



UNIVERSITATEA „ALEXANDRU IOAN CUZA” DIN IAȘI



**FACULTATEA DE BIOLOGIE
ȘCOALA DOCTORALĂ DE BIOLOGIE**

**Abordări farmacologice, biochimice și comportamentale privind efectele
unor uleiuri esențiale selecționate (Lamiaceae) cu potențial terapeutic
pentru condițiile de demență**



Conducător de doctorat:

Prof. univ. dr. habil. LUCIAN HRIȚCU

Student-doctorand:

LUMINIȚA CĂPĂȚÎNĂ

**Iasi
2023**

CUPRINS

Introducere.....	3
PARTEA TEORETICĂ.....	5
CAPITOLUL 1. DATE GENERALE PRIVIND MECANISMELE IMPLICATE ÎN PATOGENEZA BOLII ALZHEIMER	5
1.1.Istoric și epidemiologie	5
1.2. Prezentare clinică și patologie	6
1.2.1. Plăcile de amiloid și ipoteza cascadei amiloidice.....	7
1.2.2. Hiperfosforilarea proteinei tau.....	8
1.2.3. Încurcăturile neurofibrilare	8
1.2.4. Apolipoproteina E.....	9
1.2.5. Ipoteza colinergică	9
CAPITOLUL 2. MODELUL ANIMAL DE DEMENTĂ	11
2.1.Tipologia modelelor animale experimentale	11
2.2. Condiții de respectat în experimentarea peștilor zebură în laborator 12	
2.3. Avantajele și dezavantajele folosirii peștilor zebură ca model AD..	13
2.4. Peștele zebură, model experimental în studii neurologice	14
2.5. Exprimarea indicatorilor biochimici ai stresului oxidativ și a neurotrofinelor la peștii zebură	16
CAPITOLUL 3. ULEIURI ESENȚIALE SELECTATE DIN PLANTE DIN FAMILIA LAMIACEAE	19
3.1. Aplicabilitatea terapeutică pentru <i>Rosmarinus officinalis</i>	19
3.2. Aplicabilitatea terapeutică pentru <i>Thymus vulgaris</i>.....	20
3.3. Aplicabilitatea terapeutică pentru <i>Origanum vulgare</i> ssp. <i>hyrtum</i>.....	21
PARTEA PRACTICĂ	23
Capitolul 4. MATERIALE ȘI METODE	23
4.1. Design-ul experimental.....	23
4.2. Evaluarea comportamentului peștilor zebură	24

4.3. Analiza activității enzimatică din probele biologice provenite de la peștii-zebră tratate cu ulei esențial de <i>R. officinalis</i>, <i>T. vulgaris</i> și <i>O. vulgare</i> ssp. <i>hirtum</i>.....	27
4.3.1. Determinarea concentrației de proteine.....	27
4.3.2. Determinarea activității superoxid-dismutazei (SOD).....	27
4.3.3. Determinarea activității catalazei (CAT)	27
4.3.4. Determinarea activității glutatation peroxidazei (GPX).....	28
4.3.5. Determinarea nivelului de glutatation redus (GSH)	28
4.3.6. Determinarea nivelului de malondialdehidă (MDA)	28
4.3.7. Determinarea nivelului de proteine carbonilate	29
4.3.8. Determinarea activității acetilcolinesterazei (AChE)	29
4.4. Evaluare expresiei genelor de interes ai unor markeri moleculari prin reacția cantitativă de polimerizare în lanț în timp real (RT-qPCR).....	30
4.4.1. Extracția ARN-ului total din probele de creier prelevate de la peștii zebra.....	30
4.4.2. RT-qPCR și cuantificarea nivelurilor de expresie	30
4.5. Analiza statistică a datelor experimentale	30
CAPITOLUL 5. REZULTATE ȘI DISCUȚII.....	31
5.1. Efectele soluțiilor de REO, TEO și OEO asupra răspunsului anxios în testul scufundării în acvariul nou (NTT).....	31
5.2. Efectele soluțiilor de REO, TEO și OEO asupra performanțelor memoriei spațiale în testul Y.....	33
5.3. Efectele soluțiilor de REO, TEO și OEO asupra performanței memoriei în testul de recunoaștere al obiectului nou (NOR)	35
5.4. Efectele uleiurilor esențiale selecționate asupra stresului oxidativ la model de demență indus prin intermediul scopolaminei	37
5.5. Efectul soluțiilor de <i>Rosmarinus officinalis</i> , <i>Thymus vulgaris</i> și <i>Origanum vulgare</i> ssp. <i>hirtum</i> , asupra memoriei asociative în testul labirintului T	41
5.6. Efectele uleiurilor esențiale de rosmarin, cimbru și oregano asupra markerilor genetici pe probe de creier de la pești zebra imersați în scopolamină pentru a induce demență AD	46
5.6.1. Efectul REO, TEO și OEO asupra expresiei genei <i>bdnf</i>	46
5.6.2. Efectul REO, TEO și OEO asupra expresiei genei <i>creb_1</i>	47

5.6.3. Efectul REO, TEO și OEO asupra expresiei genei <i>npv</i>	48
5.6.4. Efectul REO, TEO și OEO asupra expresiei genei <i>nrf2a</i>	49
5.6.5. Efectul REO, TEO și OEO asupra expresiei genei <i>egr1</i>	49
CONCLUZII	51
Bibliografie selectivă	52

Cuvinte cheie:

1. REO - ulei esențial de Rosmarinus officinalis ;
2. TEO - ulei esențial de Thymus vulgaris ;
3. OEO – ulei esențial de Origanum vulgare subsp. hirtum ;
4. AD – boala Alzheimer ;
5. Depozite de beta-amiloid ($A\beta$) ;
6. Hiperfosforilarea proteinei tau ;
7. Încurcături neurofibrilare (NFTs) ;
8. Neurotrofine (NT) ;
9. Acetilcolinesteraza (AChE) ;
10. Scopolamina – Sco (100 mμ) ;
11. Receptori colinergici muscarinici (mAChRs) ;
12. Proteina precursoră a amiloidului (APP) ;
13. Apolipoproteina E (ApoE) ;
14. Model de neurodegenerare ;
15. Neuroni hipocretină / orexină (Hcrt) ;
16. Paliumul medial (MP);
17. Diviziunea paleală dorsală (DP) ;
18. Paliumul ventral (VP) ;
19. Paliumul lateral (LP) ;
20. Testul rezervorului nou (NTT) ;
21. Telecenfalul teleosteic ;
22. Superoxid dismutază (SOD) ;
23. Malondialdehidă (MDA) ;
24. Ecotoxicitate ;
25. Proteinele carbolinate ;
26. BDNF – factorul neurotrofic derivat din creier ;
27. Neuropeptidul Y (NPY) ;
28. Creb1 ;
29. Testul labirintului Y ;
30. Testul de recunoaștere a obiectului nou (NOR) ;
31. Testul labirintului T ;
32. Reacția de polimerizare în lanț cantitativă în timp real (RT-qPCR) .

Introducere

Boala Alzheimer (AD) este una dintre cele mai frecvente cauze de deteriorare mentală la persoanele în vârstă, reprezentând aproximativ 50% - 60% din totalul cazurilor de demență la persoanele cu vârstă peste 65 de ani. În 2010 s-a estimat că 36 de milioane de persoane sunt afectate de AD și se estimează că această cifră va crește la 66 de milioane până în 2030 (Wimo *et al.*, 2013). Semnele patologice ale AD constau în pierderea funcției neuronilor colinergici și scăderea nivelului acetilcolinei (ACh) în creierul pacienților cu AD. Cea mai notabilă caracteristică patologică a AD, o reprezintă depozitele de peptidă amiloid-beta ($A\beta$) și încurcăturile neurofibrilare (NFT_s) intracelulare ale proteinei tau hiperfosforilate. Cercetările științifice au explorat în mod constant patogenеза și ulterior tipurile de intervenții terapeutice, în special pe plan neurobiologic, iar descoperirea neurotrofinelor (NT) a constituit o piatră de hotar, care a oferit o nouă perspectivă asupra neurogenezei și supraviețuirii neuronilor (Song, Yu and Tan, 2015).

Peștele zebură (*Danio rerio*) reprezintă un model experimental important utilizat în domeniile geneticii, neurofiziologiei și a biomedicinii. Studiile de laborator asupra comportamentului peștelui zebură au urmărit în principal creșterea, hrănirea, și învățarea (Kalueff and Cachat, 2011). Organizarea creierului peștelui zebură este similară cu a altor vertebrate, în ciuda emisferelor cerebrale mai mici, a structurii și funcției lobului optic, având zone definite în mod similar, cum ar fi structurile paliumului lateral din telencefal, care par a fi omoloage cu hipocampusul mamiferelor (Santana, Rico and Burgos, 2012).

Utilizarea uleiurilor esențiale (EO) și a componentelor acestora este cunoscută din medicina tradițională și aromaterapie pentru tratarea diferitelor boli, fiind în ultimul timp intens studiate datorită contribuției lor în naturopatie. Numeroase studii clinice utilizând EO au confirmat beneficiile acestora împotriva tulburărilor neurodegenerative, în special AD, în principal asupra aspectelor patologice specifice demenței inclusiv plăcile $A\beta$, NFT_s, hipofuncția colinergică, stresul oxidativ și anomaliile glutamatergice, dar și asupra simptomelor altor tulburări neurologice, precum anxietatea, depresia, epilepsia și convulsiile (Ayaz *et al.*, 2017).

Studiile din literatura de specialitate susțin faptul că uleiurile esențiale de *Rosmarinus officinalis* (REO), *Thymus vulgaris* (TEO) și *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* (OEO) contracarează scăderea performanței cognitive și intensificarea răspunsului anxios rezultate din tratamentul cu scopolamină printr-un mecanism care implică atenuarea stresului oxidativ al creierului și reglarea activității acetilcolinesterazei (AChE). De asemenea au efecte reparatorii asupra memoriei și tulburărilor de comportament produse

de scopolamină și pot avea efecte benefice în tratamentul AD (Ozarowski *et al.*, 2013; TOPCU and KUSMAN, 2014; Komaki *et al.*, 2016).

În prezenta teză de doctorat ne-am propus să evidențiem efectele acestor trei uleiuri esențiale (REO, TEO și OEO) selectate din familia Lamiaceae, împotriva simptomelor tipice bolii AD, folosind un model animal de demență reprezentat de peștele zebură (*Danio rerio*).

Obiectivul general al tezei de doctorat a fost îndeplinit ca urmare a realizării următoarelor obiective specifice:

1. Inducerea *in vivo* a unui model animal de demență reprezentat de peștele zebură (*Danio rerio*) prin utilizarea scopolaminei (100 μ M), un blocant al receptorilor colinergici muscarinici;
2. Evaluarea efectelor uleiurilor esențiale luate în lucru (REO, TEO și OEO) asupra performanțelor cognitive și răspunsurilor anxioase și depresive utilizând modelul animal (peștele zebură-*Danio rerio*) de demență indus de scopolamină;
3. Evaluarea potențialului antiacetilcolinesterazic al uleiurilor esențiale studiate (REO, TEO și OEO) din omogenatele de creier al modelului animal de demență;
4. Evaluarea potențialului antioxidant al uleiurilor esențiale studiate (REO, TEO și OEO) din omogenatele de creier al modelului animal de demență;
5. Evaluarea efectelor uleiurilor esențiale studiate (REO, TEO și OEO) asupra expresiei genice a unor markeri moleculari în creierul modelului animal de demență;
6. Publicarea rezultatelor obținute în reviste indexate Web of Science cu factor de impact ridicat, precum și diseminarea rezultatelor experimentale publicabile la conferințe științifice naționale și internaționale.

PARTEA TEORETICĂ

CAPITOLUL 1. DATE GENERALE PRIVIND MECANISMELE IMPLICATE ÎN PATOGENEZA BOLII ALZHEIMER

Boala AD este o boală neurodegenerativă cronică ce prezintă un mecanism fiziopatologic bine definit, afectând mai ales lobul temporal medial și structurile neocorticale asociate. În ceea ce privește prevalența bolii AD, datele din literatură estimează că numărul de pacienți cu AD va ajunge la 82 de milioane la nivel global până în 2030, iar numărul este de așteptat să ajungă la 152 de milioane până în 2050, dintre care regiunea Asia-Pacific va contribui cu 71 de milioane de cazuri. Costul total pentru AD este estimat la 183 miliarde de dolari, ceea ce s-ar putea ridica până la 1,1 trilioane de dolari până în 2050. Deși cea mai răspândită ipoteză care descrie patologia AD este cea a A β , oamenii de știință au propus alte câteva ipoteze, printre care și ipoteza colinergică. Scăderea transmiterii colinergice în AD este responsabilă de anomaliile din domeniile cognitive și funcționale ale pacienților cu această boală. O altă ipoteză este cea a benzilor neurofibrilare, existând o corelație mai bună între prezența benzilor și starea evoluției bolii; cu toate acestea, ipoteza A β este valabilă, deoarece s-a observat că mutațiile proteinei Tau nu au ca rezultat depunerea plăcii de amiloid (Saleem and Kannan, 2018).

Plăcile neurologice și ghemurile neurofibrilare reprezintă caracteristicile patologice ale AD și sunt, în consecință, legate de acumularea peptidei A β în țesuturile creierului și de modificările citoscheletale care apar din hiperfosforilarea proteinei tau asociate microtubulilor în neuroni. Factorii genetici, legați de vârstă și de mediu contribuie la o schimbare metabolică care favorizează degradarea amiloidogenă a APP (proteina precursoră a amiloidului) în detrimentul căii fiziologice, secretorii (De-Paula *et al.*, 2012).

AD mai este definită și ca o tulburare neurodegenerativă progresivă, cu o durată medie de aproximativ 8,5 ani între debutul simptomelor clinice și moarte. Regiunile cerebrale asociate cu funcțiile mentale superioare, în special neocortexul și hipocampusul, sunt cele mai afectate în patologia caracteristică a bolii AD. Aceasta include depunerile extracelulare de A β (derivate din APP) în plăcile senile, formarea intracelulară a încurcăturilor neurofibrilare și pierderea sinapselor neuronale și a neuronilor piramidali (Francis *et al.*, 1999).

1.1. Istoric și epidemiologie

În 1907, Alois Alzheimer descria cazul unei femei în vârstă de 51 de ani a cărei memorie se deteriora relativ rapid, fiind însoțită de tulburări psihiatrice. Femeia luată în

studiu a decedat patru ani mai târziu. În timp, AD a fost împărțită în două condiții clinice, în funcție de vârsta de debut: *demența presenilă* care afectează persoanele cu vârsta sub 65 de ani, în timp ce demența similară la vârstnici, adică la persoanele cu vârsta peste 65 de ani, a fost denumită *demență senilă* de tip Alzheimer după studiile de pionierat ale lui Tomlinson, Roth, și Blessed (Castellani, Rolston și Smith, 2010). AD este cea mai frecventă formă de demență, reprezentând 50-60% din toate cazurile studiate. Prevalența acestei boli este sub 1% la persoanele cu vârsta cuprinsă între 60 și 64 de ani, dar prezintă o creștere aproape exponențială odată cu vârsta, astfel încât la persoanele cu vârsta de 85 de ani sau > 85, prevalența este între 24% și 33%, în special în occident.

În afară de îmbătrânire, care este cel mai evident factor de risc pentru boală, studiile epidemiologice au sugerat mai multe asociații provizorii: capacitate de rezervă scăzută a creierului, dimensiunea creierului redusă, nivelul scăzut educațional și ocupațional, capacitatea mentală scăzută în tinerețe și activitatea mentală și fizică redusă la bătrânețe (Blennow, de Leon și Zetterberg, 2006).

1.2. Prezentare clinică și patologie

Prezentarea clinică are o variabilitate considerabilă pe baza regiunilor creierului afectate. Astfel, se poate vorbi de bine-cunoscutele disfuncții în domenii precum vorbire, personalitate și judecată, vedere, asocierea funcției senzorial-motorii, pe lângă cea a memoriei. Nu este surprinzător faptul că disfuncțiile memoriei și ale personalității sunt afectate relativ devreme, întrucât boala „transentorială” urmată de boala „limbică” cuprinde primele două etape patologice generale, urmate de o etapă „izocorticală” în stadiul avansat al bolii. În demersul de a perfecționa trăsăturile de diagnostic precoce ale AD, se reflectă noua entitate nosologică, **MCI** (deficit cognitiv minor), în care pacienții prezintă aparent o disfuncție cognitivă (Castellani, Rolston și Smith, 2010).

Pe baza criteriilor clinice, cognitive și funcționale, MCI este considerată o stare intermediară între indivizii care sunt cognitiv normali și cei cu diagnostic clinic de demență. Într-un studiu din literatură, s-a urmărit la un număr de subiecți MCI prin comparație cu subiecții de control: rata de atrofiere din patru regiuni din lobul temporal medial, și anume cortexul transentorial (TEC), cortexul entorial (ERC), hipocampusul și amigdala, prin tehnica de difeomorfometrie longitudinală bazată pe cartografiere metrică difeomorfă cu deformare mare (LDDMM). S-au remarcat modificări mai semnificative în TEC în ceea ce privesc grosimea medie și rata de atrofiere spre deosebire de regiunile

mediale ale ERC, și tot TEC a fost cea mai discriminantă măsură comparativ cu celelalte zone examinate MCI și în raport cu controalele. Aceste descoperiri sugerează că grosimea TEC ar putea servi drept biomarker pentru AD în faza prodromală (perioada dintre apariția simptomelor inițiale și cronicizarea simptomelor AD) a bolii (Tward *et al.*, 2017) ; (Kulason *et al.*, 2019).

La nivel microscopic, leziunile caracteristice ale AD constau în plăci senile sau neuritice și NFTs din structurile lobului temporal medial și zonele corticale ale creierului, împreună cu o degenerare a neuronilor și sinapselor. Mai multe mecanisme patogene care stau la baza acestor schimbări au fost studiate, inclusiv agregarea și depunerea A β cu dezvoltarea plăcii, hiperfosforilarea tau cu formarea de „încurcături”, disfuncția neurovasculară și alte mecanisme precum anomalii ale ciclului celular, procese inflamatoriale, stres oxidativ și disfuncție mitocondrială. Cele două tipuri de leziuni par să formeze în mod independent, cu NFTs care apare mai întâi. Regiunile afectate prezintă de obicei pierderi sinaptice și neuronale, neuronii colinergici și glutamatergici fiind cei mai afectați, precum și inflamația, glioza, stresul oxidativ și distrofia neuronală (Blennow, de Leon și Zetterberg, 2006).

1.2.1. Plăcile de amiloid și ipoteza cascadei amiloidice

A β reprezintă o peptidă de 40 sau 42 aminoacizi derivată din APP după scindarea secvențială a acesteia de către β - și γ -secretaze. Procesul amiloidogen este inițiat prin descompunerea enzimatică a APP de către enzima de scindare β -amiloidică (BACE1). Aceasta este urmată de separarea catalitică a APP de γ -secretază pentru a forma proteine insolubile sau A β . Această acumulare de A β în neuroni duce la afectarea neurotransmisiei și implicit la neurodegenerare (Ayaz *et al.*, 2017). Rolul fiziologic al A β este legat de modularea activității sinaptice, în AD se acumulează formând oligomeri solubili intermediari, care sunt sinaptotoxici, care sunt principalul constituent al plăcilor cu miez dens (în principal A β 42) și angiopatia amiloidă cerebrală (în principal A β 40).

Mai multe studii sugerează că peptidul A β influențează activitățile neuronale și sinaptice, iar acumularea de A β în creier provoacă o combinație între activitatea de rețea aberantă și depresie sinaptică. Deficiențele interneuronilor inhibitori și stimularea aberantă a receptorilor de glutamat, care pot duce la excitotoxicitate, par să joace roluri importante în amonte în această cascadă patogenă (Huang și Mucke, 2012).

ACh este cunoscut pentru a promova prelucrarea neamiloidogenă a APP și pentru a reduce fosforilarea tau prin reducerea activității glicogen sintazei kinazei 3- β , care fosforilează proteinele tau. În consecință, eliberarea redusă de ACh de către A β poate iniția o buclă de feedback care crește producția de A β prin procesarea APP, crește fosforilarea tau și perturbă homeostazia factorului trofic. Este foarte probabil ca interacțiunile dintre sistemul colinergic, și evenimentele care includ fosforilarea tau și producția plăci de A β , să influențeze cascada patologică (Auld *et al.*, 2002).

1.2.2. Hiperfosforilarea proteinei tau

Proteina tau este o proteină asociată microtubulilor situată la nivelul axonului, unde facilitează fiziologic transportul axonal prin legarea și stabilizarea microtubulilor. În AD, proteina tau este translocată în compartimentul somatodendritic și suferă hiperfosforilare, pliere greșită și agregare, dând naștere la NFTs și fire neuropilice (Serrano-Pozo *et al.*, 2011). Proteina tau, asociată cu microtubuli foarte solubili, joacă un rol central în stabilizarea microtubulilor, în special a axonilor și printr-un proces de fosforilare, s-a dovedit a fi principalul constituent al NFTs. Studiile au mai arătat că fosforilarea tau protejează neuronii de moarte acută apoptotică prin stabilizarea b-cateninei. Deși proteina tau și fosforilarea acesteia joacă un rol esențial în fiziologia normală, totuși hiperfosforilarea sa reprezintă o manifestare patologică în tulburările neurodegenerative, iar studiile de specialitate au arătat de mai bine de patru decenii că transportul axonal bazat pe microtubuli și funcția sinaptică ar putea fi afectate în AD.

Hiperfosforilarea anormală tau duce la afectarea activității sale biologice, rezistența la degradare, induce modificări conformaționale și promovează formarea PHF, care este componenta principală a NFTs. S-a constatat că în creierul sănătos doar 2-3 resturi de aminoacizi sunt fosforilate, dar acumularea de fosforilare cu aproape nouă fosfați pe moleculă duce la AD și la alte tauopatii (Obulesu, Venu și Somashekhar, 2011).

1.2.3. Încurcăturile neurofibrilare

Încurcăturile neurofibrilare sau NFTs sunt agregate intraneuronale de proteine tau hiperfosforilate și pliate eronat care devin extraneuronale (încurcături „fantomă”) atunci când neuronii purtători de aceste „încurcături” mor. NFTs au o progresie spațio-temporală stereotipică care se corelează cu severitatea declinului cognitiv, iar diagnosticarea topografică a acestora este utilizată pentru diagnosticul patologic al AD. Studiul

morfologic a NFTs se poate face prin metoda impregnării cu argint, ele fiind argirofile, prin colorarea cu coloranți fluorescenți cum ar fi Tioflavina S, pentru recunoașterea structurii β -pliate a filamentelor elicoidale împerecheate sau prin imunocolorare cu anticorpi antitau (Serrano-Pozo *et al.*, 2011).

În AD s-a constatat prezența de NFTs în corpul celular a mai multor neuroni din cortex, hipocamp și din creierul bazal și sunt compuse din acumulări de filamente elicoidale împerecheate. Au fost raportate observații interesante referitoare la aminoacizii excitatori în raport cu NFTs. Aminoacizii excitatori (EAA), cum ar fi glutamatul și aspartatul, sunt principalii transmițători ai cortexului cerebral și ai hipocampului și EAA par să joace un rol în învățare și memorie (Greenamyre și Young, 1989).

1.2.4. Apolipoproteina E

Apolipoproteina E sau (ApoE) este o proteină de 299 aminoacizi codificată de gena *apoE*. Alelele *apoE* $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ și $\epsilon 4$ influențează puternic și în funcție de doză probabilitatea de a dezvolta AD. Astfel că alela *apoE* $\epsilon 4$ este asociată cu un risc crescut pentru AD, fiind mediată, în mare parte, de efectele diferențiale ale proteinei ApoE asupra acumulării de A β din creier, în timp ce alela *apoE* $\epsilon 2$ este asociată cu risc mai scăzut (Verghese, Castellano și Holtzman, 2011). Activitatea ApoE se manifestă diferit la nivelul organelor, având cea mai mare activitate în ficat, urmată apoi de creier. Celulele non-neuronale, în principal astrocitele și într-o oarecare măsură microglia, sunt principalele tipuri de celule care exprimă ApoE în creier. Cu toate acestea, neuronii pot produce această proteină în anumite condiții, deși la niveluri mult mai scăzute decât astrocitele (Kim, Basak și Holtzman, 2009).

1.2.5. Ipoteza colinergică

Ipoteza colinergică a AD, a apărut la mijlocul anilor '70, din dorința de a identifica o anomalie neurochimică clar definită, unde să se pună în evidență rolul emergent al ACh în învățare și memorie. Au apărut rapoarte despre deficite neocorticale, enzima specifică pentru sinteza ACh și colin acetiltransferazei (ChAT), iar descoperirile ulterioare privind absorbția redusă a colinei, eliberarea de ACh și pierderea corpului celular colinergic din nucleul bazal Meynert au confirmat un deficit colinergic presinaptic substanțial (Francis *et al.*, 1999). Degenerarea neuronilor colinergici la nivelul creierului bazal și pierderea asociată neurotransmisiei colinergice în cortexul cerebral și în alte zone

au contribuit semnificativ la deteriorarea funcției cognitive la pacienții AD. În mod specific, markerii presinaptici ai sistemului colinergic apar uniform reduși, acest lucru fiind exemplificat prin reducerea activității ChAT și sintezei ACh.

Transmiterea colinergică către receptorii muscarinici de acetilcolină (mAChR) a fost implicată în funcții ale creierului precum învățarea și memoria, iar neurotransmisia afectată a sinapselor colinergice muscarinice poate contribui la pierderea devastatoare a memoriei și a altor abilități cognitive în AD. Diversitatea moleculară a mAChR este evidențiată prin clonarea unei familii de cinci gene, *m1-m5*, care codifică subtipuri de receptori înrudite, dar distincte și prin subtipurile M1–M4 identificate în țesuturi prin hibridizarea in situ pentru a localiza mRNA-urile și anticorpilor selectivi în cuantificarea și localizarea directă a proteinelor. În regiunile creierului anterior de interes pentru AD, proteinele m1, m2 și m4 sunt cele mai abundente subtipuri (Levey, 1996).

Scopolamina reprezintă un antagonist muscarinic care afectează învățarea și memoria pentru multe sarcini, susținând un rol important pentru sistemul colinergic în aceste funcții cognitive. Această substanță este și un medicament anticolinergic utilizat în mod obișnuit ca medicament standard în scopul experimental pentru a induce deficite cognitive la animale, legat de testele de memorie de recunoaștere vizuală, reamintire vizual-spațială, viteză psihomotorie și funcție vizuală perceptivă (Newman și Gold, 2016).

CAPITOLUL 2. MODELUL ANIMAL DE DEMENTĂ

Literatura ne prezintă peștii zebură ca modele care au fost utilizate cu succes pentru a simula patologia bolii AD, precum și Tauopatia, datorită sistemului lor nervos relativ simplu și transparența optică a embrionilor care permit imagini neurologice în timp real (Saleem și Kannan, 2018). Fiind o specie populară de acvariu, peștii zebură au fost utilizați în biologia dezvoltării de mai mulți ani. Importanța sa actuală ca organism model provine din activitatea lui Streisinger, care a fost pionier în utilizarea acestora, în studii pe genetica moleculară pe embriologia vertebrată, și a lui Kimmel, care a publicat descrieri detaliate ale diferențierii celulare și organizării sistemului nervos la peștii zebură.

Calitatea sa ca model de organism este aceea, că fiind vertebrat, este mai comparabil cu oamenii spre deosebire de speciile model nevertebrate, cum ar fi *Drosophila*, și este mai tractabil la manipularea genetică și embrionară decât speciile de mamifere precum șoarecii, în care astfel de proceduri sunt mai complicate și costisitoare. *Danio rerio* a fost descris pentru prima dată de Francis Hamilton, un chirurg din Compania Britanică a Indiei de Est, staționat în Bengalul de Vest la începutul secolului al XIX-lea. El a publicat “*O relatare a peștilor găsiți în River Ganges și ramurile sale*” în 1822, care a inclus 10 specii *Danio*. Ulterior, *D. rerio* a fost atribuit subgenului *Brachydanio*, împreună cu celelalte specii mici de *Danio*, cu dorsale scurte și o linie laterală redusă (Kalueff *et al.*, 2010).

2.1. Tipologia modelelor animale experimentale

Generarea de modele animale este deosebit de relevantă, deoarece acestea au fost concepute pentru a testa neurodegenerarea cu caracteristici similare ca cele din creierul uman, permițându-ne să fie proiectate noi abordări terapeutice. Aceste modele sunt instrumente cheie pentru studii aprofundate ale bolilor neurodegenerative.

Deși multe studii de AD s-au bazat pe modele experimentale la șoareci, deoarece genomul lor este aproape 99% omolog cu omul, cauzele AD rămân necunoscute și sunt necesare mai multe eforturi pentru a descifra mecanismele care stau la baza neurodegenerării. Prin urmare, trebuie utilizate modele animale suplimentare cu avantaje complementare pentru analiza bazei neurodegenerării și, ulterior, pentru a evalua efectele medicamentelor noi. În acest sens, peștele zebură a devenit un animal intens utilizat în studiile neurocomportamentale, deoarece prezintă fenotipuri neuropatologice și comportamentale care sunt cuantificabile și a fost recent propus ca o paradigmă experimentală validă pentru studierea AD (Santana, Rico și Burgos, 2012).

Peștele zebură posedă gene ortologe celor mutante în AD familială (FAD), iar cercetările folosind acest model au relevat caracteristici unice ale acestor gene care au fost dificil de observat în modelele de rozătoare (Newman, Ebrahimie și Lardelli, 2014).

Calitatea sa ca model de organism este aceea, că fiind vertebrat, este mai comparabil cu oamenii spre deosebire de speciile model nevertebrate, cum ar fi *Drosophila*, și este mai tractabil la manipularea genetică și embrionară decât speciile de mamifere precum șoarecii, în care astfel de proceduri sunt mai complicate și costisitoare (Kalueff și Cachat, 2011).

2.2. Condiții de respectat în experimentarea peștilor zebură în laborator

Peștele zebură este o specie ce trăiește numai în bancuri/grupuri, și au tendința naturală de a forma grupuri mixte de sex în natură și captivitate, grupurile formându-se pe baza unor indicii atât vizuali cât și olfactivi. Peștii zebură sunt diurni, prezentând cele mai ridicate niveluri de activitate pe parcursul zilei, în special în dimineața devreme. Ei dorm, cel mai frecvent, noaptea, iar acest tipar clar de activitate circadiană guvernează multe procese fiziologice, biochimice și comportamentale la pești și depinde foarte mult de instituirea unei fotoperioade regulate atunci când aceștia sunt menținuți în medii artificiale. Întreruperile ciclului luminos pot fi extrem de problematice pentru peștii zebură păstrați în laborator, în special în ceea ce privește menținerea ciclului de reproducere (Harper și Lawrence, 2011).

Aceștia sunt omnivori, dieta lor naturală fiind formată în principal din zooplanton și insecte, deși din analiza conținutului intestinal au fost raportate și fitoplancton, alge lamentabile și materiale vegetale vasculare, spori și ouă nevertebrate, arahnide, nisip și nămol. Proporția mare de elemente planctonice din dieta lor indică faptul că peștii-zebură se hrănesc în primul rând în coloana de apă, însă s-a depistat și hrănirea cu insecte terestre și arahnide, ceea ce sugerează și o hrănire de suprafață (Cachat *et al.*, 2011).

Animalele utilizate în experimente au fost cumpărate de la un magazin de animale de companie local și plasate în acvarii de 8 L (10 pești pe acvariu), la 18–22 ° C, cu filtrare și aerare constantă, un ciclu natural de lumină (cu aproximativ 13 ore de lumină / 11 h întuneric) și hrănit de 14 ori pe săptămână cu mâncare. Cel puțin o săptămână de aclimatizare a fost nevoie de la achiziționarea peștilor zebură până la începutul experimentului. Deoarece este dificil să distingem fiecare pește în parte, înainte de începutul experimentelor, animalele au fost plasați individual într-un acvariu de 25 cm

lungime, 11,5 cm lățime și 15 cm înălțime. Creșterea animalelor și toate experimentele comportamentale au fost efectuate în conformitate cu “*Directiva 2010/63/UE a parlamentului european și a consiliului din 22 septembrie 2010*”, privind protecția animalelor utilizate în scopuri științifice.

2.3. Avantajele și dezavantajele folosirii peștilor zebra ca model AD

Peștele zebra are în comun proprietăți structurale și fiziologice în special cu organismul uman decât cu modelele de nevertebrate. Majoritatea genelor umane au ortologi care pot fi găsiți în peștele zebra și prezintă în mod obișnuit modele similare de exprimare, iar proteinele ortoloage sunt aproximativ 70% identice în ceea ce privește secvența lor de reziduuri de aminoacizi. Fertilizarea embrionilor este externă, iar modelul de dezvoltare facilitează observarea și manipularea experimentală a acestora și pot fi expuși la substanțe chimice plasându-le în mediul de susținere a embrionilor. Spre deosebire de mamiferele placentare, substanțele chimice nu sunt supuse metabolismului de către organismul gazdă înainte de a ajunge la embrionul în curs de dezvoltare. Femelele tind să fie mai mari decât masculii, atât în populațiile domesticite, cât și în cele sălbatice (Conference, Aucklși și New, 2022).

Printre neajunsuri se numără faptul că nu este un mamifer, este poikilotermic, iar embrionilor în curs de dezvoltare le lipsește placentă. Aceasta înseamnă că unele medicamente pot fi metabolizate într-o manieră diferită sau, cel puțin, cu o rată diferită în comparație cu mamiferele și acest lucru le poate altera funcția. Un alt potențial dezavantaj este redundanța genetică în genomul peștelui-zebra, care este rezultată din duplicarea genomului peștilor, ulterior divergenței filogenetice a peștilor și mamiferelor. Această redundanță poate complica compararea căilor de dezvoltare omoloage în aceste taxone (Detrich, Westerfield și Zon, 2009).

Printre noile abordări, peștele-zebra a apărut ca un model animal alternativ popular, iar conform *Directivei Comisiei Europene din 2010*, experimentele cu primele etape de viață ale unor animale nu sunt reglementate ca studii pe animale. Pentru peștele-zebra, hrănirea independentă, care începe în jur de 5 zile după fertilizare (dpf), este considerată prima etapă supusă reglementării pentru experimentarea pe animale. Dincolo de avantajele cunoscute privind similaritatea genelor, concordanța mecanismelor celulare și a biologiei țesuturilor comparabile, studiile de toxicologie folosind peștele zebra iau în considerare capacitatea modelului experimental de regenerare, după cum am mai menționat în acest subcapitol. Această capacitate regenerativă poate avea impact asupra obiectivelor de

toxicitate translațională, așa cum a fost demonstrat pentru retină. Conform studiilor comportamentale, în ciuda asocierii puternice cu privire la funcțiile regiunilor din creier dintre peștele zebură și om, neocortexul lipsește la peștele-zebură, însă sistemele de neurotransmițători (dopamina, GABA, glutamatul, noradrenalina serotonina, histamina și acetilcolina) sunt prezente la modelul de animal luat în studiul nostru și prin urmare poate servi drept țintă farmacologică și toxicologică (Cassar *et al.*, 2020).

Un dezavantaj în folosirea peștelui zebură ca model experimental, îl reprezintă lipsa unui sistem de metode pentru generarea celulelor stem embrionare, pentru genele de “eliminare” prin recombinarea omologă. În lipsa unor astfel de metode, se are în vedere un joc cooperativ și sinergic de “ping-pong”, între grupurile de cercetare pe peștii zebură și pe mamifere. Un alt potențial dezavantaj este redundanța genetică în genomul modelului nostru experimental, care cel mai probabil rezultată din duplicarea genomului peștilor, ulterior divergenței filogenetice ale acestora și a mamiferelor. Această redundanță poate complica compararea căilor de dezvoltare omoloage în aceste taxoane. Ca alternativă, copiile suplimentare ale genelor pot simplifica anumite tipuri de analiză, deoarece funcțiile complexe la mamifere, ar fi putut fi separate și alocate diferitelor gene paralogene la pești (Detrich, Westerfield și Zon, 2009).

2.4. Peștele zebură, model experimental în studii neurologice

Acest model animal are capacitate de regenerare a SNC, ceea ce este recomandat ca model de neurodegenerare în investigarea stării de activare a celulelor stem neurale și pentru a identifica diferențele moleculare dintre celulele stem ale peștilor zebură și mamifere pentru a le utiliza în terapiile regenerative. Peștele zebură este un model animal predominant utilizat în analiza funcțiilor genice împreună cu căile de semnalizare ale acestora în timpul proceselor de dezvoltare și neurodegenerare. Cercetătorii au folosit acest model comportamental pentru a studia comportamentul fiziologic precum hrănirea, învățarea, auzul, vederea, atingerea și emoțiile precum frica, durerea, neputința, curțarea, interacțiunile sociale, anxietatea și luarea deciziilor. În creierul embrionului de pește zebură, celulele endoteliale ale capilarelor continue au proprietăți de barieră, specializate pentru a asigura homeostazia și protecția sistemului nervos central (Quiñonez-Silvero, Hübner și Herzog, 2020).

În boala AD, BBB este afectată prin reduceri ale fluxului sanguin cerebral și afectarea răspunsurilor hemodinamice. Studiile recente de imagistică și biomarkeri sugerează o descompunere timpurie a BBB și o dereglare vasculară în AD detectabilă înainte de

declinul cognitiv. Pe de o parte, fluxul de agenți neurotoxici, celule și agenți patogeni în creier și degradarea BBB duce la dezvoltarea unor spații perivasculare mărite și la modificări ischemice ale creierului, iar pe de altă parte, disfuncția în sistemele de transport BBB duce la dezvoltarea patologiei A β și tau și pierdere neuronală (Montagne, Zhao și Zlokovic, 2017).

Asemănarea peștilor zebra cu vertebratele superioare derivă din studiile neuronale pe măduva la adulții de pești zebra, din diferențierea neuronală și din analiza rețelei spinale. Câteva analize antropomorfe, au descris un tipar comportamental similar între peștele zebra și om, ceea ce implică un mecanism comportamental bine conservat și un model de circuit ale ambelor sisteme. Mai mult, studiile indică similitudine dintre modelele de expresie și proiecțiile axonale ale neuronilor hipocretină / orexină (Hcrt) atât în cazul larvelor de pești-zebra cât și a oamenilor (Saleem și Kannan, 2018). Depunerea A β și fosforilarea tau scad expresia orexinei și a receptorilor din hipotalamus, în timp ce nivelurile de orexine din lichidul cefalorahidian cresc la pacienții cu boala AD. În celulele microgliale, orexinele cresc nivelul A β prin suprimarea absorbției și degradării A β . La peștii zebra, rețeaua Hcrt cuprinde ~ 16-60 de neuroni, care asemănător mamiferelor, sunt localizați în hipotalamus și inervează arii întinse, creierul și măduva spinării (Chen, Du și Chen, 2019).

Telencefalul peștilor zebra se caracterizează prin doi lobi masivi acoperiți de un ventricul în formă de T localizat dorsal, pe când, la șobolan telencefalul este format din două emisfere bilaterale care înconjoară ventricule situate central. Paliumul la peștele-zebra, la fel ca omologul său mamifer, constă în principal din patru diviziuni paliale: paliumul medial (MP) omolog cu amigdala palială (BLA), o diviziune paleală dorsală (DP), care corespunde topologic cu izocortexul mamifer (Ctx), iar paliumul ventral (VP) și cel lateral (LP) sunt omoloage cu paliumul mamiferelor (bazolateral), hipocampus mamifer, respectiv cu cortexul piriform (pirCtx) (Mueller, 2012).

Există unele dovezi experimentale conform cărora, zona paleală a creierului la pești este implicată în funcții de învățare distincte. Dovezi experimentale obținute din studii comportamentale sugerează că paliumul medial și cel lateral al creierului de pește ar putea avea implicații similare în învățare ca structurile lor omologe, hipocampus și respectiv amigdala. Astfel, *paliumul medial* este esențial pentru învățarea emoțională și procesele conexe (învățarea prin evitare) precum este hipocampus, în timp ce *paliumul lateral* este implicat în caracteristicile spațiale și / sau relaționale și temporale ale învățării, așa cum este amigdala palială. În plus, există o altă structură a paliumului telencefalic de pește, mai

puțin studiată, cunoscută sub numele de *pallium dorsal*, și care a fost propusă ca omologă pentru izocortexul mamifer și cortexul de tranziție (Vargas, López și Portavella, 2009).

Principalul obstacol pentru identificarea diviziunilor paliale la peștele zebură este dezvoltarea neobișnuită a telencefalului teleostean. Telencefalul peștilor zebură se dezvoltă printr-un proces unic de pliere exterioară numită eversiune. Au fost propuse o serie de modele de eversiune, variind de la foarte simple la foarte elaborate. Ca urmare, nu există un consens cu privire la exactitatea delimitării anatomice a omologiilor paliale, cum ar fi amigdala palială teleosteană, hipocampusul și cortexul piriform (Mueller *et al.*, 2011).

2.5. Explicarea indicatorilor biochimici ai stresului oxidativ și a neurotrofinelor la peștii zebură

Biologia stresului oxidativ indus de diverse particule reprezintă o paradigmă mecanică importantă, pe baza căreia se poate dezvolta un model predictiv pentru studierea toxicității substanțelor concepute. Toate organismele aere produc în mod natural specii reactive de oxigen (ROS). Principalii contribuitori ai ROS celulare sunt mitocondriile, unde oxigenul acționează ca acceptor final de electroni în lanțul de transport de electroni (ETC). Studiile susțin faptul că enzimele antioxidante (superoxid dismutaza (SOD), catalaza (CAT) și glutatión peroxidaza (GPX)) reduc daunele ROS excesive în organismul peștilor zebură (Du *et al.*, 2017).

Similar altor vertebrate, peștele zebură posedă un sistem antioxidant extins, inclusiv forma redusă de glutatión (GSH), care este un antioxidant important ce acționează singur sau în combinație cu alte enzime, cum ar fi glutatión peroxidaza (GPX). La interacțiunea cu ROS, GSH este oxidat, rezultând formarea disulfurei de glutatión (GSSG) (Massarsky, Kozal și Di Giulio, 2017). Proteinele sunt o țintă majoră a radicalilor liberi de oxigen și a altora specii reactive în timpul mai multor forme de stres. Un exemplu de stres este dat de diferența termică bruscă de la 28°C la 18°C într-un studiu, care a demonstrat cum conținutul de proteine carbonilate crește în prima oră de șoc rece acut cu până la 38%, urmat de o scădere bruscă după 6 h de expunere la frig. Ulterior, conținutul de carbonil din creier a crescut din nou și a fost semnificativ peste nivelul de control la 24 de ore și 72 de ore de aclimatizare la rece (Tseng *et al.*, 2011).

Ecotoxicitatea a fost studiată din perspectiva stresului oxidativ prin utilizarea embrionilor de pește zebură. Testul de embrioni de pește zebra este considerat a fi un bun înlocuitor pentru testul de toxicitate acută a peștilor și este folosit cu succes pentru a măsura toxicitatea multor substanțe relevante pentru mediu. SOD alături de doi produși de

deteriorare oxidativă, MDA și proteinele carbonil (PC), au fost folosite pentru a estima inducerea stresului oxidativ după testul de expunere la concentrații diferite de agent toxic (ex. 4-Epianhidrotetraciclina, un produs intermediar major în timpul progresului degradării tetraciclinei, detectat frecvent în mediile acvatiche) (Wang *et al.*, 2021).

Sistemul colinergic, având ca neurotransmițător acetilcolina (ACh), este implicat în procesele cognitive, prin activarea receptorilor colinergici metabotropi muscarinici și ionotropi nicotinici. Peștele zebură (*Danio rerio*) este un model de vertebrat urgent pentru studierea mai multor evenimente biologice, cum ar fi modificările neurochimice promovate de toxicitatea metalelor grele. Acest teleost posedă doar gena pentru AChE care a fost deja identificată, clonată și detectată funcțional în creierul acestui animal. Acetilcolinesteraza este un biomarker important pentru mai mulți contaminanți de mediu la peștele zebra. În plus, este cunoscut și rolul important al acestei enzime în afecțiunile cu o incidență tot mai mare la populația în vârstă, precum boala AD (Richetti *et al.*, 2011).

Numeroase studii pe mamifere au raportat că neurotrofinele ar putea juca un rol semnificativ atât în protecția, cât și în refacerea funcției în urma bolilor neurodegenerative. Acest rol protector al neurotrofinelor după un eveniment de leziune cerebrală traumatică spre exemplu, a fost raportat, la modelul de pește zebra. De la descoperirea factorului de creștere a nervilor (NGF) în anii 1950, familia factorilor neurotrofici a crescut progresiv. Neurotrofinele reglează diferențierea neuronală și joacă roluri cheie în supraviețuirea, creșterea și plasticitatea neuronilor.

Creierul peștelui adult are proprietăți regenerative ridicate după leziuni cerebrale, ceea ce denotă că diferențele în ceea ce privesc proprietățile regenerative dintre creierul mamiferelor și cel al peștilor, au fost atribuite unor procese remarcabile de neurogeneză în rândul adulților în special. Diferit de șoarece și om, creierul peștilor zebra adulți prezintă un număr mare de zone proliferative localizate în principal în 16 nișe neurogenice (Cacialli, 2021). Descoperiri recente sugerează un rol semnificativ al factorului neurotrofic derivat din creier (BDNF) ca mediator al regenerării creierului în urma unei leziuni înjunghiate la peștele zebra. Stresul oxidativ și apoptoza sunt două procese biologice esențiale care sunt afectate de activitatea BDNF. Astfel, se poate presupune că expresia crescută a BDNF ar putea modula stresul oxidativ și apoptoza și în creierul de pește zebra rănit (Anand, Sahu și Mondal, 2021).

Daunele oxidative induse de ROS au ca rezultat creșterea 8-oxoguaninei în ADN, urmată de repararea prin calea reparației prin excizie a bazei (BER). AP endonucleaza 1 (Apex1) participă direct la BER, și reglează factorul de transcripție Creb1. Creb1 are o

relație strânsă cu dezvoltarea normală a creierului și funcția neuronală, în timp ce CBP este cunoscut că reglează diferențierea și supraviețuirea interneuronilor. Apex1 reglează nivelurile proteinei ADN polimerază β (Polb), următorul participant în calea BER, prin Creb1. Totodată s-a raportat că BDNF activează Creb1 și reglează Apex1 în cortexul cerebral și hipocampusul șoarecilor (Pei *et al.*, 2019).

Neuropeptidul Y (NPY) controlează homeostazia energetică, inclusiv acțiunile orexigene la mamifere și non-mamifere. Recent, NPY a atras atenția ca mediator al comportamentului emoțional și al bolilor psihosomatice. Peștele zebra cu deficit pe gena *npy* (NPY-KO) a prezentat mai multe comportamente asemănătoare anxietății, cum ar fi scăderea interacțiunii sociale în testul oglină și scăderea locomoției în testul alb-negru. Secvența de aminoacizi NPY este strict conservată pentru vertebrate precum păsări, reptile, amfibieni și pești. Secvențele de aminoacizi NPY de la peștii zebra au o asemănare mare cu NPY uman (89%) și mai multe studii au sugerat că NPY de la peștele zebra funcționează într-un mod similar cu NPY uman (Shiozaki *et al.*, 2020).

Factorul de transcripție Nrf2a induce un răspuns antioxidant celular și oferă protecție împotriva stresului oxidativ indus de substanțe chimice, și prezintă de asemenea rol critic în dezvoltare și diferite boli (Mills *et al.*, 2020). Peștii zebra sunt un model important în studierea rolului Nrf2a în aceste procese, și de asemenea sunt un model important de dezvoltare care posedă șase gene *nrf*, inclusiv genele *nrf1* și *nrf2* duplicate. Comparatiile peștele zebra - om demonstrează sintonia (care posedă secvențe cromozomiale comune) conservată care implică genele *nrf2* și *hox*, indicând faptul că *nrf2a* și *nrf2b* sunt co-ortologi ai NRF2 uman (Timme-Laragy *et al.*, 2012).

Cantitățile în mod constant crescute de agenți oxidanți activează diferite căi de semnalizare care, la rândul lor, vizează promotorii genelor „sensibile la redox”, una dintre acestea fiind factorul transcripțional cu răspuns în creștere timpurie-1 (Egr-1). Egr-1 codifică factorul de transcripție a „degetelor” de zinc (engl. zinc finger), care aparține grupului de gene „up-down” și reglează o serie de gene implicate în activitatea sinaptică și plasticitate. S-a demonstrat că ROS induce rapid ARNm Egr-1 și expresia proteinei (Pagel și Deindl, 2012). De regulă, reglarea ascendentă a *egr1* are loc la niveluri ale creierului implicate în învățare și memorie, în special în hipocampusul mamiferelor. Gena *egr1* a fost legată de activarea neuronală și la pești. În general, reglarea ascendentă a *egr1* este prezentă în creierul de teleost ca răspuns la stimularea sistemică a acidului kainic care activează receptorii glutamatergici (Kress și Wullimann, 2012).

CAPITOLUL 3. ULEIURI ESENȚIALE SELECTATE DIN PLANTE DIN FAMILIA LAMIACEAE

Familia Lamiaceae (Labiatae) cuprinde plante ierboase și arbustive, cu tulpini patrunghiulare, odorante, erecte, oblice sau culcate. Frunzele la plantele din această familie sunt opuse, cu peri sau glșie mirositoare. Florile bilabiate grupate în cime bipare sau condensate la baza frunzelor sunt de regulă bilateral simetrice, hermafrodite, mai rar poligame, în dicazii așezate în verticile sau spice. Caliciu este campanulat până la lung tubulos, cu 5 sepale concrescute, adeseori bilabiat, persistent. Corola tubuloasă sau infundibuliformă, cu limb bilabiat, mai rar unilabiat sau chiar ușor radiar. Staminele în număr de patru, sunt fixate pe tubul corolei, de obicei didiname, cu două stamine mai lungi și două mai scurte, mai rar două, cu filamente libere, mai rar concrescute și antere întrorse. Fructele sunt sub forma unor nucule obovoidale sau tetraedrice grupate câte patru într-un caliciu, persistent, tubulos, cu pereți tari, netezi, rar cu verucozități sau peri (Socaci, 2020).

3.1. Aplicabilitatea terapeutică pentru *Rosmarinus officinalis*

Rosmarinus officinalis este o plantă aromatică obișnuită și este frecvent utilizată în formulări dietetice datorită proprietăților sale puternice antioxidante. Studiile științifice confirm acțiunile farmacologice ale uleiului esențial de la *R. officinalis* (REO), ca fiind antibacteriene, antifungice, anticancerigene, antioxidante și hipoglicemiente. Mai mult decât atât, REO stimulează sistemul nervos și, astfel, crește capacitatea de memorare și concentrare. Acest ulei posedă o activitate moderată de inhibare a AChE și poate acționa sinergic cu α -pinenul și 1,8-cineolul, de unde se poate observa capacitatea inhibitorie a uleiurilor esențiale asupra colinesterazelor prin legarea reversibilă de situsurile active ale enzimelor AChE / BChE, prevenindu-se degradarea neurotransmițătorului ACh. Totodată studiile susțin că REO poate restabili acțiunea enzimelor AChE / BChE pentru o perioadă lungă de timp și în consecință, concentrația sinaptică de ACh este mărită, rezultând ameliorarea simptomelor AD (Ayaz *et al.*, 2017).

Uleiul de rozmarin are proprietăți digestive, antiseptice, antispasmodice și antiinflamatorii. *R. officinalis* este utilizat în legătură cu AD și demență pentru simptomele generale de bătrânețe, debilitate și oboseală. Conform datelor din literatură, există trei tipuri de uleiuri esențiale de rozmarin, și anume tipul spaniol, bogat în α -pinen, 1,8-cineol și camfor; tipul francez, bogat în α -pinenă, 1,8-cineolă și acetat de nail și uleiurile africane din Maroc, Tunisia, cu un conținut ridicat de 1,8-cineol. Un număr de 22 componente au

fost identificate în ulei de rozmarin prin gaz-cromatografie (GC-MS), ceea ce reprezintă 95,57% din cantitatea totală (Socaci, 2020).

Analiza chimică a diferitelor tipuri de compoziție de extracte de rozmarin arată că cele mai active și puternice componente sunt triterpenele, diterpenele fenolice și acizii fenolici incluzând acid rosmarinic, acid carnosic, rosmanol, carnosol, acid ursolic și acid betulinic. Acidul ursolic, un triterpenoid pentaciclic derivat din rozmarin, ar putea reduce timpul de imobilitate atât în testul de suspensie a cozii, cât și la testul înotului forțat la șoareci. În proiectele de cercetare pe stres oxidativ, polifenoli ai REO precum *acid rosmarinic*, *luteolină*, *acid carnosic* au îmbunătățit starea de spirit și cogniția la un adult sănătos. Inhalarea uleiului esențial de rozmarin ca terapie antistres și anxiolitică are mai puține efecte secundare (Ghasemzadeh Rahbardoar și Hosseinzadeh, 2020).

3.2. Aplicabilitatea terapeutică pentru *Thymus vulgaris*

Thymus vulgaris posedă o serie de proprietăți biologice care au un impact pozitiv asupra sănătății umane. Cultivat în Franța și în alte țări, s-au raportat șase chimiotipuri: geraniol, linalool, γ -terpineol, carvacrol, timol și terpinen-4-ol. Proprietățile antiinflamatorii ale uleiului esențial de *T. vulgaris* L. au fost demonstrate prin reprimarea activității enzimice a 5-lipoxigenazei și reducerea secreției de citokine proinflamatorii TNF-, IL-1 și IL-8 în celulele THP-1, care pot avea un potențial efect anti-Alzheimer. Mai mult, acest ulei esențial are un procent ridicat de timol, cu cea mai mare activitate antioxidantă. Conținutul volatil al uleiurilor esențiale (monoterpenele- timolul, carvacrol, precum și β -cariofilen) sunt susceptibili să treacă cu ușurință BBB, datorită dimensiunii moleculare mici și a lipofilității lor. Natura lor volatilă poate permite și administrarea lor sub formă de vapori inhalanți, de aceea consumul de plante *Lamiaceae* bogate în timol și carvacrol este util în tratamentul AD, conform datelor din literatură (TOPCU și KUSMAN, 2014).

Pacienților umani li se poate administra prin perfuzie sau poate fi utilizat extern prin băi pentru vindecarea bolilor reumatice și ale pielii, însă atât cimbru cât și uleiul esențial de cimbru sunt o sursă bună de vitamine precum: vitamina A care este necesară pentru menținerea membranelor mucoase și a pielii sănătoase, precum și pentru o bună vizibilitate și vitamina C care oferă rezistență împotriva infecțiilor microbiene și combate radicalii liberi proinflamatori nocivi. În plus, este o sursă bună de vitamina B6 sau piridoxină, care ajută la menținerea nivelurilor de acid gama amino butiric (GABA) în creier și acționează ca un agent de stres. Alte vitamine prezente în compoziția aceste plante sunt vitamina K, vitamina E și acidul folic (Almanea, Abd El-Aziz și Ahmed, 2019).

Cimbru conține concentrații mari de fenoli, precum *carvacrolul* și *timolul* care sunt principalele componente fenolice responsabile de activitatea sa antioxidantă. Pe lângă acestea, uleiul de cimbru este utilizat pe scară largă în fitoterapie, în special pentru a trata și a oferi protecție împotriva acneei, hipertensiunii, infecțiilor și cancerelor. În ceea ce privește testarea pe animale, într-un studiu efectuat cu șobolani Wistar masculi, s-au urmărit efectele anxiolitice ale extractului preparat din frunze de *T. vulgaris*, utilizându-se testul labirintului plus ridicat (EPM). Compușii liposolubili, cu greutate moleculară mică, trec ușor prin BBB, precum α -pinen, limonen, linalol și 1,8-cineol după inhalare și se acumulează în organe la șoareci. Rezultatele testului EPM la șoarecii tratați cu TEO au demonstrat diminuarea efectelor oboselii și anxietății induse de inflamație sau stres (Satou *et al.*, 2018).

3.3. Aplicabilitatea terapeutică pentru *Origanum vulgare* ssp. *hirtum*

Denumirea comună de oregano descrie o aromă spre deosebire de un anumit gen sau specie botanică. Subsp. *hirtum*, a cărei denumire provine din cuvântul latin *-hirtus* care înseamnă „păros”, este cunoscut în mod obișnuit ca oregano grecesc sau maghiran dulce de iarnă, este o plantă perenă rezistentă cultivată în principal în grădini cu plante pentru uz culinar (*Origanum vulgare* subsp. *hirtum* - Plant Finder, 2023). Uleiurile esențiale de *Origanum vulgare* subspecia *vulgare* și subspecia *hirtum* au fost evaluate pentru a evidenția activitățile lor antioxidante (DPPH, ABTS, FRAP, CUPRAC, beta-caroten / acid linoleic, fosfomolibden și chelatarea metalelor), pentru proprietățile antimicrobiene și inhibitoare împotriva acetilcolinesterazei, butirilcolinesterazei, tirozinazei, α -amilazei și α -glucozidazei. Ambele uleiuri esențiale au prezentat activități antibacteriene și anti-fungice moderate. Compușii fenolici ale acestor uleiuri, joacă un rol vital în neutralizarea și inhibarea radicalilor liberi, însă prezintă un spectru larg de proprietăți farmacologice, cum ar fi efecte antiinflamatorii, anti-colinesterazice și cardio-protectoare. Descrierea compoziției, activității antioxidante, antimicrobiene și a enzimelor de inhibare din uleiurile de *O. vulgare* subsp. *hirtum* și subsp. *vulgare*, ar putea fi utilizate în dezvoltarea de noi alimente funcționale și formulări medicamentoase pentru prevenirea bolilor cronice precum Alzheimer și diabetul de tip II, care sunt legate de stresul oxidativ (Sarikurkcü *et al.*, 2015).

Compușii organici volatili sau uleiurile esențiale din plante sunt un grup de compuși organici chimici diverși, având presiuni mari de vapori și greutate moleculară mică, care le permit să se difuzeze ușor prin faza gazoasă. Aceștia sunt clasificați drept metaboliți secundari și au adesea un parfum puternic, sunt incolori, nepolari, dar solubili

în solvenți organici. Ușurința lor de difuzare prin faza gazoasă și prin sistemele biologice, îi împuternicește să servească drept molecule de semnalizare, care pot transmite informații în interiorul și între organisme (Pai, Sonkamble și Wagh, 2020). Conform studiilor, OEO poate preveni autooxidarea esterilor de acizi grași polinesaturați izolați din creierul de șoarece, datorită compușilor săi antioxidanți - carvacrolul și timolul. Se crede că proprietățile de capacitate antioxidantă ale uleiurilor esențiale sunt legate de mecanismele în care își exercită efectul asupra stresului oxidativ, printre acestea enumerându-se: activitatea de eliminare a radicalilor liberi, modularea enzimelor cu capacitate antioxidantă (superoxid dismutază), și inhibarea pro-oxidării (Leyva-López *et al.*, 2017).

PARTEA PRACTICĂ

Capitolul 4. MATERIALE ȘI METODE

4.1. Design-ul experimental

În partea experimentală a tezei de doctorat, am folosit câte cinci loturi de pești zebură pentru fiecare ulei esențial în parte și pentru fiecare test comportamental în parte astfel : un lot de control, un lot tratat cu Sco (100 μ M), și trei loturi tratate cu ulei esențial în trei concentrații diferite (25, 150, și 300 μ L/L) tratate concomitent și cu Sco (100 μ M) cu 30 de minute înainte de testarea comportamentală (Fig. 4.1.). Administrarea uleiurilor esențiale în acvariul peștilor s-a făcut prin imersie cu detergent TWEEN 80 concentrație 1% pentru a fi miscibile cu apa.

Conform studiilor de specialitate, Sco este un agent amnestic utilizat pentru a studia formarea memoriei, fiind frecvent utilizată în combinație cu medicamente nootrope care îmbunătățesc memoria. Este utilizată frecvent în cercetarea memoriei la animalele de laborator, și pe lângă simptomele de greață și disconfort însoțite, probleme de mișcare, afecțiunea prelungită adesea provoacă apatie și depresie (Hamilton *et al.*, 2017). Animalele au fost cazate în laboratorul B-115 al Facultății de Biologie din Iași, unde a fost monitorizată atât temperatura ambientală de 22°C cât și cea din bazinul peștilor (22-24°C).

În primă fază peștii zebură au fost supuși unor teste comportamentale (50 în total per ulei esențial și per test comportamental) pentru primele trei teste comportamentale, și anume testul bazinului nou (NTT), testul labirintului Y și testul de recunoaștere al obiectului nou (NOR). Toate aceste teste comportamentale s-au realizat unul după altul la distanță de o zi pauză, datorită timpului de lucru relativ scurt, pentru NTT (1-2 zile în funcție de numărul de loturi), testul labirintului Y (2-3 zile) și pentru NOR (6 zile). Pentru labirintul T, lucrurile stau puțin diferit deoarece protocolul de lucru vizează mai multe zile de lucru, cu mai multe etape și pregătirea dinaintea începerii testului prevede 2-3 zile de înfometare.

Pregătirea loturilor de animale pentru testarea în labirintul T a fost precedată de pretratament cu ulei esențial o săptămână, înfometare trei zile, și apoi parcurgerea celor trei etape. Tratamentul cu ulei a continuat pe tot parcursul testului până la eutanasiere. De menționat ar fi că în zilele de testare, administrarea REO, TEO și OEO s-a făcut cu o oră înainte de testare, iar tratamentul cu Sco (100 μ M) a început din faza de discriminare și în zilele în care am schimbat apa (o dată la trei zile), până la etapa de extincție.

După testarea comportamentului peștilor zebură, aceștia au fost eutanasiați conform normelor de etică. Conform protocolului (Gupta și Mullins, 2010) dedicat

secționării organelor de pește zebură (creier, inimă, intestin, ficat), am putut pregăti probele biologice de creier. Animalele au fost anesteziate în apă rece la 2°C cu gheață, apoi s-a secționat capul, pentru prelevarea creierului (Fig. 4.3.). Corpul este păstrat pentru analizele de biochimie, iar creierele, pentru testele genetice, și pentru activitatea AChE. Probele biochimice s-au înghețat la -20°C, iar probele pentru testele genetice au fost păstrate la -80°C.

4.2. Evaluarea comportamentului peștilor zebură

Etapele de lucru în testul NTT constau în stabilirea loturilor de pești zebură adulți și testarea lor pe grupe de interes. În prima fază se testează lotul de control cu peștii netratați și lotul tratat cu Sco, apoi loturile tratate cu ulei esențial în 3 doze diferite crescătoare, concomitent cu tratamentul Sco cu 30 de minute înainte de testare. După ce ne asigurăm că apa este deionizată și dedurizată, cu pH optim, în acvariul de testare se pun 1,5 L apă. Cu ajutorul unei camere video și prin intermediul programului de studiu al comportamentului animal ANY-maze se înregistrează în timp real comportamentul peștilor. Se aduc peștii (vârsta 6-8 luni) în camera de testat pentru a se adapta la noul mediu/acvariul nou (în jur de 10 pești în 6 litri de apă). Camera de testat prezintă un mediu ambiental de 25 - 27 °C, fiind bine iluminată, cu o oră înainte de testare. Ulterior se începe testarea, conform protocolului înscris în programul ANY-maze (Stoelting CO, Wood Dale, IL, USA). Peștii zebură se transferă în rezervorul nou, cu ajutorul unui minciog. Pentru a evita stresul animalelor, am manevrat minciogul în sensul de înot al peștilor. Am înregistrat comportamentul peștilor pentru perioada de timp dorită (de ex., 6 minute) cu ajutorul unei camere video Logitech HD Webcam C922 Pro Stream camera (Logitech, Lausanne, Switzerland) (Cachat *et al.*, 2010).

Învățarea și memoria spațială sunt studiate de câteva decenii, ele fiind relevante mai ales din punct de vedere biomedical. Pe marginea acestui lucru au fost investigate mecanismele celulare, sinaptice și moleculare care stau la baza învățării spațiale, însă strategiile comportamentale într-o sarcină spațială încă ridică întrebări. Cu ajutorul labirintului Y, am testat funcția cognitivă și de memorie a peștilor zebură, evaluând în principal răspunsul la noutate (Brinza *et al.*, 2020). Metoda labirintului Y poate fi utilizată în mod fiabil pentru peștii-zebură, oferind o sarcină nouă, rapidă și preferință / evitare independentă pentru studiul memoriei în acest teleost. În plus, rezultatele evidențiază implicațiile glutamatergice și sisteme colinergice în memoria acestui model experimental.

Brațele labirintului Y au fost desemnate astfel: (1) **brațul de pornire**, în care peștele a început să exploreze labirintul, fiind întotdeauna deschis (A), (2) **brațul nou**,

blocat în timpul primei sesiuni, dar deschis în timpul celei de a doua sesiuni (C) și (3) **celălalt braț** întotdeauna deschis (B). Porțiunea centrală a labirintului (zona neutră) nu s-a luat în calcul în analiză. Prin intermediul acestui test comportamental s-a evaluat răspunsului la noutate și recunoașterea spațială prin indicii geometrice (cercuri, pătrate, triunghiuri) la 1 h. În timpul primei sesiuni (antrenament, 5 minute), peștii au explorat doar două brațe (brațul de pornire și celălalt braț), în timp ce al treilea braț (brațul nou) este închis. În cea de a doua sesiune, peștii au fost plasați înapoi în același braț de pornire, cu acces liber la toate cele trei brațe timp de 5 minute. Sesiunile de instruire și testare au fost înregistrate și analizate folosind programul ANY-maze® (Stoelting CO, Wood Dale, IL, USA), în care s-au cuantificat numărul de intrări în brațe, alternările spontane, distanța totală parcursă, viteza medie, unghiul de rotire, numărul de linii traversate, timpul petrecut în brațul de start, timpul petrecut în celălalt și timpul petrecut în brațul nou (Cognato *et al.*, 2012).

NOR este un test comportamental utilizat uzual pentru investigarea performanței memoriei la peștele zebă (Brinza *et al.*, 2020). Acest test bazat pe elementul de noutate poate fi, de asemenea, adaptat pentru a evalua evitarea prădătorilor sau comportamentul social. Testul de recunoaștere a obiectului nou se bazează pe plasarea peștilor într-un rezervor cilindric lipsit de indicii vizuale, fie individual, fie în grup, iar după o perioadă de aclimatizare, se introduce un stimul nou. Etape de lucru în testul NOR constau în stabilirea loturilor de pești zebă adulți și testarea lor în parte fiecare. În prima fază se testează peștii netratați și pe cei tratați cu ulei esențial ca mai apoi să se repete testul și sub efectul Sco (cu excepția lotului de control care rămâne netratat). Apa este deionizată și dedurizată cu pH optim, iar în acvariul de testare se introduc 6 L apă. Cu ajutorul unei camera video, Logitech HD Webcam C922 Pro Stream camera (Logitech, Lausanne, Switzerlși) și prin intermediul programului de analiză a comportamentului ANY-maze® (Stoelting CO, Wood Dale, IL, USA) se înregistrează în timp real comportamentul peștilor de experiment. Peștii zebă au fost menținuți la o densitate de 10 animale per acvariu (umplut cu 6 L de apă), cu un ciclu constant de lumină-întuneric 14-10 h și la o temperatură de 26-28°C. Peștii din acvariul primar sunt împărțiți în 5 loturi: control, control+Sco, rosmarin (25μg/L), rosmarin (150 μg/L) și rosmarin (300 μg/L). Toate loturile au fost testate după următoarea schemă: habituarea în acvariul nou 3 zile; sesiunea de training, unde animalele au fost supuse la două obiecte identice de aceeași culoare, expunerea la agentul care favorizează patologia (în cazul nostru Sco care induce demența) și sesiunea de testare, după o pauză de 24 h, animalele se plasează înapoi în tancul de testare care va conține unul dintre obiectele

familiale din etapa de training și un obiect nou (Faillace *et al.*, 2017).

Preferința culorii la peștii zebra a fost evaluată folosindu-se obiecte de diferite culori, iar peștele zebra a arătat o preferință pentru culoarea roșie. În testul locului de preferință condiționat (CPP) a petrecut mai mult timp în compartimente cu fundal roșu și verde în raport cu fundalul galben și a arătat o puternică aversiune față de compartimentele cu fundal albastru. Testul labirintului T mai este privit și ca o investigație a învățării spațiale și a memoriei, unde animalele sunt învățate să discrimineze între cele două brațe pe baza unor repere vizuale -culorile, stimulând senzorii olfactivi, tactili sau auditivi ale acestora în timpul studiilor consecutive (*What we can learn from zebrafish in a T-maze* | Noldus, 2021). În studiul nostru am luat drept model protocolul lui Colwill, unde am folosit două grupuri de culori roșu și verde urmărindu-se achiziționarea, dispariția și extincția, prin inversarea discriminării vizuale la peștii zebra adulți. Inițial animalele au avut de învățat pe care din cele două brațe să aleagă în funcție de recompensa, reprezentată de hrană. În fiecare proces peștii erau așezați pe rând în spațiul start al labirintului T. Ușa de plexiglas a fost eliberată și apoi închisă după părăsirea spațiului de start de către pește. Odată ce peștele a intrat într-unul dintre brațele labirintului, acesta s-a blocat cu o portiță de plexiglas pentru a împiedica peștele să iasă. Aceasta a fost recompensat după 30 de secunde de la intrare în braț apoi introducându-l din nou în spațiul start (Colwill *et al.*, 2005).

De-a lungul timpului, s-au realizat experimente pe animale în testul labirintului T, folosindu-se Sco ca agent anxiolitic, în special pe rozătoare, pentru a evidenția un anumit tip de memorie. Spre exemplu, într-un studiu s-au investigat efectele Sco asupra alternanței spontane în testul labirintului T, în cadrul căruia rozătoarele alternează brațul labirintului pe care îl explorează în funcție de brațul pe care l-au explorat în procesul precedent, datorită preferinței pentru opțiunea mai nouă. Un astfel de răspuns folosește memoria de lucru, situație legată de brațul explorat în procesul precedent, care implică un mecanism colinergic muscarinic (Caramillo, 2017).

Având drept model rezultatele obținute pe rozătoare, în ceea ce privește utilizarea Sco în cadrul sarcinilor de lucru în cadrul testului T și a rezultatelor obținute pentru învățarea spațială și răspunsul la modificări, și pe alte teste asemănătoare precum testul Y, am folosit cu încredere modelul de pește zebra prin utilizarea Sco pentru a demonstra utilizarea speciei în cercetarea deficiențelor cognitive legate de boli neurodegenerative ca AD.

4.3. Analiza activității enzimatice din probele biologice provenite de la peștii-zebră tratate cu ulei esențial de *R. officinalis*, *T. vulgaris* și *O. vulgare* ssp. *hirtum*

După înregistrarea datelor comportamentale, peștii zebră au fost eutanasiați, iar creierul lor a fost izolat în vederea analizei parametrilor biochimici. Probele de creier prelevate au fost omogenizate ușor în gheață cu omogenizatorul Potter (Cole-Parmer, Vernon Hills, IL, SUA), la 200 rotații/minut timp de 2 minute în soluție de tampon fosfat de potasiu 0,1 M (pH 7,4) cu 1,15% KCl. Omogenatele au fost centrifugate la 14000 rotații/minut timp de 15 minute la 4°C. Supernatantul a fost utilizat pentru estimarea activităților specifice a AChE, superoxid dismutazei (SOD) și catalazei (CAT), concomitent cu conținutul total de glutatión redus (GSH), proteine carbonilate și malondialdehidă (MDA). Estimarea conținutului de proteine s-a făcut prin metoda Bradford (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germania) (Boiană et al., 2020). La fiecare probă cântărită a fost adăugat un volum corespunzător de soluție tampon de fosfat 0,1 M (pH 7,4) cu 1,15 % KCl (0,1 g țesut: 1 ml soluție tampon). După omogenizare, omogenatele celulare au fost transferate în eprubete Eppendorf 1,5ml și menținute pe gheață până la obținerea tuturor omogenatelor. După centrifugare, faza solubilă clară a probelor a fost din nou transferată în eprubete Eppendorf și ținută pe gheață/ congelator la -20 °C.

4.3.1. Determinarea concentrației de proteine

Pentru determinarea cantitativă a proteinelor solubile extrase din țesuturile aparținând speciei *Danio rerio* avute în studiu, s-a utilizat metoda Bradford, care se bazează pe observația conform căreia în mediu acid, colorantul Coomassie Brilliant Blue G-250 reacționează cu radicalii de arginină și ulterior cu resturile de histidine, lizină, tirozină, triptofan și fenilalanină din structura proteinelor, formând un complex al cărui maxim de absorbție este situat la $\lambda = 595$ nm.

4.3.2. Determinarea activității superoxid-dismutazei (SOD)

Determinarea activității SOD s-a făcut după metoda Winterbourn, Hawkins, Brian și Carrell adaptată de Vlad Arăne. Principiul metodei are ca prim scop determinarea activității SOD pe baza capacității enzimei de a inhiba reducerea NBT de către radicalii superoxid generați în mediu de reacție prin fotoreducerea riboflavinei.

4.3.3. Determinarea activității catalazei (CAT)

Catalaza (EC 1.11.1.6) este o enzimă antioxidantă, răspândită în organismele aerobe care alături de peroxidază și glutatión peroxidază, este implicată în detoxifierea de

ROS, care se formează atât în metabolismul normal cât și în numeroase stări patologice, sub acțiunea diferitelor oxidaze și a SOD. Determinarea spectrofotometrică a activității catalazei prin *metoda Sihna*, face referire la faptul că enzima CAT acționează asupra H_2O_2 , după care este inactivă prin adăugarea unui amestec de bicromat de potasiu – acid acetic. Cantitatea de apă oxigenată, rămasă nedescompusă după stoparea acțiunii CAT, reduce în mediul acid bicromatul de potasiu la acetat cromic, care poate fi determinat spectrofotometric la $\lambda = 570$ nm. Făcând diferența între cantitatea inițială și cea finală de apă oxigenată în mediul de reacție, se află cantitatea de apă oxigenată descompusă de catalază.

4.3.4. Determinarea activității glutathion peroxidazei (GPX)

Funcția biologică a GPX constă în reducerea peroxidului de hidrogen la apă. Determinarea activității GPX s-a realizat prin *metoda Fukuzawa și Tokumura*, conform căreia, GPX a catalizat descompunerea H_2O_2 prin folosirea ca reducător a GSH. La finalul reacției am obținut glutathionul oxidat (G-S-S-H) și apă. GSH redus rămas în exces a reacționat cu acidul 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoic (DTNB) formând un complex colorat în galben. La spectrofotometru, la o $\lambda=412$ nm, s-a măsurat intensitatea culorii complexului format. Diferența dintre cantitatea inițială și cea finală de GSH este direct proporțională cu activitatea GPX (Artenie *et al.*, 2021).

4.3.5. Determinarea nivelului de glutathion redus (GSH)

Creșterea stresului oxidativ legată de AD a fost atribuită scăderii nivelului de antioxidant cerebral, glutathion (GSH). GSH (E.C. 1.11.1.9) este un antioxidant major endogen catalizat de enzime, care joacă un rol fundamental în detoxifierea ROS și reglează mediul redox intracelular (Saharan și Mșial, 2014). Metoda de determinare a conținutului total de GSH redus se bazează pe reacția GSH cu DTNB pentru a forma disulfură de glutathion (GSSG) și acid-5-tionitrobenzoic (TNB), detectat spectrophotometric la 412 nm (Salbitani, Bottone și Carfagna, 2017).

4.3.6. Determinarea nivelului de malondialdehidă (MDA)

MDA reprezintă unul dintre compușii carbonilici reactivi, descompuși ca urmare a instabilității peroxizilor lipidici proveniți din acizii grași polinesaturați. MDA este larg utilizat ca indicator al peroxidării lipidelor și este important de utilizat ca metodă în investigarea stresului oxidativ (Artenie *et al.*, 2021). MDA a fost măsurată spectrofotometric prin utilizarea testului cu acid tiobarbituric descris de *Ohkawa et al.* în 1979. Reacția peroxizilor lipidici în țesuturile animale cu acid tiobarbituric este dependent

de pH-ul amestecului de reacție ca în cazul hidroperoxidului acidului linoleic, și s-a constatat ca pH-ul optim este 3,5. Pe baza acestor detalii, a fost elaborată o procedură standard pentru determinarea nivelului de lipide peroxidate din țesuturile animale prin reacția acestora cu acidul tiobarbituric (Noctor și Foyer, 2016).

4.3.7. Determinarea nivelului de proteine carbonilate

Conținutul de proteine carbonilate este utilizat pe scară largă atât ca marker al stresului oxidativ, cât și ca măsură a deteriorării oxidative. În creierul AD, studiile arată că are loc intensificarea oxidării proteinelor (proteine-carbonil și 3-nitrotirozină), peroxidarea lipidelor, oxidarea ADN-ului și formarea ROS. Creșterea nivelului proteinelor carbonilate a fost raportat în mod constant în hipocamp și neocortex în contextul AD (Sharma *et al.*, 2020).

Una dintre procedurile utilizate pentru evaluarea proteinelor carbonilate din probele biologice, implică derivatizarea grupării carbonil cu 2,4-dinitrofenilhidrazină (DNPH), care formează un produs stabil dinitrofenil hidrazonă (DNP). Acest fragment este ușor detectat la o absorbantă de 370 nm, iar testul poate fi cuplat la fracționarea proteinelor prin cromatografie lichidă de înaltă performanță pentru o sensibilitate și specificitate mai mare (Bizzozero, 2009). Metoda care a fost folosită în studiul nostru pentru a cuantifica proteinele carbonilate a fost descrisă de Oliver *et al.* în 1987 și modificată de Luo și Wehr (2009).

4.3.8. Determinarea activității acetilcolinesterazei (AChE)

Sistemul colinergic, cu ACh drept neurotransmițător, este implicat în procesele cognitive, prin activarea receptorilor colinergici muscarinici metabotropi și a receptorilor nicotinici colinergici ionotropi. Reacția responsabilă de menținerea nivelurilor de ACh este catalizată de două colinesteraze: acetilcolinesteraza (AChE) (E.C. 3.1.1.7) și butirilcolinesteraza (BuChE) (E.C. 3.1.1.8). Peștele zebra posedă doar gena pentru AChE, care este responsabilă pentru întreaga degradare a ACh, BuChE fiind absentă (Richetti *et al.*, 2011). Metoda *Ellman* propune studii cinetice detaliate ale activității AChE, unde progresul hidrolizei este urmat de măsurarea unui produs al reacției. Principiul metodei constă în măsurarea vitezei de producție de tiocolină, prin reacția continuă a tiolului cu ion 5 : 5 dithiobis-2-nitrobenzoat, pentru a produce anionul galben de acid 5-tio-2-nitrobenzoic. Viteza de producere a culorii este măsurată la 412 nm într-un fotometru (Ellman *et al.*, 1961).

4.4. Evaluare expresiei genelor de interes ai unor markeri moleculari prin reacția cantitativă de polimerizare în lanț în timp real (RT-qPCR)

În studiul de față ne-am propus evaluarea impactului unor uleiuri esențiale selecționate din familia Lamiaceae, REO, TEO, respectiv OEO asupra expresiei genelor *npv*, *bdnf*, *creb*, *nrf2a* și *egr1* la peștii zebură, prin tehnica RT-qPCR.

4.4.1. Extracția ARN-ului total din probele de creier prelevate de la peștii zebură

După finalizarea celor patru teste comportamentale, loturile de animale au fost eutanasiate. Ulterior, s-au prelevat probele de creier, iar pentru realizarea analizelor genetice au fost conservate în vederea stabilizării ARN-ului (RNA Save-Biological Industries, CT, SUA) și stocate la - 80° C. În cadrul procesului de extracție, din aceste probe de țesut cerebral, a fost purificat ARN-ul total pentru a evalua expresia genelor *npv*, *bdnf*, *creb*, *nrf2a* și *egr1*. 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. RT-qPCR și cuantificarea nivelurilor de expresie

Tehnica RT-qPCR a fost utilizată pe scară largă pentru analiza expresiei genelor datorită specificității, sensibilității și reproductibilității sale. Peștele zebură este un model animal vertebrat potrivit pentru studiile de genetică moleculară și funcțiilor genelor (Hu, Xie și Yao, 2016). RT-qPCR, combină efectele transcripției inverse și PCR cantitativ/în timp real pentru a amplifica și detecta ținte specifice. În procesul de lucru, s-a folosit kit-ul GoTaq® 1-Step RT-qPCR pentru efectuarea revers transcripției și amplificării într-o singură etapă de reacții de amplificare, urmând indicațiile producătorului.

4.5. Analiza statistică a datelor experimentale

În cazul nostru analizele statistice au fost realizate folosind programul GraphPad Prism versiunea 8.3 (La Jolla, CA, SUA), datele fiind 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 și biochimici.

CAPITOLUL 5. REZULTATE ȘI DISCUȚII

5.1. Efectele soluțiilor de REO, TEO și OEO asupra răspunsului anxios în testul scufundării în acvariul nou (NTT)

În cadrul testării în NTT a peștilor zebură, aceștia prezintă un răspuns puternic la anxietatea invocată de noutate. Testul în sine, se bazează pe instinctul natural al animalului de a căuta protecție într-un mediu necunoscut, scufundându-se în jumătatea inferioară a acvariului nou, alternând cu perioade de imobilitate și reducerea explorării acvariului (Cachat *et al.*, 2010).

Prin efectuarea testului NTT, se poate observa o îmbunătățire a timpului de explorare a zonei superioare la loturile tratate cu REO ($p = 0,0229$) în funcție de doză, comparativ cu lotul de scopolamină (Fig. 5.1.B). Tratamentul cu scopolamină a determinat o creștere semnificativă a timpului de explorare a zonei inferioare a acvariului nou, ceea ce denotă un comportament anxios, comparativ cu controlul ($p < 0,0001$). Scopolamina a afectat și funcția locomotorie a peștilor zebură prin scăderea distanței totale parcurse (Fig. 5.1.C, $p = 0,0061$) și a vitezei medii – magnitudinea (Fig. 5.1.D, $p < 0,0001$).

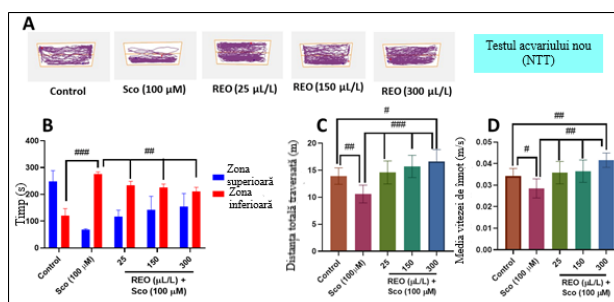


Fig. 5.1. Îmbunătățirea parametrilor locomotori și combaterea anxietății de către cele trei doze de ulei esențial de *Rosmarinus officinalis* (REO: 25, 150 și 300 $\mu\text{L/L}$) în testul NTT

Din rezultatele obținute pe TEO în testul NTT, în ceea ce privește timpul petrecut în zona superioară a acvariului nou (Fig. 5.2.B), se poate observa o îmbunătățire a comportamentului anxios ($p < 0,0001$), spre deosebire de lotul de scopolamină care a înregistrat valori semnificativ scăzute în explorarea zonei superioare, ceea ce reflectă comportamentul anxios al animalelor în cadrul testului NTT. Scopolamina a afectat de asemenea și locomoția peștilor, aceștia aflându-se mai mult în stare de imobilitate pe fundul acvariului nou, decât în mișcare explorând mediul nou. Ca rezultat, viteza medie de deplasare a fost semnificativ scăzută ($p = 0,0061$) (Fig. 5.2.D), dar și distanța totală parcursă ($p = 0,0156$) (Fig. 5.2.C).

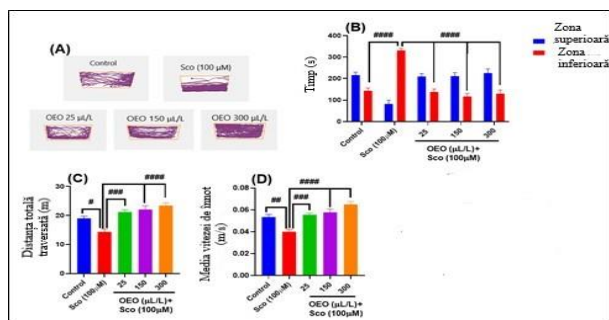


Fig. 5.2. Îmbunătățirea activității locomotorii și diminuarea răspunsului anxios ca rezultat al administrării uleiului esențial de *Thymus vulgaris* (TEO: 25, 150 și 300 µL/L) în cadrul testului NTT

Pe baza înregistrărilor parametrilor locomotori utilizând programul de analiză a comportamentului animal ANY-maze, reprezentați în Fig. 5.3.A, se observă că lotul de pești zebură tratați cu scopolamină manifestă un nivel ridicat de anxietate caracterizat prin explorarea semnificativă a zonei inferioare a acvariului nou, spre deosebire de lotul de control. Totodată putem observa intensificare a explorării zonei superioare a acvariului nou, în cazul loturilor tratate cu OEO și pretratate cu Sco (100µM), în comparație cu lotul tratat doar cu Sco (100µM). Aceste date se corelează mai departe cu datele obținute în Fig. 5.3.B, analizate prin testul ANOVA unidirecțional, care demonstrează diferențele în explorarea celor două zone ale acvariului nou, cu o scădere semnificativă a timpului de explorare a zonei inferioare în grupurile tratate cu OEO față de grupul tratat cu Sco (100µM) ($p < 0,0001$). Lotul tratat cu Sco (100µM) a explorat intens zona inferioară a NTT, ceea ce a indicat profilul anxiogen, evidențiat de o creștere semnificativă a timpului de explorare a zonei inferioare în comparație cu grupul control ($p < 0,0001$).

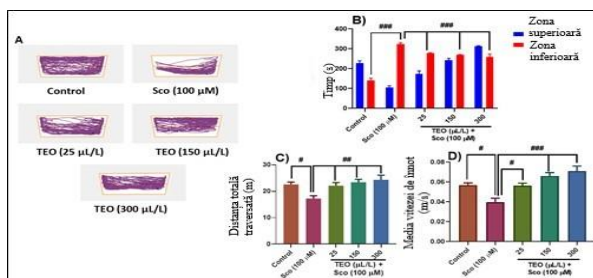


Fig. 5.3. Îmbunătățirea parametrilor locomotori și reducerea anxietății în cadrul testului NTT sub acțiunea uleiului esențial de *Origanum vulgare* ssp. *hirtum* (OEO: 25, 150 și 300 µL/L)

5.2. Efectele soluțiilor de REO, TEO și OEO asupra performanțelor memoriei spațiale în testul Y

Labirintul Y este un test de investigare a învățării spațiale și a memoriei și este utilizat într-un mod fiabil pentru peștii zebură, oferind o sarcină nouă, rapidă și preferință / evitare independentă pentru studiul memoriei în acest teleost. În plus, rezultatele evidențiază implicațiile glutamatergice și a sistemelor colinergice în memoria acestui model experimental.

Am testat ca și la testul anterior, cele trei loturi de pești zebură tratați cu ulei de rosmarin, cimbru și respectiv oregano în trei concentrații diferite, alături de controlul normal și cel tratat cu scopolamină, unde am urmărit, atât răspunsul acestui model experimental la elementul de noutate al testului Y prin timpul petrecut în brațul nou, cât și activitatea motorie esențială de înot prin distanța traversată și viteza medie.

Prin efectuarea testului labirintului Y la modelele de animale tratate cu uleiuri esențiale și cu Sco înainte de testare (Fig. 5.4.B.), se poate observa cum Sco a afectat timpul de explorare al brațului nou, spre deosebire de controlul normal- explorarea brațului nou, totuși a fost îmbunătățită la loturile tratate în toate cele trei doze, cu REO ($p < 0,0001$). Lotul tratat cu Sco a înregistrat numeroase intrări în brațul start, ceea ce denotă un deficit de memorie. De asemenea, Sco afectează locomoția, dovadă fiind scăderea distanței totale parcurse ($p < 0,0001$) (Fig. 5.4.C) și a unghiului de viraj la trecerea între cele trei brațe ($p < 0,0001$) (Fig. 5.4.D).

Tratamentul cu REO a contracarat semnificativ deficitul de locomoție și memorie indus de acțiunea Sco prin îmbunătățirea explorării brațului nou ($p < 0,0001$), în timp ce distanța totală parcursă ($p < 0,0001$) a fost semnificativ îmbunătățită la loturile REO 150 $\mu\text{L/L}$ și REO 300 $\mu\text{L/L}$ prin comparație cu peștele zebură tratat cu Sco (100 μM).

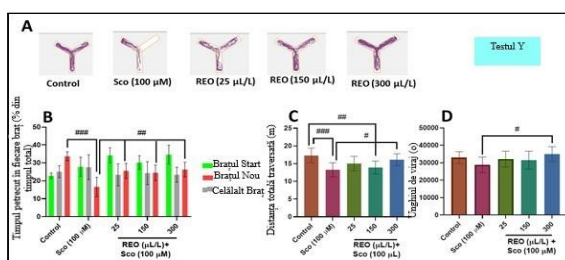


Fig. 5.4. Îmbunătățirea memoriei și a locomoției în testul Y sub acțiunea uleiului esențial de *Rosmarinus officinalis* în cele trei doze (REO: 25, 150 și 300 $\mu\text{L/L}$)

Uleiul esențial de cimbru a îmbunătățit semnificativ deficitul de memorie prin creșterea timpului de explorare a brațului nou, într-o manieră dependentă de doză, cele mai bune performanțe înregistrându-se în dozele cele mai ridicate TEO 150 și 300 $\mu\text{L/L}$ ($p < 0,0001$). Mai mult, uleiul esențial de cimbru a diminuat hipolocomoția indusă de Sco, prin creșterea distanței totale de parcurgere a labirintului ($p < 0,001$).

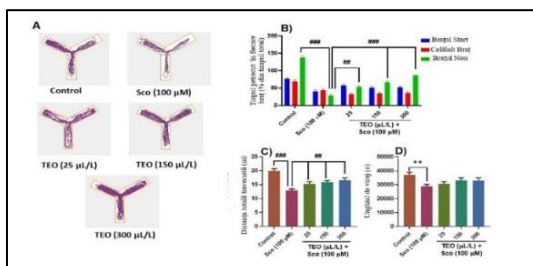


Fig. 5.5. Îmbunătățirea activității locomotorii și a performanțelor memoriei ca rezultat al administrării uleiului esențial de *Thymus vulgaris* (TEO: 25, 150 și 300 $\mu\text{L/L}$) în testul labirintului Y

În ceea ce privește testul labirintului Y, din înregistrările reprezentate în Fig. 5.6.A, lotul tratat cu Sco (100 μM) a prezentat un deficit în explorarea brațului nou, spre deosebire de loturile tratate cu OEO, la care s-a evidențiat o îmbunătățire a memoriei spațiale și a memoriei exploratorii. Beneficiile uleiului esențial de oregano în toate cele trei doze folosite în prezentul studiu sunt reprezentate de timpul petrecut în fiecare braț și anume brațul start, celălalt braț și noul braț (Fig. 5.6.B), unde evident accentul a căzut pe explorarea brațului nou, iar interesul ridicat de explorare a fost regăsit la lotul OEO 150 și 300 $\mu\text{L/L}$ ($p < 0,0001$) și OEO 25 $\mu\text{L/L}$ ($p < 0,001$) spre deosebire de lotul tratat doar cu Sco.

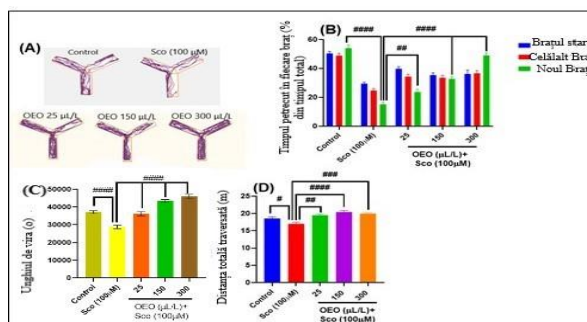


Fig. 5.6. Îmbunătățirea comportamentului explorator și a memoriei spațiale în urma administrării uleiului esențial de *Origanum vulgare* ssp. *hirtum* (OEO: 25, 150 și 300 $\mu\text{L/L}$) în cadrul testului labirintului Y

5.3. Efectele soluțiilor de REO, TEO și OEO asupra performanței memoriei în testul de recunoaștere al obiectului nou (NOR)

Memoria de recunoaștere a obiectelor este o formă simplă de memorie prezentă la diferite vertebrate, precum șobolanii, șoarecii, necesitând utilizarea unor structuri corticale, cum ar fi cortexul peririnal, entorinal și temporal inferior. Evaluarea locomoției în cadrul testului NOR (Fig. 5.7.A) ilustrează diferențele în explorarea obiectului familiar (FO) și a obiectului nou (NO), lotul tratat cu Sco (100μM) prezentând o mare preferință în a explora FO, sugerându-se un deficit de memorie. În ceea ce privește procentul de preferință (Fig. 5.7.C), testele ANOVA unidirecțional și bidirecțional au evidențiat efectul de îmbunătățire a memoriei și a concentrării ca rezultat al tratamentului cu ulei esențial de rosmarin în toate dozele, atât în abordarea obiectului nou mai mult decât pe cel familiar ($F(4, 45) = 8,971, p < 0,0001$), cât și în timpii de explorare ai NO, ($F(4, 90) = 44,33, p < 0,0001$). Animalele tratate cu Sco (100μM) au prezentat procente mai scăzute în cazul preferinței pentru NO ($p < 0,1$ și $p < 0,0001$) și timpi de explorare NO mai scăzuți ($p < 0,0001$), în comparație cu grupul de control, în timp ce administrarea REO în special în doză de 150 μL/L, a îmbunătățit preferința și timpul de explorare NO, sugerându-se îmbunătățirea memoriei.

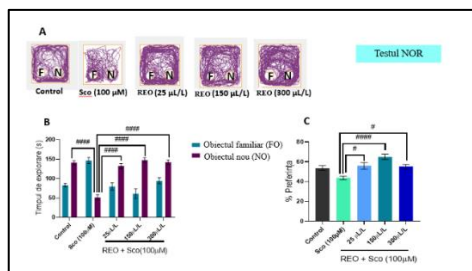


Fig. 5.7. Îmbunătățirea memoriei de recunoaștere a obiectului nou în urma administrării uleiului esențial de *Rosmarinus officinalis* (REO: 25, 150, 300 μL/L) în testul NOR

În Fig. 5.8.A este reprezentată grafic locomoția în cadrul testului NOR evaluată prin diferențele dintre explorarea obiectului familiar (FO) și a obiectului nou (NO). Lotul tratat cu Sco (100μM) a prezentat o mare preferință în a explora FO, indicând un deficit de memorie. În ceea ce privesc procentele de preferință pentru NO, analiza statistică ANOVA unidirecțională a evidențiat efecte semnificative ale tratamentului cu ulei esențial ($F(4,45) = 3,99, p < 0,001$) (Fig. 5.6.C), dar și efecte semnificative asupra timpului de explorare al

NO ($F(4,90) = 31,38$, $p < 0,0001$) (Fig. 5.8.B). Animalele tratate cu Sco (100 μ M) au prezentat procente mai scăzute în cazul preferinței pentru NO ($p < 0,01$) și timpi de explorare ai NO mai scăzuți ($p < 0,0001$) în comparație cu grupul de control, în timp ce administrarea TEO, în special în doză de 150 și 300 μ L/L ($p < 0,01$) a îmbunătățit preferința și timpul de explorare al NO, sugerându-se un profil de îmbunătățire al memoriei.

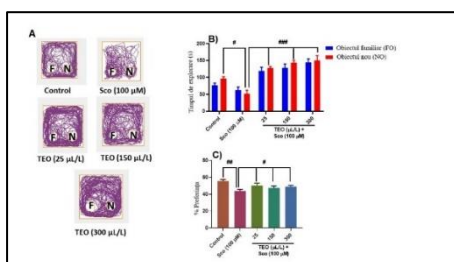


Fig. 5.8. Îmbunătățirea memoriei în cadrul testului recunoașterii obiectului nou (NOR) datorate acțiunii uleiului esențial de *Thymus vulgaris* (TEO: 25, 150 și 300 μ L/L)

În Fig. 5.9.A se regăsesc reprezentări schematice ale activității locomotorii a peștilor în testul NOR, caracterizată prin explorarea obiectului familiar (FO) și explorarea obiectului nou (NO). Preferința pentru FO este semnificativă pentru peștii din lotul tratat cu Sco, spre deosebire lotul de control sau de loturile tratate cu OEO care manifestă interes în explorarea NO. Analiza ANOVA unidirecțională a evidențiat în ceea ce privește timpul de explorare (Fig. 5.9 B), un scor ridicat de explorare a FO de către lotul Sco (100 μ M) comparativ cu NO ($p < 0,0001$), ceea ce a sugerat un deficit în memoria de recunoaștere. Loturile pretratate cu Sco (100 μ M) și tratate apoi cu OEO în dozele 25 și 300 μ L/L cu precădere, au explorat de mai multe ori NO decât FO ($p < 0,0001$), ceea ce a sugerat un profil de recunoaștere mult mai bun. În ceea ce privește procentul de preferință, cel mai scăzut a fost evident la lotul tratat cu Sco ($p < 0,0001$), potrivit Fig. 5.9 C, în timp ce loturile tratate cu OEO în toate cele trei doze, au prezentat un procent ridicat de preferință pentru NO.

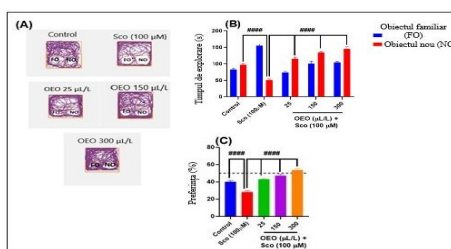


Fig. 5.9. Îmbunătățirea memoriei de recunoaștere în cadrul testului NOR prin administrarea uleiului esențial de *Origanum vulgare* ssp. *hirtum* (OEO: 25, 150 și 300 μ L/L)

5.4. Efectele uleiurilor esențiale selecționate asupra stresului oxidativ la model de demență indus prin intermediul scopolaminei

Pe baza studiilor efectuate pe animale și pe subiecți umani se poate afirma că stresul oxidativ joacă un rol important în apariția și dezvoltarea majorității bolilor. Speciile reactive de oxigen (ROS) sunt importante pentru menținerea homeostaziei, deoarece funcționează ca un al doilea mesager în cascada de semnalizare intracelulară. ROS sunt foarte instabile și reactive, prezentând un timp de înjumătățire foarte scurt, însă, speciile pe care le generează, după oxidarea biomoleculelor, sunt mult mai stabile decât ele și pot fi utilizate ca biomarkeri ai deteriorării oxidative, precum lipide, acizi nucleici și proteine în stările lor oxidate. Nivelurile modificate de enzime antioxidante, cum ar fi catalazele, superoxid dismutaza și glutatión peroxidaza, precum și alte substanțe antioxidante, pot fi considerate biomarkeri (Teixeira *et al.*, 2019).

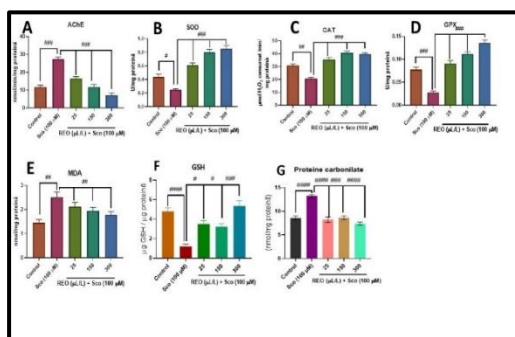


Fig. 5.10. Uleiul esențial de *Rosmarinus officinalis* (REO: 25, 150 și 300 μL/L) a exercitat un efect anti-AChE, și a îmbunătățit statusul antioxidant din creierul peștilor zebură

Rezultatele noastre experimentale au demonstrat faptul că în creierul peștilor din lotul tratat cu Sco, activitatea AChE a crescut pronunțat (Fig. 5.10.A) spre deosebire de lotul de control ($p < 0,0001$), ceea ce denotă o degradare a acetilcolinei. Tratamentul cu ulei esențial de rosmarin într-o manieră dependentă de doză, a reușit să scadă semnificativ activitatea AChE ($p < 0,0001$) spre deosebire de lotul de Sco. Acest lucru ne demonstrează profilul anti-AChE al REO, alături de îmbunătățirea capacității de memorare a peștilor zebură, așa cum s-a demonstrat anterior în testele NTT, labirintului Y și în NOR.

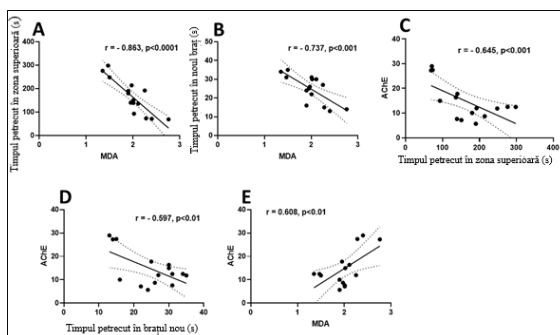


Fig. 5.11 Corelația de tip Pearson dintre parametrii comportamentali și parametrii biochimici (n = 10 animale/lot). Datele obținute pentru AChE sunt exprimate în nmol/min/mg de proteină, pentru MDA sunt exprimate în nmol/mg de proteină, iar timpul petrecut atât în zona superioară cât și în brațul nou sunt exprimate în (s)

Coefficientul (r) de corelație Pearson a fost utilizat în scopul asocierii liniare dintre cogniție, enzime antioxidante și peroxidare lipidică. Potrivit Fig. 5.11.A și Fig. 5.11.B se poate observa o corelație negativă semnificativă între timpul petrecut în zona superioară a NTTvs. MDA ($r = -0.863$, $p < 0,001$), precum și între timpul petrecut în brațul nou vs. MDA ($r = -0.737$, $p < 0,001$), $n = 10$. Corelații negative importante au fost evidențiate prin regresie liniară și în cazul AChE vs. timpul petrecut în zona superioară NTT ($r = -0.645$, $p < 0,001$) și față de timpul petrecut în brațul nou ($r = -0.597$, $p < 0,01$), $n = 10$, conform Fig. 5.11.C și Fig. 5.11.D.

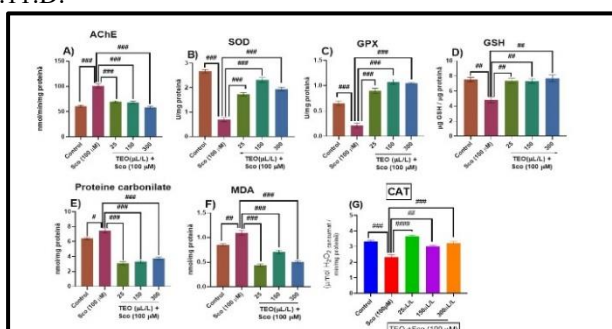


Fig. 5.12. Uleiul esențial de cimbru (TEO: 25, 150 și 300 $\mu\text{L/L}$) a exercitat un efect anti-AChE, și a îmbunătățit statusul antioxidant din creierul peștilor zebură

Mecanismul de bază al procesului de îmbunătățire a memoriei peștilor zebură tratați cu Sco, prin intermediul TEO, a fost examinat și prin nivelurile markerilor biochimici legați de funcția colinergică și stresul oxidativ. Studiile de specialitate susțin

modificarea activității AChE odată cu progresia bolii AD (Gauthier, 2002), fapt dovedit de disfuncția neuronilor colinergici de la nivelul proencefalului, menționate ca fiind cele mai primordiale evenimente patologice apărute în patogeneza AD. Acestea sunt urmate de scăderea activității colin acetiltransferazei (ChAT) și a nivelurilor de ACh în creierul persoanelor cu AD (Nyakas *et al.*, 2011).

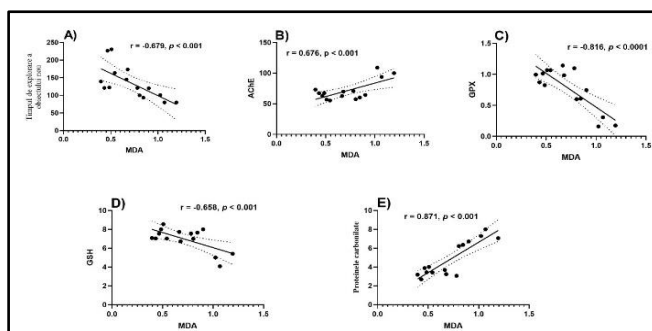


Fig. 5.13. Corelația Pearson dintre parametrii comportamentali și cei biochimici (n = 10). Datele prezentate sunt: timpul de explorare a obiectului nou (s), AChE (nmol/min/mg proteină), GPX (U/mg proteină), GSH (μg GSH/ μg proteină), proteine carbonilate (nmol/mg proteină), și MDA (nmol / mg proteină)

În Fig. 5.13. se poate observa o corelație semnificativ negativă între timpul de explorare a obiectului nou vs. MDA ($r = -0,679$, $p < 0,001$), ceea ce denotă o îmbunătățire a răspunsului comportamental în testul NOR, corelat cu un nivel scăzut de peroxidare lipidică. De asemenea, o corelație puternic negativă s-a evidențiat prin regresia liniară, în cazul GPX vs. MDA ($r = -0,816$, $p < 0,0001$) și între GSH vs MDA ($r = -0,658$, $p < 0,001$) (n=10) ceea ce denotă o corelație semnificativă între activitatea enzimelor antioxidante și un nivel scăzut de peroxidare lipidică. La polul opus s-a observat, o corelație semnificativ pozitivă între AChE vs. MDA ($r = 0,676$, $p < 0,001$) și între proteinele carbonilate vs. MDA ($r = 0,871$, $p < 0,001$), n=10, ceea ce a sugerat că scăderea activității AChE și a nivelului de proteine carbonilate se corelează cu descreșterea nivelului MDA.

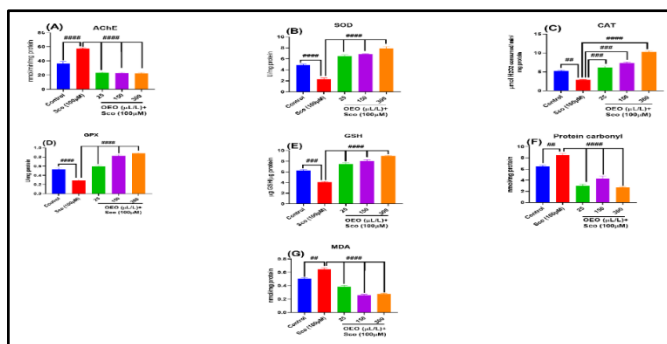


Fig. 5.14. Efectul antioxidant al uleiului esențial de *Origanum vulgare* ssp. *hirtum* (OEO: 25, 150 și 300 $\mu\text{L/L}$)

Se pot observa per total diferențe semnificative din rezultatele obținute în analiza ANOVA unidirecțională, între lotul tratat cu Sco și loturile tratate cu OEO, pentru SOD ($p < 0,0001$) - Fig. 5.14.B, CAT ($p < 0,0001$) - Fig. 5.14.C, GPX ($p < 0,0001$) – Fig. 5.14.D, . S-au obținut diferențe semnificative și pentru nivelul de GSH conform Fig. 5.14.E ($p < 0,0001$). Mai mult de atât, analiza ANOVA unidirecțională a evidențiat diferențe importante și pentru proteinele carbonilate ($p < 0,0001$) – Fig. 5.14.F și nivelul de MDA ($p < 0,0001$) – Fig. 5.14.G. Nivelele de proteine carbonilate și de peroxidare lipidică au fost crescute în cazul peștilor tratați cu Sco (100 μM), spre deosebire de lotul control, și de loturile pretratate cu Sco și tratate apoi cu OEO, care au prezentat nivele scăzute de proteine carbonilate și MDA ($p < 0,0001$), ceea ce ne confirmă efectul antioxidant al OEO.

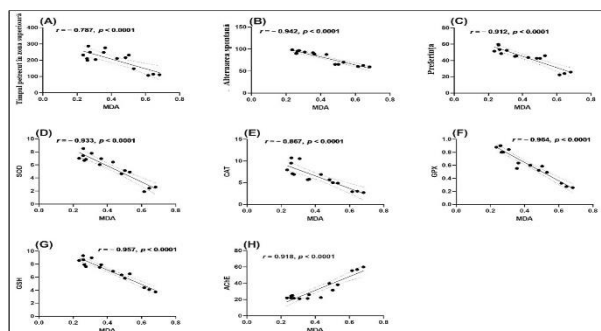


Fig. 5.15. Corelația de tip Pearson dintre parametrii comportamentali și cei biochimici ($n = 10$). Datele prezentate sunt: timpul petrecut în zona superioară (s) vs. MDA (nmol/mg de proteină), alternarea spontană (%) vs. MDA (nmol/mg de proteină), preferința pentru obiectul nou (%) vs. MDA (nmol/mg de proteină), SOD (U/mg de proteină) vs. MDA (nmol/mg de proteină), CAT ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ consumați/min/mg de proteină) vs. MDA (nmol/mg de proteină), GPX (U/mg de proteină) vs. MDA (nmol/mg de proteină), GSH

($\mu\text{g GSH/ } \mu\text{g de proteină}$) vs. MDA ($\text{nmol/mg de proteină}$) și AChE ($\text{nmol/min/mg de proteină}$) vs. MDA ($\text{nmol/mg de proteină}$)

De menționat ar fi faptul că datele obținute pentru valoarea coeficientului r , ne-au ajutat să demonstrăm că tratamentul cu OEO a avut ca efect creșterea capacității de memorie a peștilor zebra pretratați cu Sco, în strânsă legătură, cu creșterea activității enzimelor antioxidante, respectiv descreșterea nivelului de peroxidare lipidică.

5.5. Efectul soluțiilor de *Rosmarinus officinalis*, *Thymus vulgaris* și *Origanum vulgare ssp. hirtum*, asupra memoriei asociative în testul labirintului T

În testul labirintului T s-a realizat testarea abilităților de învățare, precum și studierea atât a memoriei pe termen scurt și lung, cât și a plasticității memoriei peștelui zebra (Kundap *et al.*, 2017). Protocolul de lucru după care ne-am ghidat în studiul efectului uleiurilor esențiale de rozmarin, cimbru și respectiv oregano asupra memoriei asociative a peștilor zebra, se bazează pe un model de învățare condiționată de tip Pavlovian, unde un stimul arbitrar (culoarea verde, sau culoarea roșu) devin asociat cu un stimul semnificativ pentru animal (hrana), astfel ca cei doi stimuli să evoce aceleași răspunsuri comportamentale înăscute (căutarea hranei) (Pilehvar, Town and Blust, 2020).

În funcție de lungimea intervalului de retenție, testul labirintului T poate estima puterea memoriei de lucru spațiale corelată cu învățarea asociativă (Lalonde, 2002). Conform figurii 5.16., cu cât timpul mediu necesar peștilor zebra să finalizeze fiecare sesiune de lucru este mai scurt, cu atât eficacitatea tratamentului cu ulei esențial este mai mare. Din acest punct de vedere, lotul de control a avut un timp de răspuns bun, spre deosebire de lotul de Sco. La fel și în cazul loturilor tratate REO în toate cele trei doze au prezentat un timp de execuție bun, semn că au fost contracarate efectele tratamentului cu Sco. În timpul celor două sesiuni de pre-antrenament, peștii zebra au prezentat un timp de răspuns scăzut de efectuare a sarcinii de lucru, mai ales în ultima zi, iar tratamentul cu Sco a afectat implicit această primă etapă. În sesiunile de discriminare, tendința de creștere a timpului de execuție a sarcinii de lucru s-a potențat mai ales în primele 5 stadii pentru lotul de Sco. În stadiul 9, lotul de REO ($300 \mu\text{L/L}$) a avut nevoie de un timp semnificativ de mare pentru a face alegerea corectă într-unul dintre brațele labirintului, apoi tendința a rămas constantă. Se poate observa că atât tratamentul cât și timpul afectează acest efect în faza de discriminare. Totodată timpul mediu necesar peștelui zebra pentru finalizarea

sarcinii de lucru a fost semnificativ mai scurt în sesiunea finală a 16-a, comparativ cu sesiunea 1.

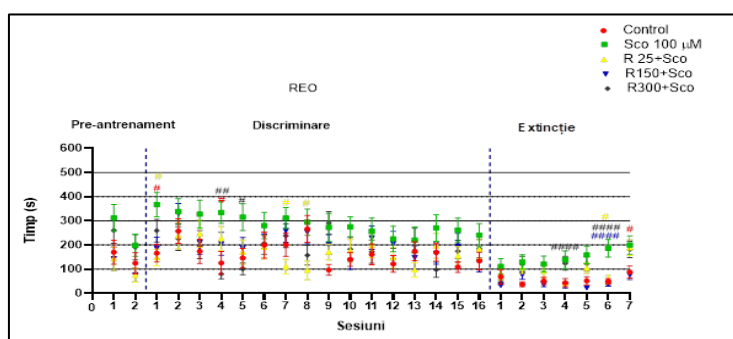


Fig. 5.16. Media timpului parcurs de peștii zebură în vederea completării fiecărei sesiuni a fiecărei etape în parte (pre-antrenament, discriminare și extincție). Datele prezentate sunt exprimate $\pm$ SD, $n=10$, # indică diferențe semnificative ($p < 0,1$) între control, loturile tratate cu ulei esențial de rosmarin în cele trei concentrații (25, 150 și 300 μ L/L), față de tratamentul cu Sco în cadrul aceleiași sesiuni (two-way RM-ANOVA)

În figura 5.17., avem reprezentat media timpului necesar peștilor zebură pentru a finaliza sesiunile dedicate fiecărei probe în parte. Un timp bun a fost înregistrat în cazul lotului de control ca și în figura 5.16., dar și în cazul loturilor tratate cu TEO în special în doza cea mai mare de 300 μ L/L. În faza de pre-antrenament se observă o medie a timpului eficace (scurt) pentru toate loturile în habituarea peștilor cu brațele testului T fără culoare doar cu recompensă de hrană, cu excepția lotului de Sco care a avut timpi mai ridicați de parcurgere a testului. În schimb, în sesiunile de discriminare, această tendință a timpului se află în creștere spre deosebire de pre-antrenament, datorită marcajului cu culoare a brațelor labirintului. În continuare lotul de control înregistrează un timp scurt de pătrundere în brațele labirintului în ordinea corectă ABBA, urmată de recompensă, spre deosebire de lotul de Sco care înregistrează timpi ridicați de finalizare a sarcinilor de lucru, înregistrând uneori și timpul maxim de 600 secunde.

În primele 6 etape ale discriminării, pentru loturile tratate cu ulei esențial de cimbru, timpul de răspuns al peștilor zebură a crescut semnificativ, înregistrându-se o medie a timpului eficientă, ceea ce denotă o inhibare a efectului Sco. Din etapa 7 până la finalul discriminării, tendința mediei de timp a rămas constantă pentru tratamentele cu TEO, fără diferențe prea mari între dozele de tratament. Cu toate acestea se poate concluziona că doza

de TEO 25 $\mu\text{L/L}$ a înregistrat o tendință a mediei de timp mai ridicată, spre deosebire de TEO 300 $\mu\text{L/L}$ care a avut media de timp cea mai scăzută sau TEO 150 $\mu\text{L/L}$ care s-a păstrat aproape constant ca timp fără prea mare contraste. Totodată mai putem afirma faptul că pentru control și loturile tratate cu TEO media de timp necesară peștilor zebră de a parcurge toate sesiunile din fiecare etapă de lucru a fost semnificativ mai scurtă în etapa finală 16, comparativ cu prima etapă, ceea ce ne demonstrează eficacitatea pre-antrenamentului și a testului T în sine de a învăța peștii sarcini de lucru.

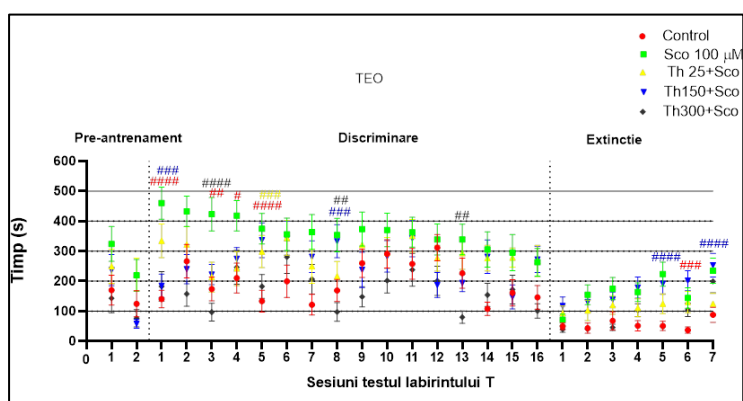


Fig. 5.17. Media timpului parcurs de peștii zebră în vederea completării fiecărei sesiuni a fiecărei etape în parte (pre-antrenament, discriminare și extincție). Datele prezentate sunt exprimate $\pm$ SD, $n = 10$, # indică diferențe semnificative ($p < 0,1$) între control, loturile tratate cu ulei esențial de cimbru în cele trei concentrații TEO (25, 150 și 300 $\mu\text{L/L}$), față de tratamentul cu Sco în cadrul aceleiași sesiuni (two-way RM-ANOVA)

Mai departe, în Fig. 5.18., s-a reprezentat media timpului necesar peștilor zebră pentru a finaliza sesiunile dedicate fiecărui proces în parte în cadrul testului T, sub acțiunea uleiului esențial de oregano. Un timp bun a fost înregistrat de către lotul de control ca și în Fig. 5.16. și Fig. 5.17., media de timp scurtă de execuție a sarcinilor de lucru, înregistrându-se și în cazul loturilor tratate cu OEO în special în doza de 25 $\mu\text{L/L}$, în mare parte din sesiunile de lucru în discriminare și în doza de 150 $\mu\text{L/L}$ din etapa 6 de discriminare și în special în extincție. În etapa de pre-antrenament media de timp per total a fost scurtă la toate dozele de ulei esențial, cu un trend în scădere.

Începând cu etapa de discriminare a culorilor, trendul mediei de timp a început să crească, fenomen întâlnit la toate cele trei uleiuri esențiale selectate în studiul nostru. Pentru loturile tratate cu TEO și OEO timpul de răspuns al peștilor zebră în sesiunile de

discriminare a crescut mai semnificativ decât REO, observat în etapele incipiente ale primelor șase etape. Aceste medii de timp crescute sunt observate pentru loturile tratate cu Sco față de control ($p < 0,0001$ și $p < 0,001$) menținându-se până în etapa 16, iar pentru loturile tratate cu OEO 150 $\mu\text{L/L}$ în etapa a 5-a față de OEO 25 $\mu\text{L/L}$ ($p < 0,001$), în etapa a 6-a pentru OEO 300 $\mu\text{L/L}$ față de OEO 150 $\mu\text{L/L}$ ($p < 0,01$) și pentru OEO 25 $\mu\text{L/L}$ în etapa a 7-a față de OEO 300 $\mu\text{L/L}$ ($p < 0,001$), după trendul de timp aflându-se într-o scădere și menținere aproximativ constantă fără diferențe semnificative. Putem concluziona că atât timpul cât și tratamentul au afectat semnificativ acest efect în faza de discriminare. În ultima etapă de extincție, trendul mediei de timp cunoaște o scădere importantă în primele 5 zile, apoi crescând puțin spre finalul celor 2 zile de testare. Per total lotul de Sco a suferit medii de timp cele mai crescute comparativ cu controlul și loturile tratate cu ulei esențial în toate cele 3 etape ale testului T.

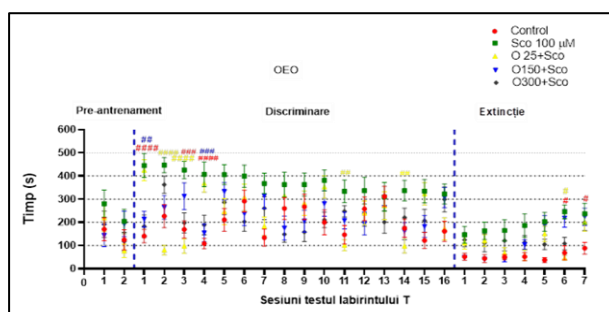


Fig. 5.18. Media timpului parcurs de peștii zebură în vederea completării fiecărei sesiuni a fiecărei etape în parte (pre-antrenament, discriminare și extincție). Datele prezentate sunt exprimate $\pm$ SD, $n = 10$, # indică diferențe semnificative ($p < 0,1$) între control, loturile tratate cu ulei esențial de oregano în cele trei concentrații (25, 150 și 300 $\mu\text{L/L}$), față de tratamentul cu Sco în cadrul aceleiași sesiuni (two-way RM-ANOVA)

Ca și concluzie finală vom detalia în tabelul 1 și 2, mediile de timp obținute de toate loturile luate în studiu în sesiunile de lucru ale etapei de discriminare și extincție pentru a vedea preferințele de culoare în funcție de uleiul esențial folosit ca tratament.

Tabelul 1. Diferențele de timp între loturile de pești în îndeplinirea antrenamentului de discriminare din cadrul testului labirintului T pe baza preferinței de culoare

LOTURI	MEDII DE TIMP - DISCRIMINARE		DIFERENȚE SEMNIFICATIVE
	Culoarea verde	Culoarea roșie	
Control	72,74 sec	101,3 sec	### p < 0,001
Scopolamină	113,8 sec	169,9 sec	#### p < 0,0001
Rosmarin 25 μ L/L	84,47 sec	114,1 sec	## p < 0,01
Rosmarin 150 μ L/L	87,08 sec	101 sec	ns p = 0,1
Rosmarin 300 μ L/L	94,40 sec	113,3 sec	# p < 0,1
Thymus 25 μ L/L	129 sec	142,5 sec	ns p = 0,1
Thymus 150 μ L/L	82,06 sec	105,9 sec	ns p = 0,8
Thymus 300 μ L/L	117,1 sec	115,7 sec	## p < 0,01
Origanum 25 μ L/L	132,2 sec	120,9 sec	ns p = 0,1
Origanum 150 μ L/L	104 sec	119,9 sec	ns p = 0,1
Origanum 300 μ L/L	117,9 sec	119,9 sec	ns p = 0,8

Tabelul 2. Diferențele de timp între loturile de pești în îndeplinirea sarcinilor de lucru în ultima etapă de extincție, din cadrul testului labirintului T pe baza preferinței de culoare

LOTURI	MEDII DE TIMP - EXTINCȚIE		DIFERENȚE SEMNIFICATIVE
	Culoarea verde	Culoarea roșie	
Control	37 sec	51 sec	ns p = 0,08
Scopolamină	117,1 sec	208 sec	## p < 0,01
Rosmarin 25 μ L/L	56,32 sec	71 sec	ns p = 0,3
Rosmarin 150 μ L/L	22,86 sec	23,83 sec	ns p = 0,1
Rosmarin 300 μ L/L	111,1 sec	112,8 sec	ns p = 0,06
Thymus 25 μ L/L	83,47 sec	132,2 sec	ns p = 0,1
Thymus 150 μ L/L	166,9 sec	137,8 sec	ns p = 0,8
Thymus 300 μ L/L	115,5 sec	56,84 sec	## p < 0,01
Origanum 25 μ L/L	184,1 sec	161,5 sec	ns p = 0,4
Origanum 150 μ L/L	140,8 sec	107,9 sec	ns p = 0,4
Origanum 300 μ L/L	140 sec	119,4 sec	ns p = 0,6

5.6. Efectele uleiurilor esențiale de rosmarin, cimbru și oregano asupra markerilor genetici pe probe de creier de la pești zebură imersați în scopolamină pentru a induce demență AD

5.6.1. Efectul REO, TEO și OEO asupra expresiei genei *bdnf*

BDNF alături de alte neurotrofine au roluri importante în neurogeneză, creștere neuronală, supraviețuire, diferențiere, maturare, migrație neuronală și influențează creșterea dendritică, densitatea, creșterea neuronală, conectivitatea și neuroplasticitatea pe durata vieții (Ahmed *et al.*, 2015). La peștele zebură, ARNm *bdnf* au fost prezenți încă din stadiul embrionar, deoarece prezența transcriptelor *bdnf* în creierul anterior, mijlocul creierului și creierul posterior a fost demonstrată în stadiile incipiente de dezvoltare, cu experimente de hibridizare in situ cu montare completă (Cacialli *et al.*, 2016). Administrarea de Sco stimulează calea neuronală colinergică și circuitele de memorie ale SNC, dar poate reduce totodată și expresia proteinei de legare a răspunsului pentru BDNF și CREB în creier.

În Fig. 5.19, am urmărit efectele REO (25, 150 și 300 $\mu\text{L/L}$), TEO (25, 150 și 300 $\mu\text{L/L}$) și OEO (25, 150 și 300 $\mu\text{L/L}$) asupra expresiei genei *bdnf* în creierul de pește zebură tratat cu Sco. Conform protocolului labirintului T, am investigat rezultatele obținute din loturi antrenate o parte să aleagă brațul verde și din alta parte, loturi antrenate să aleagă brațul roșu. După cum putem observa, peștii zebură cu preferință pentru brațul verde au o valoare mult mai mare a expresiei genelor spre deosebire de peștii zebură cu preferință pentru brațul roșu. În ambele cazuri, tratamentul cu Sco a redus semnificativ numărul de copii ARNm ale genei *bdnf*, în comparație cu loturile de control ($p < 0,1$ și $p < 0,0001$). Din fiecare ulei esențial observăm îmbunătățiri importante ale efectelor negative ale Sco asupra expresiei genei *bdnf* prin creșterea semnificativă a numărului de copii ARNm ($p < 0,01$ și $p < 0,0001$) pentru REO la concentrații de 150 și 300 $\mu\text{L/L}$; $p < 0,0001$ pentru TEO la concentrații 25 și 300 $\mu\text{L/L}$; $p < 0,0001$ pentru OEO la concentrații 150 și 300 $\mu\text{L/L}$.

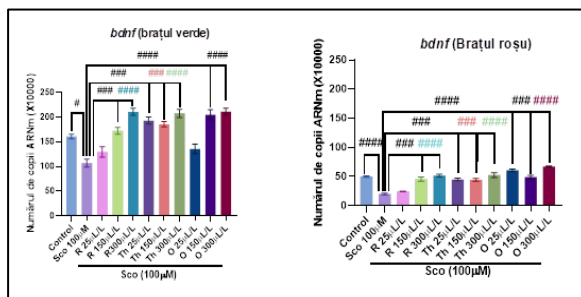


Fig. 5.19. Expresia genică din creierul de pește zebură determinată prin RT-qPCR, reprezentând graficul cu plot-urile pentru numărul de copii ARNm pentru *bdnf*, cu $F = 21,89$, $p < 0,0001$ pentru brațul verde și $F = 32,56$, $p < 0,0001$ pentru brațul roșu

5.6.2. Efectul REO, TEO și OEO asupra expresiei genei *creb_1*

CREB este esențial pentru funcții importante ale cogniției, cum ar fi memoria și plasticitatea sinaptică, de aceea în neuroni a fost corelat cu diferite procese intracelulare, inclusiv proliferarea, diferențierea, supraviețuirea, potențarea sinaptică pe termen lung, neurogeneza și plasticitatea neuronală (Wang *et al.*, 2018).

În studiul nostru, expresia ARNm *creb* a fost în plus exprimată pentru loturile tratate cu Sco în comparație cu loturile de control ($p < 0,01$ și $p < 0,0001$). Pentru peștii tratați cu uleiuri esențiale REO (25 $\mu\text{L/L}$) - braț roșu, TEO (25 și 150 $\mu\text{L/L}$) - braț verde și OEO (25 și 150 $\mu\text{L/L}$) - braț verde, expresia ARNm *creb* a fost asemănătoare cu cea a loturilor Sco (nicio diferență semnificativă). Aceasta confirmă faptul că Sco și dozele de uleiuri esențiale au fost dependente de simptomele demenței încadrate în AD, efectele amnezice, care au contribuit la pierderea funcției de memorie la pești, după ce aflăm că animalele aleg culoarea corectă asociată cu recompensa alimentară. Într-un alt caz, REO ($p < 0,0001$ la concentrație de 150 și 300 $\mu\text{L/L}$), TEO ($p < 0,001$ la concentrație de 25 $\mu\text{L/L}$ și $p < 0,0001$ pentru concentrația de 150 și 300 $\mu\text{L/L}$) și OEO ($p < 0,001$ la concentrația 150 $\mu\text{L/L}$ și $p < 0,0001$ pentru 300 $\mu\text{L/L}$) au redus semnificativ expresia brațului roșu, așa cum se observă în Fig. 5.20.

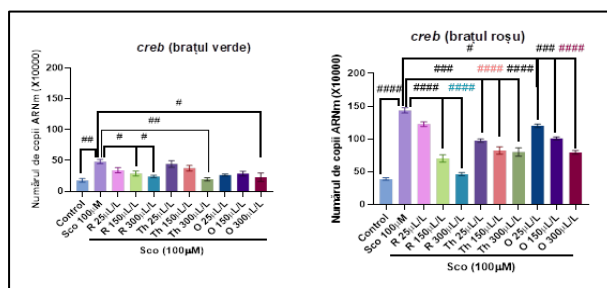


Fig. 5.20. Expresia genică din creierul de pește zebură determinată prin RT-qPCR, reprezentând graficul cu plot-urile pentru numărul de copii ARNm pentru *creb_1*, cu $F = 6,084$ ($p < 0,01$) pentru brațul verde și $F = 67,23$ ($p < 0,0001$) pentru brațul roșu

Ținând cont de rolul funcțional al polifenolilor în reglarea învățării și a memoriei, activarea semnalizării CREB ar putea explica efectele neuroprotective ale uleiurilor noastre esențiale asupra deficitelor de memorie induse de Sco.

5.6.3. Efectul REO, TEO și OEO asupra expresiei genei *npv*

Neuropeptidele exercită roluri neuroprotectoare în principal prin prevenirea acumulării de A β , creșterea transportului neuronal al glucozei, creșterea producției de neurotrofine, inhibarea stresului reticulului endoplasmatic și autofagie, modularea activității canalului de potasiu și potențarea pe termen lung a hipocampului (Chen, Du and Chen, 2019).

După cum se observă în Fig. 5.21., numărul de copii de ARNm al genei *npv* a fost redus semnificativ pentru loturile antrenate pentru brațul roșu, spre deosebire de cele antrenate pentru brațul verde și, de asemenea, pentru loturile tratate cu Sco (100 μ M) pentru ambele culori. Pentru loturile antrenate pentru brațul verde, observăm o creștere semnificativă a expresiei genice de la nivelul creierului de pește zebură tratat cu uleiuri esențiale de concentrație de 300 μ L/L, vs. Sco ($p < 0,0001$), dar avem o creștere nesemnificativă a numărului de copii ARNm și pentru REO (25 μ L/L)-braț verde, TEO (25 μ L/L) și OEO (25 μ L/L)-braț roșu.

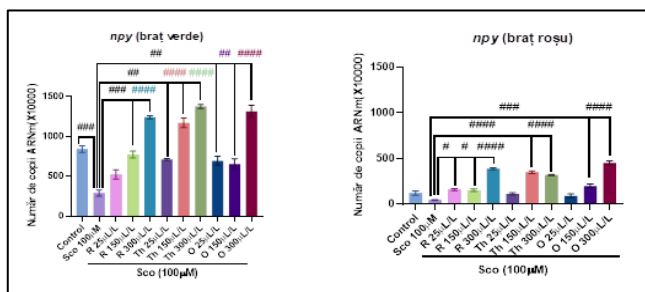


Fig. 5.21. Expresia genică din creierul de pește zebură determinată prin RT-qPCR, reprezentând graficul cu plot-urile pentru numărul de copii ARNm pentru *npv*, cu $F = 52,52$ ($p < 0,0001$), în cazul loturilor de pești antrenați pentru brațul verde și $F = 71,96$ ($p < 0,0001$) în cazul loturilor de pești antrenați pentru brațul roșu

În concluzie, NPY este util în experimentele pe model animal de laborator contra simptomelor de demență tipice AD și poate fi recomandat ca terapie țintă în tulburări neurologice datorită legăturii strânse cu acetilcolina.

5.6.4. Efectul REO, TEO și OEO asupra expresiei genei *nrf2a*

În studiile de specialitate, peștele zebură a fost folosit ca model animal experimental în studiul asupra stresului oxidativ ca mediator de toxicitate, demonstrat prin deficiența de *nrf2a*, ca genă cheie în răspunsul antioxidant, așa cum ne-a relatat Yamashita *et al.*(2019).

După cum putem observa în Fig. 5.22., nu există diferențe mari în ceea ce privește numărul de copii ARNm al genei *nrf2a*, la loturile de control atât în alegerea culorii verzi cât și a celei roșii, aceste loturi având o activitate profund crescută. În schimb numărul de copii ARNm a fost redus semnificativ pentru loturile tratate cu Sco (100 μ M) datorită toxicității emanate în corpul peștilor având deficit de activitate genică, spre deosebire de control și loturile tratate cu ulei esențial. Diferențe semnificative în activitatea genică a *nrf2a* sunt prezente pentru loturile antrenate pentru culoarea roșu în special la REO 150 μ L/L $p < 0,001$), OEO (concentrație 150 μ L/L $p < 0,1$) și pentru toate dozele ridicate de ulei esențial REO (300 μ L/L $p < 0,0001$), TEO (300 μ L/L $p < 0,1$) and OEO (300 μ L/L $p < 0,0001$); în timp ce pentru loturile antrenate pentru culoare verde, diferențele semnificative sunt prezente la TEO ($p < 0,01$) and OEO ($p < 0,01$) la concentrațiile mari de 300 μ L/L spre deosebire de loturile de Sco.

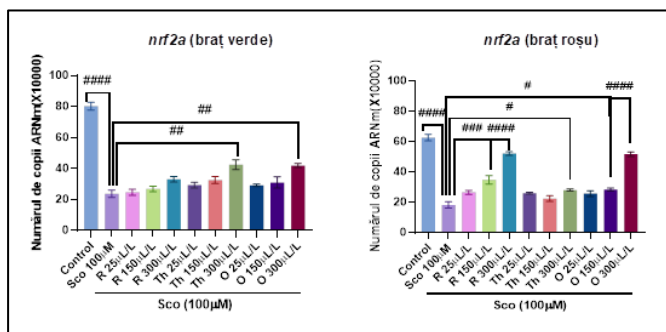


Fig. 5.22. Expresia genică din creierul de pește zebură determinată prin RT-qPCR, reprezentând graficul cu plot-urile pentru numărul de copii ARNm pentru *nrf2a*, cu $F = 49.54$, $P < 0,0001$ pentru brațul verde și $F = 73.47$, $P < 0,0001$ pentru brațul roșu

5.6.5. Efectul REO, TEO și OEO asupra expresiei genei *egr1*

Egr-1 (cunoscut și sub numele de zif268, NGFI-A, krox-24, ZENK) este un factor de transcripție care funcționează ca parte a răspunsului genetic imediat-timpuriu, primul val de expresie genetică indus într-un neuron prin stimulare. Expimarea Egr-1 este indusă

de o varietate de experiențe naturale, stimuli senzoriali și în timpul producției de comportamente (Burmeister and Fernald, 2005).

În Fig. 5.23. am evaluat nivelul de expresie al genei *egr1* în creierul peștelui zebra pretratat cu Sco și uleiuri esențiale din familia Lamiaceae. Am observat faptul că numărul de copii ARNm al acestei gene a fost semnificativ crescut pentru loturile antrenate să aleagă culoarea verde, în special la concentrații mari de tratament cu ulei esențial 300 $\mu\text{L/L}$ (REO, TEO și OEO $p < 0,0001$). În schimb numărul de copii ale ARNm al acestei gene a fost redus semnificativ în cazul loturilor tratate cu Sco (100 μM) spre deosebire de loturile de control pentru loturile de pești zebra antrenate pentru ambele culori.

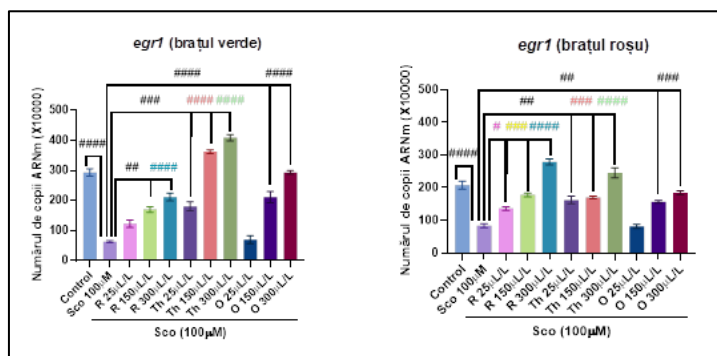


Fig. 5.23. Expresia genică din creierul de pește zebra determinată prin RT-qPCR, reprezentând graficul cu plot-urile pentru numărul de copii ARNm pentru *egr1*, cu $F=94,12$, ($p<0,0001$) pentru brațul verde și $F= 47,36$, ($p < 0,0001$) pentru brațul roșu

CONCLUZII

Studiul de față și-a propus să evalueze efectul și impactul uleiurilor esențiale de *R. officinalis*, *T. vulgaris* și *O. vulgare* ssp. *hirtum* selectate din familia Lamiaceae, atât asupra comportamentului, cât și asupra parametrilor biochimici și moleculari pe model animal de pește zebra al AD indus prin imersie în soluție de Sco (100 μ M). Pe baza rezultatelor obținute se pot formula următoarele concluzii generale:

1. Pe baza studiilor comportamentale, se observă cu acuratețe capacitatea peștilor zebra de a memora, de a executa sarcini, datorită reflexelor lor naturale, a unui comportament învățat sau deprins în urma unei recompense/pedepse, indicii care ne ajută în înțelegerea activității sistemului colinergic al animalelor dar și efectul agenților farmacologici utilizați. Conform rezultatelor obținute în testele labirintelor NTT, Y, NOR și T, se observă evoluția comportamentului peștilor luați în studiu prin comparație cu loturile de control.
2. Toate cele trei concentrații 25 μ L/L, 150 μ L/L, 300 μ L/L ale uleiurilor esențiale de *R. officinalis*, *T. vulgaris* și *O. vulgare* ssp. *hyrtum*, au evidențiat potențialul lor de a contracara stresul oxidativ indus prin administrarea de Sco, prin scăderea nivelului proteinelor carbonilate și nivelului de MDA din organismul peștilor zebra și prin nivele crescute ale conținutului total de glutatation redus, alături de intensificarea activităților specifice ale glutatation peroxidazei, superoxid dismutazei și catalazei, evidențiind capacitatea antioxidantă ale uleiurilor esențiale.
3. Administrarea uleiurilor esențiale de *R. officinalis*, *T. vulgaris* și *O. vulgare* ssp. *hyrtum* a determinat scăderi semnificative ale activității enzimatice ale AChE la nivelul țesutului cerebral al peștilor zebra, spre deosebire de efectul Sco, care a produs stres oxidativ și a crescut activitatea AChE. Totodată administrarea celor trei uleiuri esențiale selectate din familia Lamiaceae au demonstrat proprietăți pro-cognitive și antioxidante datorită creșterii expresiei genelor *bdnf*, *npv*, *creb_1*, *nrf2a* și *egr1* ca răspuns la acțiunea citotoxică a Sco de inducere a stresului oxidativ.
4. Toate aceste rezultate ne indică faptul că aceste uleiuri esențiale reprezintă o alternativă terapeutică potrivită pentru ameliorarea simptomelor asociate AD în special prin îmbunătățirea mecanismelor care stau la baza formării memoriei – sistem colinergic, expresie genică specifică și reducerea ROS.

Bibliografie selectivă

1. Ahmed, A. O. *et al.* (2015) “Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and neurocognitive deficits in people with schizophrenia: A meta-analysis,” *Psychiatry Research*. Elsevier Ireland Ltd, pp. 1–13. doi: 10.1016/j.psychres.2014.12.069.
2. Almanea, A., Abd El-Aziz, G. S. and Ahmed, M. M. M. (2019) “The potential gastrointestinal health benefits of *Thymus vulgaris* essential oil: A review,” *Biomedical and Pharmacology Journal*. Oriental Scientific Publishing Company, 12(4), pp. 1793–1799. doi: 10.13005/bpj/1810.
3. Anand, S. K., Sahu, M. R. and Mondal, A. C. (2021) “Induction of oxidative stress and apoptosis in the injured brain: potential relevance to brain regeneration in zebrafish,” *Molecular biology reports*. Mol Biol Rep, 48(6), pp. 5099–5108. doi: 10.1007/S11033-021-06506-7.
4. Artenie, V. *et al.* (no date) “Metode de investiga a metabolismului glucidic si lipidic, Ed.”
5. Auld, D. S. *et al.* (2002) “Alzheimer’s disease and the basal forebrain cholinergic system: Relations to β -amyloid peptides, cognition, and treatment strategies,” *Progress in Neurobiology*. Prog Neurobiol, pp. 209–245. doi: 10.1016/S0301-0082(02)00079-5.
6. Ayaz, M. *et al.* (2017) “Neuroprotective and Anti-Aging Potentials of Essential Oils from Aromatic and Medicinal Plants.,” *Frontiers in aging neuroscience*, 9(MAY), p. 168. doi: 10.3389/fnagi.2017.00168.
7. Bizzozero, O. A. (2009) “Protein Carbonylation in Neurodegenerative and Demyelinating CNS Diseases,” in *Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology*. Boston, MA: Springer US, pp. 543–562. doi: 10.1007/978-0-387-30375-8_23.
8. Blennow, K., de Leon, M. J. and Zetterberg, H. (2006) “Alzheimer’s disease,” *Lancet*. Elsevier, pp. 387–403. doi: 10.1016/S0140-6736(06)69113-7.
9. Boiangiu, R. S. *et al.* (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*. MDPI AG, 25(7). doi: 10.3390/molecules25071519.
10. Brinza, I. *et al.* (2020) “Ameliorative effects of rhoifolin in scopolamine-induced amnesic zebrafish (*Danio rerio*) model,” *Antioxidants*. MDPI AG, 9(7),

- pp. 1–14. doi: 10.3390/antiox9070580.
11. Burmeister, S. S. and Fernald, R. D. (2005) “Evolutionary Conservation of the Egr-1 Immediate-Early Gene Response in a Teleost,” *J. Comp. Neurol.* 481, pp. 220–232. doi: 10.1002/cne.20380.
 12. Cachat, J. *et al.* (2010) “Measuring behavioral and endocrine responses to novelty stress in adult zebrafish,” *Nature Protocols*, 5(11), pp. 1786–1799. doi: 10.1038/nprot.2010.140.
 13. Cachat, J. M. *et al.* (2011) “Modeling Stress and Anxiety in Zebrafish,” in, pp. 73–88. doi: 10.1007/978-1-60761-922-2_3.
 14. Cacialli, P. *et al.* (2016) “BDNF Expression in Larval and Adult Zebrafish Brain: Distribution and Cell Identification,” *PLoS ONE*. Public Library of Science, 11(6). doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0158057.
 15. Cacialli, P. (2021) “Neurotrophins Time Point Intervention after Traumatic Brain Injury: From Zebrafish to Human,” *International Journal of Molecular Sciences*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), 22(4), pp. 1–15. doi: 10.3390/IJMS22041585.
 16. Caramillo, E. (2017) “A Study of the Effects of Methylene Blue, Scopolamine, and Stress on Learning and Memory in the Zebrafish,” *Dissertations*. Available at: <https://aquila.usm.edu/dissertations/1385> (Accessed: June 27, 2022).
 17. Cassar, S. *et al.* (2020) “Use of Zebrafish in Drug Discovery Toxicology,” *Chemical Research in Toxicology*. American Chemical Society, 33(1), pp. 95–118. doi: 10.1021/acs.chemrestox.9b00335.
 18. Castellani, R. J., Rolston, R. K. and Smith, M. A. (2010) “Alzheimer Disease.” doi: 10.1016/j.disamonth.2010.06.001.
 19. Chen, X. Y., Du, Y. F. and Chen, L. (2019) “Neuropeptides exert neuroprotective effects in alzheimer’s disease,” *Frontiers in Molecular Neuroscience*. Frontiers Media S.A., p. 493. doi: 10.3389/fnmol.2018.00493.
 20. Cognato, G. de P. *et al.* (2012) “Y-Maze memory task in zebrafish (*Danio rerio*): The role of glutamatergic and cholinergic systems on the acquisition and consolidation periods,” *Neurobiology of Learning and Memory*. Academic Press, 98(4), pp. 321–328. doi: 10.1016/J.NLM.2012.09.008.
 21. Colwill, R. M. *et al.* (2005) “Visual discrimination learning in zebrafish (*Danio rerio*),” *Behavioural Processes*. Behav Processes, 70(1), pp. 19–31. doi: 10.1016/j.beproc.2005.03.001.

22. Conference, M. L. 2008 A., Auckland, undefined and New, undefined (no date)
Using zebrafish in human disease research: some advantages, disadvantages and ethical considerations, anzccart.org.nz. Available at:
<https://anzccart.org.nz/app/uploads/2017/06/lardelli-using.pdf> (Accessed: September 15, 2020).
23. De-Paula, V. J. *et al.* (2012) “Alzheimer’s Disease,” in *Sub-cellular biochemistry*, pp. 329–352. doi: 10.1007/978-94-007-5416-4_14.
24. Detrich, H. W., Westerfield, M. and Zon, L. I. (2009) *Essential zebrafish methods : cell and developmental biology*. Elsevier.
25. Du, Jia *et al.* (2017) “O R I G I N A L P A P E R OXIDATIVE STRESS AND APOTOSIS TO ZEBRAFISH (DANIO RERIO) EMBRYOS EXPOSED TO PERFLUOROOCTANE SULFONATE (PFOS) AND ZNO NANOPARTICLES O R I G I N A L P A P E R,” *International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health*, 30(2), pp. 213–229. doi: 10.13075/ijomeh.1896.00669.
26. Ellman, G. L. *et al.* (1961) “A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity,” *Biochemical Pharmacology*. Elsevier, 7(2), pp. 88–95. doi: 10.1016/0006-2952(61)90145-9.
27. Faillace, M. *et al.* (2017) “Short- and long-term effects of nicotine and the histone deacetylase inhibitor phenylbutyrate on novel object recognition in zebrafish,” *Psychopharmacology*. Springer Berlin Heidelberg, 234(6), pp. 943–955. doi: 10.1007/s00213-017-4532-x.
28. Francis, P. T. *et al.* (1999) “The cholinergic hypothesis of Alzheimer’s disease: a review of progress,” 66(2), pp. 137–147. doi: 10.1136/jnnp.66.2.137.
29. Gauthier, S. (2002) “Advances in the pharmacotherapy of Alzheimer’s disease,” *CMAJ: Canadian Medical Association Journal*. Canadian Medical Association, 166(5), p. 616. Available at: [/pmc/articles/PMC99406/](http://pmc/articles/PMC99406/) (Accessed: December 18, 2022).
30. Ghasemzadeh Rahbardar, M. and Hosseinzadeh, H. (2020) “Therapeutic effects of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and its active constituents on nervous system disorders,” *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*. Mashhad University of Medical Sciences, 23(9), pp. 1100–1112. doi: 10.22038/ijbms.2020.45269.10541.
31. Greenamyre, J. T. and Young, A. B. (1989) “Excitatory amino acids and

- Alzheimer's disease," *Neurobiology of Aging*. Elsevier, pp. 593–602. doi: 10.1016/0197-4580(89)90143-7.
32. Gupta, T. and Mullins, M. C. (2010) "Dissection of Organs from the Adult Zebrafish," *Journal of Visualized Experiments*, (37), p. e1717. doi: 10.3791/1717.
 33. Hamilton, T. J. *et al.* (2017) "Establishing zebrafish as a model to study the anxiolytic effects of scopolamine," *Scientific Reports*. Nature Publishing Group, 7(1), p. 15081. doi: 10.1038/s41598-017-15374-w.
 34. Harper, C. and Lawrence, C. (2011) *The Laboratory Zebrafish*. CRC Press. Available at: https://books.google.ro/books/about/The_Laboratory_Zebrafish.html?id=05zMBQAAQBAJ&redir_esc=y (Accessed: September 3, 2019).
 35. Hu, Y., Xie, S. and Yao, J. (2016) "Identification of Novel Reference Genes Suitable for qRT-PCR Normalization with Respect to the Zebrafish Developmental Stage," *PLoS ONE*. Public Library of Science, 11(2). doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0149277.
 36. Huang, Y. and Mucke, L. (2012) "Alzheimer mechanisms and therapeutic strategies," *Cell*, pp. 1204–1222. doi: 10.1016/j.cell.2012.02.040.
 37. Kalueff, A. V. and Cachat, J. M. (2011) *Zebrafish models in neurobehavioral research*.
 38. Kalueff, A. V *et al.* (2010) *The Developing Utility of Zebrafish in Modeling Neurobehavioral Disorders*, *International Journal of Comparative Psychology*. Available at: <https://escholarship.org/uc/item/6hc254ds> (Accessed: September 4, 2019).
 39. Kim, J., Basak, J. M. and Holtzman, D. M. (2009) "The Role of Apolipoprotein E in Alzheimer's Disease," *Neuron*. NIH Public Access, pp. 287–303. doi: 10.1016/j.neuron.2009.06.026.
 40. Komaki, A. *et al.* (2016) "Study of the effect of extract of *Thymus vulgaris* on anxiety in male rats," *Journal of Traditional and Complementary Medicine*. National Taiwan University, 6(3), pp. 257–261. doi: 10.1016/j.jtcme.2015.01.001.
 41. Kress, S. and Wullimann, M. F. (2012) "Correlated basal expression of immediate early gene *egr1* and tyrosine hydroxylase in zebrafish brain and downregulation in olfactory bulb after transitory olfactory deprivation," *Journal*

- of *Chemical Neuroanatomy*. *J Chem Neuroanat*, 46(1–2), pp. 51–66. doi: 10.1016/j.jchemneu.2012.09.002.
42. Kulason, S. *et al.* (2019) “Cortical thickness atrophy in the transentorhinal cortex in mild cognitive impairment,” *NeuroImage: Clinical*. Elsevier Inc., 21, p. 101617. doi: 10.1016/j.nicl.2018.101617.
 43. Kundap, U. P. *et al.* (2017) “Zebrafish as a model for epilepsy-induced cognitive dysfunction: A pharmacological, biochemical and behavioral approach,” *Frontiers in Pharmacology*. Frontiers Media S.A., 8(AUG), p. 515. doi: 10.3389/FPHAR.2017.00515/BIBTEX.
 44. Lalonde, R. (2002) “The neurobiological basis of spontaneous alternation,” *Neuroscience and biobehavioral reviews*. *Neurosci Biobehav Rev*, 26(1), pp. 91–104. doi: 10.1016/S0149-7634(01)00041-0.
 45. Levey, A. I. (1996) “Muscarinic acetylcholine receptor expression in memory circuits: Implications for treatment of Alzheimer disease,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 93(24), pp. 13541–13546. doi: 10.1073/PNAS.93.24.13541/ASSET/0141DAA9-0DC8-4F79-A82F-8DE2634C4CF0/ASSETS/GRAPHIC/PQ2162486002.JPEG.
 46. Leyva-López, N. *et al.* (2017) “Essential oils of oregano: Biological activity beyond their antimicrobial properties,” *Molecules*. MDPI AG. doi: 10.3390/molecules22060989.
 47. Luo, S. and Wehr, N. B. (2009) “Protein carbonylation: Avoiding pitfalls in the 2,4-dinitrophenylhydrazine assay,” *Redox Report*. Taylor & Francis, 14(4), pp. 159–166. doi: 10.1179/135100009X392601.
 48. Massarsky, A., Kozal, J. S. and Di Giulio, R. T. (2017) “Glutathione and zebrafish: old assays to address a current issue,” *Chemosphere*. NIH Public Access, 168, p. 707. doi: 10.1016/J.CHEMOSPHERE.2016.11.004.
 49. Mills, M. G. *et al.* (2020) “CRISPR-Generated Nrf2a Loss- And Gain-of-Function Mutants Facilitate Mechanistic Analysis of Chemical Oxidative Stress-Mediated Toxicity in Zebrafish,” *Chemical Research in Toxicology*. American Chemical Society, 33(2), pp. 426–435. doi: 10.1021/ACS.CHEMRESTOX.9B00346/SUPPL_FILE/TX9B00346_SI_002.XLSX.
 50. Montagne, A., Zhao, Z. and Zlokovic, B. V. (2017) “Alzheimer’s disease: A

- matter of blood-brain barrier dysfunction?,” *Journal of Experimental Medicine*. Rockefeller University Press, pp. 3151–3169. doi: 10.1084/jem.20171406.
51. Mueller, T. *et al.* (2011) “The dorsal pallium in zebrafish, *Danio rerio* (Cyprinidae, Teleostei),” *Brain Research*. doi: 10.1016/j.brainres.2010.12.089.
 52. Mueller, T. (2012) “What is the Thalamus in Zebrafish?,” *Frontiers in Neuroscience*. Frontiers, 6, p. 64. doi: 10.3389/fnins.2012.00064.
 53. Newman, L. A. and Gold, P. E. (2016) “Attenuation in rats of impairments of memory by scopolamine, a muscarinic receptor antagonist, by mecamylamine, a nicotinic receptor antagonist,” *Psychopharmacology*. NIH Public Access, 233(5), p. 925. doi: 10.1007/S00213-015-4174-9.
 54. Newman, M., Ebrahimie, E. and Lardelli, M. (2014) “Using the zebrafish model for Alzheimer’s disease research,” *Frontiers in Genetics*, 5(JUN), p. 189. doi: 10.3389/fgene.2014.00189.
 55. Noctor, G. and Foyer, C. H. (2016) “Intracellular redox compartmentation and ROS-related communication in regulation and signaling,” *Plant Physiology*. American Society of Plant Biologists, 171(3), pp. 1581–1592. doi: 10.1104/pp.16.00346.
 56. Nyakas, C. *et al.* (2011) “The basal forebrain cholinergic system in aging and dementia. Rescuing cholinergic neurons from neurotoxic amyloid- β 42 with memantine,” *Behavioural brain research*. Behav Brain Res, 221(2), pp. 594–603. doi: 10.1016/J.BBR.2010.05.033.
 57. Obulesu, M., Venu, R. and Somashekhar, R. (2011) “Tau mediated neurodegeneration: An insight into Alzheimer’s disease pathology,” *Neurochemical Research*. Springer New York LLC, pp. 1329–1335. doi: 10.1007/s11064-011-0475-5.
 58. *Origanum vulgare subsp. hirtum* - *Plant Finder* (no date). Available at: <http://www.missouribotanicalgarden.org/PlantFinder/PlantFinderDetails.aspx?kempercode=q980> (Accessed: May 26, 2021).
 59. Ozarowski, M. *et al.* (2013) “Rosmarinus officinalis L. leaf extract improves memory impairment and affects acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activities in rat brain,” *Fitoterapia*. Elsevier, 91, pp. 261–271. doi: 10.1016/J.FITOTE.2013.09.012.
 60. Pagel, J. I. and Deindl, E. (2012) “Disease Progression Mediated by Egr-1 Associated Signaling in Response to Oxidative Stress,” *International Journal of*

- Molecular Sciences*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), 13(10), p. 13104. doi: 10.3390/IJMS131013104.
61. Pai, S. R., Sonkamble, V. V. and Wagh, N. S. (2020) “Essential oils as effective agents against neurological disorders,” in *Plant-derived Bioactives: Production, Properties and Therapeutic Applications*. Springer Singapore, pp. 409–433. doi: 10.1007/978-981-15-1761-7_17.
 62. Pei, D. S. *et al.* (2019) “AP endonuclease 1 (Apex1) influences brain development linking oxidative stress and DNA repair,” *Cell Death & Disease* 2019 10:5. Nature Publishing Group, 10(5), pp. 1–14. doi: 10.1038/s41419-019-1578-1.
 63. Pilehvar, A., Town, R. M. and Blust, R. (2020) “The effect of copper on behaviour, memory, and associative learning ability of zebrafish (*Danio rerio*),” *Ecotoxicology and Environmental Safety*. Academic Press, 188, p. 109900. doi: 10.1016/j.ecoenv.2019.109900.
 64. Quiñonez-Silvero, C., Hübner, K. and Herzog, W. (2020) “Development of the brain vasculature and the blood-brain barrier in zebrafish,” *Developmental Biology*. Elsevier Inc., pp. 181–190. doi: 10.1016/j.ydbio.2019.03.005.
 65. Richetti, S. K. *et al.* (2011) “Acetylcholinesterase activity and antioxidant capacity of zebrafish brain is altered by heavy metal exposure,” *NeuroToxicology*. Elsevier, 32(1), pp. 116–122. doi: 10.1016/J.NEURO.2010.11.001.
 66. Saharan, S. and Mandal, P. K. (2014) “The emerging role of glutathione in alzheimer’s disease,” *Journal of Alzheimer’s Disease*. IOS Press, pp. 519–529. doi: 10.3233/JAD-132483.
 67. Salbitani, G., Bottone, C. and Carfagna, S. (2017) “Determination of Reduced and Total Glutathione Content in Extremophilic Microalga *Galdieria phlegrea*,” *BIO-PROTOCOL*. Bio-Protocol, LLC, 7(13). doi: 10.21769/bioprotoc.2372.
 68. Saleem, S. and Kannan, R. R. (2018) “Zebrafish: an emerging real-time model system to study Alzheimer’s disease and neurospecific drug discovery,” *Cell Death Discovery*. Nature Publishing Group, 4(1), p. 45. doi: 10.1038/s41420-018-0109-7.
 69. Santana, S., Rico, E. P. and Burgos, J. S. (2012) “Can zebrafish be used as animal model to study Alzheimer’s disease?,” *American Journal of Neurodegenerative Diseases*. E-Century Publishing Corporation, 1(1), pp. 32–

48. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3560447/> (Accessed: February 26, 2020).
70. Sarikurkcü, C. *et al.* (2015) “Composition, antioxidant, antimicrobial and enzyme inhibition activities of two *Origanum vulgare* subspecies (subsp. *vulgare* and subsp. *hirtum*) essential oils,” *Industrial Crops and Products*, 70, pp. 178–184. doi: 10.1016/j.indcrop.2015.03.030.
71. Satou, T. *et al.* (2018) “Anxiolytic-like effects of essential oil from *Thymus vulgaris* was increased during stress,” *Flavour and Fragrance Journal*. John Wiley and Sons Ltd, 33(2), pp. 191–195. doi: 10.1002/ffj.3434.
72. Serrano-Pozo, A. *et al.* (2011) “Neuropathological alterations in Alzheimer disease,” *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 1(1). doi: 10.1101/cshperspect.a006189.
73. Sharma, A. *et al.* (2020) “Advanced glycation end products and protein carbonyl levels in plasma reveal sex-specific differences in Parkinson’s and Alzheimer’s disease,” *Redox Biology*. Elsevier B.V., 34. doi: 10.1016/j.redox.2020.101546.
74. Shiozaki, K. *et al.* (2020) “Neuropeptide Y deficiency induces anxiety-like behaviours in zebrafish (*Danio rerio*),” *Scientific Reports*. Nature Publishing Group, 10(1). doi: 10.1038/S41598-020-62699-0.
75. Socaci, S. (no date) “CHEMICAL COMPOSITION OF SOME ESSENTIAL OILS OF LAMIACEAE FAMILY.” Available at: https://www.academia.edu/4963152/CHEMICAL_COMPOSITION_OF_SOME_ESSENTIAL_OILS_OF_LAMIACEAE_FAMILY (Accessed: September 10, 2019).
76. Song, J. H., Yu, J. T. and Tan, L. (2015) “Brain-Derived Neurotrophic Factor in Alzheimer’s Disease: Risk, Mechanisms, and Therapy,” *Molecular Neurobiology*. Humana Press Inc., pp. 1477–1493. doi: 10.1007/s12035-014-8958-4.
77. Teixeira, J. P. *et al.* (2019) “Future therapeutic perspectives into the Alzheimer’s disease targeting the oxidative stress hypothesis,” *Molecules*. MDPI AG. doi: 10.3390/molecules24234410.
78. Timme-Laragy, A. R. *et al.* (2012) “Nrf2b, novel zebrafish paralog of oxidant-responsive transcription factor NF-E2-related factor 2 (NRF2),” *The Journal of biological chemistry*. J Biol Chem, 287(7), pp. 4609–4627. doi: 10.1074/JBC.M111.260125.

79. TOPCU, G. and KUSMAN, T. (2014) "Lamiaceae Family Plants as a Potential Anticholinesterase Source in the Treatment of Alzheimer's Disease," *Bezmi Alem Science*, 2(1), pp. 1–25. doi: 10.14235/bs.2014.233.
80. Tseng, Y. C. *et al.* (2011) "Exploring uncoupling proteins and antioxidant mechanisms under acute cold exposure in brains of fish," *PloS one*. PLoS One, 6(3). doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0018180.
81. Tward, D. J. *et al.* (2017) "Entorhinal and transentorhinal atrophy in mild cognitive impairment using longitudinal diffeomorphic morphometry." doi: 10.1016/j.dadm.2017.07.005.
82. Vargas, J. P., López, J. C. and Portavella, M. (2009) "What are the functions of fish brain pallium?," *Brain Research Bulletin*. Elsevier, 79(6), pp. 436–440. doi: 10.1016/J.BRAINRESBULL.2009.05.008.
83. Verghese, P. B., Castellano, J. M. and Holtzman, D. M. (2011) "Apolipoprotein E in Alzheimer's disease and other neurological disorders," *The Lancet Neurology*. NIH Public Access, pp. 241–252. doi: 10.1016/S1474-4422(10)70325-2.
84. Wang, H. *et al.* (2018) "cAMP Response Element-Binding Protein (CREB): A Possible Signaling Molecule Link in the Pathophysiology of Schizophrenia," *Frontiers in Molecular Neuroscience*. Frontiers Media S.A., 11, p. 255. doi: 10.3389/FNMOL.2018.00255/BIBTEX.
85. Wang, M. *et al.* (2021) "Effects of 4-epianhydrotetracycline on oxidative stress in zebrafish (*Danio rerio*) embryos," *Science of The Total Environment*. Elsevier, 796, p. 149047. doi: 10.1016/J.SCITOTENV.2021.149047.
86. *What we can learn from zebrafish in a T-maze | Noldus* (no date). Available at: <https://www.noldus.com/blog/zebrafish-t-maze> (Accessed: March 23, 2022).
87. Wimo, A. *et al.* (2013) "The worldwide economic impact of dementia 2010," *Alzheimer's & Dementia*. Elsevier, 9(1), pp. 1–11.e3. doi: 10.1016/J.JALZ.2012.11.006.
88. Yamashita, A. *et al.* (2019) "Increased susceptibility to oxidative stress-induced toxicological evaluation by genetically modified nrf2a-deficient zebrafish," *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*. Elsevier Inc., 96, pp. 34–45. doi: 10.1016/j.vascn.2018.12.006.

Activitatea științifică

Articole publicate *in extenso* din subiectul tezei de doctorat:

Căpățînă L, Boianău RS, Dumitru G, Napoli EM, 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*), *Antioxidans (Basel)*, 9(1): 62, doi: 10.3390/antiox9010062. (Q1; AIS: 0,910; IF: 6,313)

Căpățînă L, Todirascu-Ciornea E, Napoli EM, Ruberto G, Hritcu L, Dumitru L, 2020, *Thymus vulgaris* essential oil protects zebrafish against cognitive dysfunction by regulating cholinergic and antioxidants systems, *Antioxidans (Basel)*, 9(11): 1083, doi: 10.3390/antiox9111083. (Q1; AIS: 0,910; IF: 6,313)

Căpățînă L, Napoli EM, Ruberto G, Hritcu L, 2021, *Origanum vulgare ssp. hirtum* (Lamiaceae) essential oil prevents behavioral and oxidative stress changes in the scopolamine zebrafish model, *Molecules*, 6(23): 7085, doi: 10.3390/molecules26237085. (Q2; AIS: 0,671; IF: 4,927)

Participări manifestări științifice:

Prezentare orală: **Căpățînă L**, Boianău RS, Todirascu-Ciornea E, Dumitru G, Napoli EM, Ruberto G, Hritcu L - "Effects of *Rosmarinus officinalis* essential oil in memory formation and relieving brain oxidative stress in zebrafish model"- 21-22 octombrie 2019, "Conference Life Sciences in the Dialogue of Generations: Connections between Universities, Academia and Business Community", Chișinău.

Prezentare poster: **Căpățînă L**, Boianău RS, Todirascu-Ciornea E, Dumitru G, Napoli EM, Ruberto G, Hritcu L - "Effects of *Rosmarinus officinalis* essential oil in memory formation and relieving brain oxidative stress in zebrafish scopolamine model"- 21-24 septembrie 2019, "The 48th Annual General Meeting of the European Brain and Behaviour Society", Praga, EBBS.

Prezentare poster: **Căpățînă L**, Boianău RS, Mihășan M, Maniu C, Napoli EM, Hritcu L - "Rosmarinus officinalis and *Thymus vulgaris* essential oils attenuate cognitive deficits and brain oxidative stress in scopolamine zebrafish model: underlying mechanisms"- 11-15 iulie 2020, "FENS 2020 Virtual Forum", Glasgow.

Workshop-uri și seminarii:

- Participare la workshop-ul susținut de Valerie Moreau (Noldus), despre utilizarea softului EthoVisionXT video tracking software, 19/02/2019, Facultatea de Biologie, Universitatea "Alexandru Ioan Cuza" din Iași;
- Participare la cel de-al 5-lea Seminar de Bioinformatică „Bioinformatics tools for exploring protein biology” organizat de Romanian Society of Bioinformatics (RSBI) în perioada 4/04/2019-5/04/2019 în cadrul Facultății de Biologie a Universității „Alexandru Ioan Cuza” din Iași;
- Participare la conferința RoBioinfo organizată de Romanian Society of Bioinformatics (RSBI) în perioada 11-13 mai 2023 la București în cadrul Institutul de Biologie și Patologie Celulară „Nicolae Simionescu“, București.