



UNIVERSITATEA „ALEXANDRU IOAN CUZA” din IAȘI

PER LIBERTATEM AD VERITATEM

www.uaic.ro

UNIVERSITATEA „ALEXANDRU IOAN CUZA” DIN IAȘI

FACULTATEA DE BIOLOGIE

ȘCOALA DOCTORALĂ DE BIOLOGIE

**STUDII PRIVIND LEGĂTURA DINTRE BOALA
ALZHEIMER ȘI DIABET (ESTE BOALA ALZHEIMER UN
DIABET DE TIP 3?)**

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Conducător de doctorat:

CS I DR. HABIL CIOBÎCĂ ALIN STELIAN

Student-doctorand:

COȘMAN (LUCA) IULIANA SIMONA

IAȘI

2023

CUPRINS

INTRODUCERE

CAPITOLUL 1. STADIUL ACTUAL AL CERCETĂRIILOR PRIVIND BOALA ALZHEIMER ȘI DIABET

1.1. Aspecte generale cu privire la boala Alzheimer

1.1.1. Definirea termenului „demență” și tipuri de demență

1.1.2. Factorii declanșatori în apariția bolii Alzheimer

1.1.3. Diagnosticul bolii Alzheimer

1.1.4. Teorii cu privire la etiologia bolii Alzheimer

1.1.4.1. Ipoteza colinergică

1.1.4.2. Ipoteza amiloidă

1.1.4.3. Ipoteza proteinei tau

1.1.4.4. Alte mecanisme etiologice importante

1.1.4.4.a. Boala vasculară

1.1.4.4.b. Diabetul și hiperinsulinemia

1.1.4.4.c. Gena apolipoprotein

1.1.4.4.d. Neuroinflamația

1.1.5. Parametri biochimici relevanți în boala Alzheimer

1.1.5.1. Parametri biochimici din lichidul cefalorahidian

1.1.5.1.a. YKL-40 biomarker potențial pentru diagnosticul diferențial al bolii

1.1.5.1.b. Alți parametri biochimici în stabilirea diagnosticului diferențial al bolii Alzheimer

1.1.5.2. Parametri biochimici din materiile fecale

1.1.5.2.a. Infecția fungică a SNC

1.1.5.2.b. HSV-1 (herpes simplex virus-1)

1.1.5.2.c. Bolile prion

1.1.5.2.d. Chlamydomphila pneumoniae, alte bacterii patogene

1.1.5.2.e. HIV-1 (virusul imunodeficienței umane)

1.1.5.2.f. Toxoplasma

1.1.5.2.g. Viroizi, miARN

1.1.5.2.h. Hepatita

1.1.5.2.i. Citomegalovirus

1.1.5.2.j. Tractul gastro-intestinal și permeabilitatea barierei hemato-encefalice

1.1.5.3. Alți parametri relevanți

1.1.5.3.a. Imagistica prin rezonanță magnetică volumetrică (RMV)

1.1.5.3.b. Tomografia cu emisie de pozitroni fluor-deoxi-glucoză (FDG) (PET)

1.2. Aspecte generale cu privire la diabet

1.2.1. Definirea noțiunii de diabet și clasificare

1.2.2. Dignosticul de diabet zaharat

1.2.2.1. Markerii ai controlului glicemic

1.2.2.1.a. Hemoglobina glicozilată

1.2.2.1.b. Albumina glicozilată

1.2.2.1.c. Fructozamina

1.2.2.1.d. 1,5 – Anhidroglucitolul (1,5–AG)

1.2.3. Studii privind existența unor deficiențe metabolice la pacienții cu demență

CAPITOLUL 2. MATERIALE ȘI METODE DE CERCETARE

2.1. Materiale de cercetare

2.1.1. Modele animale

2.1.1.1. Modele animale supuse studiului bolii Alzheimer

2.1.1.2. Elementul de inovare al acestei lucrări

2.1.2. Pacienți umani

2.1.2.1. Selectarea pacienților

2.1.2.2. Identificarea parametrilor în vederea corelării gradului de degradare cognitivă cu severitatea diabetului

2.2. Metode de cercetare

2.2.1. Studii pe modele animale

2.2.1.1. Experimentul 1 - administrare acută de fipronil 83 mM, sucroză 100 µg/l, sucroză + fipronil la pești din specia *Carassius auratus*

2.2.1.1.1. Determinări comportamentale la modelele de animale testate în cadrul experimentului 1

2.2.1.1.1.a. *Testul labirintului T de evaluare a comportamentului explorator spontan și a memoriei pe termen scurt*

2.2.1.1.1.b. *Testul preferinței lumina/întuneric pentru evaluarea anxietății*

2.2.1.1.1.c. *Testul oglinzii de evaluare a agresivității*

2.2.1.2. Experimentul 2 – administrare cronică de sucroză în concentrații diferite 5,55 mM, 27,75 mM, 55,5 mM

2.2.1.2.1. Determinări comportamentale la modelele animale testate în cadrul experimentului 2

2.2.1.2.1.a. *Testul T -labirint- de evaluare a comportamentului explorator spontan și a memoriei pe termen scurt*

2.2.1.2.1.b. *Testul oglinzii de evaluare a agresivității*

2.2.1.2.1.c. *Testul preferinței lumina/întuneric pentru evaluarea anxietății*

2.2.1.2.1.d. *Testul de evaluare a preferinței sociale*

2.2.2. Studii pe pacienți umani pentru a corela degradarea cognitivă cu severitatea diabetului

2.2.3. Interpretarea statistică a rezultatelor

CAPITOLUL 3. REZULTATELE CERCETĂRII

3.1. Rezultate obținute prin studiul modelelor animale (experimentul 1)

3.1.1. Evaluarea parametrilor comportamentali în testul labirintului T pentru evaluarea comportamentului explorator spontan și a memoriei pe termen scurt

3.1.1.1. *Evaluarea timpului petrecut în cele trei brațe, specific comportamentului explorator*

3.1.1.2. *Evaluarea numărului de intrări în cele trei brațe ale labirintului, specific comportamentului explorator*

3.1.1.3. *Evaluarea succesiunii alternărilor stânga-dreapta, relevant pentru memoria spațială pe termen scurt*

3.1.2. Evaluarea parametrilor comportamentali în testul preferinței lumină/întuneric pentru evaluarea anxietății

3.1.2.1. *Evaluarea latenței intrării în compartimentul luminat*

3.1.2.2. Evaluarea timpului petrecut în compartimentul luminat

3.1.2.3. Evaluarea numărului de treceri între cele două compartimente

3.1.2.4. Evaluarea comportamentului de evaluare a riscului

3.1.3. Evaluarea parametrilor comportamentali în testul oglinzii de evaluare a agresivității

3.1.3.1 Evaluarea latenței de contact cu oglinda

3.1.3.2. Evaluarea numărului de intrări în zona de contact cu oglinda

3.1.3.3. Evaluarea timpului petrecut în contact direct cu oglinda

3.1.3.4. Evaluarea stărilor de îngheț

3.1.3.5. Evaluarea timpului petrecut în zona de apropiere a oglinzii

3.1.3.6. Evaluarea timpului petrecut în zona depărtată de oglindă.

3.2. Rezultate obținute prin studiul modelelor animale (experimentul 2)

3.2.1. Evaluarea parametrilor comportamentali în testul labirintului T pentru evaluarea comportamentului explorator spontan și a memoriei pe termen scurt

3.2.1.1. Evaluarea numărului de intrări în cele trei brațe ale labirintului, specific comportamentului explorator

3.2.1.2. Evaluarea succesiunii alternărilor stânga-dreapta, relevant pentru memoria spațială pe termen scurt

3.2.2. Evaluarea parametrilor comportamentali în testul oglinzii de evaluare a agresivității

3.2.2.1 Evaluarea latenței de contact cu oglinda

3.2.2.2. Evaluarea numărului de intrări în zona de contact cu oglinda

3.2.2.3. Evaluarea timpului petrecut în contact direct cu oglinda

3.2.2.4. Evaluarea stărilor de îngheț

3.2.2.5. Evaluarea timpului petrecut în zona de apropiere a oglinzii

3.2.2.6. Evaluarea timpului petrecut în zona depărtată de oglindă

3.2.3. Evaluarea parametrilor comportamentali în testul preferinței lumină/întuneric pentru evaluarea anxietății

3.2.3.1. Evaluarea latenței intrării în compartimentul luminat

3.2.3.2. Evaluarea timpului petrecut în compartimentul luminat

3.2.3.3. Evaluarea numărului de treceri între cele două compartimente

3.2.3.4. Evaluarea comportamentului de evaluare a riscului

3.2.4. Evaluarea parametrilor comportamentali în testul preferinței sociale

3.2.4.1. Evaluarea latenței intrării în contact cu ținta socială

3.2.4.2. Evaluarea timpului de interacțiune efectivă cu peștele țintă

3.2.4.3. Evaluarea numărului de intrări în zona de interacțiune socială, în zona centrală și în zona distantă

3.3. Rezultate obținute prin studiul pacienților umani

3.3.1. Distribuția tipurilor de demență în eșantionul analizat

3.3.2. Prevalența patologiilor asociate bolii Alzheimer, diabet și obezitate

3.3.3. Gradul de severitate al demenței conform scorului MMSE

3.3.4. Corelații individuale între scorurile MMSE și glicemiile, colesterolului și al trigliceridelor pacienților din eșantionul analizat

3.3.5. Corelații între mediile procentuale ale pacienților cu diabet zaharat în funcție de tipul de demență și mediile glicemiilor, colesterolului și al trigliceridelor pacienților din eșantionul analizat

3.3.6. Incidența valorilor glicemice ridicate după tipul de demență

3.3.7. Corelații între medicația psihotropă și scorurile MMSE

DISCUȚII

CONCLUZII

BIBLIOGRAFIE

LISTA ABREVIERI

A β - peptida amiloid β

ADDL – liganzi difuzabili derivați de beta-amiloid

APP - proteina precursor amiloid

AD - boala Alzheimer

DSDS – tetragrame de alternanță dreapta-stânga-dreapta-stânga

GABA - acidul gama – aminobutiric

IL-1 β – interleukina 1 β

IL-6 – interleukina 6

MMSE - examinarea minima a stării mentale

NFT - încurcături neurofibrilare

PSEN1 - presenilina-1

PSEN2 - presenilina-2

SDSD – tetragrame de alternanță stânga-dreapta-stânga-dreapta

SNC – sistemul nervos central

TNF – factor de necroză tumorală

YKL-40 – proteina 1 asemănătoare chitinazei 3

INTRODUCERE

Actualul studiu aduce în atenție o patologie din practica clinică, tot mai întâlnită, și anume, boala Alzheimer, reliefată prin numeroasele publicații, care au ca subiect central interesul față de grupul tulburărilor neurologice. Aceasta este o afecțiune neurodegenerativă progresivă, cea mai densă formă de demență senilă, corelată cu procesul de îmbătrânire, caracterizată prin declinul progresiv al funcțiilor cognitive (gândirea, memoria, vorbirea), modificări comportamentale și de personalitate.

Deși, declinul cognitiv, întâlnit cu predilecție la persoanele vârstnice, se considera a fi o parte normală în procesul de schimbare a unui organism, care a trecut de perioada maturității, adică a senescenței, publicațiile existente demonstrează că această tulburare apare și în rândul persoanelor mai tinere. Să amintim faptul, că boala Alzheimer a fost depistată la o femeie, în vârstă de 50 de ani. Aflată sub observația lui Alois Alzheimer, de unde și numele acestei tulburări, pacienta manifesta o serie de simptome, surprinzătoare pentru respectiva vârstă și comparabile cu a altor pacienți, de vârstă înaintată, cu diagnostic de demență. Printre manifestări se identifică tulburări de comportament și dispoziție, stări confuzionale, afectarea persistentă a memoriei până la imposibilitatea de a efectua activitățile zilnice obișnuite. În timp, se ajunge la pierderea totală a autonomiei. Toate aceste manifestări sunt precedate de afazie, agnozie și apraxie. Există cercetări care susțin că boala Alzheimer ar avea la bază tulburări de natură metabolică, deficiențe vasculare, care, dacă ar fi diagnosticate la timp, și însoțite de diferite strategii de prevenire, pentru etapele de debut ale declinului cognitiv, dezvoltarea bolii Alzheimer ar putea fi prevenită. Aceste argumente ar putea explica prezența acestor simptome și la persoanele mai tinere.

Unul dintre motivele care m-a determinat să aleg această temă de cercetare constă în faptul, că boala Alzheimer, reprezintă încă o provocare, atât de diagnosticare cât și de tratament. Alți factori motivaționali în alegerea temei de cercetare constau în afectarea la nivel global a unui număr mare de persoane, estimarea creșterii numărului acestora în viitorul apropiat, precum și impactul uriaș asupra resurselor medicale, costul estimat pentru asistența medicală, și nu în ultimul rând, scăderea calității vieții de zi cu zi a indivizilor afectați de această boală. De asemenea, se dorește înțelegerea ipotezei că boala Alzheimer reprezintă o formă de diabet zaharat care afectează selectiv creierul, prin corelarea gradului de degradare cognitivă cu severitatea diabetului, la pacienți diagnosticați de către medici specialiști psihiatri din cadrul Institutului de Psihiatrie Socola, Iași, România.

După cum precizam anterior, printre prioritățile societății actuale se numără îmbunătățirea calității vieții pacienților diagnosticați cu boală Alzheimer. Drept urmare, patogeneza bolii Alzheimer trebuie studiată sub toate aspectele ei, cu scopul de a descoperi noi strategii terapeutice în acest sens, lucru posibil doar prin existența unor modele animale.

Astfel, scopul principal al acestei lucrări este generarea unor modele animale, care sub influența administrării unui insecticid și a unei sucroze să poată fi supuse unor teste comportamentale prin care să se evidențieze capacitatea de memorare, latura exploratorie a acestora, a agresivității, a preferinței sociale cât și a anxietății, teste potrivite pentru a evidenția existența unor deficiențe de natură cognitivă, regăsite printre simptomele bolii Alzheimer. Practic, finalitatea acestor teste este de a analiza interacțiunile dintre deficiențele cognitive și cele metabolice, diferite aspecte comportamentale, pe modele animale, aspecte

determinate prin metode variate. Deci, din perspectivă neurologică, ne dorim să aflăm dacă există o suprapunere între sindromul metabolic și tulburările neuropsihiatrice.

Elementul de noutate și originalitate al acestei cercetări constă tocmai în generarea unui model animal combinat, de Alzheimer și diabet, relevant pentru principalele patologii neurologice din societatea actuală.

Motivația în alegerea acestei teme constă în înțelegerea ipotezei că boala Alzheimer reprezintă o formă de diabet specifică creierului. De asemenea reprezintă încă o provocare de diagnosticare și tratament, precum și preconizarea creșterii numărului persoanelor afectate de această boală la un miliard din populația globală, până în 2030.

Printre **obiectivele** urmărite în rândul modelelor animale se numără:

1. inducerea unor deficiențe de memorie similare bolii Alzheimer la pești ca urmare a administrării de fipronil în combinație cu sucroză;
2. obținerea unor deficiențe metabolice de tipul diabetului bazate pe administrarea de sucroză în diferite concentrații;
3. stabilirea modului în care interacționează deficiențele metabolice cu cele de natură neurologică în cadrul modelului animal generat.

Referitor la pacienții umani, din cea de-a doua parte a studiului, printre **obiectivele** propuse se numără:

1. corelarea gradului de degradare cognitivă cu severitatea diabetului;
2. studierea modului în care medicația specifică pentru boala Alzheimer și diabet influențează tabloul patologic al acestor boli și interacțiunile dintre ele.

CAPITOLUL 1. STADIUL ACTUAL AL CERCETĂRILOR PRIVIND BOALA ALZHEIMER ȘI DIABET

Boala Alzheimer este o afecțiune neurodegenerativă progresivă, cea mai densă formă de demență senilă, corelată cu procesul de îmbătrânire, caracterizată prin declinul progresiv al funcțiilor cognitive (gândirea, memoria, vorbirea), modificări comportamentale și de personalitate. Boala Alzheimer mai poartă denumirea de diabet de tip 3, un termen propus pentru această boală neurologică, care rezultă din rezistența la insulină a creierului; un tip de diabet specific creierului.

Boala Alzheimer (numită după psihiatrul german Alois Alzheimer) este cel mai cunoscut tip de demență și poate fi definită ca o boală neurodegenerativă lent progresivă caracterizată prin plăci neuritice și încurcături neurofibrilare ca rezultat al acumulării peptidei beta-amiloide în zona cea mai afectată a creierului, lobul temporal medial și structurile neocorticale (*De-Paula V.J., 2012*).

Demența este un termen general folosit pentru a descrie un grup de simptome care afectează abilitățile cognitive ale unei persoane, inclusiv memoria, limbajul, percepția și abilitățile de rezolvare a problemelor. Nu este o boală specifică, ci mai degrabă o colecție de simptome care pot fi cauzate de diferite

afecțiuni subiacente. Aceasta nu ține cont de etnie, categorie socială, gen, vârstă, deci poate fi numită afecțiune “democratică”. Poate fi diagnosticată cu ajutorul scalei Reisberg, Scalei Mini Mental Examination cât și al Testului Clock (*Omer I. et al., 2014*).

Simptomele demenței pot varia de la o persoană la alta, dar semnele comune includ pierderea memoriei, dificultăți de limbaj și comunicare, tulburări de judecată, confuzie, modificări de personalitate și dificultăți în îndeplinirea sarcinilor zilnice.

Boala Alzheimer este una dintre cele mai des întâlnite forme de demență. Aceasta este responsabilă în proporție de 75% din cazuri (*Qi C. et al., 2009*) pe cont propriu. De cele mai multe ori însă, este asociată cu alte forme de patologie, situație în care poartă denumirea de demență mixtă. A fost descrisă prima dată în urmă cu peste 100 de ani de către psihiatrul german Alois Alzheimer și poartă numele lui (*Maurer K. et al., 1997*). La debutul bolii, caracteristicile primare ar fi imposibilitatea amintirii evenimentelor recente și găsirea cu dificultate a cuvintelor (*Taylor J-P., Thomas A., 2013*). După avansarea bolii, au loc pierderi mai mari de memorie cât și dificultăți de limbaj, care devin din ce în ce mai vizibile, cu repercusiuni în activitățile de zi cu zi, ca de exemplu, efectuarea cumpărăturilor, manipularea banilor și găsirea drumului de întoarcere. Toate aceste simptome sunt însoțite de anxietate și pierderea motivației. Simptomele se agravează în timp ce boala progresează (*Steinberg M. et al., 2008*). Finalitatea prezentei boli constă în imposibilitatea persoanei de a se îngriji. Modificările creierului în boala Alzheimer, constau în depunerea anormală de „plăci” insolubile de o proteină fibroasă cunoscută sub denumirea de amiloid și prezența fibrelor răsucite numite „încurcături neurofibrilare” la nivel cerebral (*Attems J., Jellinger AK., 2013*). Prezența plăcilor anormale și a încurcăturilor fac imposibilă funcționarea normală a celulelor cerebrale. Deficiența neurotransmițătorului acetilcolina, afectează și el procesul de învățare și memorie (*Piggott MA., 2013*).

Mai sunt încă multe de învățat despre cauzele exacte ale bolii Alzheimer, dar cercetările au identificat câțiva factori potențiali declanșatori care pot contribui la debutul acesteia. Printre cei mai frecvent studiați factori declanșatori ai bolii Alzheimer se numără: anumite mutații genetice, ca de exemplu genele proteinei precursor de amiloid (APP), presenilin-1 (PSEN1) și presenilin-2 (PSEN2) și vârsta. Riscul de a declanșa boala Alzheimer crește pe măsură ce o persoană înaintea în vârstă. La cele amintite anterior se adaugă factorii stilului de viață, dieta, fumatul, lipsa exercițiilor fizice care pot juca, de asemenea, un rol în dezvoltarea bolii Alzheimer. Sănătatea cardiovasculară precară, inclusiv hipertensiunea arterială, colesterolul crescut și diabetul, pot crește și ele riscul de a dezvolta boala Alzheimer. Leziunile cerebrale traumatice însoțite de expunerea la toxinele din mediu, cum ar fi metalele grele sau pesticidele, pot crește riscul de apariție a acestei boli. Astăzi se știe că un factor de risc important și modificabil este educația. O educație mai bună înseamnă o protecție mai bună împotriva demenței. Un număr mare de cazuri de demență pot fi prevenite prin intervenție timpurie. Modificările timpurii ale peretelui vaselor de sânge pot fi detectate prin metode precoce cu ultrasunete sau biomarkeri timpurii. Aceste metode ne permit să detectăm modificări înainte ca boala să devină evidentă clinic. Detectarea precoce a bolii permite gestionarea în timp util, iar studiile au arătat că un control atent al factorilor de risc vascular poate amâna debutul sau chiar inversa progresia bolii (*Morovic S. et al., 2019*).

Deși neuroimagingul cât și panourile de biomarkeri facilitează detectarea și gradul de severitate al bolii Alzheimer, un diagnostic definitiv poate fi exprimat prin examinarea post-mortem a creierului.

Printre ipotezele care stau la baza dezvoltării bolii Alzheimer se numără ipoteza colinergică, care susține că deficiențele în sistemul colinergic al creierului, care implică neurotransmițătorul acetilcolina, joacă un rol semnificativ în dezvoltarea simptomelor bolii Alzheimer. Nivelul acestui neurotransmițător, acetilcolina, poate fi perturbat datorită unui deficit de colin acetilază din cadrul formațiunilor implicate în procesul cognitiv. În anul 1970 s-a descoperit un deficit colinergic în creierul pacienților diagnosticați cu boală Alzheimer, intermediat de deficitele enzimei neurologice, colină acetiltransferază. Aceasta, acompaniată de recunoașterea rolului acetilcolinei în memorie și învățare, a condus la ipoteza colinergică a bolii Alzheimer (*Whitehouse P.J., 1998*).

Urmează apoi ipoteza amiloidă care datează din anii 1990. Aceasta postulează că apariția bolii Alzheimer se datorează prelucrării anormale a proteinei mari, precursora amiloidice (APP), cu formare de β -amiloid ($A\beta$) (*Hardy J., Selkoe D.J., 2002*). $A\beta$ este o peptidă formată din proteina precursor amiloid (APP), așa cum se menționa anterior, de către enzimele β - și γ -secretază (*Murphy M.P., LeVine H., 2010*). $A\beta$ poate dezlanțui apoi o cascadă care duce la alterarea sinaptică și pierderea neuronilor și în cele din urmă la manifestările patologice ale bolii Alzheimer, principalele semne, și anume, plăci amiloide și încolăcirile neurofibrilare (NFT) compuse din proteină τ hiperfosforilată, rezultatul final fiind neurodegenerarea (*Serrano-Pozo A. et al., 2011*).

O altă ipoteză în apariția bolii Alzheimer este ipoteza proteinei tau. Proteina tau, din componența neuronilor, are rolul de a stabili microtubulii din citoscheletul celular și de a ușura procesele de semnalizare intracelulară (*Mandelkow E.M., 1998*). Hiperfosforilarea acesteia face ca proteina tau să se acumuleze în aceste mase, sub formă de încolăciri neurofibrilare, în interiorul corpurilor celulare nervoase. Încurcăturile interacționează greșit cu proteinele celulare, împiedicându-le să-și execute funcțiile normale. Hiperfosforilarea are loc în aval de β -amiloid, cercetările sugerând că acumularea de β -amiloid poate iniția acest proces (*Bloom G.S., 2014*). Tau hiperfosforilat disociază microtubulii în neuroni compromițând transportul axonal și micșorând funcția sinaptică. În plus, există dovezi că taul toxic poate spori producția de β -amiloid printr-un mecanism de buclă de feed-back (*Huang H.C.G., Jiang Z.F.F., 2009*).

Boala vasculară, diabetul și hiperinsulinemia, gena apolipoprotein, neuroinflamația reprezintă alte mecanisme etiologice importante în apariția bolii Alzheimer.

Având în vedere că medicul trebuie să pună un diagnostic precis, specific bolii Alzheimer, clinicienii apelează la o identificare și cuantificare corectă a biomarkerilor specifici acestei tulburări neurodegenerative. Astfel un biomarker ideal ar trebui să respecte criterii de specificitate și sensibilitate ridicate, reproductibilitate, repetabilitate și costuri minime (*Spiller R.C., 2011*). Un diagnostic clinic al bolii Alzheimer este inexact chiar și în rândul investigatorilor experimentați în aproximativ 10% până la 15% din cazuri, iar biomarkerii ar putea îmbunătăți acuratețea diagnosticului. Biomarkerii palșmatici pentru riscul de AD pot fi identificați în lichidul cefalorahidian, YKL - proteina 1 asemănătoare chitinazei 3 sau glicoproteina 39 a cartilajului uman) colesterolul, urmtă de homocisteina sau acele proteine asociate procesului inflamator, inclusiv proteina C reactivă, IL-1 β , TNF, IL-6 și factorul de creștere transformator β (*Hansson O. et al., 2007*). De asemenea un rol important în diagnosticarea precoce a AD îl au și parametrii biochimici din materiile fecale evidențiind importanța axei creier-intestin în modul de comunicare bidirecțională permanentă între sistemul nervos central (SNC) și tractul gastro-intestinal. Numărul dovezilor care susțin influența microbiotei intestinale în interacțiunile creier-intestin de-a lungul tuturor perioadelor de dezvoltare au

crescut, începând cu viața timpurie până la neurodegenerare, cât și interacțiuni care au loc la diferite niveluri, pornind de la lumenul intestinal către SNC (*Dinan TG., Cryan JF., 2017*).

Diabetul zaharat face referire la un grup de boli metabolice cu o caracteristică comună, și anume, o creștere a nivelului de glucoză din sânge peste limita admisă, adică o stare de hiperglicemie (*Harreiter J., Roden M., 2019*) asociată cu un risc ridicat de apariție a bolilor microvasculare cât și macrovasculare (*Zaccardi F. et al., 2016*). Această stare hiperglicemică severă determină simptome diferite precum poliurie, polidipsie, oboseală precum și pierderea performanței, însoțită de o scădere în greutate inexplicabilă, tulburări de vedere și susceptibilitate la infecții la cetoacidoză, sindrom hiperosmolar cu risc de comă (*Harreiter J., Roden M., 2019*).

Recent, oamenii de știință au descoperit o formă nouă de diabet, diabet zaharat de tip 3, definit și ca un sindrom metabolic. Acesta produce defecte care au legătură cu rezistența la insulină a creierului, defecte privind căile de semnalizare a insulinei, însoțită de acumularea de neurotoxine, prezența stresului la nivelul neuronilor, ca în final să se producă neurodegenerarea (*Nguyen T. et al. 2020; Caberlotto L. et al., 2019*). Diabetul influențează procesarea memoriei, de asemenea morfologia creierului, adică atrofierea acestuia, precum și transmiterea sinaptică.

Printre testele de diagnosticare a diabetului zaharat se numără:

- testul de determinare a glucozei serice a jeun;
- determinarea hemoglobinei glicozilate;
- testul de toleranță la glucoză;
- testarea glucozei plasmatice random (*American Diabetes Association, Standards of medical care in diabetes, 2007*).

Testul de determinare a hemoglobinei glicozilate este cel mai potrivit în screening și diagnostic datorită următoarelor caracteristici:

- neobligativitatea ajunării cu 8h înainte de recoltare;
- sugerează media glicemiilor din ultimele trei luni, după durata de viață a globulelor roșii din sânge;
- este o metodă standardizată și sigură;
- neafectarea valorilor de către stres sau bolile asociate, diete sau eforturi intense (*Saudek CD. et al., 2008*).

Un marker nou, o nouă abordare în screening-ul diabetului, îl reprezintă albumina glicozilată. Deoarece hemoglobina glicozilată nu oferă cu exactitate modificările accelerate ale controlului glicemic, la pacienții a căror hemoglobină variază sau la cei cu diferite tipuri de anemii și nici informații cu referire la glucoza plasmatică postprandială, ci doar la nivelul mediu al glucozei plasmatice, se impune necesitatea abordării a unui nou marker în managementul diabetului. Este vorba despre albumina glicozilată (*Koga M. et al., 2011; Miyazaki A. et al, 2012*). Printre caracteristicile care o recomandă se numără proporția mare a albuminei din numărul total al proteinelor plasmatice (60%), cât și durata de viață (21 de zile). Astfel, albumina glicozilată poate indica media valorilor glicemice din ultimele trei săptămâni, spre deosebire de hemoglobina glicozilată, trei luni, permițând medicului de specialitate să evalueze mai repede eficiența tratamentului prescris pacientului în cauză.

Fructozamina continuă șirul markerilor inovatori folosiți în screening-ului diabetului. Fructozamina este un termen general dat oricărei proteine glicate. În reacția de glicare se produce mai întâi aldimina, formă

instabilă, apoi se formează cetoamina, stabilă, iar prin legarea lanțului lateral al cetoaminei, structura acesteia seamănă cu structura fructozei, de unde și denumirea de fructozamină. Cu ajutorul fructozaminei se poate gestiona controlul glicemic la un interval de 2-3 săptămâni, nefiind influențată de stările anemice sau hemoglobină fluctuantă. Practic, este un intermediar între hemoglobina glicozilată și albumina glicozilată (Armbruster DA., 1987).

1,5 – Anhidroglucitolul (1,5-AG) reprezintă un alt marker, mai recent, în controlul glicemiei pe termen scurt cât și în hiperglicemia postprandială, folosit practic în monitorizarea fluctuațiilor glicemice în cazul pacienților cu diabet zaharat tip 2. Studiile din literatura de specialitate demonstrează că acest marker inovativ poate fi folosit cu succes doar la pacienții diabetici bine monitorizați, dar care nu poate fi corelat cu stresul oxidativ (Kim MJ. et al., 2013). Este o monozaharidă naturală provenită din dietă. Menținerea ei în organism se face prin excreție renală și reabsorbție. Reabsorbția ei din tubul proximal este inhibată competitiv de către glicozurie, pe măsură ce glucoza serică depășește pragul de 180mg/dL. Deci, ar putea fi considerat nu marker al glicozuriei, cu rol de a identifica foarte bine variațiile rapide ale glicemiei postprandiale (Chan CL. et al., 2017; Sato A., 2014).

La întrebarea, dacă boala Alzheimer este un diabet de tip 3, vine în ajutor studiul Zinei Kraner, 2009, în care boala Alzheimer se descrie ca fiind o tulburare neurodegenerativă, pornind de la ideea că insulina poate controla modul în care sunt eliberați neurotransmițătorii la nivelul sinapselor și tot ea ar fi cea care activează căile de semnalizare responsabile cu învățarea și memoria de lungă durată (Kroner Z., 2009). Neurotoxinele de tipul liganzilor difuzabili derivați de beta-amiloid (ADDL) pot afecta semnalizarea insulinei (Viola KL. et al., 2008).

Rezistența la insulină și niveluri ridicate de insulină din diabetul zaharat de tip 2, din afara sistemului nervos central, induce o diminuare a insulinei din creier cu afectarea ulterioară a căilor de semnalizare asociate cu învățarea și memoria. Diminuarea insulinei la nivel cerebral afectează supraviețuirea neuronală, metabolismul energetic, cât și plasticitatea, deci afectează cogniția (Li L., Hotscher C., 2007).

CAPITOLUL 2. MATERIALE ȘI METODE DE CERCETARE

Modele animale

Actualul studiu folosește specia de *Carssius auratus* (caras, goldfish sau prussian carp (eng.)), folosit cu succes și în alte studii pentru a evidenția memoria spațială (Thangaleela S. et al., 2021) datorită creierului anterior, telencefalului, formațiune implicată în procesul cognitiv (Yamamoto N., 2009) și care poate fi asimilată regiunilor limbice de la mamifere, care sunt responsabile atât cu memoria spațială și cu cele legate de diferitele tipuri de comportament (Rodriguez F. et al., 2002). De asemenea, a fost folosit ca și model toxicologic (Lu Q. et al., 2018), pentru studiul stresului oxidativ și a altor mecanisme metabolice, ca rezultat al expunerii la diferite concentrații de sucroză (Falfushynska H. et al., 2019).

Pacienți umani

Materialele de cercetare supuse studiului sunt pacienți de la Institutul de Psihiatrie „Socola” Iași, cu diagnosticul de demență și diabet pentru a observa cum se degradează demența, în corelație cu diabetul. Toate demersurile au fost luate după ce, în prealabil, au fost aprobate toate aspectele legate de etică cu instituția colaboratoare. În legislația națională, obligația consimțământului informatic pentru cercetare este fixată prin legea 46/2003 a drepturilor pacientului. Articolul 19 din legea 46/2003 prevede următoarele

”Consimțământul pacientului este obligatoriu în cazul participării sale în învățământul medical clinic și la cercetarea științifică. Nu pot fi folosite pentru cercetare științifică persoanele care nu sunt capabile să își exprime voința, cu excepția obținerii consimțământului de la reprezentantul legal și dacă cercetarea este făcută și în interesul pacientului”

Metodele de cercetare folosite în studiile pe animale sunt reprezentate de teste comportamentale:

- testul labirintului T- de evaluare a comportamentului explorator spontan și a memoriei pe termen scurt;
- testul preferinței lumină/întuneric pentru evaluarea anxietății;
- testul oglinzii de evaluare a agresivității;
- testul de evaluare a preferinței sociale.

În studiile pe pacienți, cu scopul de a corela degradarea cognitivă cu severitatea diabetului s-au luat în discuție următorii parametri: forma de demență, scorul MMSE (scorul de examinare minimă mentală), diagnosticul de diabet zaharat, valorile parametrilor biochimici: glicemie, colesterol, trigliceride, precum și medicația psihotropă, și pentru diabet zaharat, în cazul în care a fost prescrisă.

Testele comportamentale sunt folosite pentru a evalua modificările comportamentale cognitive sau afectiv emoționale, precum și pentru obținerea unui grad mai mare de anxietate și depresie la animalele supuse testării.

Primul test comportamental folosit în studiul de față este testul labirintului T (fig.1) de evaluare a comportamentului de explorator spontan și a memoriei pe termen scurt în care parametrii folosiți au fost:

1. Timpul petrecut în cele trei brațe, specific comportamentului explorator, parametru ce are la bază tendința de explorare a animalului;
2. Numărul de intrări în cele trei brațe ale labirintului, specific de asemenea comportamentului explorator;
3. Succesiunea alternărilor (întoarcerilor) stânga-dreapta, efectuate în timpul testului, relevant pentru memoria spațială pe termen scurt.

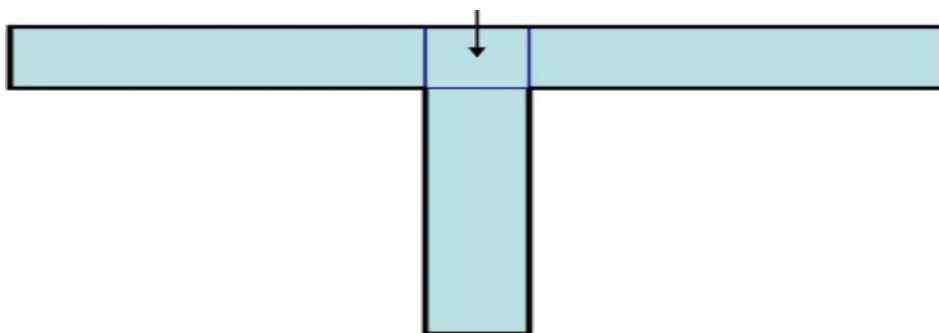


Fig. 1. Labirintul T folosit pentru evaluarea comportamentului explorator spontan și a memoriei de scurtă durată (*d'Isa Raffaele et al., 2021*)

Testul preferinței lumină/întuneric (fig.2) pentru evaluarea anxietății. Indicatorii comportamentali analizați au fost:

1. latența intrării în compartimentul luminat;
2. timpul petrecut în compartimentul luminat (calculat și ca procentaj din timpul total alocat testului) și durata medie de ședere în acesta;
3. numărul de treceri între cele două compartimente;
4. comportamentul de evaluare a riscului, reprezentat de numărul de intrări rapide în partea întunecată și de intrări parțiale în compartimentul luminat.

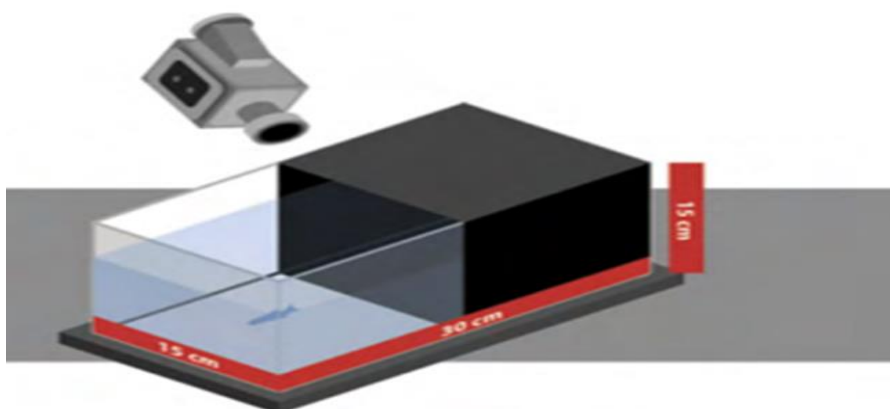


Fig. 2. Aparat folosit pentru evaluarea anxietății în testul lumină/întuneric (Danielle L. Champagne, 2010)

Testul oglinzii de evaluare (fig.3) a agresivității. Parametrii comportamentali urmăriți au fost:

1. frecvența mușcăturii oglinzii: de câte ori peștele mușcă/intră în contact direct cu oglinda;
2. durata mușcăturii oglinzii: timpul petrecut mușcând/în contact direct cu oglinda;
3. frecvența abordării oglinzii: numărul de treceri ale liniei care denotă zona de apropiere a oglinzii, dar fără contact cu oglinda;
4. latența de contact: timpul până la primul contact cu oglinda;
5. alți parametri comportamentali reflectând apariția stării de anxietate cum ar fi durata freezing/imobilitate.

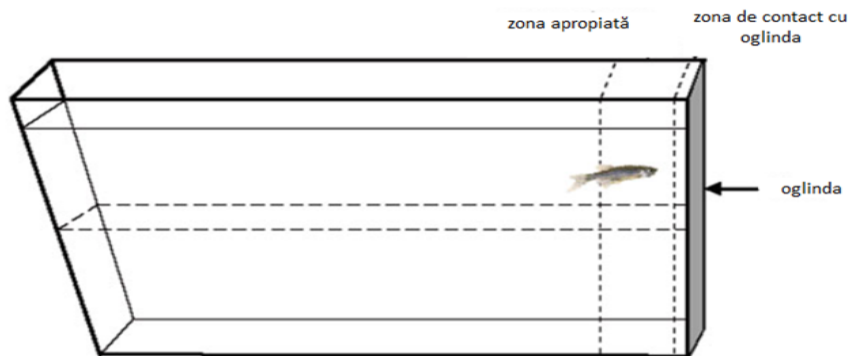


Fig.3. Aparat folosit pentru evaluarea agresivității în testul oglinzii (Pham M., 2012)

Testul preferinței sociale (fig. 4). Comportamentul peștilor a fost analizat luând în considerare următorii parametri:

1. latența intrării în contact cu ținta socială: durata până la primul contact al peștelui cu ținta socială;
2. timpul de interacțiune efectivă cu peștele țintă;
3. numărul de intrări și timpul petrecut în zona de interacțiune socială, în zona centrală și în zona distantă;

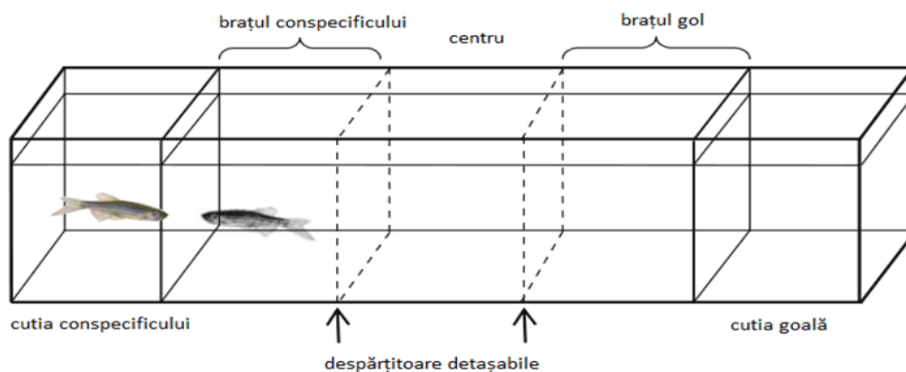


Fig.4. Aparat folosit pentru evaluarea preferinței sociale (Pham M., 2012)

Ultimul parametru, din testul labirintului T de evaluare a comportamentului de explorator spontan și a memoriei pe termen scurt, are la bază un model matematic bazat pe combinații de patru întoarceri (turns) numite tetragrame. Se pot forma 16 astfel de combinații posibile, doar că cea mai bună probabilitate statistică o au doar două dintre ele, SDSD (stânga-dreapta-stânga-dreapta), DSDS (dreapta-stânga-dreapta-stânga) și care reflectă cel mai bine strategia specifică orientării în spațiu. Strategia se bazează pe alternări, modul în care se întoarce peștele, la stânga apoi la dreapta sau invers, un mod de alegere conștient, pe bază de memorie, și nu pe repetări care se bazează pe acțiuni reflexe. Deși peștii procesează diferit informațiile față de rozătoare și au o altă orientare în spațiu comparativ cu acestea, au totuși în comun dorința de a găsi o ieșire din aparat, refugiarea într-un loc în care se simt în siguranță. Acest model a fost enunțat încă din 2018-2019, cu aplicabilitate din 2021, în care Cleal și colaboratorii au validat modelul la pești, șoareci și la oameni. Tot

ei au arătat că la un individ normal, fără să-i fie afectată memoria, combinațiile de tip alternant au valoarea medie de 40% restul fiind de tip repetitiv 60% (Cleal M., Parker M.O. 2018).

Metodele de cercetare folosite în studiile pe pacienți umani de la Institutul de Psihiatrie „Socola” Iași, cu diagnosticul de demență au luat în evidență următorii parametri: forma de demență, scorul MMSE, diagnosticul de diabet zaharat, valoarea glicemiei, valoarea colesterolului, cea a trigliceridelor, medicamentația psihotropă, medicamentația pentru tipul de diabet descoperit, cu scopul de a corela gradul de degradare cognitivă cu severitatea diabetului precum și studiarea modului în care medicația specifică pentru boala Alzheimer și diabet influențează tabloul patologic al acestor boli și interacțiunile dintre ele.

CAPITOLUL 3. REZULTATELE CERCETĂRII

Rezultate și discuții

Legat de primul parametru de explorare spontană, timpul petrecut în fiecare dintre cele trei brațe ale labirintului, din cadrul primului experiment, s-a observat o tendință uniformă în cazul grupurilor control și sucroză, iar în cazul grupurilor fipronil și sucroză cu fipronil s-a constatat o preferință semnificativă de a explora doar unul dintre brațe (cel stâng) în detrimentul celorlalte două (fig.5). La baza acestui comportament ar putea fi starea de hiperexcitabilitate indusă de fipronil (Gupta RC., Anadon A., 2018).

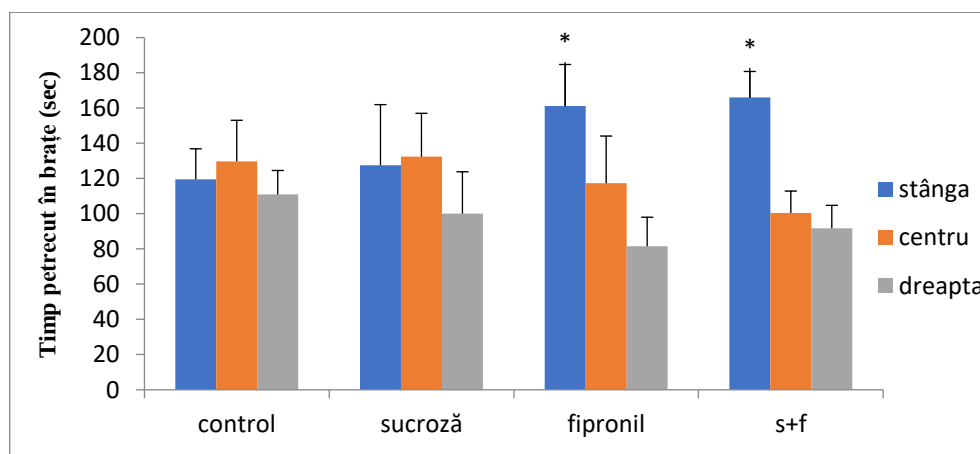


Fig. 5. Timpul petrecut în fiecare dintre cele trei brațe ale labirintului, după expunerea acută la sucroză, fipronil și sucroză+fipronil. Datele au fost exprimate ca medie $\pm$ SD ($n = 14$, * $p < 0,05$ față de control, ** $p < 0,01$ față de control, *** $p < 0,001$ față de control).

Activitatea exploratorie și locomotorie exprimată ca număr total de intrări în brațele labirintului a înregistrat o scădere pentru toate cele trei grupuri tratate vs control, o diferență semnificativă observându-se în cazul grupului fipronil, însoțită de un înot haotic ceea ce evidențiază perturbarea SNC, a activității motrice sub acțiunea fipronilului (fig.6). Exisă studii în literatura de specialitate care susțin că expunerea la fipronil, în experimente efectuate pe șobolani, a afectat neuronii dopaminergici nigrostriatali cu urmări asupra locomoției, coordonării motrice, a memoriei acestora cât și în interacțiunea socială (Sindhu KM. et al., 2006).

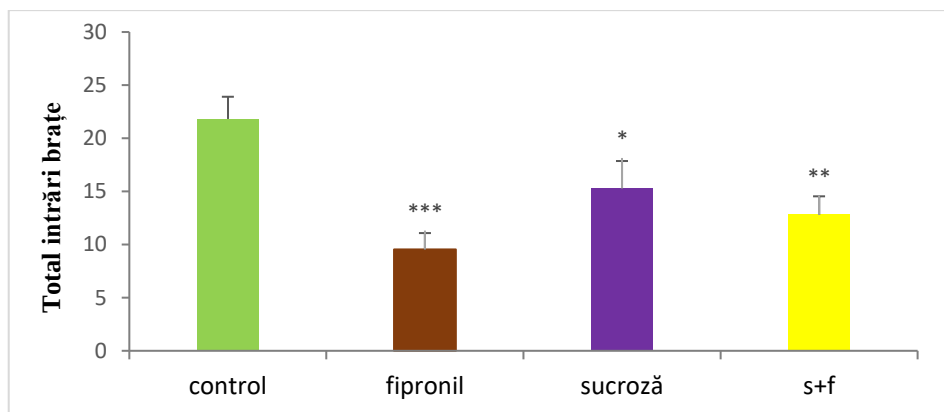


Fig. 6. Numărul total de intrări în brațele labirintului după expunerea acută la sucroză, fipronil și sucroză+fipronil. Datele au fost exprimate ca medie $\pm$ SD ($n = 14$, $*p < 0,05$ față de control, $**p < 0,01$ față de control, $***p < 0,001$ față de control).

Învățarea este considerată o primă etapă a memoriei deoarece aceasta presupune acumularea de cunoștințe noi, iar memoria presupune evidențierea, reliefaarea acestor informații învățate. La baza acestor procese stau anumite zone din creier care conțin numeroși receptori GABA: amigdala, hipocampul cât și cortexul entorinal. Cu predilecție, hipocampul, care este un sistem GABAergic. Prin perturbarea acestor receptori datorită acțiunii toxice a antagoniștilor GABA cogniția poate fi afectată (Lynch MA., 2004). Deci, receptorul GABA supus mecanismului de acțiune al fipronilului poate fi fundamentul modificărilor sau alterărilor neobișnuite ale proceselor care duc la învățare, cât și a acelor mecanisme care participă la formarea sinergică a consolidării cognitive și a memoriei spațiale (Izquierdo I., Medina JH., 1991; Davis M., 1994, Godinho AF. et al., 2016). Raportându-ne la datele din literatură amintite anterior, putem aprecia diminuarea succesiunii alternărilor de brațe, parametru considerat a reflecta memoria de lucru spațială (fig.7), o formă de memorie pe termen scurt, pentru grupul fipronil și cu semnificație statistică pentru grupul s+f, raportat la procentajul de alternări a grupului control, tocmai datorită afectării zonelor din creier cu un conținut numeros de receptori GABA (amigdala, hipocampul, cortexul entorinal), implicate în procesul cognitiv și implicit a memoriei spațiale.

Menționez că procentajul de alternări obținut în cazul grupului control este de 45%, apropiat de valoarea standard din literatura de specialitate (40% pentru indivizii cu o memorie neafectată).

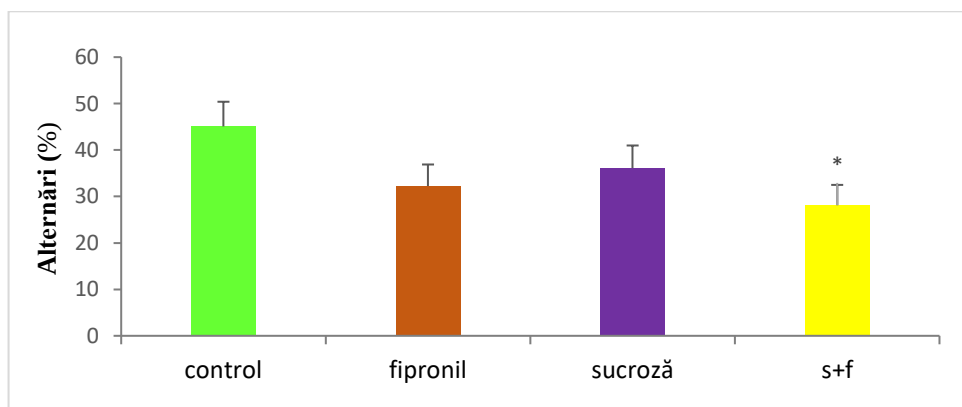


Fig. 7. Efectele asupra memoriei pe termen scurt evaluate prin succesiunea alternărilor de braț după expunerea acută la sucroză, fipronil și sucroză+fipronil. Datele au fost exprimate ca medie $\pm$ SD ($n = 14$, $*p < 0,05$ față de control, $**p < 0,01$ față de control, $***p < 0,001$ față de control).

În cel de-al doilea experiment, tot în cadrul aceluiași test, testul T, pentru primul parametru de tip explorator, numărul de intrări în brațe după expunerea la doze progresive de sucroză (fig.8), nu au fost înregistrate modificări semnificative statistic între grupuri, ci doar o scădere vizuală între grupul sucroză 5,5 mM și control, corelându-se cu episoadele de freezing susținut (stare de îngheț, de imobilitate totală) la același grup în cadrul testului oglinzii.

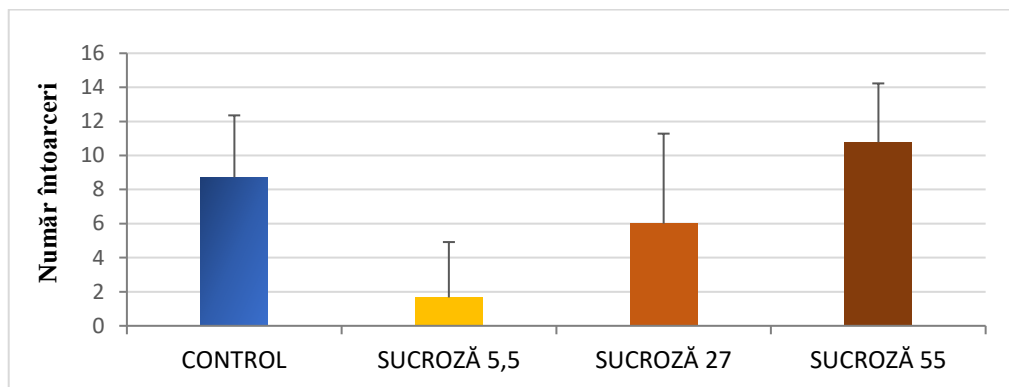


Fig. 8. Numărul de întoarceri în brațe, după expunerea la doze progresive de sucroză; 5,5 mM; 27,75 mM; 55,5 mM. Datele au fost exprimate ca medie $\pm$ SD (n = 9)

Procentajul de alternări în brațe, indicatorul ce reflectă memoria pe termen scurt, înregistrează o scădere semnificativă din punct de vedere statistic pentru grupul sucroză de concentrație maximă vs. control (fig. 9) neobservându-se diferențe semnificative între celelalte două loturi de sucroză, evidențiind alterarea performanțelor cognitive prin depășirea unui anumit prag al metabolismului glucidic. Această tendință ar putea fi explicată prin studiul *Kroner Z., 2009* în care se susținea similaritatea bolii Alzheimer cu diabetul zaharat, aceasta putând fi considerată un diabet de tip 3.

Termenul de diabet de tip 3 a fost introdus în 2005 de Suzanne de la Monte, neuropatolog și profesor asociat de Patologie și Medicina la Școala Medicală Brown. Aceasta, în urma examinării post-mortem a creierului pacienților cu AD, a remarcat că boala ar putea fi considerată o boală neuroendocrină asociată cu semnalizarea insulinei. Boala Alzheimer a fost denumită diabet de tip 3 deoarece cuprinde elemente ale diabetului de tip 1 și 2, constatându-se atât o scădere a producției de insulină cât și o rezistență la receptorii de insulină (*Rivera EJ. et al., 2005; de la Monte SM. et al., 2006*). Datele din literatură evidențiază o scădere cu 80% a numărului de receptori de insulină la pacienții cu AD comparativ cu subiecții normali. De asemenea s-a descoperit și că, capacitatea de legare a insulinei la receptori, a fost compromisă. Deci, pacienții cu AD au mai puțină insulină și mai puțini receptori de insulină decât pacienții fără AD, iar corectarea nivelurilor de insulină îmbunătățește cogniția. Insulina se leagă de receptorii de insulină din creier, majoritatea fiind localizați în cortexul cerebral, bulbul olfactiv, hipocamp, cerebel și hipotalamus. Existența receptorilor de insulină în zonele relevante pentru cunoaștere ale creierului, ne determină să luăm în considerare asocierea dintre insulină și cogniție (*Craft S., Watson GS. 2004*).

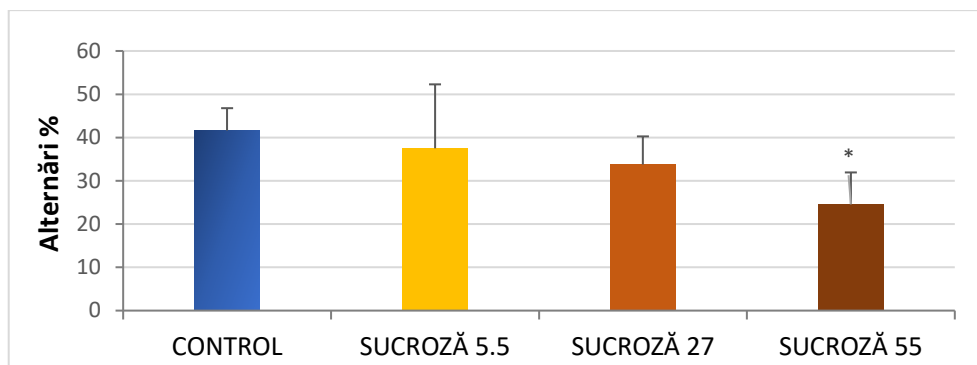


Fig. 9. Efectele asupra memoriei pe termen scurt evaluate prin succesiunea alternărilor de brațe după expunerea la doze progressive de sucroză 5,5 mM, 27,75 mM, 55,5 mM. Datele au fost exprimate ca medie $\pm$ SD (n = 9, *p<0,05 față de control).

Celelalte teste comportamentale prezentate în cadrul primului experiment, evidențiază manifestări de tip anxios pentru grupul fipronil și s+f din cadrul testului lumină/întuneric (fig. 10). Această concluzie este în concordanță cu cele publicate în literatura de specialitate. Astfel, articolul scris de Akhlaq Huussain, Gilbert Andira și colaboratorii, argumentează cele susținute anterior, prin faptul că peștele zebra expus la pesticide a executat mai multe mișcări de rotație în partea întunecată decât în cea luminoasă prin comparație cu celelalte grupuri, sugerând posibilul efect anxiogen al fipronilului (Hussain A., Audira G. et al., 2020).

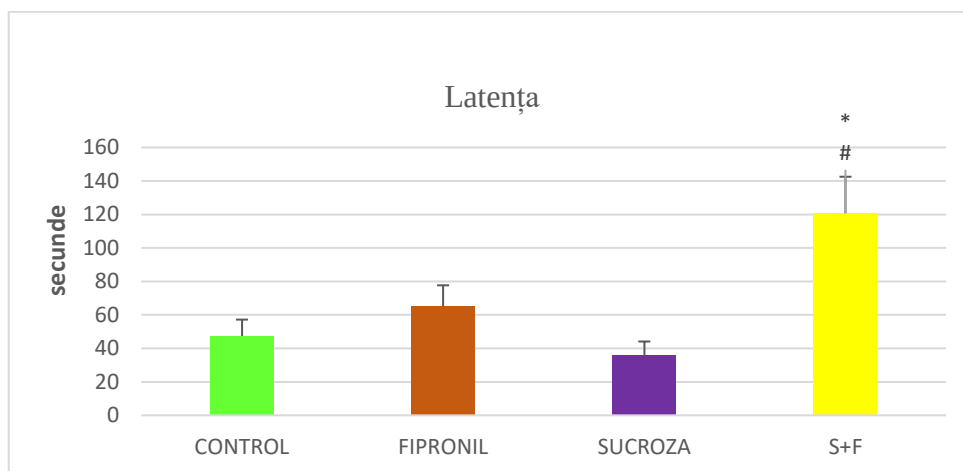


Fig. 10. Latența intrării în compartimentul luminat în Testul preferinței pentru lumină/întuneric după expunerea acută la sucroză, fipronil, și sucroză+fipronil (n=14, *p<0,05 vs control #p<0,05 vs sucroză)

Manifestări de tip anxios se observă la același grup mixt și în cadrul testului oglinzii, precum și manifestări de tip agresiv pentru celelalte două grupuri (fipronil și sucroză) (fig.11). Referitor la testul de mușcătură în oglindă, de evaluare a îndrăzneții animalului sau la capătul opus, anxiozitatea acestuia, literatura de specialitate oferă date în acest sens. Studiul lui Audira G. și al colaboratorilor săi oferă date cu privire la evaluarea comportamentului agresiv al peștilor zebra sub acțiunea diferitelor substanțe poluante, toxice urmărind îndrăzneala animalului (Audira G. et al., 2020). Alte studii oferă date contradictorii cu referire la agresivitatea modelelor animale. Astfel, în studiul în care pesticidul folosit a fost etanol s-a

observat o inhibare a agresivității, datorită efectului sedativ al etanolului (Audira G. et al., 2018). Spre deosebire de un alt studiu prezent în literatura de specialitate, unde s-au folosit alte tipuri de pesticide, și în care s-a observat o reacție opusă celei amintite anterior, o creștere a comportamentului agresiv, prin modificarea hormonilor de stres precum și a genelor implicate în reglarea comportamentului de natură agresivă (Liu ZH. et al., 2020).

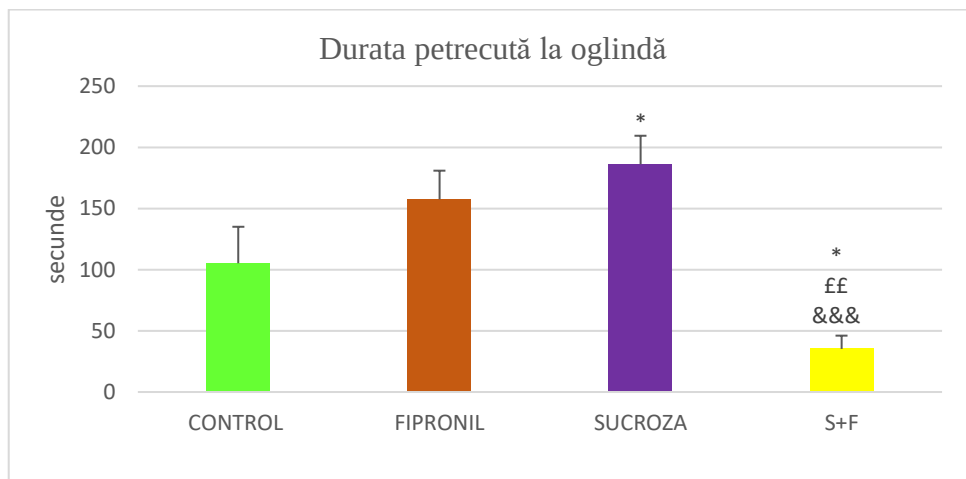


Fig. 11. Timpul petrecut în zona de contact cu oglinda după expunerea acută la doză unică de sucroză, fipronil și sucroză+fipronil (n=14, *p<0,05 vs control, ^{ff}p<0,01 vs fipronil, &&&p <0,001 vs sucroză)

Literatura evidențiază că expunerea la fipronil afectează neuronii dopaminergici cu urmări asupra locomoției, motricitate, memorie și interacțiune socială (Sindhu K.M, 2006).

Pentru cel de-al doilea experiment, în cadrul testului lumină/întuneric se face vizibil efectul anxiogen al sucrozei cronice pentru grupurile 27,75 mM și 55,5 mM și agresivitatea instalată în rândul concentrației minime de 5,5 mM (fig.12). Cercetătorii teoretizează că exercițiile fizice reduc manifestările de tip anxios prin medierea axei hipotalamo-hipofizo- suprarenale (Fulk LJ. et al., 2004) și ar putea crește în acest caz manifestările situate la polul opus, de agresiune, putând fi o explicație plauzibilă la comportamentul manifestat de grupul tratat cu 5,5mM.

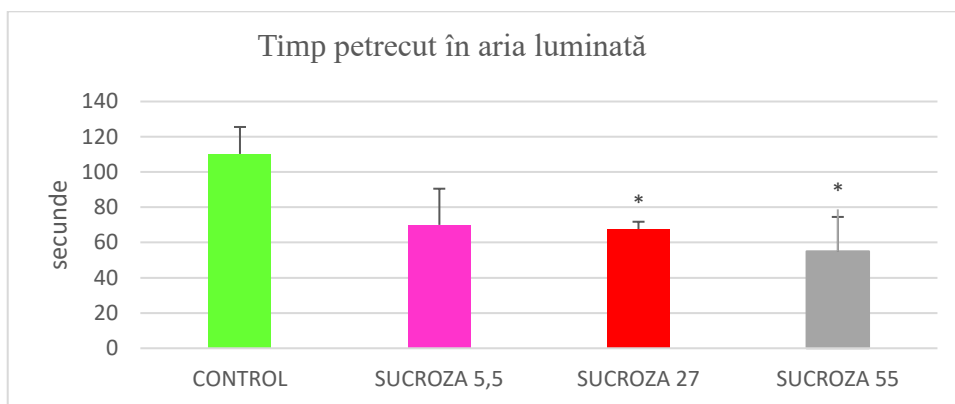


Fig. 12. Timpul petrecut în compartimentul luminat după expunerea la doze progresive de sucroză; 5,5 mM; 27,75 mM; 55,5 mM (n = 9, *p<0,05 vs control)

De asemenea, peștii tind să creeze un conflict de abordare-evitare. Cu toate că ele își manifestă dorința de a explora medii noi, această dorință este însoțită de stări de anxiozitate, teama pentru locurile noi, potențial periculoase. Astfel, peștii vor alege să stea într-un mediu confortant pentru ei, adică zona întunecată, cu scurte incursiuni în mediul neprielnic, zona luminoasă (Montgomery KC., 1955), (Toth, Miklos și Bojana Zupan, 2007). În testul de lumină/întuneric peștii hiperglicemici au înregistrat un număr scăzut de traversări, de asemenea timpul petrecut în zona luminoasă a fost diminuat însoțit de lipsa manifestărilor de evaluare a riscului (fig. 13). Toate aceste fenotipuri sugerează comportamente asemănătoare anxietății pusă pe seama nivelului ridicat de glucoză din organism (Capiotti KM. et al., 2014).

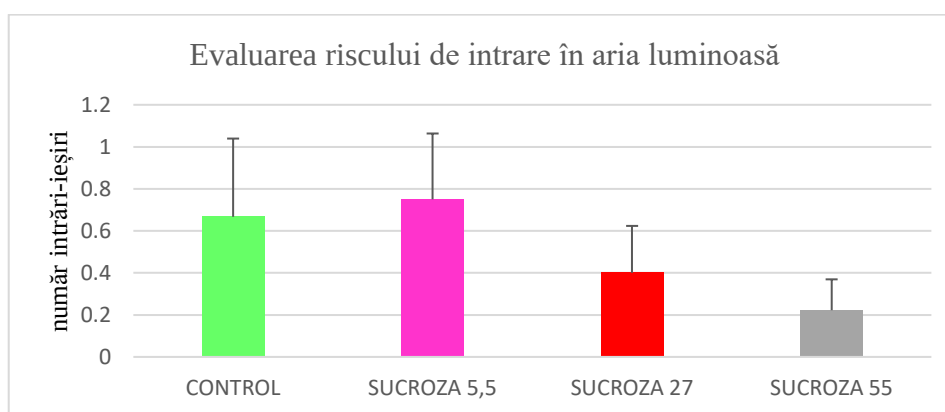


Fig. 13. Comportamentul de evaluare a riscului, reprezentat de numărul de intrări rapide în partea întunecată și de intrări parțiale în compartimentul luminat, după expunerea la doze progresive de sucroză, 5,5 mM; 27,75 mM; 55,5 mM (n = 9)

În testul oglinzii, pentru concentrațiile mari de glucoză se observă accentuarea stării de anxietate pentru grupul 55,5 mM și instalarea aceleiași stări la cel de al doilea grup 27.75 mM (fig.14). Este dificil de interpretat semnificația acestor valori, dacă ele reflectă reducerea activității motorii sau a agresivității, sau efectele unor mecanisme de reglare internă împotriva dezechilibrelor metabolice. Posibila explicație ar fi instalarea unor mecanisme compensatorii împotriva dezechilibrelor metabolice cu implicații asupra manifestărilor comportamentale. Acest lucru este evidențiat și în literatura de specialitate, prin articolul scris de Unai Galicia-Garcia și colaboratorii săi, care explică dezechilibrele metabolice ca fiind rezultatul perturbării mecanismelor implicate în procesul de sinteză și de eliberare a insulinei, precum și în detectarea acesteia. Afectarea homeostaziei glucozei prin oricare dintre mecanismele amintite anterior creează dezechilibre metabolice (Galicia-Garcia U. et al., 2020).

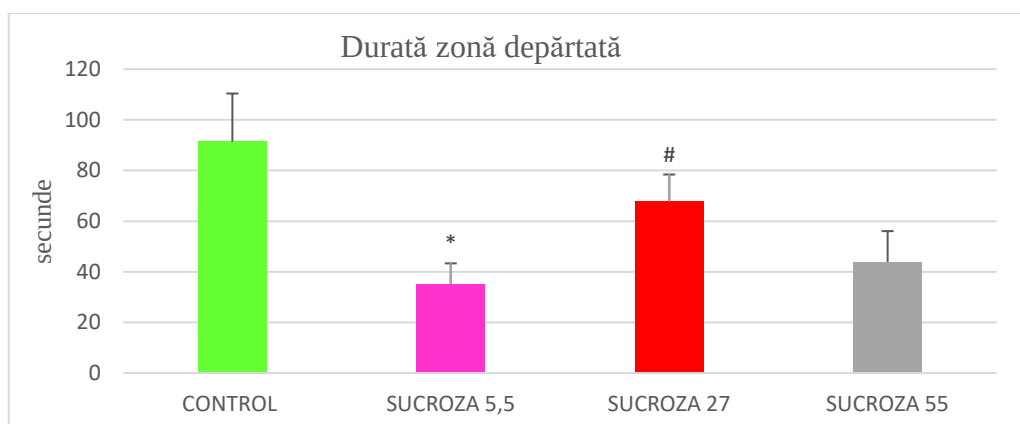


Fig. 14. Durata petrecută în zona depărtată de oglindă, după expunerea la doze progresive de sucroză; 5,5 mM; 27,75 mM; 55,5 mM (n = 9, *p<0,05 vs control, #p<0,05 vs sucroza 5,5 mM)

Referitor la testul preferinței sociale se observă reducerea componentei sociale pentru grupul sucroză 55 mM, iar pentru grupul 5,5 mM mai degrabă o reducere exploratorie decât a componentei sociale. (fig. 15). Preferințele sociale modificate, scăzute sunt dificil de interpretat, deoarece pot fi puse și pe seama unei perturbări locomotorii, și care nu are de a face cu anxietatea. Disfuncționalitățile genetice din mușchi sau căile motorii pot avea efecte negative în neuronii motori și chiar pot afecta celulele musculare, cu repercusiuni asupra locomoției. Deci, ar trebui identificat dacă comportamentul social modificat ar fi ca o urmare a unei deficiențe locomotorii sau rezultatul unui fenotip independent (Norton WHJ. et al., 2019). Preferința socială poate fi definită ca predilecția indivizilor de a trăi în apropierea conspecificilor (Liu X. et al., 2016). Datele oferite de literatura de specialitate sugerează că evaluarea preferinței sociale poate fi influențată atât de factori endogeni cât și de factori exogeni. La rândul lor factorii endogeni pot fi împărțiți în două categorii, una în care se face referire la caracteristicile individuale ale peștelui testat, iar cealaltă categorie face referire la caracteristicile de grup ale indivizilor. Printre caracteristicile individuale se numără, vârsta, sexul și personalitatea. Dintre cei de grup fac parte mărimea, fenotipul și gradul de rudenie dintre aceștia. Să nu uităm de factorii exogeni care pot interveni în componenta socială afectată, și anume condițiile de mediu, lumina, volumul apei din aparat, luminozitatea, temperatura (Ogi A. et al., 2021). Multe dintre studii susțin că peștele-zebră preferă să socializeze cu conspecifici care au fenotipuri, vârstă cât și dimensiuni asemănătoare. Neavând cunoștințe exacte care dintre acești factori ar fi putut influența preferința socială, nu putem decât să o punem pe seama concentrațiilor de glucoză ridicată din sângele peștilor, știut fiind faptul că diabetul zaharat poate afecta procesele cerebrale inducând la nivelul sistemului nervos central dereglări de tipul depresiei, anxietății și a bolii Alzheimer (Lakstygal AM. et al., 2019).

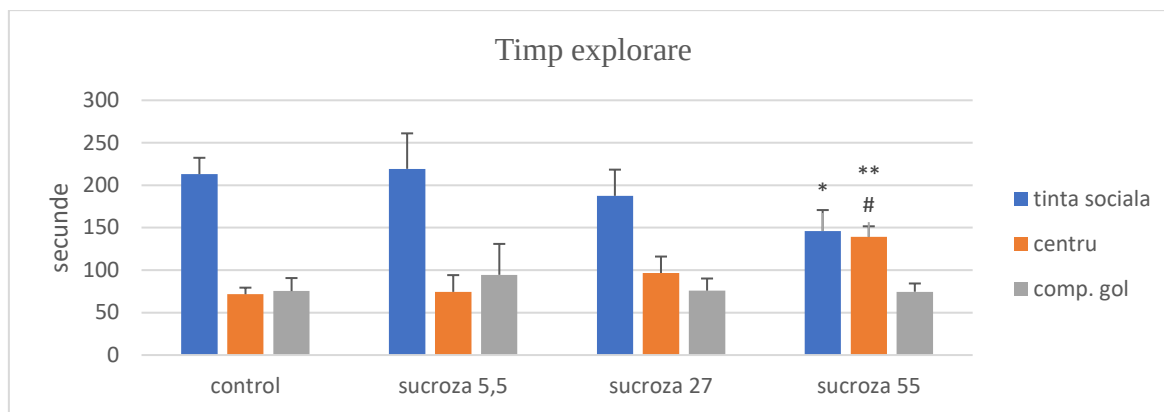


Fig. 15. Timpul de explorare, în cadrul Testului de evaluare a preferinței sociale, după expunerea la doze progresive de sucroză; 5,5 mM; 27,75 mM; 55,5 mM; (n = 9, *p<0,05 vs control; , **p<0,01 vs control; #p<0,05 vs sucroza 5,5 mM)

Partea a doua a studiului se bazează pe evaluarea pacienților din perioada ianuarie-iulie 2022 în care s-a evaluat un eșantion de 33 de pacienți, care au fost împărțiți în mai multe categorii după tipul de demență (fig.16), în care proporția cea mai mare o deține demența mixtă, formă medie, urmată de demența mixtă (boala Alzheimer combinată cu cea vasculară) și demența vasculară.

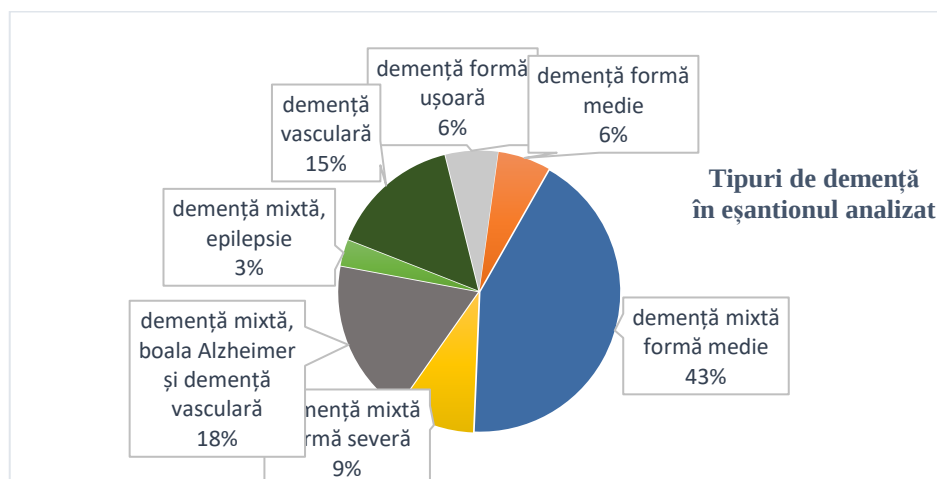


Fig. 16. Distribuția tipurilor de demență în eșantionul total de pacienți

Patologiile asociate care fac obiectul studiului de față sunt diabetul și obezitatea. Analizând din numărul total al pacienților prevalența celor care prezentau aceste patologii am găsit următoarele date:

- în grupul de demență mixtă formă medie, 7% dintre pacienți au prezentat diabet zaharat;
- în grupul de demență mixtă formă mixtă, boala Alzheimer și demență vasculară 16,6%;
- iar în grupul demență vasculară procentul e de 60% (fig.16).

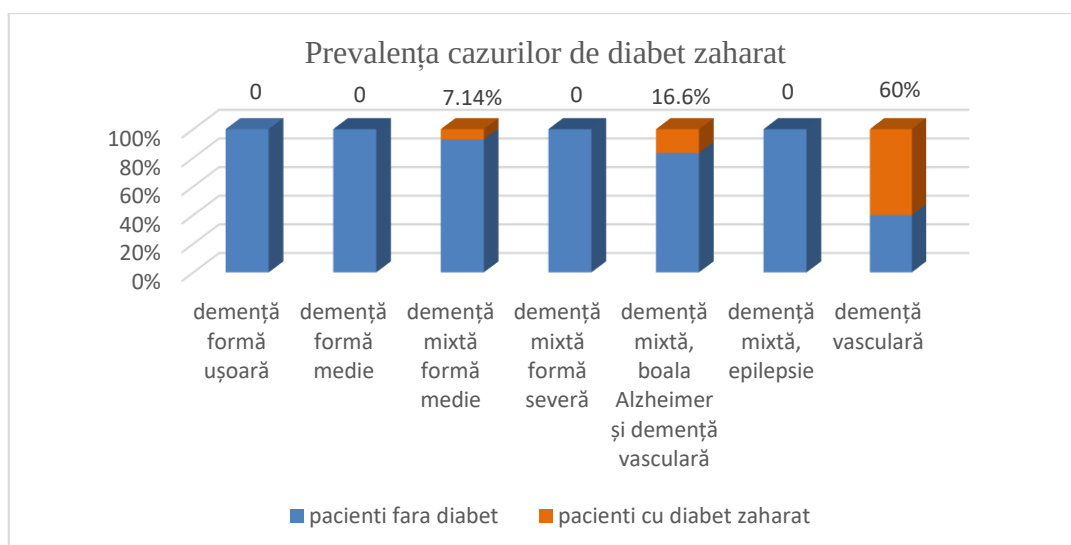


Fig. 17. Prevalența cazurilor de diabet

În cazul obezității un procent ridicat, de 50%, se înregistrează în tipurile de demență formă ușoară și 14,2% în demență mixtă, formă medie (fig.18).

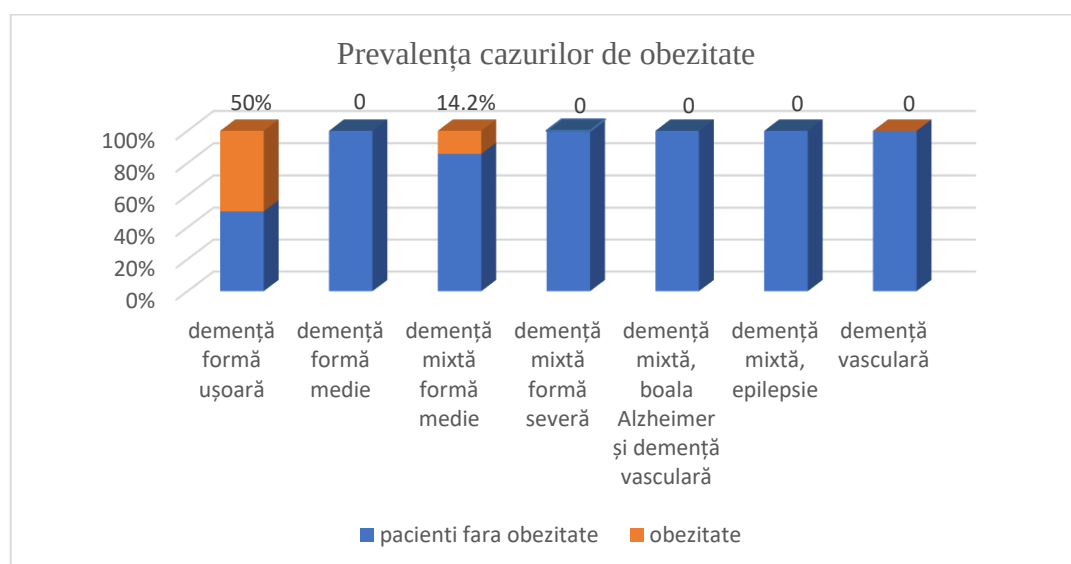


Fig.18. Prevalența cazurilor de obezitate și dislipidemie

În cazul evidențierii gradului de severitate al demenței în funcție de scorul MMSE se remarcă tipul de demență formă ușoară, demență vasculară. Scorul MMSE apreciază gradul de degradare cognitivă (fig.19).

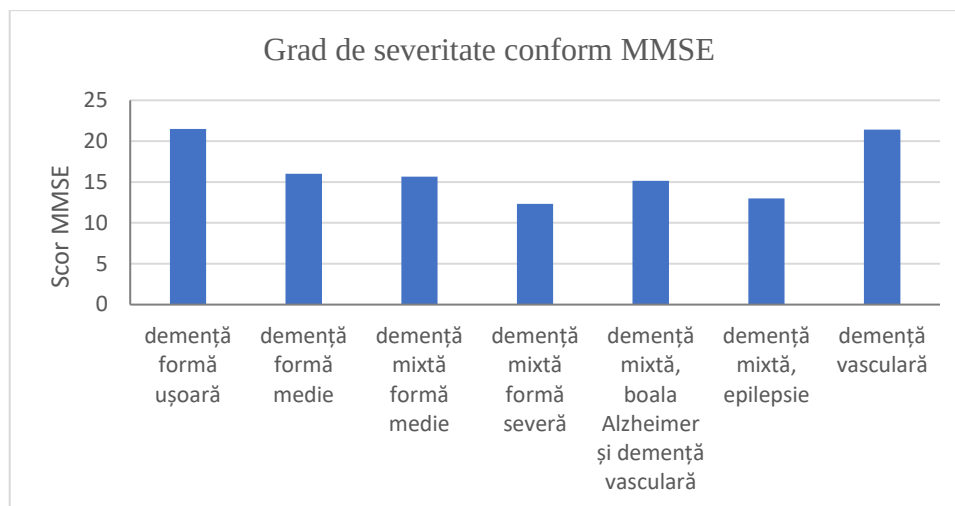


Fig.19. Gradul de severitate al demenței în funcție de scorul MMSE

Pentru cea mai mare parte a pacienților au fost analizate glicemiile, colesterolul și trigliceridele. Pe baza acestor parametri am făcut o serie de corelații individuale, în care s-au obținut corelații Pearson nesemnificative pentru toți parametrii amintiți. Lipsa corelațiilor (fig. 20, 21, 22) ar putea fi pusă pe seama scorurilor MMSE pentru demență, existând categorii de demențe cu scoruri foarte mari care nu exclud însă un grad de afectare major, demențele vasculare caracterizate prin incidența crescută a cazurilor de diabet zaharat, prezentând, în mod surprinzător, note ridicate pe scala MMSE apropiate de valorile normale, fără simptomatologie.

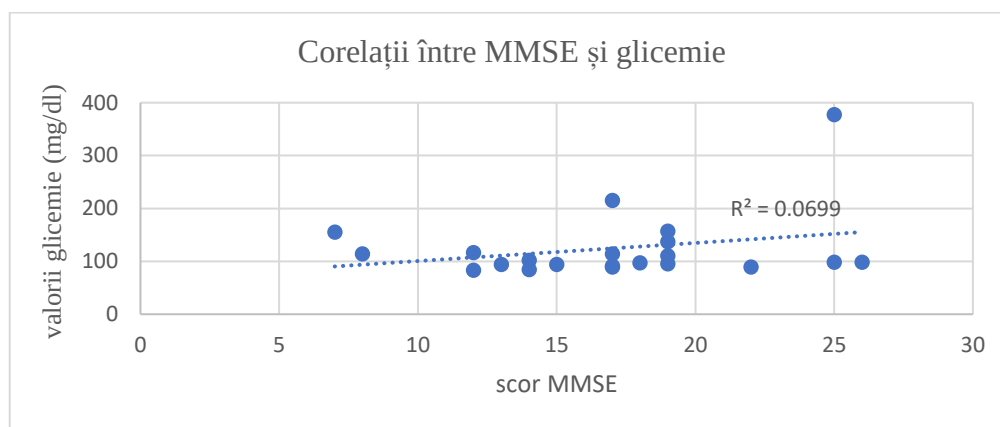


Fig. 20. Corelații între scorurile MMSE și glicemiile pacienților

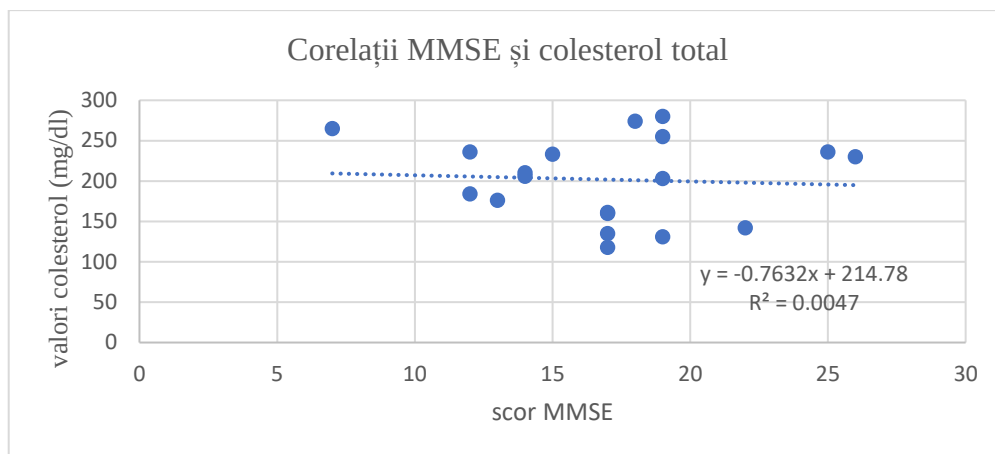


Fig. 21. Corelații între scorurile MMSE și colesterolul pacienților

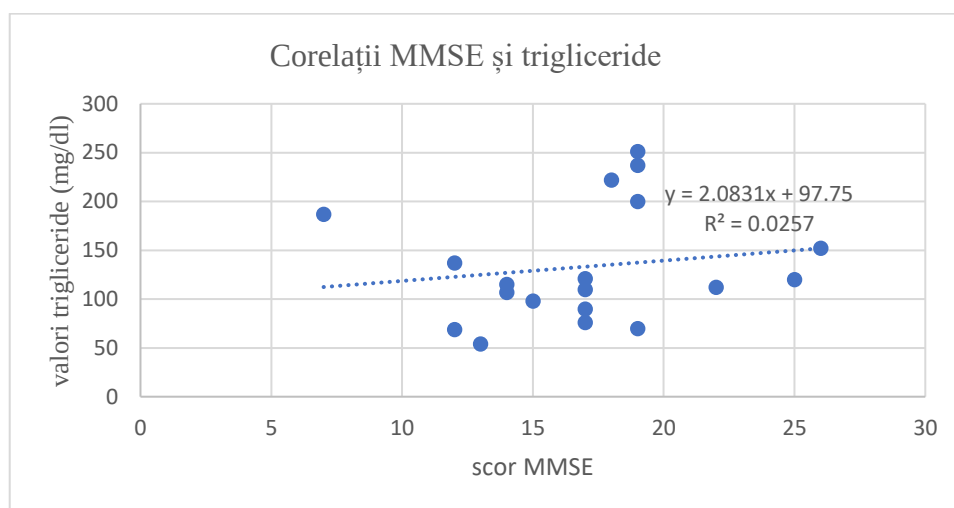


Fig.22. Corelații între scorurile MMSE și trigliceridele pacienților

În acest context am aplicat o altă metodă de analiză statistică. Am exclus pacienții fără glicemii din lipsă de date și am făcut corelații între mediile procentuale ale pacienților cu diabet zaharat în funcție de tipul de demență și mediile glicemiilor, de colesterol și al trigliceridelor, în care am obținut corelații Pearson semnificative, peste 0,7 (fig. 23, 24, 25). Astfel, există după corelațiile obținute, doar un anumit tip de demență/subtip, și anume demență vasculară și cea mixtă (boala Alzheimer și vasculară), care e mai vulnerabil la colesterol, diabet sau pare că este mai vulnerabil. Aceste patologii metabolice par a fi strâns legate de manifestările psihiatrice.

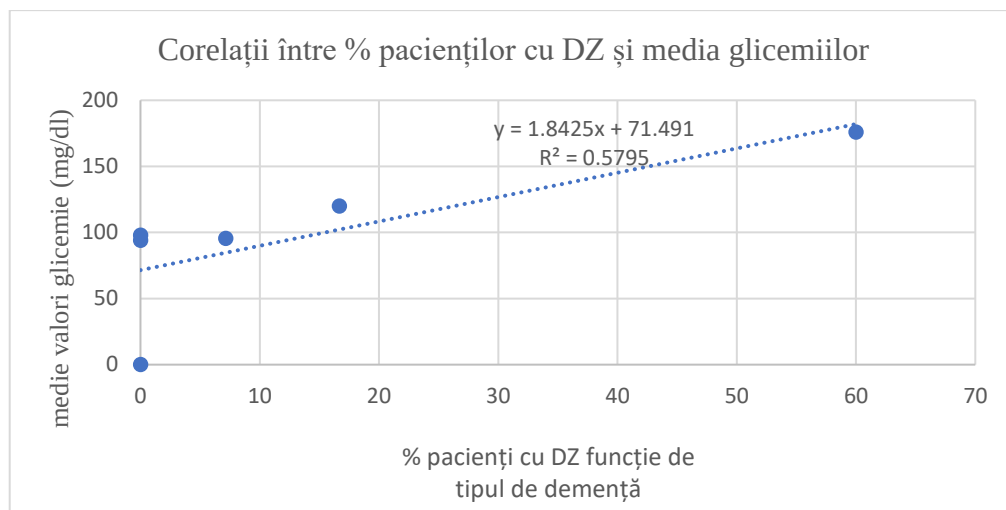


Fig. 23. Corelații între mediile procentuale ale pacienților cu diabet zaharat în funcție de tipul de demență și mediile glicemiilor

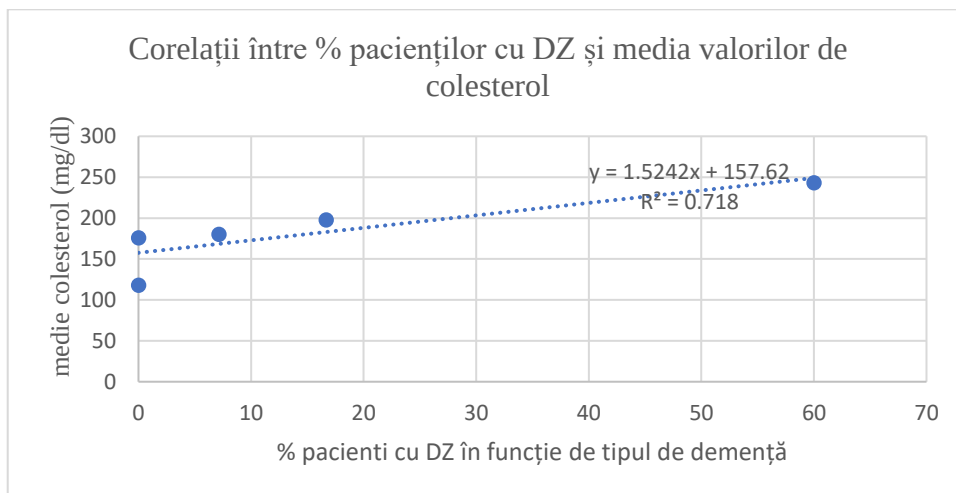


Fig. 24. Corelații între mediile procentuale ale pacienților cu diabet zaharat în funcție de tipul de demență și mediile de colesterol

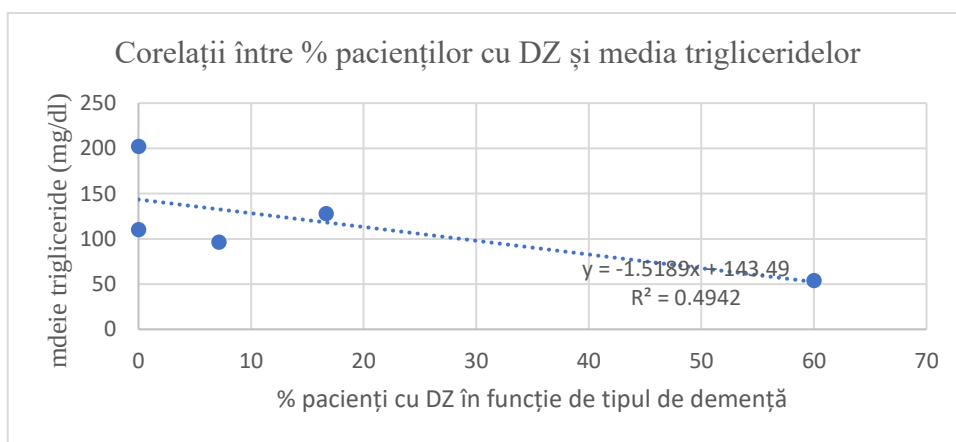


Fig. 25. Corelații între mediile procentuale ale pacienților cu diabet zaharat în funcție de tipul de demență și mediile trigliceridelor

De asemenea, se pot observa procentele în care pacienții urmează medicații psihotrope și pentru controlul diabetului zaharat. Incidența glicemiilor cu valoare ridicată, peste normal, este mare în rândul pacienților, 11 din 29 prezintă fluctuații glicemice anormale (fig.26).

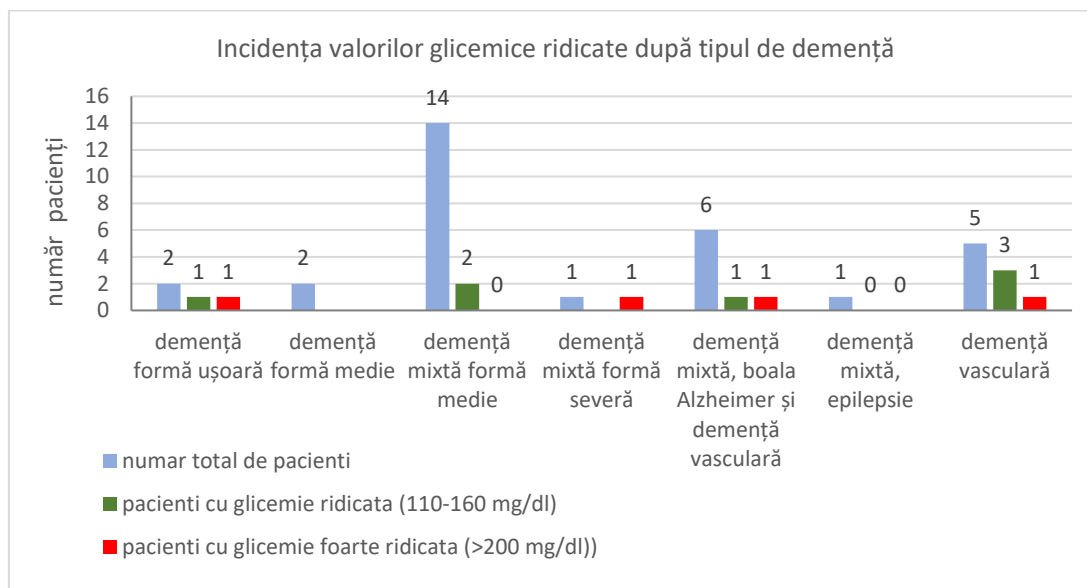


Fig. 26. Incidența valorilor glicemice ridicate după tipul de demență

În ceea ce privește corelațiile dintre medicația psihotropă și cea pentru diabetul zaharat, acestea sunt mai dificil de făcut pentru datele furnizate, fiind necesare eșantioane mai mari precum și culegerea acestora la intervale diferite, pentru a monitoriza dinamica glicemiei în raport cu starea psihiatrică.

Se poate totuși observa că scorurile MMSE sunt în general mai bune când pacienții urmează tratament medicamentos psihotrop. O excepție apare în cazul demenței de tip vascular la care scorul MMSE este foarte mare (apropiat chiar de valorile normale). Tot acesta este și tipul de demență cu cea mai mare incidență de diabet zaharat (fig.27).

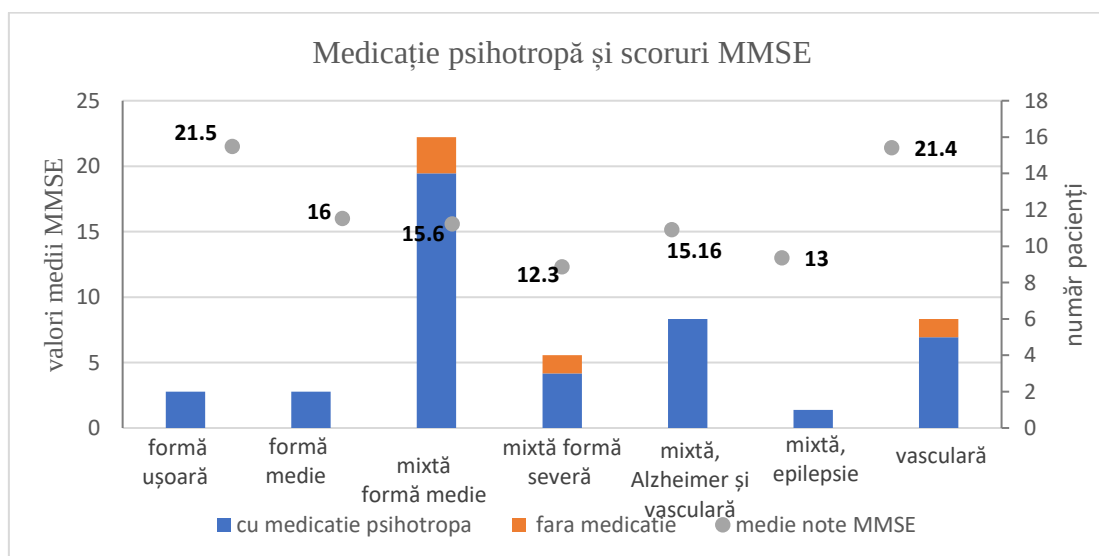


Fig. 27. Medicație psihotropă și scoruri MMSE

Concluzii

- modelele animale generate evidențiază alterarea performanțelor cognitive în contextul depășirii unui anumit prag al metabolismului glucidic;
- apariția tulburărilor pe termen scurt, în cazul grupului sucroză+fipronil, se datorează efectelor pregnante, induse de fipronil, pe fondul unei afectări metabolice prealabile.
- la nivel comportamental sucroza induce alterări cognitive și afective, marcate prin deprecierea memoriei, prin anxietate ridicată și creșterea agresivității.
- afectarea cognitivă se remarcă prin scăderea semnificativă a procentajului tetragramelelor de tip alternant în cazul grupului tratat cu concentrația maximă de sucroză, accentuând ideea unei influențe de natură metabolică.
- în doze mici sucroza reprezintă o sursă energetică care induce o stare de hiperactivitate și chiar hiperexcitabilitate, însoțită de efecte imprevizibile, episoade de freezing (stări de îngheț), sau anxietate exacerbată.
- stările de dominanță și agresivitate observate la peștii tratați cu sucroză în diferite concentrații se pot datora instalării unor mecanisme compensatorii împotriva dezechilibrelor metabolice cu implicații asupra manifestărilor comportamentale.
- prin coroborarea datelor din cele două experimente pe modelele animale din prezentul studiu se confirmă teoriile actuale din literatura că sindromul metabolic și diabetul zaharat ar putea fi cauze ale debutului bolii Alzheimer.
- în a doua parte a acestui studiu, efectuată pe pacienți umani, se pun în evidență corelații, de cele mai multe ori semnificative, între anumite subtipuri de demență și patologii asociate (diabet zaharat și obezitate), și anume cele de tip vascular și de formă mixtă (boala Alzheimer și vasculară).
- existența unei legături între aceste două tipuri de afecțiuni, probabil favorizată de un anumit tip de demență, este observată chiar dacă eșantionul analizat este unul redus, întărind astfel ipoteza studiului.
- rezultatele noastre se corelează cu teoriile actuale privind boala Alzheimer ca o formă particulară de diabet zaharat, așa numitul diabet zaharat de tip 3.

BIBLIOGRAFIE

Attems J, Jellinger AK (2013) Neuropathology. In Denning T, Thomas A (Eds) Oxford Textbook of Old Age Psychiatry. Second edition. Oxford University Press, Oxford, 87-105.

Armbruster DA. Fructosamine: structure, analysis, and clinical usefulness. Clin Chem. 1987 Dec;33(12):2153-63. PMID: 3319287.

Audira G, Siregar P, Chen JR, Lai YH, Huang JC, Hsiao CD. Systematical exploration of the common solvent toxicity at whole organism level by behavioral phenomics in adult zebrafish. Environ Pollut. 2020 Nov;266(Pt 1):115239. doi: 10.1016/j.envpol.2020.115239. Epub 2020 Jul 31. PMID: 32795887.

Audira, G.; Sampurna, B.P.; Juniardi, S.; Liang, S.-T.; Lai, Y.-H.; Hsiao, C.-D. A Versatile Setup for Measuring Multiple Behavior Endpoints in Zebrafish. *Inventions* 2018, 3, 75. <https://doi.org/10.3390/inventions3040075>.

Bloom GS. Amyloid- β and tau: the trigger and bullet in Alzheimer disease pathogenesis. JAMA Neurol. 2014 Apr;71(4):505-8. doi: 10.1001/jamaneurol.2013.5847. PMID: 24493463.

Caberlotto L, Nguyen TP, Lauria M, Priami C, Rimondini R, Maioli S, Cedazo-Minguez A, Sita G, Morroni F, Corsi M, Carboni L. Cross-disease analysis of Alzheimer's disease and type-2 Diabetes highlights the role of autophagy in the pathophysiology of two highly comorbid diseases. Sci Rep. 2019 Mar 8;9(1):3965. doi: 10.1038/s41598-019-39828-5. PMID: 30850634; PMCID: PMC6408545.

Capiotti KM, De Moraes DA, Menezes FP, Kist LW, Bogo MR, Da Silva RS. Hyperglycemia induces memory impairment linked to increased acetylcholinesterase activity in zebrafish (*Danio rerio*). Behav Brain Res. 2014 Nov 1;274: 319-25. doi: 10.1016/j.bbr.2014.08.033. Epub 2014 Aug 23. PMID: 25157430.

Chan CL, Pyle L, Kelsey MM, Newnes L, Baumgartner A, Zeitler PS, Nadeau KJ. Alternate glycemic markers reflect glycemic variability in continuous glucose monitoring in youth with prediabetes and type 2 diabetes. Pediatr Diabetes. 2017 Nov;18(7):629-636.

doi: 10.1111/pedi.12475. Epub 2016 Nov 22. PMID: 27873436; PMCID: PMC5440227.

Cleal M, Parker MO. Moderate developmental alcohol exposure reduces repetitive alternation in a zebrafish model of fetal alcohol spectrum disorders. *Neurotoxicol Teratol*. 2018 Nov-Dec; 70:1-9. doi: 10.1016/j.ntt.2018.09.001. Epub 2018 Sep 7. PMID: 30201482.

Craft S, Watson GS. Insulin and neurodegenerative disease: shared and specific mechanisms. *Lancet Neurol* 2004;3:169-178.

Davis M. The role of the amygdala in emotional learning. *Int Rev Neurobiol*. 1994; 36: 225-66. doi: 10.1016/s0074-7742(08)60305-0. PMID: 7822117.

de la Monte SM, Tong M.et al. Therapeutic rescue of neurodegeneration in experimental type 3 diabetes: relevance to Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 2006;10:89-109.

d'Isa R, Comi G, Leocani L. Apparatus design and behavioural testing protocol for the evaluation of spatial working memory in mice through the spontaneous alternation T-maze. *Sci Rep*. 2021 Oct 27;11(1):21177. doi: 10.1038/s41598-021-00402-7. PMID: 34707108; PMCID: PMC8551159.

De-Paula VJ, Radanovic M, Diniz BS, Forlenza OV. Alzheimer's disease. *Subcell Biochem*. 2012;65:329-52. doi: 10.1007/978-94-007-5416-4_14. PMID: 23225010.

Dinan TG, Cryan JF. Gut instincts: microbiota as a key regulator of brain development, ageing and neurodegeneration. *J Physiol* 2017;595:489-503.

Falfushynska H, Horyn O, Khoma V, Tereshchuk G, Gnatyshyna L. Waterborne sucrose impairs health status of farming fish *Carassius auratus gibelio*, 19th International multidisciplinary scientific geoconference, SGEM 2019. Sofia, 2019. Vol. 19, issue 6.1. P. 1045–1052 03-13. doi: 10.1007/s007020200083. PMID: 12111437.

Fulk LJ, Stock HS, Lynn A, Marshall J, Wilson MA, Hand GA. Chronic physical exercise reduces anxiety-like behavior in rats. *Int J Sports Med*. 2004 Jan;25(1):78-82. doi: 10.1055/s-2003-45235. PMID: 14750018.

Galicia-Garcia U, Benito-Vicente A, Jebari S, Larrea-Sebal A, Siddiqi H, Uribe KB, Ostolaza H, Martín C. Pathophysiology of Type 2 Diabetes Mellitus. *Int J Mol Sci*. 2020 Aug 30;21(17):6275. doi: 10.3390/ijms21176275. PMID: 32872570; PMCID:

PMC7503727.

Godinho AF, de Oliveira Souza AC, Carvalho CC, Horta DF, De Fraia D, Anselmo F, Chaguri JL, Faria CA. Memory impairment due to fipronil pesticide exposure occurs at the GABAA receptor level, in rats. *Physiol Behav.* 2016 Oct 15; 165:28-34. doi: 10.1016/j.physbeh.2016.06.035. Epub 2016 Jun 30. PMID: 27374426.

Gupta RC. and Anadon A. (2018). Fipronil.

Hansson O, Zetterberg H, Buchhave P, Andreasson U, Londos E, Minthon L, Blennow K. Prediction of Alzheimer's disease using the CSF Abeta42/Abeta40 ratio in patients with mild cognitive impairment. *Dement Geriatr Cogn Disord.* 2007;23(5):316-20. doi: 10.1159/000100926. Epub 2007 Mar 19. PMID: 17374949.

Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science.* 2002 Jul 19;297(5580):353-6. doi: 10.1126/science.1072994. Erratum in: *Science* 2002 Sep 27;297(5590):2209. PMID: 12130773.

Harreiter J, Roden M. Diabetes mellitus – Definition, Klassifikation, Diagnose, Screening und Prävention (Update 2019) [Diabetes mellitus-Definition, classification, diagnosis, screening and prevention (Update 2019)]. *Wien Klin Wochenschr.* 2019 May;131(Suppl 1):6-15. German. doi: 10.1007/s00508-019-1450-4. PMID: 30980151

Huang HC, Jiang ZF. Accumulated amyloid-beta peptide and hyperphosphorylated tau protein: relationship and links in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 2009;16(1):15-27. doi: 10.3233/JAD-2009-0960. PMID: 19158417.

Hussain A, Audira G, Malhotra N, Uapipatanakul B, Chen JR, Lai YH, Huang JC, Chen KH, Lai HT, Hsiao CD. Multiple Screening of Pesticides Toxicity in Zebrafish and Daphnia Based on Locomotor Activity Alterations. *Biomolecules.* 2020 Aug 23;10(9):1224. doi: 10.3390/biom10091224. PMID: 32842481; PMCID: PMC7564125.

Izquierdo I, Medina JH. GABAA receptor modulation of memory: the role of endogenous benzodiazepines. *Trends Pharmacol Sci.* 1991 Jul;12(7):260-5. doi: 10.1016/0165-6147(91)90567-c. PMID: 1658996.

Kim MJ, Jung HS, Hwang-Bo Y, Cho SW, Jang HC, Kim SY, Park KS. Evaluation of 1,5-anhydroglucitol as a marker for glycemic variability in patients with type 2 diabetes

mellitus. *Acta Diabetol.* 2013 Aug;50(4):505-10. doi: 10.1007/s00592-011-0302-0. Epub 2011 Jun 18. PMID: 21688018.

Koga M, Hashimoto K, Murai J, Saito H, Mukai M, Ikegame K, Ogawa H, Kasayama S. Usefulness of glycated albumin as an indicator of glycemic control status in patients with hemolytic anemia. *Clin Chim Acta.* 2011 Jan 30;412(3-4):253-7. doi: 10.1016/j.cca.2010.10.014. Epub 2010 Oct 18. PMID: 20965159.

Kroner Z. The relationship between Alzheimer's disease and diabetes: Type 3 diabetes? *Altern Med Rev.* 2009 Dec;14(4):373-9. PMID: 20030463.

Lakstygai AM, de Abreu MS, Lifanov DA, Wappler-Guzzetta EA, Serikuly N, Alpsyshov ET, Wang D, Wang M, Tang Z, Yan D, Demin KA, Volgin AD, Amstislavskaya TG, Wang J, Song C, Alekseeva P, Kalueff AV. Zebrafish models of diabetes-related CNS pathogenesis. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2019 Jun 8;92:48-58. doi: 10.1016/j.pnpbp.2018.11.016. Epub 2018 Nov 23. PMID: 30476525.

Lynch MA. Long-term potentiation and memory. *Physiol Rev.* 2004 Jan;84(1):87-136. doi: 10.1152/physrev.00014.2003. PMID: 14715912.

Li L, Hölscher C. Common pathological processes in Alzheimer disease and type 2 diabetes: a review. *Brain Res Rev.* 2007 Dec;56(2):384-402. Doi :10.1016/j.brainresrev.2007.09.001. Epub 2007 Sep 11. PMID: 17920690.

Liu X, Zhang Y, Lin J, Xia Q, Guo N, Li Q. Social preference deficits in juvenile zebrafish induced by early chronic exposure to sodium valproate. *Front Behav Neurosci.* (2016) 10:1–8. doi: 10.3389/fnbeh.2016.00201.

Liu ZH, Li YW, Hu W, Chen QL, Shen YJ. Mechanisms involved in tributyltin-enhanced aggressive behaviors and fear responses in male zebrafish. *Aquat Toxicol.* 2020 Mar;220: 105408. doi: 10.1016/j.aquatox.2020.105408. Epub 2020 Jan 9. PMID: 31935571.

Lu Q, Sun Y, Ares I, Anadón A, Martínez M, Martínez-Larrañaga MR, Yuan Z, Wang X, Martínez MA. Deltamethrin toxicity: A review of oxidative stress and metabolism. *Environ Res.* 2019 Mar; 170:260-281. doi: 10.1016/j.envres.2018.12.045. Epub 2018 Dec 21. PMID: 30599291.

Maurer K, Volk S, Gerbaldo H (1997) Auguste D and Alzheimer's disease. *Lancet.*

349, 1546-1549.

Montgomery KC. The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behavior. *J Comp Physiol Psychol.* 1955 Aug;48(4):254-60. doi: 10.1037/h0043788. PMID: 13252152.

Morovic S, Budincevic H, Govori V, Demarin V. Possibilities of Dementia Prevention - It is Never Too Early to Start. *J Med Life.* 2019 Oct-Dec;12(4):332-337. doi: 10.25122/jml-2019-0088. PMID: 32025250; PMCID: PMC6993301.

Miyazaki A, Kohzuma T, Kasayama S, Koga M. Classification of variant forms of haemoglobin according to the ratio of glycated haemoglobin to glycated albumin. *Ann Clin Biochem.* 2012 Sep;49(Pt 5):441-4. doi: 10.1258/acb.2012.011192. Epub 2012 Jun 19. PMID: 22715294.

Murphy MP, LeVine H 3rd. Alzheimer's disease and the amyloid-beta peptide. *J Alzheimers Dis.* 2010;19(1):311-23. doi: 10.3233/JAD-2010-1221. PMID: 20061647; PMCID: PMC2813509.

Nguyen TT, Ta QTH, Nguyen TTD, Le TT, Vo VG. Role of Insulin Resistance in the Alzheimer's Disease Progression. *Neurochem Res.* 2020 Jul;45(7):1481-1491. doi: 10.1007/s11064-020-03031-0. Epub 2020 Apr 20. PMID: 32314178.

Norton WHJ, Manceau L, Reichmann F. The Visually Mediated Social Preference Test: A Novel Technique to Measure Social Behavior and Behavioral Disturbances in Zebrafish. *Methods Mol Biol.* 2019; 2011:121-132. doi: 10.1007/978-1-4939-9554-7_8. PMID: 31273697.

Ogi A, Licitra R, Naef V, Marchese M, Fronte B, Gazzano A, Santorelli FM. Social Preference Tests in Zebrafish: A Systematic Review. *Front Vet Sci.* 2021 Jan 22;7:590057. doi: 10.3389/fvets.2020.590057. PMID: 33553276; PMCID: PMC7862119.

Omer Ioana, Gabriela Popescu, and Simona Marica. "Correlations between cognitive decline and the variables of Age, Gender, and Level of Education in dementia." *Journal of Research in Gender Studies* 4.1 (2014): 1109.

Pham M, Raymond J, Hester J, Kyzar E, Gaikwad S, Bruce I ... Kalueff, A. (2012). Assessing social behavior phenotypes in adult zebrafish: shoaling, social preference, and mirror biting tests. In: *Zebrafish Protocols for Neurobehavioral Research*. Neuromethods (eds. Kalueff A. & Stewart A.) 231–246 (Humana Press, 2012).

Piggott MA (2013) Neurochemical pathology of dementia. In Denning T, Thomas A (Eds) Oxford Textbook of Old Age Psychiatry. Second edition. Oxford University Press, Oxford, 107-122.

Qi C, Kivipelto M, von Strauss E, (2009) Epidemiology of Alzheimer's disease: occurrence, determinants and strategies toward intervention. Dialogues in Clinical Neuroscience. 11, 2, 111-128

Rivera EJ, Goldin A, Fulmer N, et al. Insulin and insulin-like growth factor expression and function deteriorate with progression of Alzheimer's disease: link to brain reductions in acetylcholine. J Alzheimers Dis 2005;8:247-268.

Rodríguez F, López JC, Vargas P, Gómez Y, Broglio C, Salas C (2002) Conservation of spatial memory function in the pallial forebrain of reptiles and ray-finned fishes. J. Neurosci. 22(7):2894–2903. doi: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-07-02894.2002>.

Sato A. [Indicators of glycemic control --hemoglobin A1c (HbA1c), glycated albumin (GA), and 1,5-anhydroglucitol (1,5-AG)]. Rinsho Byori. 2014 Jan;62(1):45-52. Japanese. PMID: 24724426.

Saudek CD, Herman WH, Sacks DB, Bergenstal RM, Edelman D, Davidson MB. A new look at screening and diagnosing diabetes mellitus. J Clin Endocrinol Metab. 2008 Jul;93(7):2447-53. doi: 10.1210/jc.2007-2174. Epub 2008 May 6. PMID: 18460560.

Serrano-Pozo A, Frosch MP, Masliah E, Hyman BT. Neuropathological alterations in Alzheimer disease. Cold Spring Harb Perspect Med. 2011 Sep;1(1):a006189. doi: 10.1101/cshperspect.a006189. PMID: 22229116; PMCID: PMC3234452.

Sindhu KM, Banerjee R, Senthilkumar KS, Saravanan KS, Raju BC, Rao JM, Mohanakumar KP. Rats with unilateral median forebrain bundle, but not striatal or nigral, lesions by the neurotoxins MPP+ or rotenone display differential sensitivity to amphetamine and apomorphine. Pharmacol Biochem Behav. 2006 Jun;84(2):321-9. doi: 10.1016/j.pbb.2006.05.017. Epub 2006 Jul 3. PMID: 16820197.

Spiller RC. Potential biomarkers. Gastroenterol Clin North Am. 2011 Mar;40(1):121-39. doi: 10.1016/j.gtc.2011.01.001. PMID: 21333904.

Steinberg M, Shao H, Zandi P et al (2008) Point and 5-year period prevalence of neuropsychiatric symptoms in dementia: the Cache County Study. International Journal of Geriatric Psychiatry. 23, 2, 170-177.

Taylor J-P, Thomas A (2013) Alzheimer's disease. In Denning T, Thomas A (Eds) *Oxford Textbook of old Age Psychiatry*. Second edition. Oxford University Press, Oxford, 431-455.

Thangaleela S, Ragu Varman D, Sivasangari K, Rajan KE. Inhibition of monoamine oxidase attenuates social defeat-induced memory impairment in goldfish, (*Carassius auratus*): A possible involvement of synaptic proteins and BDNF. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 2021 Jan;239: 108873. doi: 10.1016/j.cbpc.2020.108873. Epub 2020 Aug 15. PMID: 32805442.

Toth, Miklos, and Bojana Zupan. "Neurobiology of anxiety." *Handbook of contemporary Neuropsychopharmacology* (2007).

Viola KL, Velasco PT, Klein WL. Why Alzheimer's is a disease of memory: the attack on synapses by A beta oligomers (ADDLs). *J Nutr Health Aging*. 2008 Jan;12(1):51S-7S. doi: 10.1007/BF02982587. PMID: 18165846.

Whitehouse PJ. The cholinergic deficit in Alzheimer's disease. *J Clin Psychiatry*. 1998;59 Suppl 13:19-22. PMID: 9771826.

Yamamoto, N., 2009. Studies on the teleost brain morphology in search of the origin of cognition. *J. Psychol. Res.* 51 (3), 154–167. <https://doi.org/10.1111/j.1468-5884.2009.00397.x>.

Zaccardi F, Webb DR, Yates T, Davies MJ. Pathophysiology of type 1 and type 2 diabetes mellitus: a 90-year perspective. *Postgrad Med J*. 2016 Feb;92(1084):63-9. doi: 10.1136/postgradmedj-2015-133281. Epub 2015 Nov 30. PMID: 26621825.

