. Testul labirintului cu brațe radiale

Memoria și învățarea spațială a șobolanilor au fost evaluate folosind un protocol al testului labirintului cu brațe radiale (RAM) descris pentru prima dată de Olton și Samuelson (1976) și modificat ulterior de Hritcu *et al.* (2020). Labirintul cu brațe radiale care a fost utilizat în acest studiu este construit din Plexiglas gri-translucid și format din 8 brațe (40 cm lungime, 10 cm lățime și 20 cm înălțime), numerotate de la 1 la 8, care se extind radial dintr-o arenă centrală (20 cm în diametru). Aparatul este amplasat la 50 cm deasupra podelei și este înconjurat de diferite indicii vizuale în exterior care rămân în aceeași poziție pe toată durata experimentului (Fig. 4.8.). La capătul fiecărui braț s-a plasat o cupă care, în anumite brațe (brațele 1, 2, 4, 5 și 7) a conținut o doză de 50 mg hrană. Brațele cu hrană au fost marcate cu hârtie albă cu dimensiunea de 10 x 5 cm. În extremitățile brațelor 3, 6 și 8 s-au plasat câte o cupă lipsită de hrană.

Înainte de începerea testului, animalele au fost supuse unui regim alimentar astfel încât masa acestora să ajungă la 85% din greutatea corporală inițială. În această perioadă, animalele au primit mai puțină hrană și au avut acces la apă *ad libitum*.

După ce greutatea corporală a ajuns la 85% din cea inițială, a urmat o perioadă de 4 zile de antrenament pentru a învăța animalele să intre în brațele labirintului și să consume hrana. Grupuri de câte 4 animale au fost lăsate 5 minute pe zi să exploreze liber aparatul și să se obișnuiască cu acesta. În prima zi de antrenament, s-a plasat hrana în centrul arenei și în brațe. În următoarele 3 zile, hrana a fost redusă treptat și plasată doar în cupa din extremitățile brațelor.

După perioada de antrenament s-a început testul propriu-zis care a durat 7 zile. În timpul testului doar brațele care au fost marcate (1, 2, 4, 5 și 7) au conținut 50 mg de hrană în cupă, în timp ce celelalte brațe care nu au fost marcate (3, 6 și 8) au prezentat

o cupă lipsită de hrană. De această dată, fiecare șobolan a fost plasat individual în centrul labirintului și i-a fost permis să consume hrana din cele 5 brațe. Sesiunea de testare s-a încheiat atunci când a expirat perioada de 5 minute sau când șobolanul a terminat de consumat hrana din brațe. O intrare în braț a fost luată în considerare doar atunci când toate cele patru membre ale animalului au fost situate în braț.

4.1.5. Experimente de andocare moleculară *in silico*

Majoritatea proteinelor își îndeplinesc funcțiile prin interacțiunea fie cu molecule mici (substrate sau efectori), fie cu molecule mari (alte proteine, ADN sau ARN). Înțelegerea modului în care se formează aceste complexe intermoleculare este esențială pentru diferite aplicații, cum ar fi selecția unor noi ținte terapeutice, conceperea rațională de medicamente noi sau ingineria enzimatică (252). În prezent, informațiile disponibile privind activitatea biologică și structura proteinelor permit predicția computerizată a conformației a unui complex de tip proteină-ligand pornind de la structura celor două componente (proteină și ligand), procesul fiind numit andocare moleculară (252). Andocarea este un termen folosit pentru schemele computaționale care încearcă să prezică structura complexului intermolecular format între două sau mai multe molecule constituente: un receptor și un ligand (252,253). În studiul de față, am evaluat potențialul de legare al NIC și a derivaților nicotinici în situsurile alosterice ale receptorilor AChBP și $\alpha 4\beta 2$ nAChRs.

4.1.5.1. Structuri tridimensionale

În acest experiment s-au folosit doi receptori: proteina de legare a ACh (AChBP, 2,2 Å, PDB ID 1UW6) și receptorul nicotinic al ACh $\alpha 4\beta 2$ ($\alpha 4\beta 2$ nAChR, 3,9 Å, 6CNK) uman având stoechiometria $3\alpha:2\beta$. AChBP este o proteină homopentameră (cinci subunități identice), solubilă în apă, produsă în celulele gliale ale melcului *Lymnaea stagnalis* și are proprietăți farmacologice similare cu cele ale receptorilor homopentamerici din subtipului $\alpha 7$ nAChRs, inclusiv afinitate relativ slabă pentru ACh și afinitate ridicată pentru NIC (183,254). Subtipul $\alpha 4\beta 2$ al receptorului nAChR este cea mai abundentă izoformă din creierul uman și reprezintă principala țintă în dependența de NIC (255). Este cunoscut faptul că receptorul $\alpha 4\beta 2$ nAChR se assemblează în două subunități stoechiometrice α și β : $3\alpha:2\beta$ și respectiv $2\alpha:3\beta$ (256). Conform comparațiilor realizate de Walsh *et al.* (2018), doar aceste două stoechiometрии pot fi observate deoarece doar o interfață α - α sau β - β poate fi acomodată în pentamer, menținându-se în același timp interacțiuni favorabile la toate interfețele din jurul inelului pentameric. Receptorul uman $\alpha 4\beta 2$ nAChR a fost co-purificată cu două molecule de nicotină atașate la două interfețe α - β și o moleculă de nicotină atașată la o interfață α - α .

Toate structurile 3D ale liganzilor au fost descărcate în format .sdf de pe PubChem (257) și transformate într-un format potrivit (.pdbqt) pentru andocare utilizând Frog v2.14 – free on-line drug conformation generation (258). Liganzii utilizați în studiile de andocare sunt: (S)-nicotină (89594), (R)-nicotină (157672), (S)-cotinină

(854019), (R)-cotinină (21907), (S)-6-hidroxicotinină (439383), (R)-6-hidroxicotinină (439886). Interacțiunile dintre ligand și receptor au fost reprezentate sub forma unor diagrame bidimensionale (2D) generate cu programul Ligplot⁺ v2.2 (259) și au fost ulterior vizualizate 3D cu ajutorul programului PyMOL v2.2.3. (260).

4.1.5.2. Program de andocare

Andocarea *in silico* a fost efectuată utilizând algoritmul genetic din programul AutoDock 4 (261). Toți pașii necesari andocării (generarea suprafeței moleculare, generarea rețelei energetice și a cubului de căutare) precum și evaluarea rezultatelor obținute după andocare au fost realizate cu programul AutoDockTools v1.5.6 (ADT) (262) folosind parametrii prestabiliți.

4.1.5.3. Parametri de andocare

Receptorii au fost menținuți rigizi și toți liganzii au fost flexibili. Toate legăturile covalente simple din moleculele liganzilor au fost considerate ca fiind rotabile. Andocarea a fost direcționată (locală), spațiul de căutare fiind inclus într-un cub cu volumul de 180 Å, centrat pe un atom al moleculei de nicotină din fișierul PDB care a fost ulterior îndepărtată. Conformațiile obținute în urma andocării au fost suprapuse peste structura receptorului din fișierul PDB și s-a calculat deviația rădăcinii medii la pătrat (RMSD) cu DeepView-Swiss-PdbViewer v4.1.0 (263).

4.2. Evaluarea performanțelor cognitive ale peștilor zebură

4.2.1. Cazarea și întreținerea peștilor zebură

Un număr total de 150 de pești zebură (*Danio rerio*), femele și masculi în raport 50:50, au fost achiziționați de la compania autorizată Animax (Pet Product S.R.L., București, România) și acomodați în laboratorul B115 din cadrul Unității utilizatoare de animale în scopuri științifice ce aparține Facultății de Biologie a Universității "Alexandru Ioan Cuza" din Iași. Peștii au fost menținuți, timp de două săptămâni, în 3 acvarii (70 L fiecare) aerate constant și luminate timp de 14 ore: o perioadă de întuneric de 10 ore (acvariile au fost luminate începând cu ora 8:00). Temperatura apei a fost menținută la $27 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, pH $7,0 \pm 0,15$, oxigen dizolvat $6,0 \pm 0,1$ mg/L, amoniac total $<0,01$ mg/L, duritate totală 6 mg/L și alcalinitate la concentrația de 22 mg/L CaCO_3 . Peștii au fost hrăniți de două ori pe zi cu hrană din comerț NovoMalawi (JBL, Neuhofen, Germania). Parametrii apei nu au fost schimbați între tratamente.

Animalele au fost tratate în conformitate cu normele instituționale de bioetică care sunt menționate în Legea nr. 43/2014 privind protecția animalelor utilizate în scopuri științifice din România și toate procedurile au fost realizate în conformitate cu Directiva 2010/63/UE a Parlamentului European și a Consiliului din 22 septembrie 2010 privind protecția animalelor utilizate în scopuri științifice.

Tabel 4.2. Repartizarea peștilor zebură în grupurile experimentale, tratamentele și testele comportamentale aplicate

Lot	N*	Inducerea modelului animal al AD (30 minute)	Tratament acut (3 minute)	Teste comportamentale
Control	10	Apă	Apă	Toate testele comportamentale
SCOP	10	Soluție SCOP 100 μ M	Apă	Toate testele comportamentale
GAL + SCOP	10	Soluție SCOP 100 μ M	Soluție GAL 1 mg/L	Testul labirintului Y Testul de recunoaștere a obiectului nou
IMP + SCOP	10	Soluție SCOP 100 μ M	Soluție IMP 20 mg/L	Testul de scufundare în acvariul nou
NIC 1 mg/L + SCOP	10	Soluție SCOP 100 μ M	Soluție NIC 1 mg/L	Toate testele comportamentale
NIC 2 mg/L + SCOP	10	Soluție SCOP 100 μ M	Soluție NIC 2 mg/L	Toate testele comportamentale
COT 1 mg/L + SCOP	10	Soluție SCOP 100 μ M	Soluție COT 1 mg/L	Toate testele comportamentale
COT 2 mg/L + SCOP	10	Soluție SCOP 100 μ M	Soluție COT 2 mg/L	Toate testele comportamentale
6HLN 1 mg/L + SCOP	10	Soluție SCOP 100 μ M	Soluție 6HLN 1 mg/L	Toate testele comportamentale
6HLN 2 mg/L + SCOP	10	Soluție SCOP 100 μ M	Soluție 6HLN 2 mg/L	Toate testele comportamentale

N* - număr de animale

4.2.2. Inducerea modelului de pește zebra al bolii Alzheimer prin imersie în scopolamină. Repartizarea animalelor și administrarea tratamentelor

După două săptămâni de acomodare, animalele au fost împărțite aleatoriu în 10 loturi experimentale (Tabel 4.2.) a câte 10 pești fiecare și păstrați în acvarii de 30 L prevăzute cu pompe de aer și încălzitoare. Cu ajutorul programului InVivoStat v4.1.0 (242) și a pachetului statistic bazat pe R, s-a constatat că numărul de 10 animale pe lot este adecvat pentru analiza statistică. Pe baza unui prag de semnificație de 0,05, puterea de a detecta o modificare relevantă din punct de vedere biologic de 20% față de control este de 100%. Înainte de efectuarea unui test comportamental, peștii au fost plasați individual, timp de 30 minute, într-un volum de 2 L de soluție de SCOP 100 μ M pentru inducerea experimentală a modelului animal al AD. Pentru a minimiza variabilele care ar putea afecta comportamentul, soluția de SCOP a fost preparată înainte de utilizare și schimbată după fiecare expunere. Ulterior, peștii zebra au fost supuși 3 minute unui tratament acut cu două doze (1 și 2 mg/L) de NIC, COT și 6HLN. Lotul tratat cu 1 mg/L de GAL a reprezentat controlul pozitiv în testele de memorie: testul labirintului Y și testul de recunoaștere a obiectului nou. Lotul tratat cu 20 mg/L de IMP a reprezentat controlul pozitiv în testul de evaluare a anxietății. Tratamentul a fost administrat într-un pahar Berzelius de 0,5 L. Înainte de a fi plasați în acvariul de testare comportamentală, peștilor li s-au acordat 5 minute de repaus în apa din acvariul de cazare.

4.2.3. Testele comportamentale utilizate pentru analiza performanțelor cognitive ale peștilor zebra tratați cu nicotină și derivați nicotinici

Comportamentul animalelor în testele cognitive a fost înregistrat de o cameră video-digitală (Logitech C922 Pro HD Stream), iar înregistrările au fost analizate utilizând programul ANY-maze v6.3 (Stoelting Co., IL, SUA).

4.2.3.1. Testul de scufundare în acvariul nou

În testul de scufundare în acvariul nou (NTT), peștii zebra prezintă răspunsuri comportamentale puternice la anxietatea provocată de noutate (264,265). Acest test se bazează pe instinctul natural al animalului de a căuta protecție într-un mediu necunoscut prin scufundare, imobilitate și reducerea explorării. Pe măsură ce peștele se adaptează treptat la noul mediu, apare de obicei o creștere a explorării (de exemplu, activitate locomotorie crescută, scăderea perioadei de imobilitate și mai multe intrări în jumătatea superioară a bazinului (266). În acest studiu am utilizat o variantă modificată a testului (267) în care acvariul nou a fost compartimentat virtual în zona superioară și respectiv cea inferioară. Poziția peștilor în acvariu (în partea superioară sau cea inferioară) a fost considerată un indice al anxietății. Peștii vor fi transferați individual într-un acvariu de testare și filmați timp de 6 minute (268). Aparatul experimental utilizat a fost cel descris de mai multe grupuri de cercetători (267,269) și a constatat într-un acvariu din sticlă trapezoidal cu următoarele dimensiuni: 23,9 cm latura inferioară x 28,9 cm latura superioară x 15,1 cm înălțime și 15,9 cm în diagonală. Lățimea superioară a fost de 7,4

cm, iar cea inferioară a fost de 6,1 cm, acvariul fiind umplut cu 1,5 L de apă din acvariul de cazare.

4.2.3.2. Testul labirintului Y

Peștii au fost testați într-un acvariu de sticlă sub forma literei Y, având trei brațe cu dimensiunea de 25 cm x 8 cm x 15 cm (lungime x lățime x înălțime). Diverse forme geometrice (pătrate, triunghiuri și cercuri) realizate din hârtie albă au fost folosite ca indici (stimuli) vizuali și au fost plasați pe pereții exteriori ai fiecărui braț, făcându-i vizibili din interiorul labirintului, iar zona rămasă a fost acoperită cu folie autoadezivă neagră. Acești indici vizuali au fost stabiliți anterior de Cognato *et al.* (2012) care au arătat că față de aceste forme geometrice, peștele nu prezintă semne de evitare sau preferință. În acvariu, s-au folosit 3 L din aceeași apă utilizată în acvariul de cazare, astfel încât indicii vizuali să fie acoperiți în totalitate.

Brațele labirintului au fost stabilite aleatoriu: brațul start (A) din care peștele a început testul, brațul deschis permanent (B) și brațul nou care a fost blocat în timpul testului inițial (antrenament) dar care a fost deschis în timpul celui de-al doilea test (C). Testul labirintului Y a fost desfășurat în două etape separate de un interval de o oră între acestea pentru a evalua răspunsul la noutate (peștele plasat în aparat atunci când brațul nou a fost deblocat) și memoria de recunoaștere spațială. Pe parcursul primei etape (sesiunea de antrenament), peștele a fost lăsat să exploreze brațul start și cel deschis timp de 5 minute, însă brațul nou a fost menținut închis. În a doua etapă (sesiunea de testare), peștii au fost plasați în brațul start și li s-a permis să acceseze toate cele trei brațe timp de 5 minute. A fost determinat timpul petrecut în brațul nou, împreună cu parametrii corespunzători activității locomotorii, cum ar fi distanța totală parcursă (m), viteza medie (m/s), unghiul de rotire ($^{\circ}$) și numărul de linii traversate.

4.2.3.3. Testul de recunoaștere a obiectului nou

Testul de discriminare a obiectului, cunoscut și sub denumirea de testul de recunoaștere spontană a obiectelor sau testul de recunoaștere a obiectului nou (NOR), este utilizat pentru a evalua capacitatea de a recunoaște un obiect nou în mediu, acesta fiind unul dintre cele mai populare paradigme utilizate pentru evaluarea memoriei (271). Acest test comportamental a fost efectuat într-un acvariu de sticlă de ~20 L cu dimensiunile de 30 cm x 30 cm x 30 cm (lungime x lățime x înălțime).

Toate loturile experimentale au fost supuse următoarelor etape: (1) sesiunea de habituație (T_0) în acvariul de testare (3 zile); (2) sesiunea de antrenament (T_1) în care animalele au fost expuse la două obiecte identice; (3) inducerea modelului și expunerea la tratament; și (4) sesiunea de testare (T_2) în care, după un interval de retenție de o oră, animalele au fost plasate înapoi în acvariul de testare și expuse la un obiect familiar (F) și unul nou (N) (272). În T_0 , animalele au fost plasate individual în acvariul de testare în absența obiectelor timp de 5 minute, de două ori pe zi (interval de 5 ore între sesiunile de habituație) și timp de 3 zile consecutive. În a patra zi, în T_1 , animalele au fost expuse la două obiecte identice (de aceeași culoare) timp de 10 minute. După antrenament,

animalele au fost supuse unui interval de retenție de o oră, timp în care s-a indus modelul animal al AD și s-a administrat tratamentul. În T₂, unul dintre obiectele identice a fost înlocuit cu un obiect de culoare diferită și timpul de explorare a fost evaluat timp de 10 minute. În T₂, a fost evaluat timpul de explorare al fiecărui obiect (%). Procentele de preferință au fost calculate după următoarea formulă: $[\text{timpul de explorare N} / (\text{timpul de explorare F} + \text{timpul de explorare N})] \times 100$ (272,273). Scorurile mai mari de 50% indică o preferință relativă pentru N, sub 50% indică o aversiune relativă pentru N și un scor de 50% nu indică nicio preferință pentru N comparativ cu F.

4.3. Evaluarea parametrilor biochimici din probele de creier prelevate de la animalele de laborator tratate cu nicotină și derivați nicotinici

4.3.1. Eutanasierea animalelor și prelevarea probelor de țesut cerebral

După efectuarea testelor comportamentale, toți șobolanii au fost profund anesteziați cu o supradoză de pentobarbital de sodiu (150 mg/kg, g.c., i.p.) și decapitați, creierul întreg fiind îndepărtat. Hipocampul a fost precis excizat. Probele de hipocamp au fost cântărite (~0,3 mg) și omogenizate individual timp de 2 minute la 200 rpm, pe gheață în soluție tampon de extracție (soluție tampon fosfat de potasiu 0,1 M, pH 7,4 cu KCl 1,15% preparată conform indicațiilor din subcapitolul 4.4.2.) în raport 1:10, w/v utilizând un omogenizator Potter (Heidolph Instruments, Schwabach, Germania) cuplat cu un mixer Cole-Parmer Servodyne (Cole-Parmer Instrument Co., Chicago, IL, SUA). Omogenatul a fost centrifugat (15 minute la 14000 rpm), iar supernatantul a fost utilizat ulterior pentru determinarea conținutului total de proteine, evaluarea activității specifice a superoxid-dismutazei (SOD), catalazei (CAT), glutation peroxidazei (GPX) și acetilcolinesterazei (AChE) și estimarea conținutului total de glutation redus (GSH), malondialdehidă (MDA) și proteine carbonilate.

În ceea ce privește peștii zebură, la scurt timp după efectuarea testelor comportamentale, aceștia au fost eutanasiați prin răcire rapidă. Metoda a necesitat scăderea temperaturii apei până la 2-4°C prin adăugarea de gheață (5 părți gheață și 1 parte apă) și prin împiedicarea peștilor de a atinge gheața înainte de a deveni inconștienți (274,275). După eutanasiere, peștii zebură au fost disecați conform procedurii descrise de Gupta și Mullins (2010). Peștii au fost preluați din apa rece și transferați pe un suport de disecție unde au fost uscați prin tamponare cu un prosop de hârtie. Peștii au fost decapitați, capetele fiind mai departe supuse unei disecții precise în soluție tampon fosfat salin (PBS) 1X, pH 7,4 (soluția a fost preparată conform indicațiilor din subcapitolul 4.4.2.). Creierul întregi au fost prelevate în microeprubete de 0,5 ml. În testele biochimice, trei creiere de pește zebură au fost considerate ca fiind o singură probă. Țesutul cerebral (3 creiere) a fost cântărit (~15 mg) și omogenizat (1:10, w/v) timp de 1 minut la 1000 rpm, pe gheață, în soluție tampon de extracție (soluție tampon fosfat de potasiu 0,1 M, pH 7,4 cu 1,15% KCl, preparată conform indicațiilor din subcapitolul 4.4.2.) cu ajutorul morii Mikro-Dismembrator U (Sartorius, New York, SUA) dotată cu bile magnetice cu diametrul de 3 mm (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Goettingen,

Germania). Omogenatul a fost centrifugat (15 minute, 14000 rpm, 4°C) pentru clarificare, iar supernatantul a fost utilizat ulterior pentru determinarea conținutului total de proteine, evaluarea activității specifice a enzimelor SOD, CAT, GPX și AChE și estimarea conținutului total de GSH, MDA și proteine carbonilate.

4.3.2. Determinarea concentrației de proteine solubile

Determinarea proteinelor este una dintre cele mai frecvente operații efectuate în cercetarea biochimică. Principiul testului acidului bicinconinic (BCA) a fost descris pentru prima dată de Smith *et al.* (1985) și este similar cu cel al procedurii lui Lowry, deoarece ambele metode se bazează pe formarea complexului Cu^{2+} -proteină în condiții alcaline urmată de reducerea Cu^{2+} la Cu^{1+} . Cantitatea de Cu^{2+} redus este proporțională cu cantitatea de proteină prezentă.

4.3.3. Determinarea activității superoxid-dismutazei

Activitatea superoxid-dismutazei (SOD, EC 1.15.1.1) a fost determinată pe baza protocolului descris de Winterbourn *et al.* în 1975 și adaptat de Arteni *et al.* în 2008. Pe scurt, s-a monitorizat capacitatea enzimei de a inhiba reducerea Nitro Blue Tetrazoliului (NBT) de către radicalii liberi de superoxid care au fost generați în mediul de reacție prin fotoreducerea riboflavinei.

4.3.4. Determinarea activității catalazei

Pentru determinarea activității catalazei (CAT, EC 1.11.1.6) am utilizat o metodă colorimetrică simplă descrisă de Sinha în anul 1972. Această metodă se bazează pe faptul că bicromatul de potasiu este redus în mediu acid (acid acetic) la acetat cromic în prezența căldurii și a apei oxigenate (H_2O_2). Acetatul cromic produs astfel, va fi determinat spectrofotometric la 570 nm. Extractul catalazic va fi lăsat să acționeze asupra apei oxigenate o perioadă fixă de timp, reacția fiind ulterior oprită prin adăugarea soluției de bicromat de potasiu în acid acetic glacial. Cantitatea de apă oxigenată care va rămâne nedescompusă după oprirea reacției enzimatice va reduce bicromatul de potasiu la acetat cromic care va fi măsurat spectrofotometric la 570 nm (279).

4.3.5. Determinarea activității glutation peroxidazei

Glutation peroxidaza (GPX, E.C. 1.11.1.9) este o peroxidază descoperită în plasma sanguină, eritrocite și alte țesuturi (creier, mușchi, ficat, etc.). Activitatea acestei enzime a fost evaluată prin utilizarea protocolului descris de Fukuzawa și Tokumura în 1976. Glutation peroxidaza catalizează descompunerea peroxidului de hidrogen (H_2O_2) cu participarea glutationului redus în calitate de reducător, rezultând astfel glutation oxidat (GSSG) și apă. Glutationul redus rămas în exces reacționează cu DTNB formând un complex galben. Intensitatea culorii va fi măsurată spectrofotometric, întrucât diferența dintre cantitatea inițială și cea finală este direct proporțională cu activitatea enzimatică (279). Activitatea enzimatică a fost exprimată ca unități/mg proteină.

4.3.6. Determinarea activității acetilcolinesterazei

Pentru determinarea activității acetilcolinesterazei (AChE, E.C. 3.1.1.7) din omogenate, s-a utilizat metoda fotometrică descrisă de Ellman *et al.* în 1961. Activitatea enzimatică a fost măsurată prin monitorizarea formării culorii galbene produsă din reacția dintre tiocolină și acid 5-5'-ditiobis-(2-nitrobenzoic) (DTNB). Enzima acționează asupra acetiltiocolinei, formându-se în mediu tiocolină și acetat. Tiocolina rezultată reacționează rapid cu DTNB din mediul de reacție și duce la formarea anionului 5-tio-2-nitrobenzoat de culoare galbenă. Metoda este des utilizată pentru a determina activitatea enzimei din eritrocite și omogenate din țesuturi cerebrale, rinichi, plămâni, ficat și țesut muscular.

4.3.7. Determinarea conținutului de glutatation redus

În general, glutatationul este un tripeptid și este considerat a fi cea mai importantă formă de depozitare și transport de sulf redus. Glutatationul este un component esențial al sistemului celular antioxidant de apărare și este implicat direct în menținerea homeostaziei redox-ului celular și a concentrațiilor scăzute de ROS. Pentru determinarea conținutului de glutatation redus, s-a aplicat metoda folosită de Salbitani *et al.* (2015).

4.3.8. Determinarea nivelului de malondialdehidă

Malondialdehida (MDA), compus organic considerat a fi unul din cei mai importanți indicatori ai peroxidării lipidice a acizilor grași polinesaturați, este principalul produs al conversiei acidului arahidonic în prostaglandină E2 de către ciclooxygenaza 1 sau 2 (284). MDA reacționează cu doi echivalenți ai TBA și formează un complex roșu fluorescent (MDA-TBA2) care poate fi ușor de cuantificat spectrofotometric (285). În acest studiu, nivelul de MDA a fost cuantificat din țesutul animal folosind un protocol pe bază de HPLC-RP care a fost adaptat anterior de Vaideș-Negustor și Mihășan (2020).

4.3.9. Determinarea conținutului de proteine carbonilate

Conținutul de proteine carbonilate este frecvent utilizat ca un marker pentru stresul oxidativ și pentru a măsura deteriorarea oxidativă. Metodele utilizate pe scară largă pentru determinarea proteinelor carbonilate se bazează pe reacția grupărilor carbonil cu 2,4-dinitrofenilhidrazină (DNPH) în vederea formării de 2,4-dinitrofenilhidrazone legate de proteine. Hidrazonile pot fi cuantificate spectrofotometric sau, pentru o sensibilitate mai mare, pot fi detectate imunochimic cu anticorpi anti-dinitrofenil (286). Metoda care a fost utilizată în acest studiu pentru a cuantifica proteinele carbonilate a fost descrisă de Oliver *et al.* în 1987 și modificată de Luo și Wehr, (2009).

4.4. Evaluarea expresiei genice a unor markeri moleculari prin RT-qPCR

În cadrul acestui studiu, a fost evaluat impactul NIC și a derivaților nicotinici asupra expresiei genelor *Arc*, *Bdnf* și *Il-1β* la șobolani și a genelor *npv*, *bdnf*, *egr1* și *nrf2a* la peștii zebură, prin RT-qPCR.

4.4.1. Extracția ARN-ului total din probele de creier prelevate de la animalele de laborator

4.4.1.1. Extracția ARN-ului total din probele de creier prelevate de la șobolani

După eutanasierea șobolanilor, creierul întregi au fost preluate și supuse unei excizii precise, păstrându-se doar hipocampusul. Cele două regiuni cerebrale au fost introduse în soluție de stocare a țesutului pentru stabilizarea ARN-ului RNA Save (Biological Industries, CT, SUA) și păstrate la - 80°C. Din aceste probe de țesut, a fost purificat ARN-ul total necesar pentru evaluarea expresiei genelor *arc*, *bdnf* și *il1β*. ARN-ul a fost extras utilizând kitul ARN SV Total RNA Isolation System (Promega, Madison, SUA) urmând indicațiile producătorului.

4.4.1.2. Extracția ARN-ului total din probele de creier prelevate de la pești zebură

După eutanasierea peștilor zebură și în urma disecției, creierul întregi au fost introduse în soluția de stocare a țesutului pentru stabilizarea ARN-ului RNA Save (Biological Industries, CT, SUA) și păstrate la - 80°C. Din aceste probe de țesut, a fost purificat ARN-ul total necesar pentru evaluarea expresiei genelor *npv*, *bdnf*, *egr1* și *nrf2a*. ARN-ul a fost extras utilizând kitul ARN Maxwell® 16 Tissue LEV Total RNA Purification Kit (Promega, Madison, SUA) urmând indicațiile producătorului.

4.4.2. Tehnica RT-qPCR și cuantificarea nivelurilor de expresie

Revers transcriptia și amplificarea au fost efectuate într-o singură etapă de reacții de amplificare utilizând kit-ul GoTaq® 1-Step RT-qPCR conform indicațiilor producătorului.

4.5. Analiza statistică a datelor experimentale

Analizele statistice au fost realizate folosind programul GraphPad Prism v8.3 (La Jolla, CA, SUA). Toate datele au fost exprimate ca medii ± eroarea standard a mediei (S.E.M.). Diferențele semnificative statistic dintre grupuri au fost identificate folosind analiza varianței (ANOVA) uni- sau bidirecțională, urmată de testul Tukey *post hoc* pentru comparații multiple. O diferență statistic semnificativă a fost considerată pentru un prag de semnificație statistic (p) mai mic de 0,05 ($p < 0,05$). Coeficientul de corelație a lui Pearson (r) a fost utilizat pentru a corela parametrii comportamentali, biochimici și genetici.

CAPITOL 5. REZULTATE ȘI DISCUȚII

5.1. Efectele cognitive ale nicotinei și derivaților nicotinici asupra modelului amiloidic al bolii Alzheimer indus de peptida A β_{25-35}

5.1.1. Efectele nicotinei, cotininei și 6-hidroxi-L-nicotinei asupra memoriei de scurtă durată și activității locomotorii în testul labirintului Y

Comportamentul de alternare spontană reflectă memoria spațială de lucru, care este o formă a memoriei de scurtă durată. Memoria de recunoaștere spațială a fost reprezentată grafic prin procentul de alternare spontană. La finalul testului labirintului Y, s-a constatat că animalele tratate doar cu A β_{25-35} prezintă o diminuare semnificativă ($p < 0,0001$) a procentului de alternare spontană în comparație cu șobolanii din lotul de control și din cel tratat cu 5 mg/kg de DNP, sugerându-se astfel o scădere a performanței memoriei de recunoaștere spațială (Fig. 5.6). Inhibitorul de AChE, DNP, este un agent terapeutic prescris în mod obișnuit pacienților care suferă de AD pentru a îmbunătăți cogniția (288) și a fost utilizat în studiul de față ca și control pozitiv. Conform figurii 5.6., putem observa că ambele doze de NIC, în special cea de 0,3 mg/kg, au ameliorat deficitul cognitiv indus de peptida A β_{25-35} , crescând procentul de alternare spontană (289). În ceea ce privește 6HLN, doar doza de 0,3 mg/kg a crescut procentul de alternare spontană la șobolanii tratați cu A β_{25-35} ($p < 0,001$) (289). De asemenea, s-a înregistrat o creștere ușoară a acestui parametru și în cazul dozei de 0,7 mg/kg, însă comparativ cu lotul tratat doar cu A β_{25-35} , diferența nu a fost semnificativă din punct de vedere statistic. Administrarea COT a îmbunătățit semnificativ memoria spațială a șobolanilor tratați cu A β_{25-35} într-o manieră dependentă de doză ($p < 0,001$ și $p < 0,0001$ pentru doza de 0,3 și respectiv 0,7 mg/kg) (289). Comparând cele trei tratamente între ele, memoria a fost îmbunătățită în aceeași măsură atunci când a fost utilizată doza de 0,3 mg/kg. În ceea ce privește doza de 0,7 mg/kg, COT s-a dovedit a fi mai eficientă decât 6HLN în a ameliora memoria de recunoaștere spațială la șobolani ($p < 0,001$).

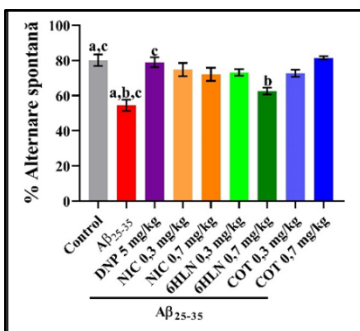


Figura 5.1. Efectele administrării NIC, COT și 6HLN (0,3 și 0,7 mg/kg, i.p., g.c.) la șobolanii tratați cu A β_{25-35} asupra procentului de alternare spontană în testul labirintului

Y. Valorile sunt exprimate ca medii $\pm$ S.E.M. (n=6 animale pe lot). Analiza ANOVA unidirecțională a identificat diferențe semnificative generale între loturi $F(8,45)=9,897$, $p<0,0001$.

5.1.2. Efectele nicotinei, cotininei și 6-hidroxi-L-nicotinei asupra memoriei de recunoaștere în testul de recunoaștere a obiectului nou

Deficitul memoriei de recunoaștere la șobolanii tratați i.c.v. cu peptida $A\beta_{25-35}$ a fost demonstrat prin reducerea semnificativă a DI comparativ cu animalele din lotul de control ($p<0,0001$, Fig. 5.7.A). Acest lucru sugerează că șobolanii tratați doar cu $A\beta_{25-35}$ au petrecut mai puțin timp explorând obiectul nou comparativ cu cei din lotul de control. Administrarea acută de DNP 5 mg/kg șobolanilor tratați cu $A\beta_{25-35}$ a normalizat valoarea DI. În ceea ce privește tratamentul cronic cu NIC, 6HLN și COT, s-a observat că pentru fiecare compus, doza de 0,3 mg/kg a fost mai eficientă decât cea de 0,7 mg/kg în determinarea unei creșteri semnificative puternice ($p<0,0001$ vs. $A\beta_{25-35}$) a DI, indicându-se astfel o ameliorare a deficitului cognitiv cauzat de $A\beta_{25-35}$ până la obținerea unor valori similare cu cele ale grupului de control (Fig. 5.7.A) (289).

Un procent din timpul petrecut pentru explorarea obiectului nou în raport cu timpul total petrecut explorând ambele obiecte poate fi o măsură de recunoaștere a obiectului nou. Acest concept este reprezentat de RI și este indicele principal al retenției. În urma măsurării RI, nu s-au obținut diferențe semnificative generale între loturile experimentale (Fig. 5.7.B). Cu toate acestea, o creștere ușoară a acestui parametru a fost identificată la utilizarea dozei de 0,3 mg/kg de NIC, COT și 6HLN la șobolanii tratați cu $A\beta_{25-35}$, însă datele nu au fost semnificative din punct de vedere statistic (Fig. 5.8.B) (289).

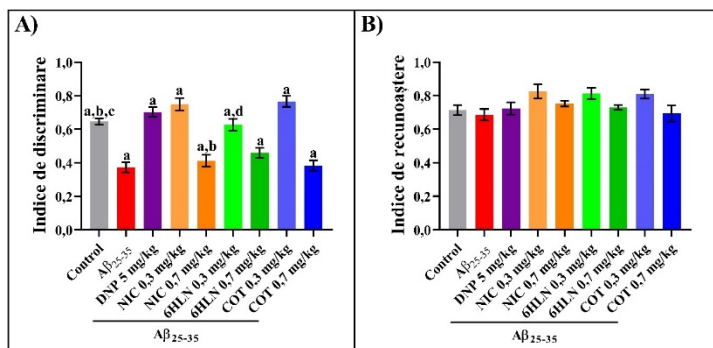


Figura 5.2. Efectele administrării NIC, COT și 6HLN (0,3 și 0,7 mg/kg, i.p., g.c.) la șobolanii tratați cu $A\beta_{25-35}$ asupra (A) DI și (B) RI în testul NOR. Valorile sunt exprimate ca medii $\pm$ S.E.M. (n=6 animale pe lot). Analiza ANOVA unidirecțională a identificat diferențe semnificative generale între loturi doar pentru (A) $F(8,45)=26,17$, $p<0,0001$.

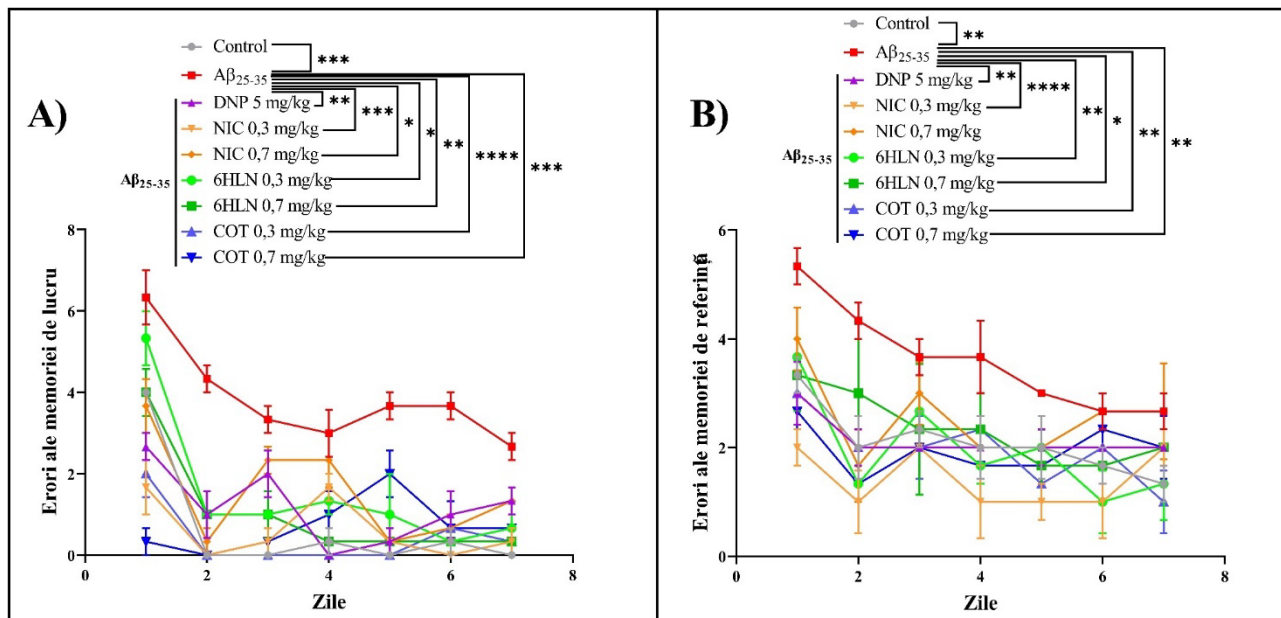


Figura 5.3. Efectele administrării dozelor de 0,3 și 0,7 mg/kg de NIC, 6HLN și COT la șobolanii tratați cu A β_{25-35} asupra erorilor memoriei de lucru (A) și de referință (B) în testul RAM. Valorile au fost exprimate ca medii $\pm$ SEM (n=6). ANOVA bidirecțională a identificat diferențe semnificative generale pentru (A) $F(8,54)=5,570$, $p<0,0001$ și (B) $F(8,54)=5,431$, $p<0,0001$.

5.1.3. Efectele nicotinei, cotininei și 6-hidroxi-L-nicotinei asupra memoriei spațiale în testul labirintului cu brațe radiale

După cum se poate observa în Fig. 5.8.A, infuzia i.c.v. a peptidei $A\beta_{25-35}$ a determinat o creștere semnificativă ($p<0,001$) a numărului de erori ale memoriei de lucru comparativ cu lotul de control, sugerând astfel o deteriorare a memoriei de scurtă durată a șobolanilor. Similar, dar într-o măsură mai mică, peptida $A\beta_{25-35}$ a cauzat, de asemenea, o deteriorare a memoriei de lungă durată prin creșterea semnificativă ($p<0,01$) a numărului de erori ale memoriei de referință (Fig. 5.8.B). Cu toate acestea, administrarea acută a DNP (5 mg/kg, g.c., i.p.) a îmbunătățit semnificativ ($p<0,01$) atât memoria pe termen scurt, cât și cea pe termen lung, la șobolanii tratați cu suspensie de $A\beta_{25-35}$ (289).

Conform figurii 5.8.A, doza de 0,3 mg/kg s-a dovedit a fi mult mai eficientă decât cea de 0,7 mg/kg în a reduce numărul de erori ale memoriei de lucru atunci când NIC a fost administrată cronic șobolanilor tratați în prealabil cu $A\beta_{25-35}$. Mai mult decât atât, doza de 0,3 mg/kg de NIC, dar nu și cea de 0,7 mg/kg, a redus semnificativ ($p<0,0001$) numărul erorilor memoriei de referință la șobolanii tratați cu $A\beta_{25-35}$, sugerându-se astfel o îmbunătățire a memoriei pe termen lung (Fig. 5.8.B) (289).

În ceea ce privește 6HLN, s-a observat o relație doză-răspuns a tratamentului asupra memoriei pe termen scurt atunci când a fost administrată în combinație cu $A\beta_{25-35}$, ambele doze reducând semnificativ numărul de erori ale memoriei de lucru față de controlul negativ ($p<0,05$ pentru doza de 0,3 mg/kg și $p<0,01$ pentru cea de 0,7 mg/kg, Fig. 5.8.A). În cazul memoriei de lungă durată, doza de 0,7 mg/kg de 6HLN s-a dovedit a fi mai eficientă decât cea de 0,3 mg/kg în a reduce numărul erorilor memoriei de referință la șobolanii tratați cu suspensie de $A\beta_{25-35}$ (Fig. 5.8.B) (289).

În cazul administrării cronice a COT la șobolanii injectați i.c.v. cu $A\beta_{25-35}$, comparația *post hoc* a indicat că ambele doze au micșorat semnificativ atât numărul de erori ale memoriei de lucru ($p<0,0001$ pentru doza 0,3 mg/kg și $p<0,001$ pentru cea de 0,7 mg/kg, Fig. 5.8.A) cât și numărul erorilor memoriei de referință ($p<0,01$ pentru ambele doze, Fig. 5.8.B), ameliorând astfel efectul amnezic al peptidei $A\beta_{25-35}$ (289).

5.1.4. Efectele nicotinei, cotininei și 6-hidroxi-L-nicotinei asupra anxietății în testul labirintului în cruce suspendat

Tendința naturală a șobolanilor din lotul de control este aceea de a petrece mai mult timp și de a pătrunde de mai multe ori în brațele închise ale labirintului comparativ cu cele deschise. Conform figurii 5.9.B, șobolanii tratați cu $A\beta_{25-35}$ au accesat de puține ori brațele deschise ale labirintului în cruce suspendat comparativ cu animalele din lotul de control ($p<0,05$), sugerându-se astfel că o stare similară anxietății indusă de $A\beta_{25-35}$. Controlul pozitiv, reprezentat de șobolani la care s-a co-administrat $A\beta_{25-35}$ și BSP 1 mg/kg, au prezentat o creștere semnificativă ($p<0,05$) a numărului de intrări în brațele deschise comparativ cu controlul negativ.

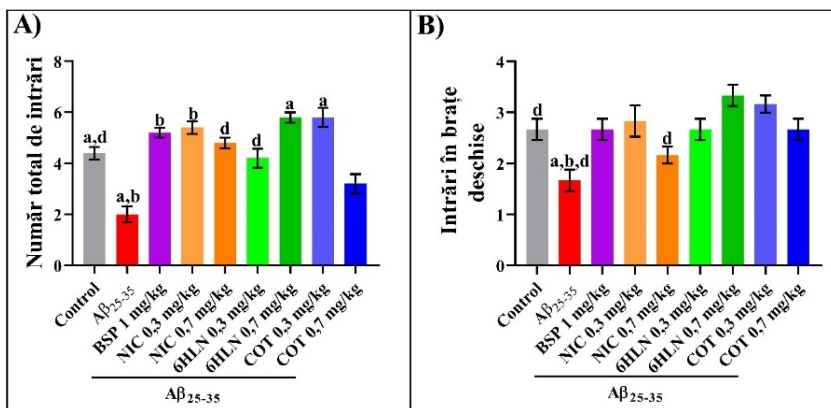


Figura 5.4. Efectul administrării cronice a dozelor de 0,3 și 0,7 mg/kg de NIC, 6HLN și COT la șobolanii tratați cu Aβ₂₅₋₃₅ asupra numărului total de intrări (A) și a intrărilor în brațele deschise (B) în cadrul testului EPM. Valorile sunt exprimate ca medii ± S.E.M. (n=6 animale pe lot). ANOVA unidirecțională a identificat diferențe semnificative generale între condițiile experimentale pentru (A) F(8,36)=18,95, p<0,0001 și (B) F(8,45)=5,317, p<0,001.

Administrarea dozei de 0,3 mg/kg de NIC la șobolanii tratați cu Aβ₂₅₋₃₅ a determinat un efect anxiolitic, întrucât NIC a crescut numărul de intrări în brațele deschise. Cu toate acestea, în cazul dozei mai mari de NIC, nu a fost înregistrată o diferență semnificativă față de controlul negativ (Fig. 5.9.B). De asemenea, rezultatele noastre au indicat că administrarea ambelor doze de 6HLN, în special cea de 0,7 mg/kg, la șobolanii tratați cu Aβ₂₅₋₃₅ determină o activitate mai intensă a animalelor în brațele deschise ale labirintului comparativ cu șobolanii tratați doar cu Aβ₂₅₋₃₅ (p<0,05 și p<0,0001 pentru doza de 0,3 și respectiv 0,7 mg/kg, Fig. 5.9.B). În ceea ce privește COT, doza de 0,3 mg/kg administrată la șobolanii tratați cu Aβ₂₅₋₃₅ a determinat o creștere semnificativă (p<0,001) a numărului de intrări în brațele deschise ale EPM. Pe de altă parte, doza superioară de COT a crescut același parametru dar într-o măsură mai mică (p<0,05, Fig. 5.9.B).

5.1.5. Efectele nicotinei, cotininei și 6-hidroxi-L-nicotinei asupra anxietății în testul în câmp deschis

OFT a fost aplicat și pentru a evalua impactul tratamentului asupra stării similare anxietății indusă de Aβ₂₅₋₃₅. În acest sens, s-a înregistrat timpul de staționare al animalelor în arenă precum și numărul de elongații efectuate de acestea. Infuzia cerebrală a peptidei Aβ₂₅₋₃₅ a declanșat o stare de anxietate similară cu cea întâlnită în AD, aceasta determinând o creștere semnificativă a timpului de imobilitate (Fig. 5.10.A) a animalelor precum și un număr scăzut de elongații (Fig. 5.10.B) față de control. Conform figurii 5.10.A, administrarea cronică a NIC, în special a dozei de 0,3 mg/kg, a

indus un efect anxiolitic la șobolanii tratați i.c.v. cu $A\beta_{25-35}$, reducând timpul de staționare al animalelor în arena centrală ($p<0,01$ și $p<0,05$ pentru doza de 0,3 și respectiv 0,7 mg/kg). În plus, ambele doze de NIC au crescut și numărul elongații efectuate de animale (Fig. 5.10.B). De asemenea, tratamentul cu 6HLN a determinat un efect anxiolitic mai pronunțat decât cel al NIC, diminuând semnificativ timpul de staționare (Fig. 5.10.A) al animalelor în câmpul deschis și a mărinnd numărul de elongații al acestora (Fig. 5.10.B).

În ceea ce privește tratamentul cu COT, doza de 0,3 mg/kg s-a dovedit a fi mai eficientă decât cea de 0,7 mg/kg în a reduce timpul de staționare al animalelor (Fig. 5.10.A). În plus, șobolanii tratați cu COT au prezentat și un număr mai mare de elongații efectuate comparativ cu animalele din controlul negativ ($p<0,0001$ și $p<0,05$ pentru doza de 0,3 și respectiv 0,7 mg/kg, Fig. 5.10.B). Rezultatele obținute indică faptul că NIC și derivații nicotinici acționează ca agenți anxiolitici la modelul de șobolan al AD indus de peptida $A\beta_{25-35}$ reducând anxietatea în OFT.

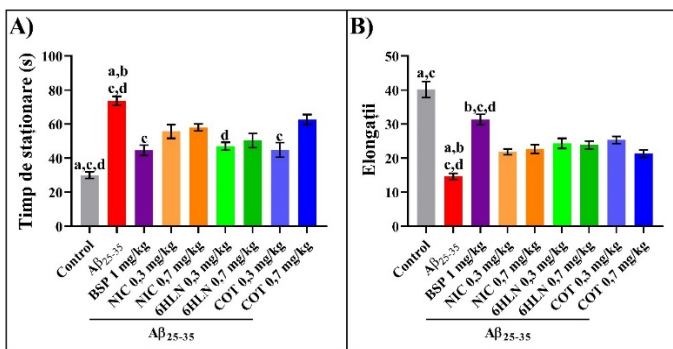


Figura 5.5. Efectele administrării i.p. a dozelor de 0,3 și 0,7 mg/kg de NIC, 6HLN și COT asupra (A) timpului de staționare și a (B) numărului de elongații, evaluate în OFT. Valorile sunt exprimate ca medii $\pm$ S.E.M. ($n=6$ animale pe lot). ANOVA a identificat diferențe semnificative generale între condițiile experimentale pentru (A) $F(8,45)=15,55$, $p<0,0001$ și (B) $F(8,45)=27,29$, $p<0,0001$.

5.1.6. Efectele nicotinei, cotininei și 6-hidroxi-L-nicotinei asupra stării similare depresiei în testul înotului forțat

În cadrul acestui experiment, FST a fost utilizat pentru a evalua efectele administrării cronice de NIC, 6HLN și COT în doze de 0,3 și 0,7 mg/kg asupra stării asemănătoare depresiei la modelul de șobolan al AD indus prin infuzia i.c.v. a peptidei $A\beta_{25-35}$. După cum se poate observa în figura 5.11., infuzia i.c.v. a peptidei $A\beta_{25-35}$ la șobolanii normali din rasa Wistar a indus comportamentul tipic depresiei prin scăderea semnificativă a timpului de înot și implicit prin creșterea timpului de imobilitate în comparație cu animalele din lotul de control ($p<0,0001$) și din lotul tratat cu o combinație între $A\beta_{25-35}$ și imipramină (IMP) 1 mg/kg ($p<0,0001$). Lotul tratat cu $A\beta_{25-}$

și IMP a fost utilizat ca un control pozitiv întrucât IMP este un antidepresiv triciclic și este considerat ca tratament farmacologic pentru depresie (290). Administrarea tratamentului cronic cu doze de 0,3 și 0,7 mg/kg de NIC, 6HLN și COT șobolanilor tratați cu $A\beta_{25-35}$ au determinat o creștere semnificativă puternică a timpului de înot și simultan o scădere a timpului de imobilitate în cadrul FST, comparativ cu animalele din lotul tratat doar cu $A\beta_{25-35}$ ($p < 0,0001$, Fig. 5.11.), sugerându-se astfel un efect antidepresiv al tratamentului utilizat. Mai mult decât atât, comparând tratamentele între ele, s-a observat că 6HLN și COT prezintă un efect antidepresiv similar și mai accentuat decât al NIC în cazul ambelor doze.

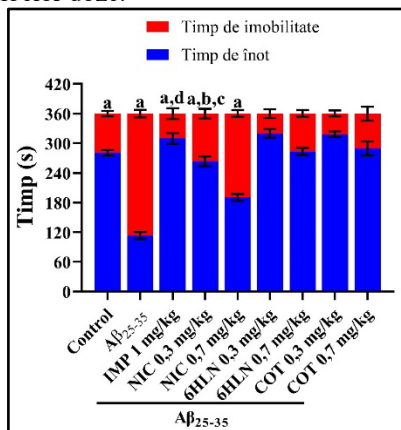


Figura 5.6. Efectele administrării cronice de NIC, 6HLN și COT, în doze de 0,3 și 0,7 mg/kg, asupra timpului de înot și de imobilitate în testul FST. Valorile sunt exprimate ca medii $\pm$ S.E.M. (n=6 animale pe lot). ANOVA bidirecțională a identificat diferențe semnificative generale între condițiile experimentale $F(8,90)=117,8$, $p < 0,0001$.

5.2. Andocarea moleculară a nicotinei și a derivaților nicotinici la receptorii nicotinici ai acetilcolinei

5.2.1. Andocarea moleculară la receptorul AChBP

Subtipul $\alpha 7$ al receptorilor nAChRs este exprimat intens în hipocamp și este implicat în funcțiile cognitive ale SNC, cum ar fi formarea memoriei, iar modularea acestora devine o abordare terapeutică pentru tulburările cognitive, inclusiv AD (291). În creierul afectat de AD, nivelul de ACh este limitat, iar pierderea receptorilor $\alpha 7$ nAChRs din hipocamp a fost corelată cu pierderea progresivă a funcțiilor cognitive (291,292). S-a demonstrat că multe caracteristici ale efectelor pro-cognitive ale NIC și potențialul său de îmbunătățire a memoriei sunt mediate prin intermediul receptorilor $\alpha 7$ nAChRs (291).

În acest studiu, am evaluat potențialul de legare al NIC și a celor doi derivați nicotinici similari din punct de vedere structural, COT și 6HLN, în situsul de legare al

receptorului AChBP. Ca și în cazul receptorilor nAChRs, situsurile de atașare a ligandului se găsesc la interfața dintre două subunități și sunt complet cufundate în proteină. Pentru a simplifica procesul de andocare, au fost păstrate doar acele subunități care formează situsul de legare al NIC (denumit situs AChBP). Cubul de căutare a fost centrat pe un atom al moleculei de NIC native și a cuprins toți aminoacizii implicați în atașarea ligandului.

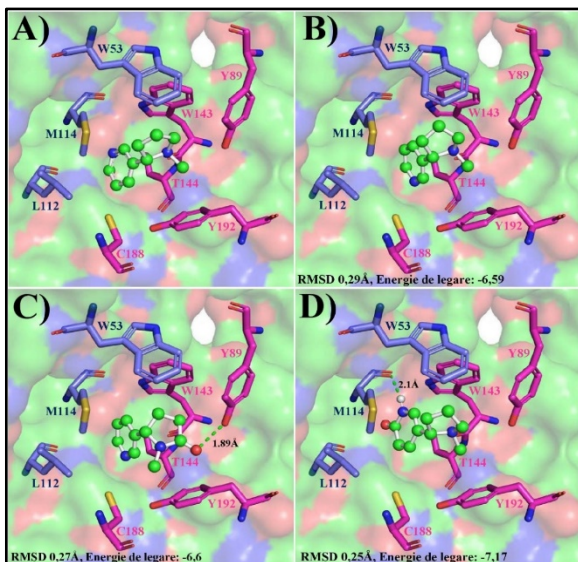


Figura 5.7. Poziția nativă a moleculei de NIC la interfața dintre două subunități identice ale receptorului AChBP (1UW6) (A) și cele mai bune poziții teoretice de atașare a (S)-nicotinei (B), (S)-cotininei (C) și (S)-6-hidroxinicotinei (D). Liganzii sunt reprezentați sub formă de bile și bastonașe, reziduurile care formează situsul de legare al NIC sunt reprezentate ca bastonașe (reziduurile cu catena laterală colorată cu magenta aparțin subunității principale în timp ce reziduurile cu catena laterală colorată cu albastru închis aparțin subunității complementare), legăturile de hidrogen sunt reprezentate ca linii punctate verzi, iar restul receptorului este afișat ca suprafață moleculară (289).

În urma andocării, s-au obținut un număr de 50 de conformații de legare posibile pentru fiecare ligand. Dintre acestea, s-au păstrat cele mai bune trei poziții de legare ale liganzilor testați. Pentru fiecare conformație obținută, s-a calculat potențialul (energia) de legare, eficiența ligandului, precum și valoarea RMSD a pozițiilor atomice.

Tabel 5.1. Rezultatele de andocare pentru cele mai bune trei poziții de legare ale liganzilor utilizând ca receptor AChBP

Receptor	Ligand	RMSD (Å)	Energie de legare	Eficiența ligandului
AChBP (PDB ID 1UW6)	(S)-nicotină (CID 89594)	0,46	-7,05	-0,59
		0,45	-6,95	-0,58
		0,29	-6,59	-0,55
	(R)-nicotină (CID 157672)	0,36	-6,88	-0,57
		0,37	-6,79	-0,57
		0,57	-6,77	-0,56
	(S)-cotinină (CID 854019)	0,27	-6,6	-0,51
		0,5	-6,56	-0,5
		0,56	-6,46	-0,5
	(R)-cotinină (CID 21907)	0,6	-6,55	-0,5
		0,44	-6,47	-0,5
		0,42	-6,42	-0,49
	(S)-6-hidroxicotină (CID 439383)	0,33	-7,2	-0,55
		0,27	-7,18	-0,55
		0,25	-7,17	-0,55
	(R)-6-hidroxicotină (CID 439886)	0,64	-7,34	-0,56
		0,5	-7,34	-0,56
		0,65	-7,32	-0,56

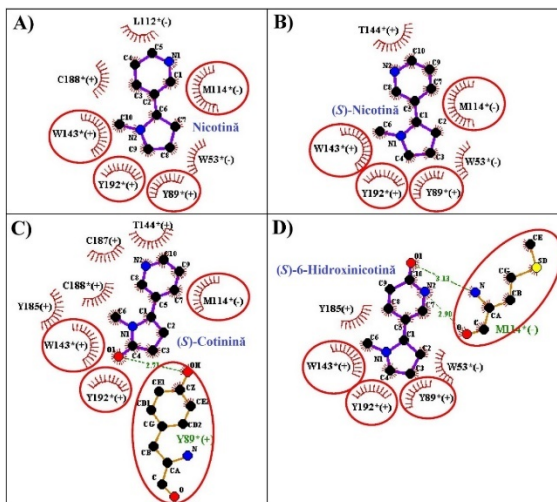


Figura 5.8. Diagramă schematică a interacțiunilor dintre reziduurile situsului de legare pentru NIC a receptorului AChBP și NIC (A), (S)-nicotină (B), (S)-cotinină (C) și (S)-6-hidroxinicotină (D). Reziduurile marcate cu * sunt comune cu cele descrise în literatură și reziduurile încercuite sunt comune pentru toți liganzii selectați. Interacțiunile hidrofobe dintre reziduuri și atomii corespunzători ai liganzilor precum și legăturile de hidrogen sunt ilustrate conform programului Ligplot+ (289).

În primul rând, (S)-nicotina a fost andocată în situsul de legare și comparată cu orientarea sa observată experimental de Celie *et al.* (2004) (Fig. 5.12.A). Potrivirea foarte bună între orientarea obținută computațional a (S)-nicotinei cu cea determinată experimental (RMSD de 0,29 Å pentru 12 atomi suprapuși ai ligandului (Tabel 5.1., Fig. 5.12.B) indică faptul că metoda de andocare utilizată este corectă (289).

În continuare, (S)-cotinina și (S)-6-hidroxinicotina au fost andocați în situsul de legare al receptorului AChBP, iar orientarea și afinitatea (exprimată ca energie de legare) acestora au fost comparate cu datele obținute experimental pentru NIC. Poziția de legare teoretică a (S)-cotininei a fost diferită în comparație cu cea a NIC (RMSD de 0,27 Å pentru 9 atomi suprapuși, dintre care doar 6 s-au potrivit perfect). Mai mult decât atât, acest compus a prezentat o energie de legare similară cu cea a (S)-nicotinei (-6,6 pentru COT și -6,59 pentru NIC, Tabel 5.1.) și ADT a identificat o legătură de hidrogen (lungime de 1,89 Å) formată între gruparea hidroxil a COT și reziduul Y89 localizat pe subunitatea principală a receptorului AChBP (Fig. 5.12.C). (S)-6-Hidroxinicotina a prezentat o orientare similară în cavitatea de legare a receptorului AChBP cu cea observată experimental pentru NIC, rezultând un RMSD de 0,25 Å pentru 12 atomi suprapuși ai ligandului. În plus, rezultatele noastre au indicat o energie de legare mai mică a (S)-6-hidroxinicotinei (energie de legare teoretică de -7,17) comparativ cu (S)-nicotina (energie de legare teoretică de -6,59), sugerând astfel o afinitate mai mare a

6HLN în situsul de legare al receptorului AChBP decât NIC (Tabel 5.1.). De asemenea, ADT a identificat o legătură de hidrogen (lungime de 2,1 Å) formată între (S)-6-hidroxinicotină și reziduul M114 localizat pe subunitatea complementară a receptorului AChBP (Fig. 5.12.D) (289).

Analiza interacțiunilor ligand-receptor a demonstrat că toți liganzii intră în contact cu reziduurile Y89, W143 și Y192 localizate pe subunitatea principală (+) și cu reziduul M114 localizat pe subunitatea complementară (-) (Fig. 5.13.). Aceste rezultate indică faptul că 6HLN și COT s-ar putea lega de receptorii $\alpha 7$ nAChRs cu o afinitate similară sau mai mare decât a NIC (289).

5.2.2. Andocarea moleculară la receptorul $\alpha 4\beta 2$ nAChR

Următoarea etapă a acestui studiu a constat în evaluarea și compararea potențialului de legare a NIC și a celor doi derivați nicotinici, 6HLN și COT, în două situsuri de legare alosterice ale receptorului $\alpha 4\beta 2$ nAChRs (3 α :2 β): $\alpha 4$ - $\alpha 4$ și $\alpha 4$ - $\beta 2$.

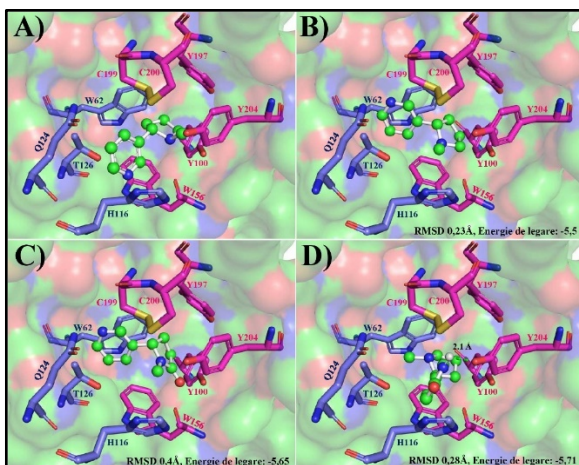


Figura 5.9. Poziția nativă a moleculei de NIC la interfața $\alpha 4$ - $\alpha 4$ a receptorului uman $\alpha 4\beta 2$ nAChR (3 α :2 β , 6CNK) (A) și cele mai bune poziții de atașare teoretice a (S)-nicotinei (B), (S)-cotininei (C) și (S)-6-hidroxinicotinei (D). Liganzii sunt reprezentați sub formă de bile și bastonașe, reziduurile care formează situsul de legare al NIC sunt reprezentate ca bastonașe (reziduurile cu catena laterală colorată cu magenta aparțin subunității principale – $\alpha 4$ +) în timp ce reziduurile cu catena laterală colorată cu albastru închis aparțin subunității complementare – $\alpha 4$ -), legăturile de hidrogen sunt reprezentate ca linii punctate verzi, iar restul receptorului este afișat ca suprafață moleculară (289).

Orientarea moleculei de NIC în situsul $\alpha 4$ - $\alpha 4$ precum și rolurile specifice ale reziduurilor cu care interacționează în cavitatea de legare au fost descrise anterior de Walsh *et al.* (2018) (Fig. 5.14.A). La fel ca și în cazul receptorului AChBP, am păstrat

doar acele subunități care au format situsul de legare al NIC pentru a simplifica procesul de andocare. În primul rând, (*S*)-nicotina a fost andocată în situsul $\alpha 4$ - $\alpha 4$ și orientarea acesteia a fost comparată cu cea observată experimental de Walsh *et al.* (2018). Valoarea scăzută a RMSD obținută pentru (*S*)-nicotină (0,23 Å pentru 12 atomi suprapuși ai ligandului, Tabel 5.2.) ne confirmă din nou că metoda de andocare și parametrii utilizați pot fi aplicați și pentru ceilalți liganzi luați în studiu (Fig. 5.14.B) (289). În continuare, derivații nicotinici au fost andocați în situsul $\alpha 4$ - $\alpha 4$ și am comparat orientarea și afinitatea acestora cu cea a NIC. Calcularea valorii RMSD a arătat că pozițiile de legare teoretice a (*S*)-cotininei (Fig. 5.14.C) și (*S*)-6-hidroxinicotinei (Fig. 5.14.D) au fost foarte similare cu orientarea obținută experimental pentru NIC (RMSD de 0,4 Å pentru COT și 0,28 Å pentru 6HLN corespunzător pentru 12 atomi suprapuși ai ligandului). Energiile de interacțiune calculate de ADT au arătat că derivații nicotinici, în special (*S*)-6-hidroxinicotina, s-ar atașa mai puternic în situsul $\alpha 4$ - $\alpha 4$ comparativ cu (*S*)-nicotina (energie teoretică de legare de -5,65 pentru COT, -5,71 pentru 6HLN și -5,5 pentru NIC, Tabel 5.2.). Această afinitate ridicată a 6HLN se poate datora unei legături de hidrogen suplimentare (lungime de 2,1 Å) formată cu reziduul Y204 situat pe subunitatea principală $\alpha 4$ a interfeței $\alpha 4$ - $\alpha 4$ (289).

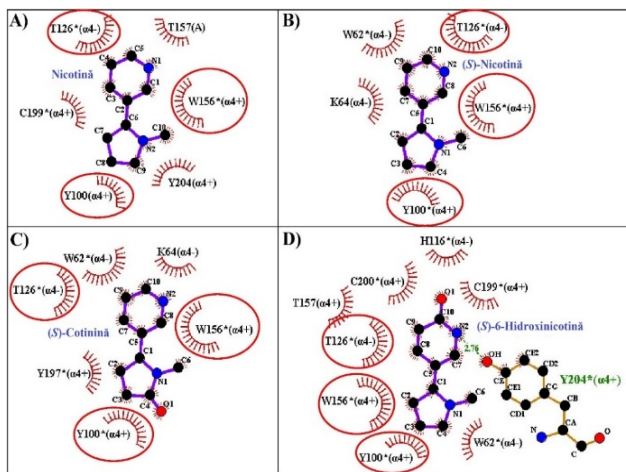


Figura 5.10. Diagramă schematică a interacțiunilor dintre reziduurile situsului $\alpha 4$ - $\alpha 4$ a receptorului $\alpha 4\beta 2$ nAChRs și NIC (A), (*S*)-nicotină (B), (*S*)-cotină (C) și (*S*)-6-hidroxinicotină (D). Reziduurile marcate cu * sunt comune cu cele din literatură și reziduurile încercuite sunt comune pentru toți liganzii selectați. Interacțiunile hidrofobe dintre reziduuri și atomii corespunzători ai ligandului precum și legăturile de hidrogen sunt ilustrate conform programului LigPlot+ (289).

Tabel 5.2. Rezultatele de andocare pentru cele mai bune trei poziții de legare ale liganzilor testați utilizând ca receptor interfața $\alpha 4$ - $\alpha 4$ a receptorului $\alpha 4\beta 2$ nAChR ($3\alpha:2\beta$) (289)

Receptor	Ligand	RMSD (Å)	Energie de legare	Eficiența ligandului
Interfața $\alpha 4$ - $\alpha 4$ a receptorului $\alpha 4\beta 2$ nAChR ($3\alpha:2\beta$) (PDB ID 6CNK)	(S)-nicotină (CID 89594)	0,55	-5,57	-0,46
		0,56	-5,51	-0,46
		0,23	-5,5	-0,46
	(R)-nicotină (CID 157672)	0,5	-5,52	-0,46
		0,51	-5,51	-0,46
		0,51	-5,49	-0,46
	(S)-cotinină (CID 854019)	0,4	-5,65	-0,43
		0,45	-5,62	-0,43
		0,47	-5,61	-0,43
	(R)-cotinină (CID 21907)	0,45	-5,65	-0,43
		0,54	-5,62	-0,43
		0,43	-5,62	-0,43
	(S)-6-hidroxicotină (CID 439383)	0,28	-5,71	-0,44
		0,37	-5,69	-0,44
		0,39	-5,67	-0,44
	(R)-6-hidroxicotină (CID 439886)	0,42	-5,73	-0,44
		0,65	-5,69	-0,44
		0,51	-5,66	-0,44

Conform programului Ligplot+, în situsul $\alpha 4$ - $\alpha 4$, liganzii au interacționat cu reziduurile Y100 și W156 situate pe subunitatea principală $\alpha 4+$ și cu reziduul T126 de pe subunitatea complementară $\alpha 4-$ (Fig. 5.15.).

Într-o manieră similară, liganzii au fost andocați și în interfața $\alpha 4$ - $\beta 2$ a receptorului uman $\alpha 4\beta 2$ nAChR. Ca și în situațiile anterioare, s-a identificat o bună suprapunere între cei 12 atomi ai (*S*)-nicotinei și orientarea sa observată experimental, rezultând o valoare RMSD de 0,31 Å (Fig. 5.16.B, Tabel 5.3.).

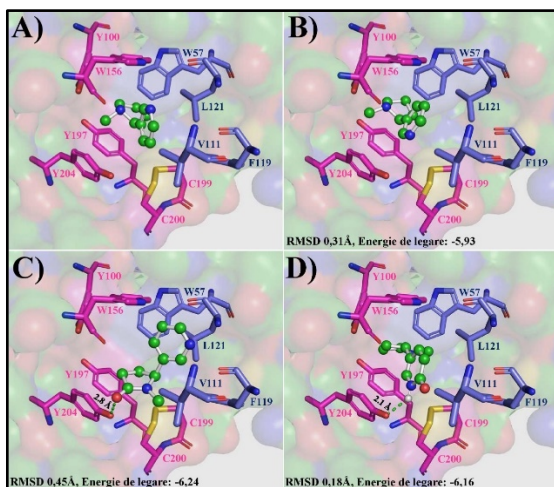


Figura 5.11. Poziția nativă a moleculei de NIC în situsul $\alpha 4$ - $\beta 2$ a receptorului uman $\alpha 4\beta 2$ nAChR (3 α :2 β , 6CNK) (A) și cele mai bune poziții de legare teoretice a (*S*)-nicotinei (B), (*S*)-cotininei (C) și (*S*)-6-hidroxinicotinei (D). Liganzii sunt reprezentați sub formă de bile și bastonașe, reziduurile care formează situsul de legare al NIC sunt reprezentate ca bastonașe (reziduurile cu catena laterală colorată cu magenta aparțin subunității $\alpha 4$ în timp ce reziduurile cu catena laterală colorată cu albastru închis aparțin subunității $\beta 2$), legăturile de hidrogen sunt reprezentate ca linii punctate verzi, iar restul receptorului este afișat ca suprafață moleculară (289).

Poziția de legare teoretică obținută pentru (*S*)-cotinină în situsul $\alpha 4$ - $\beta 2$ a fost destul de diferită de orientarea NIC determinată experimental (Fig. 5.16.C), rezultând o valoare RMSD de 0,45 Å pentru 10 atomi suprapuși, dintre care doar 7 s-au potrivit perfect. Cu toate acestea, în această orientare teoretică, (*S*)-cotinina a prezentat o energie de legare mai mică decât (*S*)-nicotina (-6,24 pentru COT și -5,93 pentru NIC, Tabel 5.3.), sugerând astfel o afinitate mai mare a acestui compus față de situsul $\alpha 4$ - $\beta 2$ comparativ cu moleculele precursor. Această afinitate ridicată a COT ar putea fi explicată prin legătura de hidrogen suplimentară (lungime de 2,8 Å) identificată de ADT între gruparea hidroxil a COT și reziduul Y204 localizat pe subunitatea $\alpha 4$ (Fig. 5.16.C) (289). De asemenea, s-a observat că poziția de legare teoretică a (*S*)-6-hidroxinicotinei

a fost foarte similară cu orientarea NIC determinată experimental (RMSD de 0,18 Å pentru 12 atomi suprapuși, Fig. 5.16.D). În această poziție teoretică, (*S*)-6-hidroxinicotina s-a atașat în situsul $\alpha 4$ - $\beta 2$ cu o afinitate mai mare decât NIC (energie teoretică de legare de -6,16 pentru 6HLN și -5,93 pentru NIC) și, similar cu COT, a format o legătură de hidrogen suplimentară (lungime de 2,1 Å) cu rezidulul Y204 situat pe subunitatea $\alpha 4$ (289).

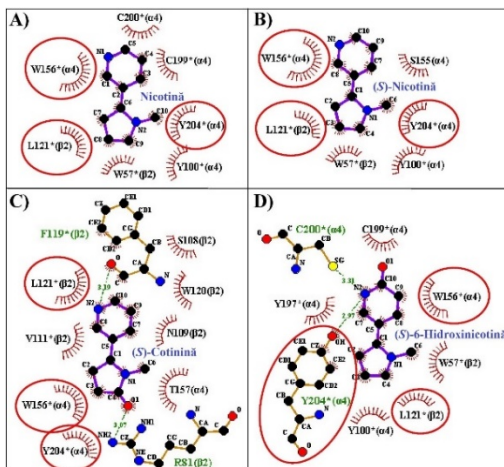


Figura 5.12. Diagramă schematică a interacțiunilor dintre reziduurile situsului $\alpha 4$ - $\beta 2$ a receptorului uman $\alpha 4\beta 2$ nAChR și NIC (A), (*S*)-nicotină (B), (*S*)-cotină (C), (*S*)-6-hidroxinicotină (D). Reziduurile marcate cu * sunt comune cu cele din literatură și reziduurile încercuite sunt comune pentru toți liganzii selectați. Interacțiunile hidrofobe dintre reziduuri și atomii corespunzători ai ligandului precum și legăturile de hidrogen sunt ilustrate conform programului Ligplot+ (289).

Conform programului Ligplot+, liganzii au interacționat cu reziduurile W156 și Y204 localizate pe subunitatea $\alpha 4$ și cu rezidulul L121 situat pe subunitatea $\beta 2$ (Fig. 5.17.) (289).

Pentru a evidenția o posibilă afinitate (preferință) a NIC și a derivaților nicotinici pentru un anumit tip de situs, am comparat energiile teoretice de legare ale liganzilor andocați în situsul $\alpha 4$ - $\alpha 4$ cu cele ale liganzilor andocați în situsul $\alpha 4$ - $\beta 2$. Rezultatele noastre au indicat că pentru fiecare ligand, energiile de legare teoretice corespunzătoare situsului $\alpha 4$ - $\beta 2$ sunt mai mici decât cele calculate pentru situsul $\alpha 4$ - $\alpha 4$ (Tabel 5.2. și 5.3.), sugerând astfel o posibilă preferință a NIC și a derivaților nicotinici față de receptorii nAChRs care conțin un număr mai mare de interfețe de tipul $\alpha 4$ - $\beta 2$. Aceste rezultate sugerează faptul că 6HLN și COT s-ar putea atașa în ambele situsuri de legare alosterice ale receptorilor $\alpha 4\beta 2$ nAChRs cu o afinitate mai mare decât NIC și prezintă o preferință față de interfața $\alpha 4$ - $\beta 2$ (289).

Tabel 5.3. Rezultatele de andocare obținute pentru cele mai bune trei poziții de legare ale liganzilor testați utilizând ca receptor interfața $\alpha 4$ - $\beta 2$ a receptorului $\alpha 4\beta 2$ nAChR ($3\alpha:2\beta$) (289)

Receptor	Ligand	RMSD (Å)	Energie de legare	Eficiența ligandului
Interfața $\alpha 4$ - $\beta 2$ a receptorului $\alpha 4\beta 2$ nAChR ($3\alpha:2\beta$) (PDB ID 6CNK)	(S)-nicotină (CID 89594)	0,47	-6,06	-0,51
		0,31	-5,93	-0,49
		0,32	-5,93	-0,49
	(R)-nicotină (CID 157672)	0,48	-5,87	-0,49
		0,62	-5,86	-0,49
		0,47	-5,85	-0,49
	(S)-cotinină (CID 854019)	0,45	-6,24	-0,48
		0,61	-6,17	-0,47
		0,45	-6	-0,46
	(R)-cotinină (CID 21907)	0,45	-6,17	-0,47
		0,44	-6,17	-0,47
		0,45	-6,13	-0,47
	(S)-6-hidroxinicotină (CID 439383)	0,18	-6,16	-0,47
		0,22	-6,16	-0,47
		0,18	-6,16	-0,47
	(R)-6-hidroxinicotină (CID 439886)	0,51	-6,48	-0,5
		0,6	-6,37	-0,49
		0,5	-6,36	-0,49

5.3. Efectele nicotinei și derivaților nicotinici asupra activității acetilcolinesterazei la modelul amiloidic al bolii Alzheimer indus de peptida A β ₂₅₋₃₅

În urma administrării i.c.v. a peptidei A β ₂₅₋₃₅, s-a înregistrat o creștere semnificativă ($p < 0,0001$) a activității specifice a AChE în hipocamp (Fig. 5.18.), comparativ cu animalele din grupul de control. Cu toate acestea, ambele doze de NIC, în special cea de 0,3 mg/kg, s-au dovedit eficiente în a reduce semnificativ activitatea AChE în hipocampul (Fig. 5.18.) șobolanilor tratați în prealabil cu suspensie de A β ₂₅₋₃₅. Mai mult decât atât, 6HLN și COT s-au dovedit a fi mai eficiente decât NIC, reducând semnificativ ($p < 0,0001$) activitatea specifică a AChE în hipocampul (Fig. 5.18.) șobolanilor care au injectați i.c.v. cu A β ₂₅₋₃₅ până la un nivel apropiat de cel al grupului de control. Aceste rezultate sugerează un profil antiacetilcolinesterazic al NIC, 6HLN și COT la un model animal de demență indus de peptida A β ₂₅₋₃₅ (289).

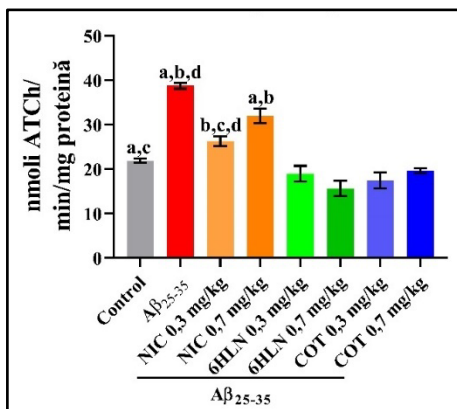


Figura 5.13. Efectele administrării cronice de NIC, 6HLN și COT (0,3 și 0,7 mg/kg, g.c., i.p.) asupra activității specifice a AChE din probele de hipocamp. Valorile sunt exprimate ca medii $\pm$ S.E.M. ($n=3$ animale pe lot). Analiza ANOVA unidirecțională a identificat diferențe semnificative generale între loturile experimentale pentru $F(7,16)=36,46$, $p < 0,0001$.

5.4. Efectele nicotinei și derivaților nicotinici asupra statusului oxidativ la modelul amiloidic al bolii Alzheimer indus de peptida A β ₂₅₋₃₅

În probele de hipocamp obținute de la șobolanii tratați i.c.v. cu A β ₂₅₋₃₅, s-a observat o scădere semnificativă a activității specifice a SOD ($p < 0,001$, Fig. 5.19.A), CAT ($p < 0,0001$, Fig. 5.19.B) și GPX ($p < 0,0001$, Fig. 5.19.C) în comparație cu animalele din lotul de control care au primit soluție salină. Injecția i.p. a dozei de 0,7 mg/kg de NIC șobolanilor tratați cu A β ₂₅₋₃₅ a dus la o creștere semnificativă ($p < 0,01$) a activității SOD în hipocamp comparativ cu controlul negativ. De asemenea, în aceeași

regiune a creierului, s-a observat o creștere ușoară a activității SOD când s-a utilizat o concentrație mai mică de NIC, însă pragul statistic de semnificație nu a fost depășit (Fig. 5.19.A). Pe de altă parte, doar concentrația de 0,3 mg/kg de NIC a restabilit activitatea normală a CAT ($p<0,0001$, Fig. 5.19.B) și GPX ($p<0,001$, Fig. 5.19.C) în hipocampus șobolanilor tratați i.c.v. cu $A\beta_{25-35}$. Co-administrarea 6HLN cu $A\beta_{25-35}$ a determinat o creștere semnificativă a activității SOD și GPX în hipocampus animalelor într-o manieră doză-răspuns ($p<0,01$ și $p<0,0001$ pentru doza de 0,3 și respectiv 0,7 mg/kg, Fig. 5.19.A și Fig. 5.19.C). În plus, ambele concentrații de 6HLN s-au dovedit a fi eficiente în a contracara efectul peptidei $A\beta_{25-35}$ asupra activității CAT comparativ cu animalele tratate doar cu $A\beta_{25-35}$ ($p<0,0001$, Fig. 5.19.B). Mai mult decât atât, COT a prezentat un efect similar cu cel al 6HLN, întrucât ambele doze utilizate au crescut substanțial și într-o manieră dependentă de doză activitatea enzimelor antioxidante SOD (Fig. 5.19.A), CAT (Fig. 5.19.B) și GPX (Fig. 5.19.C) în hipocampus șobolanilor tratați i.c.v. cu $A\beta_{25-35}$ (289).

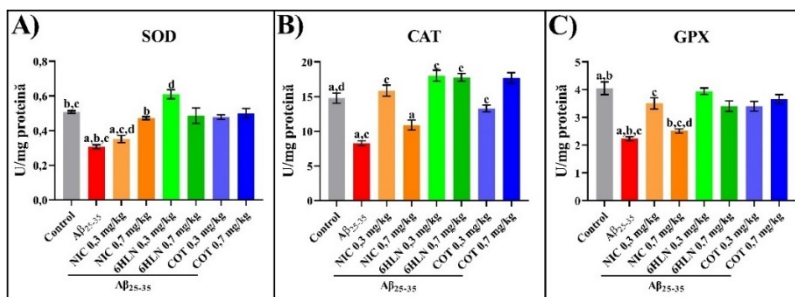


Figura 5.14. Efectele administrării cronice de NIC, 6HLN și COT (0,3 și 0,7 mg/kg, g.c., i.p.) la modelul amiloidic al AD asupra activității specifice a enzimelor (A) SOD, (B) CAT și (C) CAT măsurate din probele de hipocamp. Valorile sunt exprimate ca medii $\pm$ S.E.M. ($n=3$ animale pe lot). Analiza ANOVA unidirecțională a identificat diferențe semnificative generale între loturile experimentale pentru (A) $F(7,16)=16,68$, $p<0,0001$, (B) $F(7,16)=27,82$, $p<0,0001$ și (C) $F(7,16)=15,73$, $p<0,0001$.

Pentru a evalua potențialul antioxidant al NIC, 6HLN și COT de a reduce stresul oxidativ indus de peptidea $A\beta_{25-35}$, au fost monitorizați o serie de indicatori non-enzimatici ai stresului oxidativ, cum ar fi nivelurile de GSH, MDA și proteine carbonilate, în hipocampus șobolanilor. Inducerea modelului animal al AD prin infuzia i.c.v. a peptidei $A\beta_{25-35}$ a determinat o scădere pronunțată a conținutului de GSH ($p<0,001$, Fig. 5.20.A) și o creștere substanțială a nivelului de MDA ($p<0,001$, Fig. 5.20.B) și proteine carbonilate ($p<0,0001$, Fig. 5.20.C) în hipocampus animalelor de laborator comparativ cu lotul de control. Tratamentul cronic cu NIC a redus efectul negativ al peptidei $A\beta_{25-35}$ asupra conținutului de GSH doar atunci când a fost utilizată concentrația de 0,7 mg/kg ($p<0,05$, Fig. 5.20.A). În schimb, ambele doze de NIC au determinat o scădere accentuată a nivelului de MDA ($p<0,001$ și $p<0,0001$ pentru doza

de 0,3 și respectiv 0,7 mg/kg, Fig. 5.20.B) și proteine carbonilate ($p < 0,0001$, Fig. 5.20.C) în hipocampus animalelor tratate cu $A\beta_{25-35}$. Mai mult decât atât, tratamentul cu 6HLN și COT a redus stresul oxidativ indus de $A\beta_{25-35}$ în hipocampus animalelor, întrucât ambele concentrații utilizate au crescut cantitatea de GSH (Fig. 5.20.A) și au diminuat nivelul de MDA (Fig. 5.20.B) și proteine carbonilate (Fig. 5.20.C).

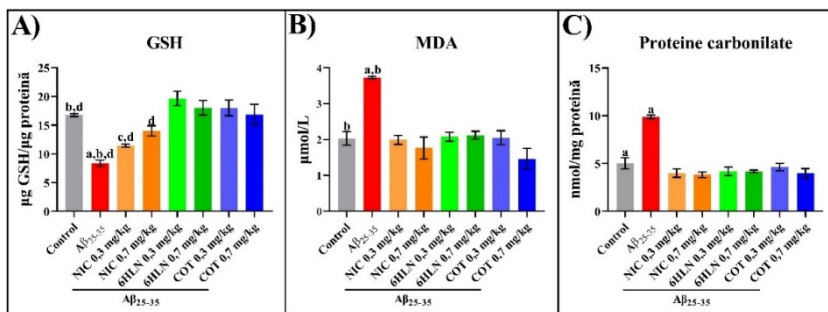


Figura 5.15. Efectele administrării cronice de NIC, 6HLN și COT (0,3 și 0,7 mg/kg, g.c., i.p.) la modelul amiloidic al AD asupra nivelului de (A) GSH, (B) MDA și (C) proteine carbonilate măsurat din probele de hipocamp. Valorile sunt exprimate ca medii $\pm$ S.E.M. ($n=3$ animale pe lot). Analiza ANOVA unidirecțională a identificat diferențe semnificative generale între loturile experimentale pentru (A) $F(7,16)=12,57$, $p < 0,0001$, (B) $F(7,16)=12,34$, $p < 0,0001$ și (C) $F(7,16)=25,63$, $p < 0,0001$.

5.5. Efectele nicotinei și derivaților nicotinici asupra markerilor genetici la modelul amiloidic al bolii Alzheimer indus de peptida $A\beta_{25-35}$

5.5.1. Efectul nicotinei, cotininei și 6-hidroxi-L-nicotinei asupra expresiei genei *Bdnf* în hipocampus și amigdala șobolanilor

Pentru a evalua impactul NIC și al derivaților săi asupra neuroprotecției, am investigat expresia genei *Bdnf* în hipocampus șobolanilor tratați și cu $A\beta_{25-35}$. După cum se poate observa în figura 5.21., infuzia hipocampică a peptidei $A\beta_{25-35}$ a indus o scădere semnificativă ($p < 0,001$) a numărului de copii de ARNm al genei *Bdnf* comparativ cu animalele din lotul de control, indicând astfel un efect neurotoxic al peptide (289). Cu toate acestea, acest parametru a fost inversat de pre-tratamentul cronic cu 0,3 și 0,7 mg/kg de NIC, 6HLN și COT, care a crescut semnificativ ($p < 0,0001$) expresia genei *Bdnf* în hipocampus comparativ cu grupul tratat doar cu $A\beta_{25-35}$ (Fig. 5.21.) (289).

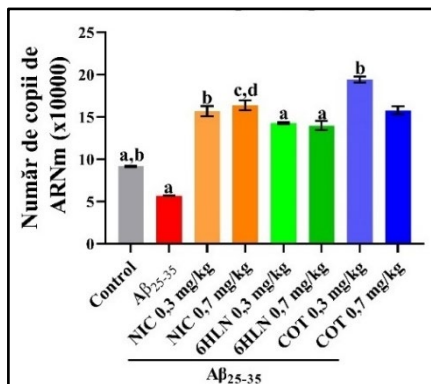


Figura 5.16. Efectele administrării NIC, 6HLN și COT (0,3 și 0,7 mg/kg, g.c., i.p.) la șobolanii tratați cu Aβ₂₅₋₃₅ asupra numărului de copii de ARNm al genei *Bdnf* în hipocamp. Valorile sunt exprimate ca medii ± S.E.M. (n=3 șobolani pe grup). Analiza ANOVA a identificat diferențe semnificative generale între loturile experimentale pentru F(7,16)=109,5, p<0,0001.

5.5.2. Efectul nicotinei, cotininei și 6-hidroxi-L-nicotinei asupra expresiei genei *Arc* în hipocampus și amigdala șobolanilor

Pentru a evalua rolul NIC și al derivaților nicotinicici asupra consolidării memoriei, am examinat numărul de copii de ARNm al genei *Arc* în hipocampus și amigdala șobolanilor tratați i.c.v. cu Aβ₂₅₋₃₅ după efectuarea testelor de memorie.

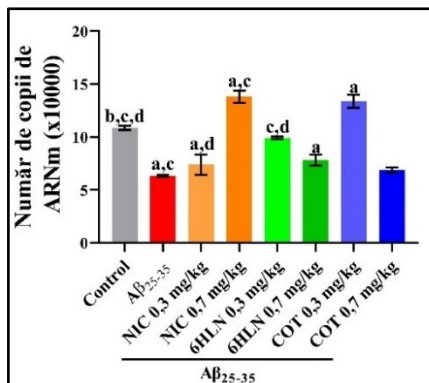


Figura 5.17. Efectele administrării NIC, 6HLN și COT (0,3 și 0,7 mg/kg, g.c., i.p.) la șobolanii tratați cu Aβ₂₅₋₃₅ asupra numărului de copii de ARNm al genei *Arc* în hipocampus. Valorile sunt exprimate ca medii ± S.E.M. (n=3 șobolani pe grup). Analiza ANOVA a identificat diferențe semnificative generale între loturile experimentale F(7,16)=33,44, p<0,0001.

Infuzia hipocamică a peptidei $A\beta_{25-35}$ a redus semnificativ ($p<0,001$, Fig. 5.22) numărul de copii de ARNm comparativ cu șobolanii din lotul de control care au primit soluție salină, sugerând astfel o abrogare a consolidării memoriei care ar putea afecta și sinteza proteinelor necesară pentru a produce modificările sinaptice necesare pentru stocarea memoriei pe termen lung (289). Cu toate acestea, tratamentul cronic cu 0,7 mg/kg de NIC și 0,3 mg/kg de 6HLN sau COT a crescut semnificativ ($p<0,0001$ pentru NIC și COT și $p<0,01$ pentru 6HLN) numărul de copii de ARNm în hipocampus șobolanilor tratați cu $A\beta_{25-35}$ (Fig. 5.22) (289).

5.5.3. Efectul nicotinei, cotininei și 6-hidroxi-L-nicotinei asupra expresiei genei *Il-1 β* în hipocampus și amigdala șobolanilor

În studiul actual, am evaluat efectele NIC și a derivaților nicotiniici asupra neuroinflamației prin examinarea expresiei genei *Il-1 β* în hipocampus șobolanilor tratați cu peptida $A\beta_{25-35}$. Infuzia peptidei $A\beta_{25-35}$ a crescut semnificativ ($p<0,0001$) numărul de copii de ARNm al genei *Il-1 β* comparativ cu animalele din grupul de control care au primit soluție salină, sugerând astfel un proces inflamator în hipocampus șobolanilor (Fig. 5.23.). Administrarea cronică a ambelor doze de NIC modelului animal au redus semnificativ ($p<0,0001$) expresia genei *Il-1 β* în hipocampus (Fig. 5.23.) (289). În plus, administrarea cronică de 6HLN și COT a redus semnificativ și într-o manieră dependentă de doză ($p<0,001$ și $p<0,0001$ pentru doza de 0,3 și respectiv 0,7 mg/kg) numărul de copii de ARNm al genei *il-1 β* în hipocampus șobolanilor tratați cu $A\beta_{25-35}$ comparativ cu grupul tratat doar cu animalele din controlul negativ (Fig. 5.23.) (289).

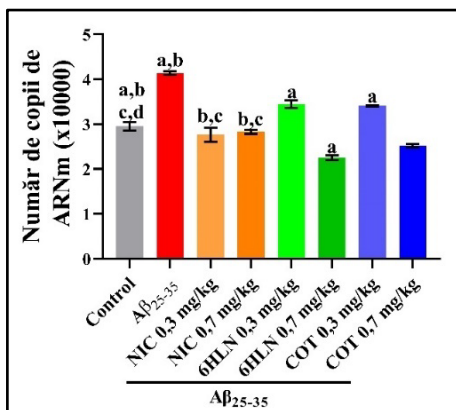


Figura 5.18. Efectele administrării NIC, 6HLN și COT (0,3 și 0,7 mg/kg, g.c., i.p.) la șobolanii tratați cu $A\beta_{25-35}$ asupra numărului de copii de ARNm al genei *Il-1 β* în hipocampus. Valorile sunt exprimate ca medii $\pm$ S.E.M. ($n=3$ șobolani pe grup). Analiza ANOVA a identificat diferențe semnificative generale între loturile experimentale doar pentru $F(7,16)=59,63$, $p<0,0001$.

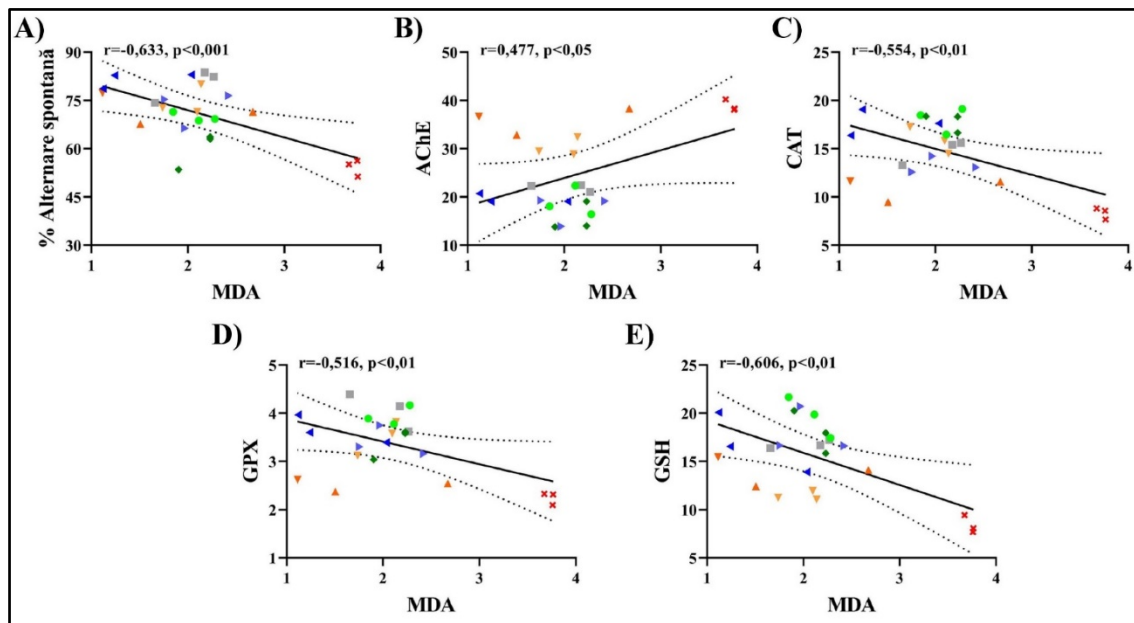


Figura 19. Coeficientul de corelație al lui Pearson (r) între parametrii comportamentali sau biochimici și nivelul de MDA ($n=3$ animale pe lot): **A)** % Alternare spontană vs. MDA ($r=-0,633$, $p<0,001$), **B)** AChE vs. MDA ($r=0,477$, $p<0,05$), **C)** CAT vs. MDA ($r=-0,554$, $p<0,01$), **D)** CAT GPX vs. MDA ($r=-0,516$, $p<0,01$) și **E)** GSH vs. MDA ($r=-0,606$, $p<0,01$) în control (■), A β_{25-35} (×), NIC 0,3 mg/kg + A β_{25-35} (▼), NIC 0,7 mg/kg + A β_{25-35} (▲), 6HLN 0,3 mg/kg + A β_{25-35} (●), 6HLN 0,7 mg/kg + A β_{25-35} (◆), COT 0,3 mg/kg + A β_{25-35} (►) și COT 0,7 mg/kg + A β_{25-35} (◄). Datele sunt exprimate astfel: AChE (nmoli ATCh/min/mg proteină), MDA ($\mu\text{mol/L}$), CAT (U/mg proteină), GSH ($\mu\text{g GSH}/\mu\text{g proteină}$) (289).

5.6. Corelații Pearson între parametrii comportamentali și biochimici

În acest studiu, coeficientul de corelație Pearson (r) a fost utilizat pentru a cuantifica asocierea liniară între parametri comportamentali și cei biochimici, măsurati la nivelul hipocampului.

Rezultatele noastre au arătat că procentul de alternare spontană măsurat în testul labirintului Y se corelează puternic cu MDA, produsul peroxidării lipidice ($n=3$, $r=-0,633$, $p<0,001$, Fig. 5.24.A). Acest lucru sugerează că îmbunătățirea memoriei șobolanilor cu NIC, 6HLN sau COT este corelată cu o scădere a nivelului de MDA în hipocamp. De asemenea, am corelat activitatea AChE și mai multe sisteme de apărare antioxidantă, cum ar fi activitatea enzimelor CAT și GPX și conținutul de GSH, cu nivelul de MDA. După cum se poate observa în figura 5.24.B, s-a obținut o corelație pozitivă între activitatea AChE și nivelul de MDA ($n=3$, $r=0,477$, $p<0,05$). Acest lucru sugerează că reducerea activității specifice a AChE sub acțiunea NIC și derivații nicotinici este corelată cu un nivel scăzut al peroxidării lipidice. În ceea ce privește sistemul antioxidant, activitățile specifice ale enzimelor CAT ($n=3$, $r=-0,554$, $p<0,01$, Fig. 5.24.C) sau GPX ($n=3$, $r=-0,516$, $p<0,01$, Fig. 5.24.D) și conținutul de GSH ($n=3$, $r=-0,606$, $p<0,01$, Fig. 5.24.E) au fost corelate negativ și semnificativ cu nivelul de MDA. Acest lucru indică faptul că o creștere a activităților enzimelor antioxidante și a conținutului de GSH de către NIC, 6HLN și COT este bine corelată cu o reducere a formării de MDA în hipocampus animalelor (289).

5.7. Efectele cognitive ale nicotinei și derivaților nicotinici la modelul de pește zebra al bolii Alzheimer indus prin imersie în scopolamină

5.7.1. Efectele nicotinei, cotininei și 6-hidroxi-L-nicotinei asupra memoriei spațiale a peștilor zebra în testul labirintului Y

În cadrul acestui studiu, efectul tratamentului cu 1 și 2 mg/L de NIC, 6HLN și COT asupra memoriei de recunoaștere spațială și activității locomotorii a peștilor zebra a fost investigat cu ajutorul testului labirintului Y. În urma efectuării sesiunii de testare a labirintului Y, s-a obținut o serie de reprezentări grafice ale traseelor urmate de peștii zebra pe parcursul celor 5 minute precum și diferențele ce pot apărea între tiparele de înot ale animalelor din loturi diferite (Fig. 5.25.). Deși toți peștii au explorat cele trei brațe ale labirintului, în cazul lotului tratat doar cu SCOP, se poate observa o activitate redusă a peștilor în brațul nou. Cu toate acestea, administrarea NIC, 6HLN și COT a crescut activitatea peștilor în brațele labirintului Y, în special în brațul nou (Fig. 5.25.) (293).

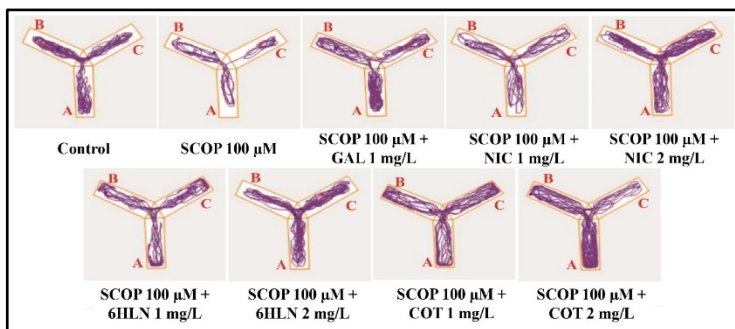


Figura 5.20. Reprezentarea grafică a traseului urmat de peștii zebură din loturile experimentale corespunzătoare în sesiunea de testare din cadrul testului labirintului Y. Brațele labirintului au fost notate astfel: brațul start din care peștele a început testul (A), brațul deschis permanent (B) și brațul nou (C), închis în sesiunea de antrenament și deschis în cea de testare. Punctul albastru reprezintă începutul traseului în timp ce punctul roșu reprezintă capătul traseului (293).

Memoria de recunoaștere spațială a fost evaluată folosind ca parametru timpul petrecut de pești în brațul nou al labirintului raportat la timpul total de explorare. Conform figurii 5.26., peștele zebură tratat cu SCOP 100 µM a petrecut mai puțin timp în brațul nou decât animalele din grupul de control sau GAL + SCOP, sugerând astfel un efect amnezic al SCOP. GAL, un inhibitor competitiv, selectiv și reversibil al AChE, este utilizat în terapia AD pentru îmbunătățirea funcției cognitive (98,294) și a fost utilizat ca și control pozitiv în testele cognitive efectuate asupra peștelui zebură.

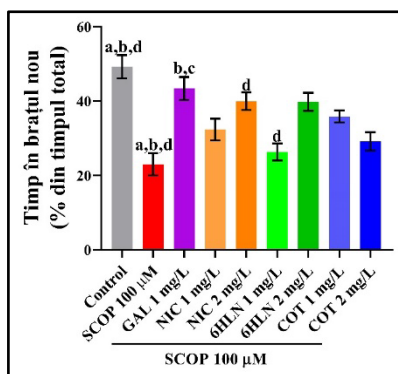


Figura 5.21. Efectele administrării de NIC, 6HLN și COT (1 și 2 mg/L) la peștii zebură tratați cu SCOP asupra memoriei spațiale evaluată în cadrul testului labirintului Y. Valorile au fost exprimate ca medii $\pm$ S.E.M. (n=10 pești pe grup). Analiza ANOVA unidirecțională a identificat diferențe semnificative generale între condițiile experimentale [$F(8,81)=10,54$, $p<0,0001$] (293).

Administrarea soluției de GAL 1 mg/L peștilor tratați cu SCOP 100 μ M a îmbunătățit semnificativ ($p < 0,0001$) memoria spațială în testul labirintului Y comparativ cu peștii din lotul tratat doar cu SCOP. Rezultatele obținute au sugerat că tratamentul acut cu 2 mg/L de NIC sau 6HLN previne efectele negative ale SCOP asupra memoriei inducând performanțe apropiate de cele ale GAL 1 mg/L ($p < 0,001$, Fig. 5.26.). În ceea ce privește COT, doar doza de 1 mg/L a ameliorat semnificativ deficitul de memorie induse de SCOP ($p < 0,05$, Fig. 5.26.). Deși s-a putut observa o ușoară creștere a timpului petrecut în brațul nou la grupul tratat cu 2 mg/L de COT, nu a fost detectată nicio diferență semnificativă (293).

5.7.2. Efectele nicotinei, cotininei și 6-hidroxi-L-nicotinei asupra memoriei de recunoaștere a peștilor zebură în testul de recunoaștere a obiectului nou

În acest experiment, testul NOR a fost utilizat pentru a evalua memoria de recunoaștere a peștilor zebură. În urma efectuării testului, s-au obținut o serie de grafice reprezentative ale traseului urmat de peștii din grupurile experimentale corespunzătoare (Fig. 5.27.). Urmărind traseul peștilor din lotul tratat doar cu SCOP, putem observa că aceștia au explorat mai mult timp obiectul familiar în comparație cu peștii din celelalte loturi experimentale. Tratamentul acut cu NIC, 6HLN și COT a crescut timpul de explorare al obiectului nou. Mai mult decât atât, peștii din toate loturile experimentale au prezentat inițial un comportament de tip tigmotaxis. Tigmotaxisul reprezintă preferința unui animal de a rămâne aproape de margine/lateral, evitând zonele deschise centrale. Cu toate acestea, acest comportament a fost redus treptat în timpul sesiunii de testare (293).

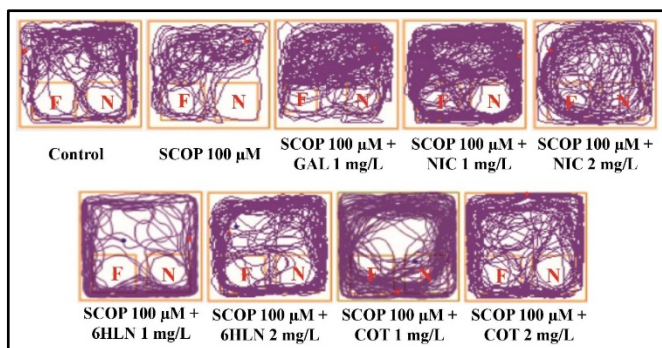


Figura 5.22. Grafice reprezentative ale traseului urmat de peștii zebură din loturile experimentale corespunzătoare în sesiunea de testare din cadrul testului NOR. Obiectul familiar a fost notat cu F, în timp ce obiectul nou a fost notat cu N. Chenarele care încadrează obiectele reprezintă aria de explorare și a fost calculată conform indicațiilor din subcapitolul 4.3.3.3. Punctul albastru reprezintă începutul traseului în timp ce punctul roșu reprezintă capătul traseului (293).

Memoria de recunoaștere a fost exprimată în procente de preferință și a reflectat predilecția animalului pentru obiectul nou. Rezultatele obținute au demonstrat că tratarea peștilor zebură cu SCOP 100 μ M a dus la o scădere semnificativă ($p<0,01$) a preferinței comparativ cu peștii din lotul de control și GAL + SCOP, ducând la scoruri mai mici de 50% și sugerând o aversiune relativă față de obiectul nou (Fig. 5.28.). Ca și în testul labirintului Y, lotul tratat cu 1 mg/L de GAL și SCOP 100 μ M a fost utilizat în calitate de control pozitiv. GAL a inversat efectul negativ al SCOP, valorile obținute fiind apropiate de cele ale lotului de control. Din cele două doze de NIC utilizate, doar cea de 2 mg/L a crescut semnificativ ($p<0,0001$) preferința față de obiectul nou a peștilor zebură tratați în prealabil cu SCOP 100 μ M (Fig. 5.28.). Ambele doze de COT și 6HLN, dar mai ales doza de 2 mg/L, au inversat deficitele memoriei de recunoaștere provocate de administrarea SCOP crescând semnificativ ($p<0,01$ și $p<0,0001$ pentru 1 și respectiv 2 mg/L, Fig. 5.28.) preferința peștilor zebură pentru obiectul nou. Doza de 2 mg/L de NIC, 6HLN și COT a determinat performanțe care au depășit nivelul de șansă (50%), indicând astfel o preferință relativă pentru de obiectul nou (Fig. 5.28.). Prin urmare, NIC și derivații nicotinici îmbunătățesc memoria de recunoaștere la modelul de pește zebură al AD indus de SCOP în cadrul testului NOR (293).

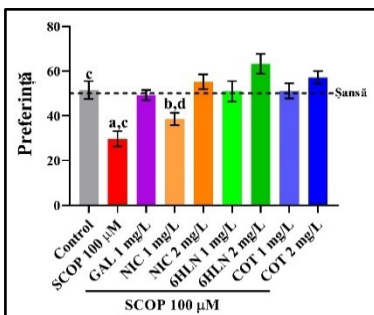


Figura 5.23. Efectele administrării NIC, 6HLN și COT (1 și 2 mg / L) la peștele zebură pre-tratat cu SCOP asupra memoriei de recunoaștere evaluate în cadrul testului NOR. Linia punctată neagră (șansa) indică o preferință de 50%. Valorile au fost exprimate ca medii $\pm$ S.E.M. ($n=10$ pești pe grup). Analiza ANOVA a identificat diferențe semnificative generale între condițiile experimentale [$F(8,81)=8,078$, $p<0,0001$].

5.8. *Efectele nicotinei și derivaților nicotinici asupra stării asemănătoare anxietății la modelul de pește zebură al bolii Alzheimer indus prin imersie în scopolamină*

În urma efectuării NTT, s-au obținut graficele reprezentative ale traseului urmat de peștii zebură din loturile experimentale corespunzătoare (Fig. 5.29.). În aceste grafice, se pot observa tiparele de înot diferite ale peștilor zebură în cadrul testului NTT, în special tiparul de înot al peștilor tratați doar cu SCOP, care au prezentat o activitate

intensă în jumătatea inferioară a bazinului, sugerându-se astfel un profil anxiogenic. Peștii zebură din lotul de control au prezentat inițial o activitate exploratorie în zona inferioară urmând apoi o migrare generală pe parcursul derulării testului. Mai mult decât atât, s-a observat o activitate intensă și în rândul peștilor tratați cu NIC, 6HLN și COT în jumătatea superioară a acvariului, în special atunci când s-a utilizat doza de 2 mg/L (Fig. 5.29.) (293).

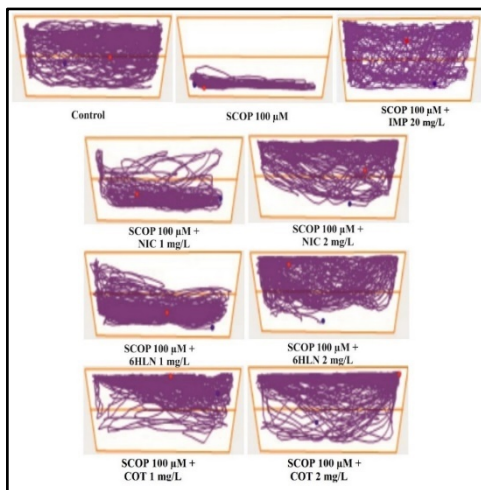


Figura 5.24. Grafice reprezentative ale traseului urmat de peștii zebură din loturile experimentale corespunzătoare în cadrul NTT. Acvariul trapezoid a fost divizat virtual în două zone orizontale egale (zona superioară și cea inferioară) pentru evaluarea activității exploratorii verticale. Punctul albastru reprezintă începutul traseului în timp ce punctul roșu reprezintă capătul traseului (293).

Efectele tratamentului acut cu NIC, 6HLN și COT asupra comportamentului asemănător anxietății la peștele zebură expus la SCOP 100 μ M au fost evaluate în NTT prin măsurarea distanței parcurse de pești în zona superioară a bazinului (Fig. 5.30.A) precum și a timpului petrecut de aceștia în zona respectivă (Fig. 5.30.B). Administrarea SCOP a provocat un răspuns anxiogen robust, determinând o scădere semnificativă a distanței parcurse ($p < 0,0001$, Fig. 5.30.A) și o reducere semnificativă a timpului petrecut în zona superioară ($p < 0,0001$, Fig. 5.30.B) comparativ cu animalele din lotul de control sau IMP + SCOP. IMP este un antidepresiv tricyclic care pare a fi, de asemenea, eficient pentru reducerea anxietății generale (295) și, din acest motiv, a fost utilizat ca și control pozitiv în cadrul NTT. Administrarea acută a dozei de 2 mg/L de NIC a prevenit apariția stării similare anxietății indusă de SCOP prin creșterea semnificativă ($p < 0,0001$, Fig. 5.30.A) a distanței parcurse de peștii zebură în zona superioară a bazinului. În plus, ambele doze de NIC au determinat o creștere

semnificativă a timpului petrecut de pești în jumătatea superioară a acvariului ($p < 0,0001$, Fig. 5.30.B). Administrarea acută a ambelor doze de 1 și 2 mg/L de 6HLN și COT a ameliorat efectul anxiogen al SCOP prin creșterea distanței parcurse (Fig. 5.30.A) de pești în zona superioară concomitent cu creșterea timpului petrecut de animale în această zonă (Fig. 5.30.B) (293).

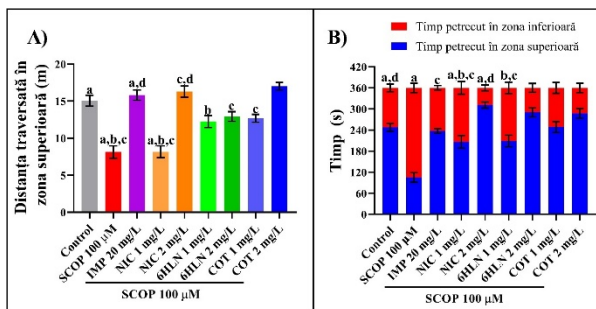


Figura 5.25. Efectele administrării NIC, 6HLN și COT (1 și 2 mg/L) la peștele zebură tratat cu SCOP asupra comportamentului asemănător anxietății în cadrul NTT. Distanța traversată în zona superioară (A) și timpul petrecut în zona superioară și/sau inferioară (B) au reprezentat parametrii pentru anxietate. Valorile au fost exprimate ca medii $\pm$ S.E.M. ($n=10$ pești pe grup). Analiza ANOVA a identificat diferențe semnificative generale între loturi pentru (A) $F(8,81)=21,35$, $p < 0,0001$ și (B) $F(8,162)=42,29$, $p < 0,0001$ (293).

5.9. Efectele nicotinei și derivaților nicotinici asupra activității acetilcolinesterazei la modelul de pește zebură al bolii Alzheimer indus prin imersie în scopolamină

În acest experiment, am investigat dacă NIC, COT și 6HLN prezintă vreun efect asupra activității biologice a AChE în creierul peștilor zebură tratați cu SCOP. Conform figurii 5.31., expunerea acută a peștelui zebură la SCOP 100 μ M a cauzat o creștere semnificativă ($p < 0,01$) a activității specifice a AChE în comparație cu animalele din lotul de control. Tratamentul acut cu 1 și 2 mg/L NIC a contracarat efectul SCOP, reducând semnificativ ($p < 0,0001$) activitatea enzimei în creierul peștilor (Fig. 5.31.). Mai mult decât atât, ambele doze de 1 și 2 mg/L de COT și 6HLN au restabilit activitatea normală a AChE, reducând semnificativ efectul SCOP până la un nivel apropiat de control (Fig. 5.31.) (293).

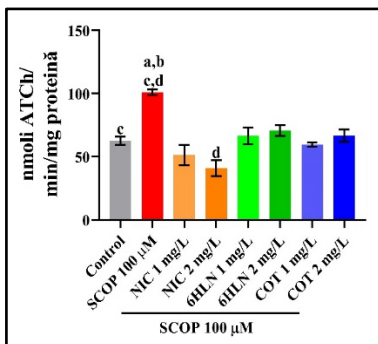


Figura 5.26. Efectul administrării acute de NIC, 6HLN și COT (1 și 2 mg/L) asupra activității specifice a AChE din creierul peștilor zebură pre-tratați cu SCOP. Valorile sunt exprimate ca medii $\pm$ S.E.M. (n=3 pești pe grup). Analiza ANOVA unidirecțională a identificat diferențe semnificative generale între condițiile experimentale [$F(7,16)=11,5$, $p<0,0001$] (293).

5.10. Efectele nicotinei și derivaților nicotinici asupra stresului oxidativ la modelul de pește zebură al bolii Alzheimer indus prin imersie în scopolamină

5.10.1. Efectul nicotinei și al derivaților nicotinici asupra activității specifice a enzimelor antioxidante în creierul peștilor zebură

Pentru a evalua potențialul antioxidant al NIC și al derivaților nicotinici de a reduce stresul oxidativ indus de expunerea la SCOP (100 μ M), au fost măsurate activitățile enzimelor antioxidante SOD, CAT și GPX în creierul peștilor zebură. Expunerea acută a peștilor zebură la SCOP a redus semnificativ ($p<0,0001$) activitatea specifică a eliminătorilor enzimatici ai ROS, cum ar fi SOD, CAT și GPX, comparativ cu animalele din lotul de control (Fig. 5.32.). Administrarea NIC, în special a dozei de 2 mg/L, a contracarat efectul SCOP, intensificând substanțial activitatea enzimelor SOD (Fig. 5.32.A), CAT (Fig. 5.32.B) și GPX (Fig. 5.32.C) în creierul peștilor. Un efect similar a fost înregistrat și în cazul derivaților nicotinici. Ambele concentrații de 6HLN și COT au blocat proprietățile oxidante ale SCOP în creierul peștilor zebură, stimulând activitatea SOD (Fig. 5.32.A), CAT (Fig. 5.32.B) și GPX (Fig. 5.32.C) (293).

Potențialul antioxidant al NIC, 6HLN și COT (1 și 2 mg/L) de a reduce stresul oxidativ indus de SCOP (100 μ M) în creierul peștilor zebură a fost evaluat și prin măsurarea unor indicatori non-enzimatici ai stresului oxidativ, cum ar fi conținutul de GSH, MDA și proteine carbonilate.

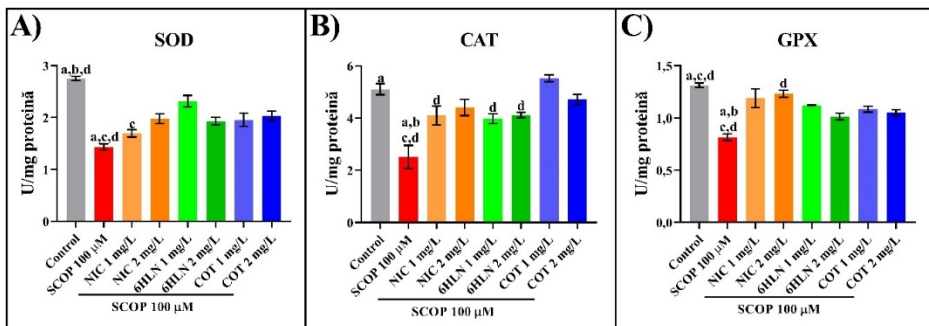


Figura 5.27. Efectele administrării cronice de NIC, 6HLN și COT (1 și 2 mg/L) asupra activității specifice a enzimelor (A) SOD, (B) CAT și (C) CAT în creierul peștilor tratați cu SCOP. Valorile sunt exprimate ca medii $\pm$ S.E.M. (n=3 animale pe lot). Analiza ANOVA unidirecțională a identificat diferențe semnificative generale între loturile experimentale pentru (A) $F(7,16)=20,15$, $p<0,0001$, (B) $F(7,16)=11,31$, $p<0,0001$ și (C) $F(7,16)=14,22$, $p<0,0001$ (293).

Pe lângă reducerea activității enzimelor antioxidante, tratamentul cu SCOP 100 μ M a dus la o epuizare a conținutului de GSH ($p<0,01$, Fig. 5.33.A) și a crescut nivelul de MDA ($p<0,01$, Fig. 5.33.B), principalul produs al peroxidării lipidice, și proteine carbonilate ($p<0,001$, Fig. 5.33.C), markerul oxidării proteice. Cu toate acestea, administrarea ambelor doze de NIC, 6HLN și COT la peștii zebură tratați în prealabil cu SCOP a restaurat nivelul optim de GSH în creierul peștilor (Fig. 5.33.A). Mai mult decât atât, acest tratament a contracarat efectul pro-oxidativ al SCOP, normalizând astfel nivelul de MDA (Fig. 5.33.B) și de proteine carbonilate (Fig. 5.33.C) din creierul peștilor zebură (293).

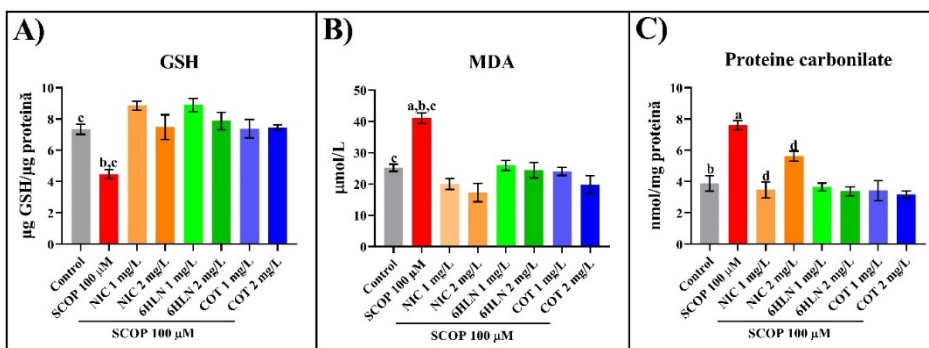


Figura 5.28. Efectele administrării cronice de NIC, 6HLN și COT (1 și 2 mg/L) asupra nivelului de (A) GSH, (B) MDA și (C) proteine carbonilate în creierul peștilor tratați cu SCOP. Valorile sunt exprimate ca medii $\pm$ S.E.M. (n=3 animale pe lot). Analiza

ANOVA unidirecțională a identificat diferențe semnificative generale între loturile experimentale pentru (A) $F(7,16)=8,541$, $p<0,001$, (B) $F(7,16)=12,39$, $p<0,0001$ și (C) $F(7,16)=14,53$, $p<0,0001$ (293).

5.11. Efectele nicotinei și derivaților nicotinici asupra markerilor genetici la modelul de pește zebra al bolii Alzheimer indus prin imersie în scopolamină

5.11.1. Efectul nicotinei, cotininei și 6-hidroxi-L-nicotinei asupra expresiei genei *bdnf* în creierul peștilor zebra

În experimentul acesta, am evaluat efectele NIC, 6HLN și COT asupra expresiei genei *bdnf* în creierul peștilor zebra tratați cu SCOP. Conform figurii 5.34., expunerea la SCOP a redus semnificativ ($p<0,01$) numărul de copii de ARNm ale genei *bdnf* din creierul peștilor zebra comparativ cu lotul de control. Administrarea acută de NIC peștilor tratați în prealabil cu SCOP a modificat pozitiv expresia genei *bdnf* într-o manieră dependentă de doză ($p<0,01$ pentru doza de 1 mg/L și $p<0,0001$ pentru doza de 2 mg/L, Fig. 5.34.). Doar doza de 1 mg/L de 6HLN a ameliorat efectul negativ al SCOP asupra expresiei genei *bdnf*, crescând semnificativ ($p<0,05$, Fig. 5.34.) numărul de copii de ARNm. În plus, ambele doze de COT s-au dovedit a fi eficiente în a normaliza expresia genei *bdnf* în creierul peștelui zebra tratat cu SCOP ($p<0,01$ și $p<0,001$ pentru dozele de 1 mg/L și respectiv 2 mg/L, Fig. 5.34.) (293).

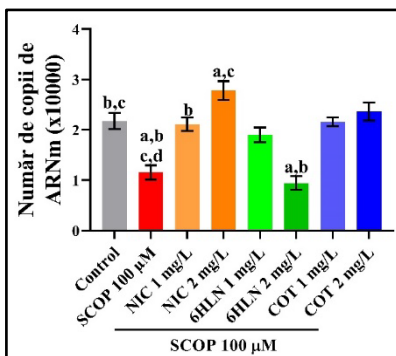


Figura 5.29. Efectele administrării NIC, 6HLN și COT (1 și 2 mg/L) asupra expresiei genei *bdnf* în creierul peștilor tratați cu SCOP. Valorile sunt exprimate ca medii $\pm$ S.E.M. ($n=4$ pești pe grup). Analiza ANOVA unidirecțională a identificat diferențe semnificative generale între condițiile experimentale [$F(7,24)=16,65$, $p<0,0001$] (293).

5.11.2. Efectul nicotinei, cotininei și 6-hidroxi-L-nicotinei asupra expresiei genei *npv* în creierul peștilor zebra

Nivelul de expresie al genei *npv* a fost evaluat în creierele peștilor zebra tratați concomitent cu SCOP și NIC sau derivați nicotinici. După cum este descris în figura

5.35., numărul de copii de ARNm al genei *npv* a fost puternic redus ($p<0,0001$) în creierul peștilor tratați doar cu SCOP comparativ cu grupul de control. NIC a crescut expresia genei *npv* în creierul peștilor, determinând o creștere a numărului de copii de ARNm într-o manieră doză-răspuns ($p<0,01$ și $p<0,0001$ pentru doza de 1 și respectiv 2 mg/L, Fig. 5.35.). Administrarea acută a dozei de 2 mg/L de 6HLN la peștele zebra tratat cu SCOP a crescut semnificativ ($p<0,01$) expresia *npv*, deși s-a observat o ușoară creștere (nesemnificativă) a numărului de copii ale ARNm și pentru doza de 1 mg/L (Fig. 5.35.). În schimb, COT s-a dovedit a fi mai eficientă la doza de 1 mg/L, normalizând numărul de copii de ARNm al genei *npv* în creierul peștelui zebra tratat cu SCOP (Fig. 5.35.) (293).

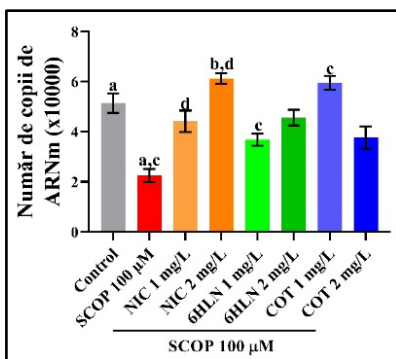


Figura 5.30. Efectele administrării NIC, 6HLN și COT (1 și 2 mg/L) asupra expresiei genei *npv* în creierul peștilor tratați cu SCOP. Valorile sunt exprimate ca medii $\pm$ S.E.M. ($n=4$ pești pe grup). Analiza ANOVA unidirecțională a identificat diferențe semnificative generale între condițiile experimentale [$F(7,24)=14,79$, $p<0,0001$] (293).

5.11.3. Efectul nicotinei, cotininei și 6-hidroxi-L-nicotinei asupra expresiei genei *egr1* în creierul peștilor zebra

Nivelul de expresie al genei *egr1* a fost evaluat în creierul peștilor zebra tratați simultan cu SCOP și NIC sau derivați nicotiniici. Figura 5.36. indică că tratamentul cu SCOP a determinat o scădere semnificativă puternică ($p<0,0001$) a numărului de copii de ARNm ale genei *egr1* în creierul peștilor comparativ cu animalele din lotul de control. În ceea ce privește NIC și derivații nicotiniici, testele de comparație multiple ale lui Tukey au arătat că cei trei compuși ameliorează efectul negativ al SCOP asupra expresiei *egr1*. NIC și COT au crescut numărul de copii ale ARNm în creierul peștelui zebra tratat cu SCOP într-o manieră dependentă de doză (Fig. 5.36.). 6HLN s-a dovedit a fi eficient doar atunci când a fost utilizată doza mai mare ($p<0,0001$ pentru doza de 2 mg/L), deși s-a observat o ușoară creștere și pentru doza de 1 mg/L (Fig. 5.36.) (293).

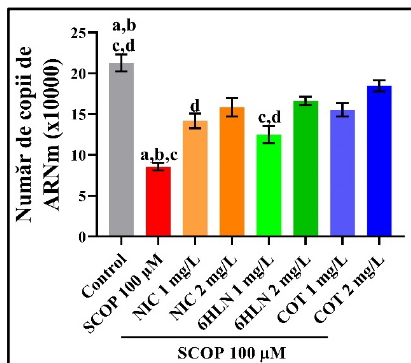


Figura 5.31. Efectele administrării NIC, 6HLN și COT (1 și 2 mg/L) asupra expresiei genei *egr1* în creierul peștilor tratați cu SCOP. Valorile sunt exprimate ca medii $\pm$ S.E.M. (n=4 pești pe grup). Analiza ANOVA unidirecțională a identificat diferențe semnificative generale între condițiile experimentale [$F(7,24)=19,87$, $p<0,0001$] (293).

5.11.4.Efectul nicotinei, cotininei și 6-hidroxi-L-nicotinei asupra expresiei genei *nrf2a* în creierul peștilor zebură

Nivelul de expresie al genei *nrf2a* a fost evaluat în creierul peștilor zebură co-tratați cu SCOP și NIC sau derivați nicotini. Conform figurii 5.37., expunerea acută la SCOP a redus puternic ($p<0,0001$) numărul copiilor ARNm ale genei *nrf2a* din creierul zebură, comparativ cu grupul de control. Ambele doze de NIC și COT au îmbunătățit în mod remarcabil ($p<0,0001$, Fig. 5.37.) expresia *nrf2a* la nivelul ARNm în creierul peștilor zebra tratați cu SCOP comparativ cu controlul negativ. În plus, ambele doze de 6HLN, în special cea de 1 mg/L, au crescut semnificativ ($p<0,0001$ și $p<0,05$ pentru 1 și respectiv 2 mg/L, Fig. 5.37.) numărul de copii de ARNm când a fost administrat concomitent cu SCOP (293).

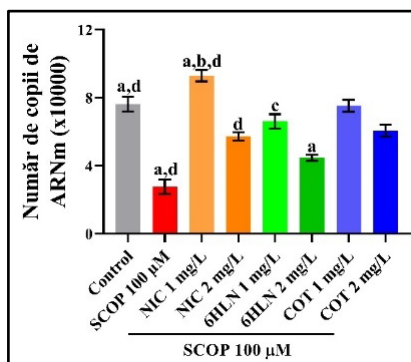


Figura 5.32. Efectele administrării NIC, 6HLN și COT (1 și 2 mg/L) asupra expresiei genei *nrf2a* în creierul peștilor tratați cu SCOP. Valorile sunt exprimate ca medii $\pm$

S.E.M. (n=4 pești pe grup). Analiza ANOVA unidirecțională a identificat diferențe semnificative generale între condițiile experimentale [$F(7,24)=32,96$, $p<0,0001$] (293).

5.12. Corelații Pearson între parametrii comportamentali, biochimici și genetici

Coeficientul de corelație Pearson (r) a fost calculat pentru a corela mai mulți parametri comportamentali sau biochimici cu MDA, produsul final al peroxidării lipidelor, sau cu nivelurile de expresie ale genelor *nrf2a*, *egr1* și *npv*.

În primul rând, am identificat mai multe corelații între scorurile comportamentale măsurate în testele de memorie și nivelurile de expresie ale genelor implicate în funcțiile cognitive. Rezultatele noastre indică faptul că timpul petrecut de peștele zebra în brațul nou al labirintului Y se corelează puternic cu nivelurile de expresie ale genelor *egr1* (n=10, $r=0,648$, $p<0,001$, Fig. 5.38.A) și *npv* (n=10, $r=0,524$, $p<0,01$, Anexa 1A). Mai mult decât atât, s-au obținut corelații pozitive între procentele de preferință calculate în cadrul testului NOR și numărul de copii de ARNm al genelor *npv* (n=10, $r=0,421$, $p<0,05$, Fig. 5.38.B) și *egr1* (n=10, $r=0,555$, $p<0,001$, Anexa 1B). Acest lucru sugerează că această creștere a performanțelor memoriei în grupurile tratate concomitent cu SCOP și NIC, 6HLN sau COT sunt bine corelate cu supra-expresia genelor *egr1* și *npv* (293).

În al doilea rând, am identificat o puternică corelație pozitivă între activitatea specifică a AChE și nivelul MDA (n=10, $r=0,819$, $p<0,001$, Fig. 5.38.C), sugerând astfel o activitate intensă a acestei enzime în creierul zebra atunci când nivelul de MDA este ridicat. În plus, datele noastre au dezvăluit corelații negative ridicate între componentele sistemului de apărare antioxidant și nivelul de MDA după cum urmează: CAT vs. MDA (n=10, $r=-0,613$, $p<0,001$, Fig. 5.38.D), GPX vs. MDA (n=10, $r=-0,692$, $p<0,001$, Anexa 1C) și GSH vs. MDA (n=10, $r=-0,678$, $p<0,001$, Anexa 1D). Aceste constatări sugerează că stimularea sistemului de apărare antioxidant de către NIC și derivații nicotinici este bine corelată cu un nivel scăzut de MDA (293).

În cele din urmă, am calculat regresia liniară între parametrii biochimici ai stresului oxidativ și nivelul de expresie al genei *nrf2a*. Activitatea specifică a CAT (n=10, $r=0,546$, $p<0,0001$, Fig. 5.38.E) și GPX (n=10, $r=0,697$, $p<0,001$, Anexa 1E) și conținutul de GSH (n=10, $r=0,678$, $p<0,001$, Fig. 5.38.F) au fost corelate pozitiv cu numărul de copii de ARNm al genei *nrf2a*. Cu toate acestea, acest lucru nu s-a aplicat și în cazul nivelului de MDA (n=10, $r=-0,577$, $p<0,001$, Anexa 1F), care a fost corelat negativ cu nivelul de expresie al genei *nrf2a*. Prin urmare, o reducere a stresului oxidativ indus de SCOP în creierul peștilor de către NIC, 6HLN și COT este asociată cu o supra-expresiei genei *nrf2a* (293).

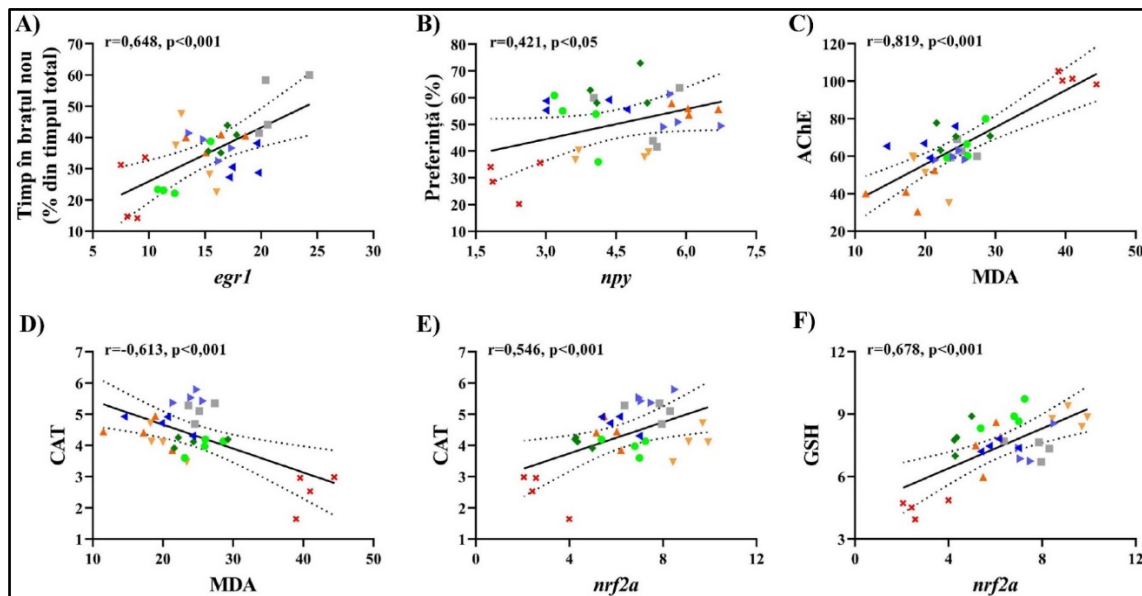


Figura 5.33. Coeficientul de corelație al lui Pearson (r) între parametrii comportamentali sau biochimici și nivelul de MDA sau markerii expresiei genice ($n=10$ animale pe grup): **(A)** Timpul în brațul nou (% din timpul total) vs. *egr1* ($r=0,648$, $p<0,001$), **(B)** Preferința % vs. *npv* ($r=0,421$, $p<0,05$), **(C)** AChE vs. MDA ($r=0,819$, $p<0,001$), **(D)** CAT vs. MDA ($r=-0,613$, $p<0,001$), **(E)** CAT vs. *nrf2a* ($r=0,546$, $p<0,001$) și **(F)** GSH vs. *nrf2a* ($r=0,678$, $p<0,001$) în control (■), SCOP (×), NIC 1 mg/L + SCOP (▽), NIC 2 mg/L + SCOP (▲), 6HLN 1 mg/L + SCOP (●), 6HLN 2 mg/L + SCOP (◆), COT 1 mg/L + SCOP (▶) și COT 2 mg/L + SCOP (◀). Datele sunt exprimate astfel: AChE (nmoli ATCh/min/mg proteină), MDA ($\mu\text{mol/L}$), CAT (U/mg proteină), GSH ($\mu\text{g GSH}/\mu\text{g proteină}$), *nrf2a* (număr de copii de ARNm, $\times 10000$) și *egr1* (număr de copii de ARNm, $\times 10000$) (293).

CONCLUZII

Studiul actual a fost realizat pentru a evalua impactul NIC și a celor doi derivați nicotinici, COT și 6HLN, asupra comportamentului și parametrilor biochimici și moleculari utilizând două modele animale diferite ale AD și anume: modelul de șobolan al AD indus prin infuzia i.c.v. a peptidei A β ₂₅₋₃₅ și modelul de pește zebură al AD indus prin imersie în SCOP. Rezultatele obținute au dus la formularea următoarelor concluzii generale:

1. La modelul de șobolan al AD indus de A β ₂₅₋₃₅, administrarea cronică de NIC, 6HLN și COT a ameliorat deficitul cognitive, anxietatea și depresia în testele comportamentale specifice. Aceste efecte au fost atribuite interacțiunilor dintre compușii chimici utilizați și receptorii nAChRs. Astfel, simulările de andocare moleculară au sugerat că 6HLN și COT s-ar putea atașa, cu o afinitate similară sau mai ridicată decât a NIC, de receptorii $\alpha 7$ și $\alpha 4\beta 2$ nAChRs. Mai mult decât atât, simulările efectuate la nivelul receptorilor $\alpha 4\beta 2$ nAChRs au indicat o posibilă afinitate mai mare a NIC, 6HLN și COT pentru situsul $\alpha 4$ - $\beta 2$ comparativ cu situsul $\alpha 4$ - $\alpha 4$. Analizele biochimice au demonstrat că NIC, 6HLN și COT prezintă proprietăți antiacetilcolinesterazice și antioxidante în omogenatele obținute din hipocampusul rozătoarelor. De asemenea, analiza moleculară prin RT-qPCR a indicat că tratamentul utilizat ar putea determina efecte neuroprotectoare, promnecice și antiinflamatorii prin modularea pozitivă a expresiei genelor *Bdnf*, *Arc* și respectiv *Il-1 β* .
2. La modelul de pește zebură al AD, datele obținute au demonstrat că tratamentul acut cu NIC și derivați nicotinici ameliorează starea similară anxietății și deficitul cognitive induse de SCOP în testele comportamentale specifice. Mai mult decât atât, tratamentul cu NIC, 6HLN și COT a redus activitatea AChE, a îmbunătățit sistemul antioxidant și a diminuat stresul oxidativ (oxidarea lipidelor și proteinelor) în omogenatele obținute din creierul peștilor zebură tratați cu SCOP. Abilitățile procognitive și proprietățile antioxidante ale NIC, COT și 6HLN ar putea fi datorate creșterii expresiei genelor *bdnf*, *npv*, *egr1* și *nrf2a* ca răspuns la o potențială modulare a receptorilor $\alpha 7$ nAChRs.
3. Toate aceste rezultate indică faptul că mecanismul care stă la baza îmbunătățirii memoriei poate implica modulări ale sistemului colinergic, expresie genică specifică și reducerea stresului oxidativ. Aceste dovezi sugerează că COT și 6HLN ar putea fi considerate o alternativă terapeutică viabilă pentru ameliorarea condițiilor asociate cu AD.

BIBLIOGRAFIE

1. **Hodson R.** Alzheimer's disease. *Nature*. 2018 Jul 25;559(7715):S1–S1.
2. **Alzheimer's Association.** 2020 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's Dement*. 2020 Mar 10;16(3):391–460.
3. **DeTure MA, Dickson DW.** The neuropathological diagnosis of Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener*. 2019 Dec 2;14(1):32.
4. **Johansson M, Stomrud E, Lindberg O, Westman E, Johansson PM, van Westen D, et al.** Apathy and anxiety are early markers of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2020 Jan;85:74–82.
5. **Ferreira-Vieira HT, Guimaraes MI, Silva RF, Ribeiro MF.** Alzheimer's disease: Targeting the Cholinergic System. *Curr Neuroparmacol*. 2016 Jan 22;14(1):101–15.
6. **Takahashi RH, Nagao T, Gouras GK.** Plaque formation and the intraneuronal accumulation of β -amyloid in Alzheimer's disease. *Pathology International*. 2017.
7. **Calderon-Garcidueñas AL, Duyckaerts C.** Alzheimer disease. In: *Handbook of Clinical Neurology*. Elsevier B.V.; 2018. p. 325–37.
8. **Hardy J, Selkoe DJ.** The Amyloid Hypothesis of Alzheimer's Disease: Progress and Problems on the Road to Therapeutics. *Science* (80-). 2002 Jul 19;297(5580):353–6.
9. **Barage SH, Sonawane KD.** Amyloid cascade hypothesis: Pathogenesis and therapeutic strategies in Alzheimer's disease. *Neuropeptides*. 2015 Aug;52:1–18.
10. **Selkoe DJ, Hardy J.** The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Mol Med*. 2016 Jun 29;8(6):595–608.
11. **Hampel H, Mesulam M-M, Cuello AC, Farlow MR, Giacobini E, Grossberg GT, et al.** The cholinergic system in the pathophysiology and treatment of Alzheimer's disease. *Brain*. 2018 Jul 1;141(7):1917–33.
12. **Lombardo S, Maskos U.** Role of the nicotinic acetylcholine receptor in Alzheimer's disease pathology and treatment. *Neuropharmacology*. 2015 Sep;96:255–62.
13. **Posadas I, López-Hernández B, Ceña V.** Nicotinic receptors in neurodegeneration. *Curr Neuroparmacol*. 2013 May;11(3):298–314.
14. **Parri HR, Hernandez CM, Dineley KT.** Research update: Alpha7 nicotinic acetylcholine receptor mechanisms in Alzheimer's disease. *Biochem Pharmacol*. 2011 Oct;82(8):931–42.
15. **Medeiros R, Castello NA, Cheng D, Kitazawa M, Baglietto-Vargas D, Green KN, et al.** α 7 Nicotinic Receptor Agonist Enhances Cognition in Aged 3xTg-AD Mice with Robust Plaques and Tangles. *Am J Pathol*. 2014 Feb;184(2):520–9.
16. **Sofuoglu M, Herman AI, Robinson C, Waters AJ.** Cognitive Effects of

- Nicotine. In: *The Effects of Drug Abuse on the Human Nervous System*. Elsevier; 2014. p. 367–85.
17. **Colzato LS**. Theory-Driven Approaches to Cognitive Enhancement [Internet]. Colzato LS, editor. *Theory-Driven Approaches to Cognitive Enhancement*. Cham: Springer International Publishing; 2017. 60–70 p.
 18. **Guan Z-Z, Yu W-F, Nordberg A**. Dual effects of nicotine on oxidative stress and neuroprotection in PC12 cells. *Neurochem Int*. 2003 Aug;43(3):243–9.
 19. **Nizri E, Irony-Tur-Sinai M, Lory O, Orr-Urtreger A, Lavi E, Brenner T**. Activation of the cholinergic anti-inflammatory system by nicotine attenuates neuroinflammation via suppression of Th1 and Th17 responses. *J Immunol*. 2009 Nov 15;183(10):6681–8.
 20. **Nordberg A, Hellström-Lindahl E, Lee M, Johnson M, Mousavi M, Hall R, et al**. Chronic nicotine treatment reduces beta-amyloidosis in the brain of a mouse model of Alzheimer's disease (APPsw). *J Neurochem*. 2002 May;81(3):655–8.
 21. **Benowitz NL, Fraiman JB**. Cardiovascular effects of electronic cigarettes. *Nat Rev Cardiol*. 2017 Aug 23;14(8):447–56.
 22. **Carr E**. Targeting Nicotine Addiction. *Clin J Oncol Nurs*. 2018 Jun 1;22(3):243–4.
 23. **Buccafusco JJ**. Neuronal Nicotinic Receptor Subtypes: DEFINING THERAPEUTIC TARGETS. *Mol Interv*. 2004 Oct 1;4(5):285–95.
 24. **Echeverria V, Zeitlin R**. Cotinine: A Potential New Therapeutic Agent against Alzheimer's disease. *CNS Neurosci Ther*. 2012 Jul;18(7):517–23.
 25. **Grizzell JA, Echeverria V**. New Insights into the Mechanisms of Action of Cotinine and its Distinctive Effects from Nicotine. *Neurochem Res*. 2015 Oct 27;40(10):2032–46.
 26. **Igloi GL, Brandsch R**. Sequence of the 165-Kilobase Catabolic Plasmid pAO1 from *Arthrobacter nicotinovorans* and Identification of a pAO1-Dependent Nicotine Uptake System. *J Bacteriol*. 2003 Mar 15;185(6):1976–86.
 27. **Brandsch R**. Microbiology and biochemistry of nicotine degradation. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2006 Jan;69(5):493–8.
 28. **Boiangiu R, Guzun D, Mihășan M**. Time dependent accumulation of nicotine derivatives in the culture medium of *Arthrobacter nicotinovorans* pAO1. *Analele Stiint ale Univ "Alexandru Ioan Cuza" din Iasi Sec II a Genet si Biol Mol*. 2014;15:19–23.
 29. **Hritcu L, Mihasan M**. 6-Hydroxy-l-Nicotine and Memory Impairment. In: *Neuroscience of Nicotine*. Elsevier; 2019. p. 165–72.
 30. **World Health Organization**. Dementia [Fact sheet] [Internet]. 2021.
 31. **Craig LA, Hong NS, McDonald RJ**. Revisiting the cholinergic hypothesis in the development of Alzheimer's disease. *Neurosci Biobehav Rev*. 2011 May 1;35(6):1397–409.

32. **Davies P, Maloney AJF.** Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease. *Lancet*. 1976 Dec 25;308(8000):1403.
33. **Bowen DM, Smith CB, White P, Davison AN.** Neurotransmitter-related enzymes and indices of hypoxia in senile dementia and other abiotrophies. *Brain*. 1976 Sep 1;99(3):459–96.
34. **Auld DS, Kar S, Quirion R.** Beta-amyloid peptides as direct cholinergic neuromodulators: a missing link? *Trends Neurosci*. 1998 Jan;21(1):43–9.
35. **Kar S, Issa AM, Seto D, Auld DS, Collier B, Quirion R.** Amyloid beta-peptide inhibits high-affinity choline uptake and acetylcholine release in rat hippocampal slices. *J Neurochem*. 1998 May;70(5):2179–87.
36. **Nordberg A, Alafuzoff I, Winblad B.** Nicotinic and muscarinic subtypes in the human brain: Changes with aging and dementia. *J Neurosci Res*. 1992 Jan;31(1):103–11.
37. **Forman MS, Trojanowski JQ, Lee VM-Y.** Neurodegenerative diseases: a decade of discoveries paves the way for therapeutic breakthroughs. *Nat Med*. 2004 Oct 1;10(10):1055–63.
38. **Tucker RP.** The roles of microtubule-associated proteins in brain morphogenesis: a review. *Brain Res Brain Res Rev*. 1990;15(2):101–20.
39. **Brandt R, Léger J, Lee G.** Interaction of tau with the neural plasma membrane mediated by tau's amino-terminal projection domain. *J Cell Biol*. 1995 Dec;131(5):1327–40.
40. **Mazanetz MP, Fischer PM.** Untangling tau hyperphosphorylation in drug design for neurodegenerative diseases. *Nat Rev Drug Discov*. 2007 Jun;6(6):464–79.
41. **Kuret J, Congdon EE, Li G, Yin H, Yu X, Zhong Q.** Evaluating triggers and enhancers of tau fibrillization. *Microsc Res Tech*. 2005 Jul;67(3–4):141–55.
42. **Roy S, Zhang B, Lee VM-Y, Trojanowski JQ.** Axonal transport defects: a common theme in neurodegenerative diseases. *Acta Neuropathol*. 2005 Jan 12;109(1):5–13.
43. **Hardy JA, Higgins GA.** Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science*. 1992 Apr 10;256(5054):184–5.
44. **Walsh DM, Selkoe DJ.** A beta oligomers - a decade of discovery. *J Neurochem*. 2007 Jun;101(5):1172–84.
45. **Perl DP.** Neuropathology of Alzheimer's disease. *Mt Sinai J Med*. 2010 Jan;77(1):32–42.
46. **Alzheimer A.** Ueber eine eigenartige erkrankung der hirnrinde. *Z Gesamte Neurol Psychiatr*. 1907;18:177–9.
47. **Iwatsubo T, Hasegawa M, Ihara Y.** Neuronal and glial tau-positive inclusions in diverse neurologic diseases share common phosphorylation characteristics. *Acta Neuropathol*. 1994;88(2):129–36.
48. **Lee VM, Balin BJ, Otvos L, Trojanowski JQ.** A68: a major subunit of paired

- helical filaments and derivatized forms of normal Tau. *Science*. 1991 Feb 8;251(4994):675–8.
49. **van der Kant R, Goldstein LSB.** Cellular Functions of the Amyloid Precursor Protein from Development to Dementia. *Dev Cell*. 2015 Feb 23;32(4):502–15.
 50. **Selkoe DJ.** Alzheimer's Disease Is a Synaptic Failure. *Science* (80-). 2002 Oct 25;298(5594):789–91.
 51. **Scheff SW, Price DA, Schmitt FA, DeKosky ST, Mufson EJ.** Synaptic alterations in CA1 in mild Alzheimer disease and mild cognitive impairment. *Neurology*. 2007 May 1;68(18):1501–8.
 52. **Masliah E, Mallory M, Alford M, DeTeresa R, Hansen LA, McKeel DW, et al.** Altered expression of synaptic proteins occurs early during progression of Alzheimer's disease. *Neurology*. 2001 Jan 9;56(1):127–9.
 53. **Querfurth HW, LaFerla FM.** Alzheimer's Disease. *N Engl J Med*. 2010 Jan 28;362(4):329–44.
 54. **Masliah E, Crews L, Hansen L.** Synaptic remodeling during aging and in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. 2006;9(3 Suppl):91–9.
 55. **Lister JP, Barnes CA.** Neurobiological changes in the hippocampus during normative aging. *Arch Neurol*. 2009 Jul 1;66(7):829–33.
 56. **Walsh DM.** Certain Inhibitors of Synthetic Amyloid -Peptide (A) Fibrillogenesis Block Oligomerization of Natural A and Thereby Rescue Long-Term Potentiation. *J Neurosci*. 2005 Mar 9;25(10):2455–62.
 57. **Shankar GM, Bloodgood BL, Townsend M, Walsh DM, Selkoe DJ, Sabatini BL.** Natural oligomers of the Alzheimer amyloid-beta protein induce reversible synapse loss by modulating an NMDA-type glutamate receptor-dependent signaling pathway. *J Neurosci*. 2007 Mar 14;27(11):2866–75.
 58. **Snyder EM, Nong Y, Almeida CG, Paul S, Moran T, Choi EY, et al.** Regulation of NMDA receptor trafficking by amyloid- β . *Nat Neurosci*. 2005 Aug 17;8(8):1051–8.
 59. **Hsieh H, Boehm J, Sato C, Iwatsubo T, Tomita T, Sisodia S, et al.** AMPAR Removal Underlies A β -Induced Synaptic Depression and Dendritic Spine Loss. *Neuron*. 2006 Dec;52(5):831–43.
 60. **Mucke L, Masliah E, Yu GQ, Mallory M, Rockenstein EM, Tatsuno G, et al.** High-level neuronal expression of abeta 1-42 in wild-type human amyloid protein precursor transgenic mice: synaptotoxicity without plaque formation. *J Neurosci*. 2000 Jun 1;20(11):4050–8.
 61. **Cooper JD, Salehi A, Delcroix JD, Howe CL, Belichenko P V, Chua-Couzens J, et al.** Failed retrograde transport of NGF in a mouse model of Down's syndrome: reversal of cholinergic neurodegenerative phenotypes following NGF infusion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Aug 28;98(18):10439–44.
 62. **Tuszynski MH.** Nerve Growth Factor Gene Therapy in Alzheimer Disease.

- Alzheimer Dis Assoc Disord. 2007 Apr;21(2):179–89.
63. **Connor B, Young D, Yan Q, Faull RL, Synek B, Dragunow M.** Brain-derived neurotrophic factor is reduced in Alzheimer's disease. *Brain Res Mol Brain Res.* 1997 Oct 3;49(1–2):71–81.
 64. **Garzon DJ, Fahnstock M.** Oligomeric amyloid decreases basal levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) mRNA via specific downregulation of BDNF transcripts IV and V in differentiated human neuroblastoma cells. *J Neurosci.* 2007 Mar 7;27(10):2628–35.
 65. **Ernfors P, Bramham CR.** The coupling of a trkB tyrosine residue to LTP. *Trends Neurosci.* 2003 Apr;26(4):171–3.
 66. **Nagahara AH, Merrill DA, Coppola G, Tsukada S, Schroeder BE, Shaked GM, et al.** Neuroprotective effects of brain-derived neurotrophic factor in rodent and primate models of Alzheimer's disease. *Nat Med.* 2009 Mar 8;15(3):331–7.
 67. **Ikonomic MD, Wecker L, Abrahamson EE, Wu J, Counts SE, Ginsberg SD, et al.** Cortical $\alpha 7$ Nicotinic Acetylcholine Receptor and β -Amyloid Levels in Early Alzheimer Disease. *Arch Neurol.* 2009 May 1;66(5):646–51.
 68. **Maelicke A, Samochocki M, Jostock R, Fehrenbacher A, Ludwig J, Albuquerque EX, et al.** Allosteric sensitization of nicotinic receptors by galantamine, a new treatment strategy for Alzheimer's disease. *Biol Psychiatry.* 2001 Feb 1;49(3):279–88.
 69. **Wang HY, Lee DH, D'Andrea MR, Peterson PA, Shank RP, Reitz AB.** beta-Amyloid(1–42) binds to alpha7 nicotinic acetylcholine receptor with high affinity. Implications for Alzheimer's disease pathology. *J Biol Chem.* 2000 Feb 25;275(8):5626–32.
 70. **Nitsch RM.** From acetylcholine to amyloid: neurotransmitters and the pathology of Alzheimer's disease. *Neurodegeneration.* 1996 Dec;5(4):477–82.
 71. **Caccamo A, Oddo S, Billings LM, Green KN, Martinez-Coria H, Fisher A, et al.** M1 receptors play a central role in modulating AD-like pathology in transgenic mice. *Neuron.* 2006 Mar 2;49(5):671–82.
 72. **Bitner RS, Nikkel AL, Markosyan S, Otte S, Puttfarcken P, Gopalakrishnan M.** Selective alpha7 nicotinic acetylcholine receptor activation regulates glycogen synthase kinase3beta and decreases tau phosphorylation in vivo. *Brain Res.* 2009 Apr 10;1265:65–74.
 73. **Bodick NC, Offen WW, Levey AI, Cutler NR, Gauthier SG, Satlin A, et al.** Effects of xanomeline, a selective muscarinic receptor agonist, on cognitive function and behavioral symptoms in Alzheimer disease. *Arch Neurol.* 1997 Apr;54(4):465–73.
 74. **Nitsch RM, Deng M, Tennis M, Schoenfeld D, Growdon JH.** The selective muscarinic M1 agonist AF102B decreases levels of total Abeta in cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease. *Ann Neurol.* 2000 Dec;48(6):913–8.

75. **Panza F, Frisardi V, Capurso C, D'Introno A, Colacicco AM, Imbimbo BP, et al.** Late-Life depression, mild cognitive impairment, and dementia: Possible continuum? *Am J Geriatr Psychiatry*. 2010;18(2):98–116.
76. **Steffens DC, R McQuoid D, Potter GG.** Amnesic mild cognitive impairment and incident dementia and Alzheimer's disease in geriatric depression. *Int Psychogeriatrics*. 2014 Dec 17;26(12):2029–36.
77. **Holmes C, Arranz M, Collier D, Powell J, Lovestone S.** Depression in Alzheimer's disease: The effect of serotonin receptor gene variation. *Am J Med Genet*. 2003 May 15;119B(1):40–3.
78. **Seignourel PJ, Kunik ME, Snow L, Wilson N, Stanley M.** Anxiety in dementia: A critical review. *Clin Psychol Rev*. 2008 Oct;28(7):1071–82.
79. **Kaiser NC, Liang L-J, Melrose RJ, Wilkins SS, Sultzer DL, Mendez MF.** Differences in Anxiety Among Patients With Early- Versus Late-Onset Alzheimer's Disease. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*. 2014 Jan;26(1):73–80.
80. **Ballard C, Neill D, O'Brien J, McKeith IG, Ince P, Perry R.** Anxiety, depression and psychosis in vascular dementia: prevalence and associations. *J Affect Disord*. 2000 Aug;59(2):97–106.
81. **Porter VR, Buxton WG, Fairbanks LA, Strickland T, O'Connor SM, Rosenberg-Thompson S, et al.** Frequency and Characteristics of Anxiety Among Patients With Alzheimer's Disease and Related Dementias. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*. 2003 May;15(2):180–6.
82. **Lyketsos CG.** Mental and Behavioral Disturbances in Dementia: Findings From the Cache County Study on Memory in Aging. *Am J Psychiatry*. 2000 May 1;157(5):708–14.
83. **Chemerinski E, Petracca G, Manes F, Leiguarda R, Starkstein SE.** Prevalence and correlates of anxiety in Alzheimer's disease. *Depress Anxiety*. 1998;7(4):166–70.
84. **Reitz C, Mayeux R.** Alzheimer disease: Epidemiology, diagnostic criteria, risk factors and biomarkers. *Biochem Pharmacol*. 2014 Apr;88(4):640–51.
85. **De Strooper B, Saftig P, Craessaerts K, Vanderstichele H, Guhde G, Annaert W, et al.** Deficiency of presenilin-1 inhibits the normal cleavage of amyloid precursor protein. *Nature*. 1998 Jan;391(6665):387–90.
86. **Scheuner D, Eckman C, Jensen M, Song X, Citron M, Suzuki N, et al.** Secreted amyloid beta-protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. *Nat Med*. 1996 Aug;2(8):864–70.
87. **Green RC, Cupples LA, Go R, Benke KS, Edeki T, Griffith PA, et al.** Risk of dementia among white and African American relatives of patients with Alzheimer disease. *J Am Med Assoc*. 2002;
88. **Gatz M, Reynolds CA, Fratiglioni L, Johansson B, Mortimer JA, Berg S,**

- et al.** Role of genes and environments for explaining Alzheimer disease. *Arch Gen Psychiatry*. 2006 Feb 1;63(2):168–74.
89. **Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, et al.** Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science*. 1993 Aug 13;261(5123):921–3.
 90. **Poirier J, Davignon J, Bouthillier D, Kogan S, Bertrand P, Gauthier S.** Apolipoprotein E polymorphism and Alzheimer's disease. *Lancet (London, England)*. 1993 Sep 18;342(8873):697–9.
 91. **Bekris LM, Yu C-E, Bird TD, Tsuang DW.** Genetics of Alzheimer Disease. *J Geriatr Psychiatry Neurol*. 2010 Dec 2;23(4):213–27.
 92. **Moruzzi E.** Genetica în boala Alzheimer. *Rom J Med Pract*. 2014;9(4(37)):214–8.
 93. **Hebert LE, Bienias JL, Aggarwal NT, Wilson RS, Bennett DA, Shah RC, et al.** Change in risk of Alzheimer disease over time. *Neurology*. 2010 Aug 31;75(9):786–91.
 94. **Nelson PT, Head E, Schmitt FA, Davis PR, Neltner JH, Jicha GA, et al.** Alzheimer's disease is not "brain aging": neuropathological, genetic, and epidemiological human studies. *Acta Neuropathol*. 2011 May 24;121(5):571–87.
 95. **Loy CT, Schofield PR, Turner AM, Kwok JB.** Genetics of dementia. *Lancet*. 2014 Mar 1;383(9919):828–40.
 96. **Wolters FJ, van der Lee SJ, Koudstaal PJ, van Duijn CM, Hofman A, Ikram MK, et al.** Parental family history of dementia in relation to subclinical brain disease and dementia risk. *Neurology*. 2017 Apr 25;88(17):1642–9.
 97. **Luchsinger JA.** Adiposity, hyperinsulinemia, diabetes and Alzheimer's disease: an epidemiological perspective. *Eur J Pharmacol*. 2008 May 6;585(1):119–29.
 98. **Sahoo AK, Dandapat J, Dash UC, Kanhar S.** Features and outcomes of drugs for combination therapy as multi-targets strategy to combat Alzheimer's disease. *J Ethnopharmacol*. 2018 Apr 6;215:42–73.
 99. **Anand P, Singh B.** A review on cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *Arch Pharm Res*. 2013 Apr 24;36(4):375–99.
 100. **Krishnan KRR, Charles HC, Doraiswamy PM, Mintzer J, Weisler R, Yu X, et al.** Randomized, placebo-controlled trial of the effects of donepezil on neuronal markers and hippocampal volumes in Alzheimer's disease. *Am J Psychiatry*. 2003 Nov;160(11):2003–11.
 101. **Lopez OL, Becker JT, Wisniewski S, Saxton J, Kaufer DI, DeKosky ST.** Cholinesterase inhibitor treatment alters the natural history of Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2002 Mar;72(3):310–4.
 102. **Mori E, Hashimoto M, Krishnan KR, Doraiswamy PM.** What constitutes

- clinical evidence for neuroprotection in Alzheimer disease: support for the cholinesterase inhibitors? *Alzheimer Dis Assoc Disord*. 2006 Apr;20(2 Suppl 1):S19-26.
103. **Singh S, Kushwah AS, Singh R, Farswan M, Kaur R.** Current therapeutic strategy in Alzheimer's disease. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2012 Nov;16(12):1651–64.
 104. **Reichman WE.** Current pharmacologic options for patients with Alzheimer's disease. *Ann Gen Hosp Psychiatry*. 2003 Jan 29;2(1):1.
 105. **Wagstaff AJ, McTavish D.** Tacrine. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic efficacy in Alzheimer's disease. *Drugs Aging*. 1994 Jun;4(6):510–40.
 106. **Tokita K, Yamazaki S, Yamazaki M, Matsuoka N, Mutoh S.** Combination of a novel antidementia drug FK960 with donepezil synergistically improves memory deficits in rats. *Pharmacol Biochem Behav*. 2002 Oct;73(3):511–9.
 107. **Wilcock GK, Lilienfeld S, Gaens E.** Efficacy and safety of galantamine in patients with mild to moderate Alzheimer's disease: multicentre randomised controlled trial. *Galantamine International-1 Study Group. BMJ*. 2000 Dec 9;321(7274):1445–9.
 108. **Tatemoto K, Carlquist M, Mutt V.** Neuropeptide Y—a novel brain peptide with structural similarities to peptide YY and pancreatic polypeptide. *Nature*. 1982 Apr;296(5858):659–60.
 109. **Götzsche CR, Woldbye DPD.** The role of NPY in learning and memory. *Neuropeptides*. 2016 Feb;55:79–89.
 110. **Chan-Palay V, Lang W, Allen YS, Haesler U, Polak JM.** II. Cortical neurons immunoreactive with antisera against neuropeptide Y are altered in Alzheimer's-type dementia. *J Comp Neurol*. 1985 Aug 22;238(4):390–400.
 111. **Davies CA, Morroll DR, Prinja D, Mann DMA, Gibbs A.** A quantitative assessment of somatostatin-like and neuropeptide Y-like immunostained cells in the frontal and temporal cortex of patients with Alzheimer's disease. *J Neurol Sci*. 1990 Apr;96(1):59–73.
 112. **Beal MF, Martin JB.** Neuropeptides in neurological disease. *Ann Neurol*. 1986 Nov;20(5):547–65.
 113. **Koide S, Onishi H, Hashimoto H, Kai T, Yamagami S.** Plasma neuropeptide Y is reduced in patients with Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*. 1995 Sep;198(2):149–51.
 114. **Minthon L, Edvinsson L, Gustafson L.** Correlation Between Clinical Characteristics and Cerebrospinal Fluid Neuropeptide Y Levels in Dementia of the Alzheimer Type and Frontotemporal Dementia. *Alzheimer Dis Assoc Disord*. 1996;10(4):197–203.
 115. **Tanila H.** The role of BDNF in Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis*. 2017 Jan;97:114–8.

116. **Minichiello L.** TrkB signalling pathways in LTP and learning. *Nat Rev Neurosci.* 2009 Dec;10(12):850–60.
117. **Koponen E, Vöikar V, Riekkö R, Saarelainen T, Rauramaa T, Rauvala H, et al.** Transgenic mice overexpressing the full-length neurotrophin receptor trkB exhibit increased activation of the trkB–PLC γ pathway, reduced anxiety, and facilitated learning. *Mol Cell Neurosci.* 2004 May;26(1):166–81.
118. **Garzon D, Yu G, Fahnstock M.** A new brain-derived neurotrophic factor transcript and decrease in brain-derived neurotrophic factor transcripts 1, 2 and 3 in Alzheimer’s disease parietal cortex. *J Neurochem.* 2004 Feb 3;82(5):1058–64.
119. **Peng S, Wu J, Mufson EJ, Fahnstock M.** Precursor form of brain-derived neurotrophic factor and mature brain-derived neurotrophic factor are decreased in the pre-clinical stages of Alzheimer’s disease. *J Neurochem.* 2005 May 16;93(6):1412–21.
120. **Wong J, Higgins M, Halliday G, Garner B.** Amyloid beta selectively modulates neuronal TrkB alternative transcript expression with implications for Alzheimer’s disease. *Neuroscience.* 2012 May;210:363–74.
121. **Lesuis SL, Hoeijmakers L, Korosi A, de Rooij SR, Swaab DF, Kessels HW, et al.** Vulnerability and resilience to Alzheimer’s disease: early life conditions modulate neuropathology and determine cognitive reserve. *Alzheimers Res Ther.* 2018 Dec 19;10(1):95.
122. **Zhu Q-B, Unmehopa U, Bossers K, Hu Y-T, Verwer R, Balesar R, et al.** MicroRNA-132 and early growth response-1 in nucleus basalis of Meynert during the course of Alzheimer’s disease. *Brain.* 2016 Mar;139(3):908–21.
123. **Bossers K, Wirz KTS, Meerhoff GF, Essing AHW, van Dongen JW, Houba P, et al.** Concerted changes in transcripts in the prefrontal cortex precede neuropathology in Alzheimer’s disease. *Brain.* 2010 Dec;133(12):3699–723.
124. **Wirz KTS, Bossers K, Stargardt A, Kamphuis W, Swaab DF, Hol EM, et al.** Cortical beta amyloid protein triggers an immune response, but no synaptic changes in the APP^{swe}/PS1^{dE9} Alzheimer’s disease mouse model. *Neurobiol Aging.* 2013 May;34(5):1328–42.
125. **Dickey CA, Loring JF, Montgomery J, Gordon MN, Eastman PS, Morgan D.** Selectively Reduced Expression of Synaptic Plasticity-Related Genes in Amyloid Precursor Protein + Presenilin-1 Transgenic Mice. *J Neurosci.* 2003 Jun 15;23(12):5219–26.
126. **Li L, Carter J, Gao X, Whitehead J, Tourtellotte WG.** The Neuroplasticity-Associated Arc Gene Is a Direct Transcriptional Target of Early Growth Response (Egr) Transcription Factors. *Mol Cell Biol.* 2005 Dec 1;25(23):10286–300.
127. **Link W, Konietzko U, Kauselmann G, Krug M, Schwanke B, Frey U, et al.** Somatodendritic expression of an immediate early gene is regulated by synaptic

- activity. *Proc Natl Acad Sci.* 1995 Jun 6;92(12):5734–8.
128. **Rodriguez JJ, Davies HA, Silva AT, De Souza IEJ, Peddie CJ, Colyer FM, et al.** Long-term potentiation in the rat dentate gyrus is associated with enhanced Arc/Arg3.1 protein expression in spines, dendrites and glia. *Eur J Neurosci.* 2005 May;21(9):2384–96.
129. **Bloomer WAC, VanDongen HMA, VanDongen AMJ.** Activity-regulated cytoskeleton-associated protein Arc/Arg3.1 binds to spectrin and associates with nuclear promyelocytic leukemia (PML) bodies. *Brain Res.* 2007 Jun 11;1153(1):20–33.
130. **Vazdarjanova A, Ramirez-Amaya V, Insel N, Plummer TK, Rosi S, Chowdhury S, et al.** Spatial exploration induces ARC, a plasticity-related immediate-early gene, only in calcium/calmodulin-dependent protein kinase II-positive principal excitatory and inhibitory neurons of the rat forebrain. *J Comp Neurol.* 2006 Sep 20;498(3):317–29.
131. **Lacor PN, Buniel MC, Chang L, Fernandez SJ, Gong Y, Viola KL, et al.** Synaptic targeting by Alzheimer’s-related amyloid beta oligomers. *J Neurosci.* 2004 Nov 10;24(45):10191–200.
132. **Wegenast-Braun BM, Fulgencio Maisch A, Eicke D, Radde R, Herzig MC, Staufenbiel M, et al.** Independent Effects of Intra- and Extracellular A β on Learning-Related Gene Expression. *Am J Pathol.* 2009 Jul;175(1):271–82.
133. **Palop JJ.** Vulnerability of Dentate Granule Cells to Disruption of Arc Expression in Human Amyloid Precursor Protein Transgenic Mice. *J Neurosci.* 2005 Oct 19;25(42):9686–93.
134. **Dickey CA, Gordon MN, Mason JE, Wilson NJ, Diamond DM, Guzowski JF, et al.** Amyloid suppresses induction of genes critical for memory consolidation in APP + PS1 transgenic mice. *J Neurochem.* 2004 Dec 23;88(2):434–42.
135. **Dinkova-Kostova AT, Kostov R V., Kazantsev AG.** The role of Nrf2 signaling in counteracting neurodegenerative diseases. *FEBS J.* 2018 Oct;285(19):3576–90.
136. **Wang Q, Li W-X, Dai S-X, Guo Y-C, Han F-F, Zheng J-J, et al.** Meta-Analysis of Parkinson’s Disease and Alzheimer’s Disease Revealed Commonly Impaired Pathways and Dysregulation of NRF2-Dependent Genes. *J Alzheimer’s Dis.* 2017 Feb 20;56(4):1525–39.
137. **Rojo AI, Pajares M, Rada P, Nuñez A, Nevado-Holgado AJ, Killik R, et al.** NRF2 deficiency replicates transcriptomic changes in Alzheimer’s patients and worsens APP and TAU pathology. *Redox Biol.* 2017 Oct;13:444–51.
138. **Branca C, Ferreira E, Nguyen T-V, Doyle K, Caccamo A, Oddo S.** Genetic reduction of Nrf2 exacerbates cognitive deficits in a mouse model of Alzheimer’s disease. *Hum Mol Genet.* 2017 Dec 15;26(24):4823–35.
139. **Oksanen M, Hyötyläinen I, Trontti K, Rolova T, Wojciechowski S, Koskivi**

- M, et al.** NF-E2-related factor 2 activation boosts antioxidant defenses and ameliorates inflammatory and amyloid properties in human Presenilin-1 mutated Alzheimer's disease astrocytes. *Glia*. 2020;68(3):589–99.
140. **Cacabelos R, Alvarez XA, Fernández-Novoa L, Franco A, Mangues R, Pellicer A, et al.** Brain interleukin-1 beta in Alzheimer's disease and vascular dementia. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*. 1994 Mar;16(2):141–51.
 141. **Simard AR, Soulet D, Gowing G, Julien J-P, Rivest S.** Bone Marrow-Derived Microglia Play a Critical Role in Restricting Senile Plaque Formation in Alzheimer's Disease. *Neuron*. 2006 Feb;49(4):489–502.
 142. **Craft JM, Watterson DM, Hirsch E, Van Eldik LJ.** Interleukin 1 receptor antagonist knockout mice show enhanced microglial activation and neuronal damage induced by intracerebroventricular infusion of human beta-amyloid. *J Neuroinflammation*. 2005 Jun 20;2(1):15.
 143. **Blasko I, Veerhuis R, Stampfer-Kountchev M, Saurwein-Teissl M, Eikelenboom P, Grubeck-Loebenstien B.** Costimulatory Effects of Interferon- γ and Interleukin-1 β or Tumor Necrosis Factor α on the Synthesis of A β 1-40 and A β 1-42 by Human Astrocytes. *Neurobiol Dis*. 2000 Dec;7(6):682–9.
 144. **Griffin WST, Liu L, Li Y, Mrak RE, Barger SW.** Interleukin-1 mediates Alzheimer and Lewy body pathologies. *J Neuroinflammation*. 2006 Mar 16;3(1):5.
 145. **Aparicio N, Grande MT, Ruiz de Martín Esteban S, López A, Ruiz-Pérez G, Amores M, et al.** Role of interleukin 1-beta in the inflammatory response in a fatty acid amide hydrolase-knockout mouse model of Alzheimer's disease. *Biochem Pharmacol*. 2018 Nov;157:202–9.
 146. **Benowitz NL, Hukkanen J, Jacob P.** Nicotine Chemistry, Metabolism, Kinetics and Biomarkers. In: *Nicotine Psychopharmacology*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2009. p. 29–60.
 147. **Gurusamy R, Natarajan S.** Current Status on Biochemistry and Molecular Biology of Microbial Degradation of Nicotine. *Sci World J*. 2013;2013:1–15.
 148. **Dome P, Lazary J, Kalapos MP, Rihmer Z.** Smoking, nicotine and neuropsychiatric disorders. *Neurosci Biobehav Rev*. 2010 Mar;34(3):295–342.
 149. **Metz CN, Gregersen PK, Malhotra AK.** Metabolism and biochemical effects of nicotine for primary care providers. *Med Clin North Am*. 2004 Nov;88(6):1399–413, ix.
 150. **Rezvani AH, Levin ED.** Cognitive effects of nicotine. *Biol Psychiatry*. 2001 Feb 1;49(3):258–67.
 151. **Hao J, Simard AR, Turner GH, Wu J, Whiteaker P, Lukas RJ, et al.** Attenuation of CNS inflammatory responses by nicotine involves $\alpha 7$ and non- $\alpha 7$ nicotinic receptors. *Exp Neurol*. 2011 Jan;227(1):110–9.
 152. **Han Y, Lau Y.** Nicotine, an anti-inflammation molecule. *Inflamm Cell Signal*.

2014 Jul 1;1(2).

153. **Wei P, Liu Q, Li D, Zheng Q, Zhou J, Li J.** Acute nicotine treatment attenuates lipopolysaccharide-induced cognitive dysfunction by increasing BDNF expression and inhibiting neuroinflammation in the rat hippocampus. *Neurosci Lett.* 2015 Sep 14;604:161–6.
154. **Shytle RD, Mori T, Townsend K, Vendrame M, Sun N, Zeng J, et al.** Cholinergic modulation of microglial activation by $\alpha 7$ nicotinic receptors. *J Neurochem.* 2004 Mar 8;89(2):337–43.
155. **Sadigh-Eteghad S, Majdi A, Mahmoudi J, Golzari SEJ, Talebi M.** Astrocytic and microglial nicotinic acetylcholine receptors: an overlooked issue in Alzheimer's disease. *J Neural Transm.* 2016 Dec 4;123(12):1359–67.
156. **Hellström-Lindahl E, Court J, Keverne J, Svedberg M, Lee M, Marutle A, et al.** Nicotine reduces A beta in the brain and cerebral vessels of APPsw mice. *Eur J Neurosci.* 2004 May;19(10):2703–10.
157. **Utsuki T, Shoaib M, Holloway HW, Ingram DK, Wallace WC, Haroutunian V, et al.** Nicotine lowers the secretion of the Alzheimer's amyloid beta-protein precursor that contains amyloid beta-peptide in rat. *J Alzheimers Dis.* 2002 Oct;4(5):405–15.
158. **Ono K, Hasegawa K, Yamada M, Naiki H.** Nicotine breaks down preformed Alzheimer's beta-amyloid fibrils in vitro. *Biol Psychiatry.* 2002 Nov 1;52(9):880–6.
159. **Dineley KT, Westerman M, Bui D, Bell K, Ashe KH, Sweatt JD.** β -Amyloid activates the mitogen-activated protein kinase cascade via hippocampal $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors: In Vitro and in Vivo mechanisms related to Alzheimer's disease. *J Neurosci.* 2001 Jun 15;21(12):4125–33.
160. **Matta SG, Balfour DJ, Benowitz NL, Boyd RT, Buccafusco JJ, Caggiula AR, et al.** Guidelines on nicotine dose selection for in vivo research. *Psychopharmacology (Berl).* 2007 Feb 9;190(3):269–319.
161. **Linert W, Bridge MH, Huber M, Bjugstad KB, Grossman S, Arendash GW.** In vitro and in vivo studies investigating possible antioxidant actions of nicotine: relevance to Parkinson's and Alzheimer's diseases. *Biochim Biophys Acta.* 1999 Jul 7;1454(2):143–52.
162. **Pachauri V, Flora SJS.** Effect of nicotine pretreatment on arsenic-induced oxidative stress in male Wistar rats. *Hum Exp Toxicol.* 2013 Sep 8;32(9):972–82.
163. **Soto-Otero R, Méndez-Alvarez E, Hermida-Ameijeiras A, López-Real AM, Labandeira-García JL.** Effects of (-)-nicotine and (-)-cotinine on 6-hydroxydopamine-induced oxidative stress and neurotoxicity: relevance for Parkinson's disease. *Biochem Pharmacol.* 2002 Jul 1;64(1):125–35.
164. **Goerig M, Ullrich V, Schettler G, Foltis C, Habenicht A.** A new role for nicotine: selective inhibition of thromboxane formation by direct interaction

- with thromboxane synthase in human promyelocytic leukaemia cells differentiating into macrophages. *Clin Investig.* 1992;70(3–4):239–43.
165. **Song G, Nesil T, Cao J, Yang Z, Chang SL, Li MD.** Nicotine mediates expression of genes related to antioxidant capacity and oxidative stress response in HIV-1 transgenic rat brain. *J Neurovirol.* 2016 Feb 26;22(1):114–24.
 166. **Crowley-Weber CL, Dvorakova K, Crowley C, Bernstein H, Bernstein C, Garewal H, et al.** Nicotine increases oxidative stress, activates NF-kappaB and GRP78, induces apoptosis and sensitizes cells to genotoxic/xenobiotic stresses by a multiple stress inducer, deoxycholate: relevance to colon carcinogenesis. *Chem Biol Interact.* 2003 Mar 6;145(1):53–66.
 167. **Donato MT, Viitala P, Rodriguez-Antona C, Lindfors A, Castell J V, Raunio H, et al.** CYP2A5/CYP2A6 expression in mouse and human hepatocytes treated with various in vivo inducers. *Drug Metab Dispos.* 2000 Nov;28(11):1321–6.
 168. **Visoni S, Meireles N, Monteiro L, Rossini A, Pinto LFR.** Different modes of inhibition of mouse Cyp2a5 and rat CYP2A3 by the food-derived 8-methoxypsoralen. *Food Chem Toxicol.* 2008 Mar;46(3):1190–5.
 169. **Yamanaka H, Nakajima M, Nishimura K, Yoshida R, Fukami T, Katoh M, et al.** Metabolic profile of nicotine in subjects whose CYP2A6 gene is deleted. *Eur J Pharm Sci.* 2004 Aug;22(5):419–25.
 170. **Nakajima M, Fukami T, Yamanaka H, Higashi E, Sakai H, Yoshida R, et al.** Comprehensive evaluation of variability in nicotine metabolism and CYP2A6 polymorphic alleles in four ethnic populations. *Clin Pharmacol Ther.* 2006 Sep;80(3):282–97.
 171. **Lockman PR.** Brain Uptake Kinetics of Nicotine and Cotinine after Chronic Nicotine Exposure. *J Pharmacol Exp Ther.* 2005 Apr 1;314(2):636–42.
 172. **Riah O, Courrière P, Dousset J-C, Todeschi N, Labat C.** Nicotine is more efficient than cotinine at passing the blood-brain barrier in rats. *Cell Mol Neurobiol.* 1998 Jun;18(3):311–8.
 173. **Hatsukami DK, Grillo M, Pentel PR, Oncken C, Bliss R.** Safety of cotinine in humans: physiologic, subjective, and cognitive effects. *Pharmacol Biochem Behav.* 1997 Aug;57(4):643–50.
 174. **Echeverria V, Zeitlin R, Burgess S, Patel S, Barman A, Thakur G, et al.** Cotinine reduces amyloid- β aggregation and improves memory in Alzheimer's disease mice. *J Alzheimer's Dis.* 2011;24(4):817–35.
 175. **Echeverria V, Yarkov A, Aliev G.** Positive modulators of the $\alpha 7$ nicotinic receptor against neuroinflammation and cognitive impairment in Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol.* 2016 Sep;144:142–57.
 176. **Echeverria V, Burgess S, Zeitlin R, Barman A, Thakur G, Inouye H, et al.** Cotinine: A dual-action drug with multiple benefits against Alzheimer's disease. *Alzheimer's Dement.* 2010 Jul 1;6(4):S536–7.

177. **Patel S, Grizzell JA, Holmes R, Zeitlin R, Solomon R, Sutton TL, et al.** Cotinine halts the advance of Alzheimer's disease-like pathology and associated depressive-like behavior in Tg6799 mice. *Front Aging Neurosci.* 2014 Jul 23;6:162.
178. **Rehani K, Scott DA, Renaud D, Hamza H, Williams LR, Wang H, et al.** Cotinine-induced convergence of the cholinergic and PI3 kinase-dependent anti-inflammatory pathways in innate immune cells. *Biochim Biophys Acta.* 2008 Mar;1783(3):375–82.
179. **Szymańska I, Radecka H, Radecki J, Kaliszan R.** Electrochemical impedance spectroscopy for study of amyloid beta-peptide interactions with (-) nicotine ditartrate and (-) cotinine. *Biosens Bioelectron.* 2007 Apr 15;22(9–10):1955–60.
180. **Salomon AR, Marcinowski KJ, Friedland RP, Zagorski MG.** Nicotine Inhibits Amyloid Formation by the β -Peptide $\dagger$. *Biochemistry.* 1996 Jan 22;35(42):13568–78.
181. **Burgess S, Zeitlin R, Echeverria V.** Cotinine Inhibits Amyloid- β Peptide Neurotoxicity and Oligomerization. *J Clin Toxicol.* 2012 Apr 20;01(S6):2011–3.
182. **Hrițcu L, Ștefan M, Brandsch R, Mihășan M.** 6-hydroxy-l-nicotine from *Arthrobacter nicotinovorans* sustain spatial memory formation by decreasing brain oxidative stress in rats. *J Physiol Biochem.* 2013 Mar 20;69(1):25–34.
183. **Mihășan M, Căpățînă L, Neagu E, Ștefan M, Hrițcu L.** In-silico identification of 6-hydroxy-L-nicotine as a novel neuroprotective drug. *Rom Biotechnol Lett.* 2013;18(3):8333–40.
184. **Hritcu L, Stefan M, Brandsch R, Mihasan M.** Enhanced behavioral response by decreasing brain oxidative stress to 6-hydroxy-l-nicotine in Alzheimer's disease rat model. *Neurosci Lett.* 2015 Mar 30;591:41–7.
185. **Hritcu L, Ionita R, Motei DE, Babii C, Ștefan M, Mihasan M.** Nicotine versus 6-hydroxy-l-nicotine against chlorisondamine induced memory impairment and oxidative stress in the rat hippocampus. *Biomed Pharmacother.* 2017 Feb;86:102–8.
186. **LaFerla FM, Green KN.** Animal Models of Alzheimer Disease. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012 Nov 1;2(11):a006320–a006320.
187. **Kumar A, Aggarwal A, Singh A, Naidu PS.** Animal Models in Drug Discovery of Alzheimer's Disease: A Mini Review. *EC Pharmacol Toxicol.* 2016;2(1):60–79.
188. **Yamada K, Nabeshima T.** Animal models of Alzheimer's disease and evaluation of anti-dementia drugs. *Pharmacol Ther.* 2000 Nov;88(2):93–113.
189. **Sabbagh JJ, Kinney JW, Cummings JL.** Animal systems in the development of treatments for Alzheimer's disease: challenges, methods, and implications. *Neurobiol Aging.* 2013 Jan;34(1):169–83.

190. **Neha, Sodhi RK, Jaggi AS, Singh N.** Animal models of dementia and cognitive dysfunction. *Life Sci.* 2014 Jul 30;109(2):73–86.
191. **Wu Y-Y, Wang X, Tan L, Liu D, Liu X-H, Wang Q, et al.** Lithium attenuates scopolamine-induced memory deficits with inhibition of GSK-3 β and preservation of postsynaptic components. Alonso A, Gong C, editors. *J Alzheimers Dis.* 2013 Sep 24;37(3):515–27.
192. **Chen C, Li X-H, Zhang S, Tu Y, Wang Y-M, Sun H-T.** 7,8-Dihydroxyflavone Ameliorates Scopolamine-Induced Alzheimer-Like Pathologic Dysfunction. *Rejuvenation Res.* 2014 Jun 17;17(3):249–54.
193. **Goverdhan P, Sravanthi A, Mamatha T.** Neuroprotective effects of meloxicam and selegiline in scopolamine-induced cognitive impairment and oxidative stress. *Int J Alzheimers Dis.* 2012;2012:974013.
194. **Schifilliti D, Santamaria LB, Rosa G, Di Nino G, Mandal PK, Fodale V.** Cholinergic central system, Alzheimer's disease, and anesthetics liaison: a vicious circle? Mandal PK, Fodale V, editors. *J Alzheimers Dis.* 2010 Sep 29;22 Suppl 3(s3):35–41.
195. **Yang S, Zhou G, Liu H, Zhang B, Li J, Cui R, et al.** Protective effects of p38 MAPK inhibitor SB202190 against hippocampal apoptosis and spatial learning and memory deficits in a rat model of vascular dementia. *Biomed Res Int.* 2013;2013:215798.
196. **Riedel G, Kang SH, Choi DY, Platt B.** Scopolamine-induced deficits in social memory in mice: Reversal by donepezil. *Behav Brain Res.* 2009 Dec 1;204(1):217–25.
197. **Lu P, Mamiya T, Lu LL, Mouri A, Zou L, Nagai T, et al.** Silibinin prevents amyloid beta peptide-induced memory impairment and oxidative stress in mice. *Br J Pharmacol.* 2009 Aug;157(7):1270–7.
198. **Desrumaux C, Pisoni A, Meunier J, Deckert V, Athias A, Perrier V, et al.** Increased Amyloid- β Peptide-Induced Memory Deficits in Phospholipid Transfer Protein (PLTP) Gene Knockout Mice. *Neuropsychopharmacology.* 2013 Apr 3;38(5):817–25.
199. **Meng QH, Lou FL, Hou WX, Liu M, Guo H, Zhang XM.** Acetylpuerarin reduces inflammation and improves memory function in a rat model of Alzheimer's disease induced by Abeta1-42. *Pharmazie.* 2013 Nov;68(11):904–8.
200. **Do Carmo S, Cuello AC.** Modeling Alzheimer's disease in transgenic rats. *Mol Neurodegener.* 2013 Oct 25;8(1):37.
201. **Newman M, Ebrahimie E, Lardelli M.** Using the zebrafish model for Alzheimer's disease research. *Front Genet.* 2014 Jun 30;5:189.
202. **Lieschke GJ, Currie PD.** Animal models of human disease: zebrafish swim into view. *Nat Rev Genet.* 2007 May;8(5):353–67.
203. **Saleem S, Kannan RR.** Zebrafish: an emerging real-time model system to

- study Alzheimer's disease and neurospecific drug discovery. *Cell death Discov.* 2018 Dec 3;4(1):45.
204. **Spitsbergen JM, Kent ML.** The state of the art of the zebrafish model for toxicology and toxicologic pathology research--advantages and current limitations. *Toxicol Pathol.* 2003 Jan 17;31 Suppl(1_suppl):62–87.
 205. **Wullmann MF, Rupp B, Reichert H.** Introduction: neuroanatomy for a neurogenetic model system. In: *Neuroanatomy of the Zebrafish Brain*. Basel: Birkhäuser Basel; 1996. p. 1–5.
 206. **Mueller T, Wullmann MF.** An evolutionary interpretation of teleostean forebrain anatomy. *Brain Behav Evol.* 2009;74(1):30–42.
 207. **Mueller T, Vernier P, Wullmann MF.** The adult central nervous cholinergic system of a neurogenetic model animal, the zebrafish *Danio rerio*. *Brain Res.* 2004 Jun 18;1011(2):156–69.
 208. **Rico EP, Rosemberg DB, Seibt KJ, Capiotti KM, Da Silva RS, Bonan CD.** Zebrafish neurotransmitter systems as potential pharmacological and toxicological targets. *Neurotoxicol Teratol.* 2011 Nov;33(6):608–17.
 209. **Park E, Lee Y, Kim Y, Lee C-J.** Cholinergic modulation of neural activity in the telencephalon of the zebrafish. *Neurosci Lett.* 2008 Jul 4;439(1):79–83.
 210. **Panula P, Sallinen V, Sundvik M, Kolehmainen J, Torkko V, Tiittula A, et al.** Modulatory neurotransmitter systems and behavior: towards zebrafish models of neurodegenerative diseases. *Zebrafish.* 2006 Jun;3(2):235–47.
 211. **Anichtchik O, Sallinen V, Peitsaro N, Panula P.** Distinct structure and activity of monoamine oxidase in the brain of zebrafish (*Danio rerio*). *J Comp Neurol.* 2006 Oct 10;498(5):593–610.
 212. **Chen Y-C, Priyadarshini M, Panula P.** Complementary developmental expression of the two tyrosine hydroxylase transcripts in zebrafish. *Histochem Cell Biol.* 2009 Oct 15;132(4):375–81.
 213. **Kawai H, Arata N, Nakayasu H.** Three-dimensional distribution of astrocytes in zebrafish spinal cord. *Glia.* 2001 Dec;36(3):406–13.
 214. **Peri F, Nüsslein-Volhard C.** Live imaging of neuronal degradation by microglia reveals a role for v0-ATPase a1 in phagosomal fusion in vivo. *Cell.* 2008 May 30;133(5):916–27.
 215. **Koulen P, Janowitz T, Johnston LD, Ehrlich BE.** Conservation of localization patterns of IP(3) receptor type 1 in cerebellar Purkinje cells across vertebrate species. *J Neurosci Res.* 2000 Sep 1;61(5):493–9.
 216. **Westerfield M, McMurray J V, Eisen JS.** Identified motoneurons and their innervation of axial muscles in the zebrafish. *J Neurosci.* 1986 Aug;6(8):2267–77.
 217. **Avila RL, Tevlin BR, Lees JPB, Inouye H, Kirschner DA.** Myelin structure and composition in zebrafish. *Neurochem Res.* 2007 Feb 7;32(2):197–209.
 218. **Stil A, Drapeau P.** Neuronal labeling patterns in the spinal cord of adult

- transgenic Zebrafish. *Dev Neurobiol.* 2016 Jun;76(6):642–60.
219. **Best JD, Berghmans S, Hunt JJFG, Clarke SC, Fleming A, Goldsmith P, et al.** Non-Associative Learning in Larval Zebrafish. *Neuropsychopharmacology.* 2008 Apr 20;33(5):1206–15.
 220. **Nery LR, Eltz NS, Hackman C, Fonseca R, Altenhofen S, Guerra HN, et al.** Brain intraventricular injection of amyloid- β in zebrafish embryo impairs cognition and increases tau phosphorylation, effects reversed by lithium. *Laks J*, editor. 2014 Sep 4;9(9):e105862.
 221. **Chen J, Huang C, Zheng L, Simonich M, Bai C, Tanguay R, et al.** Trimethyltin chloride (TMT) neurobehavioral toxicity in embryonic zebrafish. *Neurotoxicol Teratol.* 2011 Nov;33(6):721–6.
 222. **Nada SE, Williams FE, Shah ZA.** Development of a Novel and Robust Pharmacological Model of Okadaic Acid-induced Alzheimer's Disease in Zebrafish. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 2016 Jan 15;15(1):86–94.
 223. **He X, Zhong Z-M, Che Y.** [Locomotor activity and learning and memory abilities in Alzheimer's disease induced by aluminum in an acid environment in zebrafish]. *Dong wu xue yan jiu = Zool Res.* 2012 Apr 18;33(2):231–6.
 224. **Paquet D, Schmid B, Haass C.** Transgenic Zebrafish as a Novel Animal Model to Study Tauopathies and Other Neurodegenerative Disorders in vivo. *Neurodegener Dis.* 2010;7(1–3):99–102.
 225. **Leimer U, Lun K, Romig H, Walter J, Grünberg J, Brand M, et al.** Zebrafish (*Danio rerio*) presenilin promotes aberrant amyloid beta-peptide production and requires a critical aspartate residue for its function in amyloidogenesis. *Biochemistry.* 1999 Oct 12;38(41):13602–9.
 226. **Groth C, Nornes S, McCarty R, Tamme R, Lardelli M.** Identification of a second presenilin gene in zebrafish with similarity to the human Alzheimer's disease gene presenilin2. *Dev Genes Evol.* 2002 Nov 1;212(10):486–90.
 227. **van Tijn P, Kamphuis W, Marlatt MW, Hol EM, Lucassen PJ.** Presenilin mouse and zebrafish models for dementia: focus on neurogenesis. *Prog Neurobiol.* 2011 Feb;93(2):149–64.
 228. **Campbell WA, Yang H, Zetterberg H, Baulac S, Sears JA, Liu T, et al.** Zebrafish lacking Alzheimer presenilin enhancer 2 (Pen-2) demonstrate excessive p53-dependent apoptosis and neuronal loss. *J Neurochem.* 2006 Mar;96(5):1423–40.
 229. **Nornes S, Newman M, Verdile G, Wells S, Stoick-Cooper CL, Tucker B, et al.** Interference with splicing of Presenilin transcripts has potent dominant negative effects on Presenilin activity. *Hum Mol Genet.* 2008 Feb 1;17(3):402–12.
 230. **Wong PC, Zheng H, Chen H, Becher MW, Sirinathsinghji DJ, Trumbauer ME, et al.** Presenilin 1 is required for Notch1 and Dll1 expression in the paraxial mesoderm. *Nature.* 1997 May 15;387(6630):288–92.

231. **Sundvik M, Chen Y-C, Panula P.** Presenilin1 regulates histamine neuron development and behavior in zebrafish, danio rerio. *J Neurosci.* 2013 Jan 23;33(4):1589–97.
232. **Musa A, Lehrach H, Russo V.** Distinct expression patterns of two zebrafish homologues of the human APP gene during embryonic development. *Dev Genes Evol.* 2001 Dec 1;211(11):563–7.
233. **Lee J-A, Cole GJ.** Generation of Transgenic Zebrafish Expressing Green Fluorescent Protein Under Control of Zebrafish Amyloid Precursor Protein Gene Regulatory Elements. *Zebrafish.* 2007 Dec;4(4):277–86.
234. **Liao H-K, Wang Y, Noack Watt KE, Wen Q, Breitbach J, Kemmet CK, et al.** *Tol2* gene trap integrations in the zebrafish amyloid precursor protein genes *appa* and *aplp2* reveal accumulation of secreted APP at the embryonic veins. *Dev Dyn.* 2012 Feb;241(2):415–25.
235. **Lessman CA.** The developing zebrafish (*Danio rerio*): A vertebrate model for high-throughput screening of chemical libraries. *Birth Defects Res Part C Embryo Today Rev.* 2011 Sep;93(3):268–80.
236. **Parng C, Roy NM, Ton C, Lin Y, McGrath P.** Neurotoxicity assessment using zebrafish. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 2007 Jan;55(1):103–12.
237. **Guo S.** Using zebrafish to assess the impact of drugs on neural development and function. *Expert Opin Drug Discov.* 2009 Jul 1;4(7):715–26.
238. **Menelaou E, Svoboda KR.** Secondary motoneurons in juvenile and adult zebrafish: axonal pathfinding errors caused by embryonic nicotine exposure. *J Comp Neurol.* 2009 Jan 20;512(3):305–22.
239. **Bilotta J, Barnett JA, Hancock L, Saszik S.** Ethanol exposure alters zebrafish development: a novel model of fetal alcohol syndrome. *Neurotoxicol Teratol.* 2004 Nov;26(6):737–43.
240. **Levin ED, Limpuangthip J, Rachakonda T, Peterson M.** Timing of nicotine effects on learning in zebrafish. *Psychopharmacology (Berl).* 2006 Mar 21;184(3–4):547–52.
241. **Paxinos G, Watson C.** The rat brain in stereotaxic coordinates. Elsevier; 2007.
242. **Bate ST, Clark RA.** The Design and Statistical Analysis of Animal Experiments [Internet]. The Design and Statistical Analysis of Animal Experiments. Cambridge: Cambridge University Press; 2014.
243. **Jackson LL.** VTE on an elevated T-maze. *J Comp Psychol.* 1943;
244. **Boiangiu RS, Brinza I, Hancianu M, Orhan IE, Eren G, Gündüz E, et al.** Cognitive Facilitation and Antioxidant Effects of an Essential Oil Mix on Scopolamine-Induced Amnesia in Rats: Molecular Modeling of In Vitro and In Vivo Approaches. *Mol* 2020, Vol 25, Page 1519. 2020;
245. **Foyet HS, Asongalem AE, Oben EK, Cioanca O, Hancianu M, Hritcu L.** Effects of the Methanolic Extract of *Vitellaria paradoxa* Stem Bark Against Scopolamine-Induced Cognitive Dysfunction and Oxidative Stress in the Rat

- Hippocampus. *Cell Mol Neurobiol*. 2016 Oct 30;36(7):1139–49.
246. **Pardo Andreu GL, Maurmann N, Reolon GK, de Farias CB, Schwartzmann G, Delgado R, et al.** Mangiferin, a naturally occurring glucoxilxanthone improves long-term object recognition memory in rats. *Eur J Pharmacol*. 2010 Jun 10;635(1–3):124–8.
 247. **Costa AA, Morato S, Roque AC, Tinós R.** A computational model for exploratory activity of rats with different anxiety levels in elevated plus-maze. *J Neurosci Methods*. 2014 Oct 30;236:44–50.
 248. **Hrițcu L.** Fiziologie animală experimentală. Iasi EU "Alexandru IC, editor. Iasi; 2012. 121–135 p.
 249. **Can A, Dao DT, Arad M, Terrillion CE, Piantadosi SC, Gould TD.** The mouse forced swim test. *J Vis Exp*. 2012 Jan 29;(59):e3638.
 250. **Olton DS, Samuelson RJ.** Remembrance of places passed: Spatial memory in rats. *J Exp Psychol Anim Behav Process*. 1976;2(2):97–116.
 251. **Hritcu L, Boiangiu RS, de Morais MC, de Sousa DP.** (-)- cis -Carveol, a Natural Compound, Improves β -Amyloid-Peptide 1-42-Induced Memory Impairment and Oxidative Stress in the Rat Hippocampus. *Biomed Res Int*. 2020 Apr 24;2020:1–9.
 252. **Mihășan M.** What in silico molecular docking can do for the “bench-working biologists”. *J Biosci*. 2012 Dec;37(6):1089–95.
 253. **Sousa SF, Fernandes PA, Ramos MJ.** Protein-ligand docking: current status and future challenges. *Proteins*. 2006 Oct 1;65(1):15–26.
 254. **Celie PHN, van Rossum-Fikkert SE, van Dijk WJ, Brejc K, Smit AB, Sixma TK.** Nicotine and carbamylcholine binding to nicotinic acetylcholine receptors as studied in AChBP crystal structures. *Neuron*. 2004 Mar 25;41(6):907–14.
 255. **Walsh RM, Roh S-H, Gharpure A, Morales-Perez CL, Teng J, Hibbs RE.** Structural principles of distinct assemblies of the human $\alpha 4\beta 2$ nicotinic receptor. *Nature*. 2018 May 2;557(7704):261–5.
 256. **Morales-Perez CL, Noviello CM, Hibbs RE.** X-ray structure of the human $\alpha 4\beta 2$ nicotinic receptor. *Nature*. 2016 Oct 3;538(7625):411–5.
 257. **Kim S, Chen J, Cheng T, Gindulyte A, He J, He S, et al.** PubChem 2019 update: improved access to chemical data. *Nucleic Acids Res*. 2019 Jan 8;47(D1):D1102–9.
 258. **Miteva MA, Guyon F, Tuffery P.** Frog2: Efficient 3D conformation ensemble generator for small compounds. *Nucleic Acids Res*. 2010 Jul 1;38(Web Server):W622–7.
 259. **Laskowski RA, Swindells MB.** LigPlot+: multiple ligand-protein interaction diagrams for drug discovery. *J Chem Inf Model*. 2011 Oct 24;51(10):2778–86.
 260. **Schrödinger L.** The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.2.3. 2015.
 261. **Morris GM, Goodsell DS, Halliday RS, Huey R, Hart WE, Belew RK, et al.** Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical

- binding free energy function. *J Comput Chem*. 1998 Nov 15;19(14):1639–62.
262. **Morris GM, Huey R, Lindstrom W, Sanner MF, Belew RK, Goodsell DS, et al.** AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J Comput Chem*. 2009 Dec;30(16):2785–91.
263. **Guex N, Peitsch MC.** SWISS-MODEL and the Swiss-Pdb Viewer: An environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis*. 1997 Dec;18(15):2714–23.
264. **Levin ED, Bencan Z, Cerutti DT.** Anxiolytic effects of nicotine in zebrafish. *Physiol Behav*. 2007 Jan 30;90(1):54–8.
265. **Bencan Z, Sledge D, Levin ED.** Buspirone, chlordiazepoxide and diazepam effects in a zebrafish model of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav*. 2009 Nov;94(1):75–80.
266. **Wong K, Elegante M, Bartels B, Elkhayat S, Tien D, Roy S, et al.** Analyzing habituation responses to novelty in zebrafish (*Danio rerio*). *Behav Brain Res*. 2010 Apr;208(2):450–7.
267. **Cachat J, Stewart A, Grossman L, Gaikwad S, Kadri F, Chung KM, et al.** Measuring behavioral and endocrine responses to novelty stress in adult zebrafish. *Nat Protoc*. 2010 Nov 14;5(11):1786–99.
268. **Zanandrea R, Abreu MS, Piato A, Barcellos LJG, Giacomini ACV V.** Lithium prevents scopolamine-induced memory impairment in zebrafish. *Neurosci Lett*. 2018 Jan 18;664:34–7.
269. **Rosemberg DB, Rico EP, Mussulini BHM, Piato ÂL, Calcagnotto ME, Bonan CD, et al.** Differences in Spatio-Temporal Behavior of Zebrafish in the Open Tank Paradigm after a Short-Period Confinement into Dark and Bright Environments. Zhuang X, editor. *PLoS One*. 2011 May 2;6(5):e19397.
270. **Cognato G de P, Bortolotto JW, Blazina AR, Christoff RR, Lara DR, Vianna MR, et al.** Y-Maze memory task in zebrafish (*Danio rerio*): the role of glutamatergic and cholinergic systems on the acquisition and consolidation periods. *Neurobiol Learn Mem*. 2012 Nov;98(4):321–8.
271. **Stefanello F V., Fontana BD, Ziani PR, Müller TE, Mezzomo NJ, Rosemberg DB.** Exploring Object Discrimination in Zebrafish: Behavioral Performance and Scopolamine-Induced Cognitive Deficits at Different Retention Intervals. *Zebrafish*. 2019 May 30;zeb.2018.1703.
272. **Faillace M, Pisera-Fuster A, Medrano M, Bejarano A, Bernabeu R.** Short- and long-term effects of nicotine and the histone deacetylase inhibitor phenylbutyrate on novel object recognition in zebrafish. *Psychopharmacology (Berl)*. 2017 Mar 27;234(6):943–55.
273. **Haettig J, Stefanko DP, Multani ML, Figueroa DX, McQuown SC, Wood MA.** HDAC inhibition modulates hippocampus-dependent long-term memory for object location in a CBP-dependent manner. *Learn Mem*. 2011 Jan 11;18(2):71–9.

274. **Matthews M, Varga ZM.** Anesthesia and Euthanasia in Zebrafish. *ILAR J.* 2012 Jun 1;53(2):192–204.
275. **Valentim AM, Eeden FJ, Strähle U, Olsson IAS.** Euthanizing zebrafish legally in Europe. *EMBO Rep.* 2016 Dec 18;17(12):1688–9.
276. **Gupta T, Mullins MC.** Dissection of Organs from the Adult Zebrafish. *J Vis Exp.* 2010 Mar 4;(37).
277. **Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, et al.** Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem.* 1985 Oct;150(1):76–85.
278. **Winterbourn CC, Hawkins RE, Brian M, Carrell RW.** The estimation of red cell superoxide dismutase activity. *J Lab Clin Med.* 1975 Feb;85(2):337–41.
279. **Artenie V, Ungureanu E, Negură AM.** Metode de investigare a metabolismului glucidic și lipidic: manual de lucrări practice. Editura Pim. Iași: Editura Pim; 2008. 88–112 p.
280. **Sinha AK.** Colorimetric assay of catalase. *Anal Biochem.* 1972 Jun;47(2):389–94.
281. **Fukuzawa K, Tokumura A.** Glutathione peroxidase activity in tissues of vitamin E-deficient mice. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo).* 1976;22(5):405–7.
282. **Ellman GL, Courtney KD, Andres V, Feather-Stone RM.** A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol.* 1961 Jul;7:88–95.
283. **Salbitani G, Vona V, Bottone C, Petriccione M, Carfagna S.** Sulfur deprivation results in oxidative perturbation in chlorella sorokiniana (211/8k). *Plant Cell Physiol.* 2015 May 1;56(5):897–905.
284. **Vaideș-Negustor RN, Mihășan M.** Side comparison of two methods for quantifying malondialdehyde levels in animal tissue extracts. *J Exp Molec Biol.* 2020;Tome XX(4):61–6.
285. **Nair V, O’Neil CL, Wang PG.** Malondialdehyde. In: *Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis.* Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd; 2008.
286. **Luo S, Wehr NB.** Protein carbonylation: avoiding pitfalls in the 2,4-dinitrophenylhydrazine assay. *Redox Rep.* 2009 Aug 19;14(4):159–66.
287. **Oliver CN, Ahn BW, Moerman EJ, Goldstein S, Stadtman ER.** Age-related changes in oxidized proteins. *J Biol Chem.* 1987 Apr 25;262(12):5488–91.
288. **Lee J-H, Jeong S-K, Kim BC, Park KW, Dash A.** Donepezil across the spectrum of Alzheimer’s disease: dose optimization and clinical relevance. *Acta Neurol Scand.* 2015 May;131(5):259–67.
289. **Boiangiu RS, Mihasan M, Gorgan DL, Stache BA, Petre BA, Hritcu L.** Cotinine and 6-Hydroxy-L-Nicotine Reverses Memory Deficits and Reduces Oxidative Stress in Aβ25-35-Induced Rat Model of Alzheimer’s Disease. *Antioxidants.* 2020 Aug 18;9(8):768.
290. **Brown WA, Rosdolsky M.** The Clinical Discovery of Imipramine. *Am J*

- Psychiatry. 2015 May;172(5):426–9.
291. **Taly A, Corringier P-J, Guedin D, Lestage P, Changeux J-P.** Nicotinic receptors: allosteric transitions and therapeutic targets in the nervous system. *Nat Rev Drug Discov.* 2009 Sep 1;8(9):733–50.
292. **Pohanka M.** Alpha7 Nicotinic Acetylcholine Receptor Is a Target in Pharmacology and Toxicology. *Int J Mol Sci.* 2012 Feb 17;13(2):2219–38.
293. **Boiangiu RS, Mihasan M, Gorgan DL, Stache BA, Hriteu L.** Anxiolytic, Promnesic, Anti-Acetylcholinesterase and Antioxidant Effects of Cotinine and 6-Hydroxy-L-Nicotine in Scopolamine-Induced Zebrafish (*Danio rerio*) Model of Alzheimer’s Disease. *Antioxidants.* 2021 Feb 1;10(2):212.
294. **Liu Y, Zhang Y, Zheng X, Fang T, Yang X, Luo X, et al.** Galantamine improves cognition, hippocampal inflammation, and synaptic plasticity impairments induced by lipopolysaccharide in mice. *J Neuroinflammation.* 2018 Dec 18;15(1):112.
295. **Huh J, Goebert D, Takeshita J, Lu BY, Kang M.** Treatment of Generalized Anxiety Disorder: A Comprehensive Review of the Literature for Psychopharmacologic Alternatives to Newer Antidepressants and Benzodiazepines. *Prim Care Companion CNS Disord.* 2011;13(2).

ACTIVITATEA ȘTIINȚIFICĂ

Articole publicate in extenso din subiectul tezei de doctorat

Articole cotate ISI din zona roșie (Q1)

1. **Boiangiu, R.S.**; Mihasan, M.; Gorgan, D.L.; Stache, B.A.; Hritcu, L.; 2021 – Anxiolytic, Promnesic, Anti-Acetylcholinesterase and Antioxidant Effects of Cotinine and 6-Hydroxy-L-Nicotine in Scopolamine-Induced Zebrafish (*Danio rerio*) Model of Alzheimer's Disease. *Antioxidants*, 10(2), 212, <https://doi.org/10.3390/antiox10020212>, (IF = 5,014);
2. **Boiangiu, R.S.**; Mihasan, M.; Gorgan, D.L.; Stache, B.A.; Petre, B.A.; Hritcu, L.; 2020 – Cotinine and 6-Hydroxy-L-Nicotine Reverses Memory Deficits and Reduces Oxidative Stress in A β ₂₅₋₃₅-Induced Rat Model of Alzheimer's Disease. *Antioxidants*, 9(8), 768, <https://doi.org/10.3390/antiox9080768> (IF = 5,014);

Articole publicate in extenso în timpul studiilor doctorale

Articole cotate ISI din zona roșie (Q1)

1. Brinza, I.; **Boiangiu, R.S.**; Hancianu, M.; Cioanca, O.; Orhan, I.E.; Hritcu, L.; 2021 – Bay Leaf (*Laurus Nobilis* L.) Incense Improved Scopolamine-induced Amnesic Rats by Restoring Cholinergic Dysfunction and Brain Antioxidant Status. *Antioxidants*, 10(2), 259, <https://doi.org/10.3390/antiox10020259>, (IF = 5,014);
2. Valu, M.V.; Soare, L.C.; Sutan, N.A.; Ducu, C.; Moga, S.; Hritcu, L.; **Boiangiu, R.S.**; Carradori, S.; 2020 – Optimization of Ultrasonic Extraction to Obtain Erinacine A and Polyphenols with Antioxidant Activity from the Fungal Biomass of *Hericium erinaceus*. *Foods*, 9(12), 1889, <https://doi.org/10.3390/foods9121889> (IF = 4,092);
3. Brinza, I.; Abd-Alkhalek, A.M.; El-Raey, M.A.; **Boiangiu, R.S.**; Eldahshan, O.A.; Hritcu, L.; 2020 – Ameliorative Effects of Rhoifolin in Scopolamine-Induced Amnesic Zebrafish (*Danio rerio*) Model. *Antioxidants*, 9, 580, <https://doi.org/10.3390/antiox9070580> (IF = 5,014);
4. Abidar, S.; **Boiangiu, R.S.**; Dumitru, G.; Todirascu-Ciornea, E.; Amakran, A.; Cioanca, O.; Hritcu, L.; Nhiri, M.; 2020 – The Aqueous Extract from *Ceratonia siliqua* Leaves Protects against 6-Hydroxydopamine in Zebrafish: Understanding the Underlying Mechanism. *Antioxidants*, 9(4), 304, <https://doi.org/10.3390/antiox9040304> (IF = 5,014);

5. Capatina, L.; **Boiangiu, R.S.**; Dumitru, G.; Napoli, E.M.; Ruberto, G.; Hritcu, L.; Todirascu-Ciornea, E.; 2020 – Rosmarinus officinalis Essential Oil Improves Scopolamine-Induced Neurobehavioral Changes via Restoration of Cholinergic Function and Brain Antioxidant Status in Zebrafish (Danio rerio). *Antioxidants*, 9(1), 62, <https://doi.org/10.3390/antiox9010062> (IF = 5,014);
6. Dumitru, G.; El-Nashar, H.A.S.; Mostafa, N.M.; Eldahshan, O.A.; **Boiangiu, R.S.**; Todirascu-Ciornea, E.; Hritcu, L.; Singab, A.N.B.; 2019 – Agathisflavone isolated from Schinus polygamus (Cav.) Cabrera leaves prevents scopolamine-induced memory impairment and brain oxidative stress in zebrafish (Danio rerio). *Phytomedicine*, 58, 152889, <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2019.152889> (IF = 4,268);

Articole cotate ISI din zona galbenă (Q2)

1. **Boiangiu, R.S.**; Brinza, I.; Hancianu, M.; Orhan, I.E.; Eren, G.; Gunduz, E.; Ertas, H.; Hritcu, L.; Cioanca, O.; 2020 – Cognitive facilitation and antioxidant effects of an essential oil mix on scopolamine-induced amnesia in rats: molecular modeling of in vitro and in vivo approaches. *Molecules*, 25(7) 1519, <https://doi.org/10.3390/molecules25071519> (IF = 3,267);

Articole cotate ISI din zona gri (Q3)

1. Hritcu, L.; **Boiangiu, R.S.**; Castro de Moraes, M.; Pergentino de Sousa, D.; 2020 – (-)-cis-Carveol, a natural compound, improves amyloid-beta (1-42)-induced memory impairment and oxidative stress in the rat hippocampus. *BioMed Research International*, Volume 2020, Article ID 8082560, <https://doi.org/10.1155/2020/8082560> (IF = 2,276);
2. Todirascu-Ciornea, E.; El-Nashar, H.A.S.; Mostafa, N.M.; Eldahshan, O.; **Boiangiu, R.S.**; Dumitru, G.; Hritcu, L.; Singab, A.N.; 2019 – Schinus terebinthifolius essential oil attenuates scopolamine-induced memory deficits via cholinergic modulation and antioxidant properties in a zebrafish model. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, Volume 2019, Article ID 5256781, 11 pages, <https://doi.org/10.1155/2019/5256781> (IF = 1,813);
3. Hritcu, L.; Abidar, S.; Dumitru, G.; **Boiangiu, R.S.**; Nhiri, M.; Sandu, I.; Todirascu-Ciornea, E.; 2019 – Ceratonia siliqua methanolic extract on 6-OHDA zebrafish model: Antiacetylcholinesterase and anxiolytic profile. *REVISTA DE CHIMIE* (Bucharest), 70(4), pp. 1364-1367, <https://doi.org/10.37358/RC.19.4.7128>, (IF = 1,755);

4. Todirascu-Ciornea, E.; Dumitru, G.; Coprean, D.; Tigran, L.M.; **Boiangiu, R.S.**; Sandu, I.; Hritcu, L.; 2019 – Effect of micotoxins treatment on oxidative stress, memory and anxious behavior in zebrafish (*Danio rerio*). *REVISTA DE CHIMIE* (Bucharest), 70(3), 776-780, <https://doi.org/10.37358/RC.19.3.7005>, (IF = 1,755);
5. Dumitru, G.; Abidar, S.; Nhiri, M.; Hritcu, L.; **Boiangiu, R.S.**; Sandu, I.; Todirascu-Ciornea, E.; 2018 – Effect of *Ceratonia Siliqua* methanolic extract and 6-hydroxydopamine on memory impairment and oxidative stress in zebrafish (*Danio rerio*) model. *REVISTA DE CHIMIE* (Bucharest), 69(12), 3545-3548, <https://doi.org/10.37358/RC.18.12.6788>, (IF = 1,755);

Articole publicate în rezumat

1. **Boiangiu, R.S.**, Mihasan, M., Hritcu, L.– Anti-acetylcholinesterase and procognitive profile of cotinine and 6-hydroxy-L-nicotine in an A β ₂₅₋₃₅-induced rat model of Alzheimer's Disease – *Journal of Experimental and Molecular Biology*, 20(3), <http://www.jemb.bio.uaic.ro/index.php/jemb/issue/view/7/6>;
2. Hritcu, L., Dumitru, G., El-Nashar, H.A., Mostafa, N.M., Eldahshan, O.A., **Boiangiu, R.S.**, Todirascu-Ciornea, E., Singab, A.N.B., 2019 – Agathisflavone isolated from *Schinus polygamus* (cav.) Cabrera leaves prevents scopolamine-induced memory impairment and brain oxidative stress in zebrafish (*Danio rerio*). *FEBS Open Bio*, 9: S1 P-15-006, <https://doi.org/10.1002/2211-5463.12675> (IF = 2,231);
3. **Boiangiu, R.S.**, Mihasan, M., Hritcu, L., 2019 – Effects of cotinine and 6-hydroxy-L-nicotine on memory impairment in A β ₂₅₋₃₅ peptide-induced an Alzheimer's disease rat model. *FEBS Open Bio*, 9: S1, P-24-003, <https://doi.org/10.1002/2211-5463.12675> (IF = 2,231);
4. Paduraru, A.F., Cioanca, O., Mircea, C., **Boiangiu, R.S.**, Iancu, C., Gille, E., Hritcu, L., Hancianu, M., 2019 – Chemical and biological profile of two *Ajuga* species cultivated in northern Romania – *4th International Conference on Natural Products Utilization: From Plants to Pharmacy Shelf*, Albena, Bulgaria, 29 Mai – 1 Iunie 2019;
5. **Boiangiu, R.S.**, Andrei, A., Mihasan, M., 2018 – Nicotine metabolic genes in *Arthrobacter*: pAO1 vs AK-YN10. *FEBS Open Bio*, 8: S1, P.28-008, <https://doi.org/10.1002/2211-5463.12453> (IF = 2,231);

Participări la manifestări științifice

Conferințe internaționale

1. **Boiangiu, R.S.**, Mihasan, M., Hritcu, L. – Cotinine and 6-hydroxy-L-nicotine improves neurobehavioral changes and reduce oxidative stress in a zebrafish (*Danio rerio*) model of Alzheimer's Disease – *"Victor Babes" National Institute of Pathology – Annual Scientific Meeting & 13th National Pathology Symposium*, 5-7 November 2020 (Virtual);
2. **Boiangiu, R.S.**, Mihasan, M., Hritcu, L. – Cotinine and 6-hydroxy-L-nicotine improves neurobehavioral changes and reduce oxidative stress in a zebrafish (*Danio rerio*) model of Alzheimer's Disease – *IBNS 2020 Online Poster Sessions*, 3-7 August 2020;
3. **Boiangiu, R.S.**, Mihasan, M., Hritcu, L. – Effects of cotinine and 6-hydroxy-L-nicotine on memory, anxious behavior and oxidative stress in a zebrafish (*Danio rerio*) model of Alzheimer's Disease – *FENS Forum 2020 Virtual Forum*, 11-15 Iulie 2020;
4. **Boiangiu, R.S.**, Mihasan, M., Hritcu, L. – Anti-acetylcholinesterase and procognitive profile of cotinine and 6-hydroxy-L-nicotine in an $A\beta_{25-35}$ -induced rat model of Alzheimer's Disease – *National Conference with International Participation Life sciences in the dialogue of generations: Connections between Universities, Academia and Business community*, Chisinau, Republic of Moldova, 21-22 October, 2019;
5. **Boiangiu, R.S.**, Mihasan, M., Hritcu, L. – Anti-acetylcholinesterase and procognitive profile of cotinine and 6-hydroxy-L-nicotine in an $A\beta_{25-35}$ -induced rat model of Alzheimer's Disease – *Annual International Conference of the Romanian Society of Biochemistry and Molecular Biology*, Iasi, Romania, 26-27 September, 2019;
6. **Boiangiu, R.S.**, Mihasan, M., Hritcu, L. – Cotinine and 6-hydroxy-L-nicotine mitigate the memory deficits and oxidative stress induced by brain infusion of $A\beta_{25-35}$ in rats – *48th Meeting of the European Brain and Behaviour Society (EBBS)*, Prague, Czech Republic 21-24 September, 2019;
7. **Boiangiu, R.S.**, Mihasan, M., Hritcu, L. – Effects of cotinine and 6-hydroxy-L-nicotine on memory impairment in $A\beta_{25-35}$ peptide-induced an Alzheimer's disease rat model – *The 44th FEBS Congress, From Molecules to Living Systems*, Krakow, Poland, 6-11 July, 2019;

8. **Boiangiu, R.S.**; Andrei, A.; Mihasan, M.– Nicotine metabolic genes in *Arthrobacter*: pAO1 vs AK-YN10 – *The Annual International Conference of the RSBMB*, Bucuresti, România 5-7 Septembrie 2018;
9. **Boiangiu R.S.**; Andrei, A.; Mihasan, M. – Nicotine metabolic genes in *Arthrobacter*: pAO1 vs AK-YN10 – *The 43rd FEBS Congress, Prague, Czech Republic* 7-12 July 2018;
10. **Boiangiu, R.S.**, Mihasan, M.– Assessing the presence of nic-genes in *Arthrobacter* sp. AK-YN10 – *International Conference of Romanian Society of Biochemistry and Molecular Biology*, Timisoara, Romania 7-9 June 2017;

Conferințe naționale

1. **Boiangiu, R.S.**, Mihasan, M.; Hritcu, L. – Efectele cotininei și 6-hidroxi-l-nicotinei asupra deficitelor de memorie și stresului oxidativ la modelul de șobolan al bolii Alzheimer indus de peptida A β ₂₅₋₃₅ – *Conferința Națională a Școlilor Doctorale din Consorțiul Universitaria*, Timișoara, România, 11-14 Noiembrie 2019;
2. **Boiangiu, R.S.** – Simpozionul Național al Asociației Române pentru Știința Animalelor de Laborator, București, România, 3 Octombrie 2019;
3. Galbur G., **Boiangiu, R.S.**, Mihășan, M. – Inactivarea genei 6hlnO din *Paenarthrobacter nicotinovorans*: asamblarea vectorului PH6- Δ 6HLNO-CMX – *Sesiunea Științifică anuală a studenților naturaliști*, Ediția a III-a, Iași, România 24-25 Mai 2019;
4. **Boiangiu, R.S.**; Andrei, A.; Mihasan, M. – Genele pentru metabolizarea nicotinei *Arthrobacter*: pAO1 vs AK-YN10 – *Conferința Națională a Școlilor Doctorale din Consorțiul Universitaria*, Iași, România 31 Octombrie – 3 Noiembrie 2018;

Workshop-uri naționale

1. **Boiangiu R.S.** – *5th @RoBioinfo Seminar: Bioinformatics tools for exploring protein biology*, 4-5 Aprilie 2019, Iași.