



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

**DETERMINAREA UNOR ASPECTE DE BIOLOGIE
MOLECULARĂ ȘI RELEVANȚA MICROBIOMULUI ÎN
ETIOPATOFIZIOLOGIA BOLII PARKINSON**

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Conducător de doctorat:

C.S. I. DR. HABIL. CIOBÎCĂ ALIN-STELIAN

Student-doctorand:

ILIE OVIDIU-DUMITRU

IAȘI

2023

Mulțumiri

Chiar dacă suma experiențelor și a cunoștințelor acumulate în decursul anilor de studiu excede forma fizică cristalizată a prezentei teze de doctorat, rezerv această pagină pentru a-mi exprima gratitudinea față de toți cei care și-au lăsat amprenta asupra dezvoltării mele personale și profesionale pentru a transcende pe o nouă treaptă a carierei, finalizând împlinit etapa de student-doctorand.

În primul rând înaintez sincere mulțumiri conducătorului de doctorat, dl. C.S. I. dr. habil. Alin-Stelian Ciobîcă pentru încrederea pe care mi-a oferit-o pe parcursul celor trei ani de studiu, oferindu-mi libertatea de a pune în aplicare fiecare idee și pentru că m-a sfătuit și îndrumat să fac cele mai bune alegeri. Deși au fost momente de răscruce în care nu mai aveam idei sau poate că erau eronate, el a avut intuiția și răbdarea de a mă călăuzi pe drumul meu.

În egală măsură sunt recunoscător fiecărui membru al comisiei de îndrumare pentru timpul pe care mi l-au alocat și povața oferită. Acord considerații și recunoștință dlui. prof. univ. dr. Dumitru Cojocaru, dlui. prof. univ. dr. habil. Dragoș-Lucian Gorgan și dra. șef lucr. dr. Sabina-Ioana Cojocaru.

De asemenea, stima și prețuirea pentru susținere sunt dedicate dlui. C.S. II. dr. Teodor-Mihai Cosmin, dnei. șef lucr. dr. Roxana Popescu, dlui. conf. dr. habil. Romeo-Petru Dobrin și dlui. conf. dr. habil. Bogdan Doroftei din cadrul UMF Iași, dnei. prof. univ. dr. Carmen Solcan din cadrul USV Iași, și prof. univ. dr. habil. Mircea-Nicușor Nicoară, dar și colegilor mei dra. dr. Ioana-Miruna Balmuș, dra. dr. Mădălina-Andreea Robea, dna. dr. Roxana-Oana Cojocariu, dra. drd. Raluca-Elena Duță și nu în ultimul rând dnei. C.S. Jijie-Roxana Strungaru și dlui. C.S. Ștefan-Adrian Strungaru din cadrul UAIC Iași ce mi-au stat drept model și inspirație.

În final, dedic această teză membrilor familiei și prietenilor pentru înțelegere și suport dăruite necondiționat, în special în momentele de impas, dar mai ales dnei. drd. Niță Ilinca-Bianca.

Cuprins

Lista abrevierilor și cuvinte cheie.....	7
PARTE TEORETICĂ.....	13
Introducere.....	13
Scop, ipoteze și obiectivele tezei.....	16
Capitolul 1. Stadiul actual al cunoașterii.....	17
1.1. Aspecte introductive.....	17
1.2. Funcționalitatea microflorei gastrointestinale.....	18
1.3. Ipoteza lui Braak privind patogeniza bolii Parkinson.....	20
1.4. Agregatele de lipofuscină și boala Parkinson.....	21
Capitolul 2. Simptome gastrointestinale.....	23
2.1. Manifestări acute.....	23
2.1.1. Disfagia acută.....	23
2.1.2. Volvulusul colonic.....	23
2.1.3. Impactul fecal.....	23
2.1.4. Pseudo-obstrucția colonică acută.....	23
2.2. Manifestări cronice.....	24
2.2.1. Orofaringe și esofag.....	24
2.2.2. Stomac.....	25
2.2.3. Intestinul subțire.....	26
2.2.4. Colon.....	26
2.2.5. Anorectul.....	27
Capitolul 3. Tehnici dedicate reconstrucției microflorei.....	28
3.1. Pro-, pre- și sinbioticele.....	28
3.2. Transplantul de microbiotă fecală și terapia de transfer microbian.....	30
Capitolul 4. Inducerea experimentală a bolii Parkinson.....	35
4.1. Generalități.....	35

4.2. Rotenona, agonist dopaminergic?.....	36
PARTE EXPERIMENTALĂ.....	37
Capitolul 5. Materiale și metode de cercetare.....	37
5.1. Model experimental.....	37
5.2. Tipologii comportamentale.....	38
5.2.1. Locomoția.....	40
5.2.2. Agresivitatea.....	41
5.2.3. Sociabilitatea.....	41
5.3. Fenotipul asociat bolii Parkinson.....	42
5.3.1. Influența tulpinilor lactice probiotice asupra sociabilității și locomoției.....	42
5.3.2. Influența acidului valproic, a combinației de levodopa și carbidopa și a tulpinilor lactice probiotice asupra sociabilității și stărilor de agresivitate.....	42
5.3.3. Influența acidului valproic, a combinației de levodopa și carbidopa și a tulpinilor lactice probiotice asupra locomoției.....	43
5.4. Ant(agoniști) utilizați.....	44
5.4.1. Administrarea de rotenonă.....	44
5.4.2. Administrarea de acid valproic.....	44
5.4.3. Administrarea de levodopa și carbidopa.....	44
5.4.4. Administrarea de probiotice.....	44
5.5. Justificarea concentrațiilor administrate.....	45
5.5.1. Rotenona.....	45
5.5.2. Acidul valproic.....	45
5.5.3. Levodopa și carbidopa.....	45
5.5.4. Tulpinile lactice probiotice.....	46
5.6. Testarea comportamentală.....	46
5.6.1. Testul de interacțiune (anti)socială, agresivitatea și locomoția.....	46
5.6.2. Testul de activitate locomotorie.....	49
5.7. Eutanasierea, recoltarea și repartizarea probelor.....	50

5.8. Determinarea biomarkerilor stresului oxidativ.....	51
5.8.1. Determinarea activității superoxid dismutazei.....	53
5.8.2. Determinarea activității glutatation peroxidazei.....	53
5.8.3. Determinarea nivelului malondialdehidei.....	53
5.8.4. Metoda Bradford de cuantificare a proteinelor solubile.....	53
5.9. Reacția de polimerizare în lanț în timp real.....	53
5.10. Determinarea nivelului de dopamină.....	54
5.11. Analiza histologică și imunohistologică.....	55
5.12. Analiza statistică.....	56
Capitolul 6. Rezultate.....	58
6.1. Testul de interacțiune socială.....	58
6.1.1. Expunerea la 2 µg/L rotenonă.....	58
6.2. Testul comportamentului anti-social.....	58
6.2.1. Expunerea la 2,5 µg/L rotenonă.....	58
6.3. Testul oglinzii.....	60
6.3.1. Expunerea la 2,5 µg/L rotenonă.....	60
6.4. Evaluarea activității locomotorii.....	61
6.4.1. Expunerea la 2 µg/L rotenonă.....	61
6.4.2. Expunerea la 2,5 µg/L rotenonă.....	64
6.5. Rotirea în sens invers acelor de ceasornic.....	68
6.5.1. Expunerea la 2,5 µg/L rotenonă.....	68
6.6. Evaluarea biomarkerilor oxidativi.....	71
6.6.1. Expunerea la 2 µg/L rotenonă.....	71
6.6.2. Expunerea la 2,5 µg/L rotenonă.....	72
6.7. Determinarea modificărilor expresiei genice.....	73
6.7.1. Expunerea la 2,5 µg/L rotenonă.....	73
6.8. Stabilirea nivelului de dopamină.....	74

6.8.1. Expunerea la 2,5 µg/L rotenonă.....	74
6.9. Evidențierea alterărilor histologice prin imunohistochimie.....	75
6.9.1. Expunerea la 2,5 µg/L rotenonă.....	75
Capitolul 7. Discuții.....	78
7.1. Impactul a 2 µg/L rotenonă asupra sociabilității și locomoției.....	78
7.2. Impactul a 2,5 µg/L rotenonă asupra caracterului anti-social și agresivității.....	80
7.3. Impactul a 2,5 µg/L asupra activității locomotorii.....	81
7.4. Impactul a 2 µg/L rotenonă asupra biomarkerilor oxidativi.....	83
7.5. Impactul a 2,5 µg/L rotenonă asupra biomarkerilor oxidativi.....	84
7.6. Impactul a 2,5 µg/L rotenonă asupra expresiei genelor.....	85
7.7. Impactul a 2,5 µg/L rotenonă asupra nivelului de dopamină.....	86
7.8. Modificările histologice asociate administrării a 2,5 µg/L.....	87
Concluzii generale.....	89
Bibliografie selectivă.....	92
Articole publicate.....	128

Lista abrevierilor și cuvinte cheie

PD - boala Parkinson
AD - boala Alzheimer
SN - substanța neagră
DA - dopamină
LB - corpi Lewy
 α S - alfa sinucleină
DIP - parkinsonism indus medicamentos
GM - microfloră gastrointestinală
HMP - Proiectul Microbiomului Uman
HGP - Proiectul Genomului Uman
iHMP - Proiectul Integrativ al Microbiomului Uman
IBS - sindrom de colon iritabil
GI - tract gastrointestinal
GBA - axa intestin-creier
IESC - celulă stem a epiteliului intestinal
GC - celulă calciformă
EEC - celulă enteroendocrină
IEC - celulă a epiteliului intestinal
GALT - țesut limfoid asociat tractului gastrointestinal
MUC2 - mucină 2
AMP - peptidă antimicrobiană
TFF3 - factor trefoil 3
RELM β - molecula asemănătoare rezistinei- β
LPS - lipopolizaharid
CD - cluster de diferențiere
BBB - bariera hematoencefalică
HPA - axa hipotalamo-hipofizo-suprarenală
PPR - receptor de recunoaștere a modelului
TLR - receptor de tip taxă
NOD - receptor asemănător domeniului oligomerizării care leagă nucleotide
CLR - receptor de lectină tip C
RLR - receptor asemănător genei I inductibil de acid retinoic

ALR - receptor absent în melanomul 2
cGAS - GMP-AMP sintaza ciclică
RAGE - receptor pentru produsele finale de glicare avansată
NF-κB - factorul nuclear kappa B
IRF3 - factorul de reglementare a interferonului 3
PAMP - model molecular asociat agentului patogen
DAMP - model molecular asociat daunelor
DC - celulă dendritică
APC - celulă prezentatoare de antigen
MC - celulă microfold
Th - T ajutătoare
IgA - imunoglobulină A
SCFA - acid gras cu lanț scurt
GPCR - receptor cuplat la proteinele G
NA - noradrenalină
5-HT - 5-hidroxitriptamină
EC - celulă enterocromafină
ASF - flora Schaedler alterată
ACh - acetilcolină
VN - nerv vag
ENS - sistem nervos enteric
OS - stres oxidativ
DNV - nucleu dorsal al vagului
LF - lipofuscină
SNC - sistem nervos central
DMT1 - transportor de metale divalent-1
FPN1 - feroportina-1
NM - neuromelanină
MPTP - 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridină
CT - computer tomograf
SC - colită stercorală
DRE - examen rectal digital
ACPO - pseudo-obstrucție colonică acută
BMS - sindromul gurii arzătoare

QOL - calitatea vieții
VF - videofluoroscopia
HRM - manometrie de înaltă rezoluție
LES - sfincter esofagian inferior
DGE - golire gastrică întârziată
GET - timp de golire gastrică
WMC - capsulă de motilitate fără fir
SBTT - timp de tranzit a intestinului subțire
CTT - timp de tranzit colonic
WGTT - timp de tranzit intestinal
GES - stimulator electric gastric
SIBO - suprapopularea bacteriană a intestinului subțire
CFU - unități formatoare de colonii
HBT - test de respirație cu glucoză
ACG - Colegiul American de Gastroenterologie
HRAM - manometrie anorectală de înaltă rezoluție
MR - rezonanță magnetică
FAO - Organizația pentru Alimentație și Agricultură
WHO - Organizația Mondială a Sănătății
FMT - transplant de microbiotă fecală
CDI - infecție cu *Clostridium difficile*
IBD - boală inflamatorie intestinală
MTT - terapie de transfer microbian
LBP - produs bioterapeutic viu
FIFRA - Legea Federală Referitoare la Insecticide, Fungicide și Rodenticide
ATP - adenzin trifosfat
ROS - specie reactivă de oxigen
ETC - lanț de transport de electroni mitocondrial
WT - tip sălbatic
UE - Uniunea Europeană
ARRIVE - Cercetarea Animalelor: Raportarea Experimentelor *In Vivo*
SOD - superoxid dismutaza
GPx - glutation peroxidaza
MDA - malondialdehidă

ARN - acid ribonucleic
 ELISA - test imunosorbent legat de enzimă
 HE - hematoxină-eozină
 IHC - imunohistochimie
 GFAP - proteină glială acidă fibrilară
 S100b - S100 proteina de legare a calciului B
 PCNA - antigen nuclear celular proliferant
 p53 - antigen tumoral p53
 cox4i1 - citocrom c oxidaza subunitatea 4 izoforma 1, mitocondrială
 PBS - soluție salină tamponată cu fosfat
 IgG - imunoglobulină G
 DAB - 3,3'-diaminobenzidină
 ANOVA - analiza varianței
 SEM - eroare standard a mediei
 NSC - celulă stem neuronală
 RGC - celulă radială glială
 ip - injecție intraperitoneală
 PFC - cortex prefrontal
 SVZ - zona subventriculară

boala Parkinson, pește zebură, *Danio rerio*, rotenonă, acid valproic, levodopa, carbidopa, probiotice, *Bifidobacterium longum* BB536, *Lactobacillus rhamnosus* HN001, *Lactobacillus casei* W56, *Lactobacillus acidophilus* W22, *Lactobacillus paracasei* W20, *Lactobacillus salivarius* W24, *Lactobacillus lactis* W19, *Lactobacillus plantarum* W62, *Bifidobacterium lactis* W51, *Bifidobacterium lactis* W52, *Bifidobacterium bifidum* W23, sociabilitate, anti-social, agresivitate, locomoție, labirint T, conformații tridimensionale, timp petrecut în brațe, stare activă, distanța înotată, viteză, episoade de imobilitate, rotație în sens invers acelor de ceasornic, stres oxidativ, SOD, GPx, MDA, Bradford, spectrofotometrie, expresie genică, RT-PCR, *LRRK2*, *PINK1*, *PARKIN*, *alfa-SNCA*, *ACTIN*, ELISA, dopamină, imunohistochimie, GFAP, S100b, PCNA, p53, cox4i1

PARTE TEORETICĂ

Introducere

PD afectează între 8,7 - 9,3 milioane de indivizi la nivel global, ocupând în prezent a doua poziție ca frecvență după AD. Se preconizează chiar o devansare, respectiv dublare a numărului de cazuri (Dorsey și colab., 2007) până în 2050 (Poewe și colab., 2017). Cumulativ, AD și PD exercită o presiune financiară colosală asupra resurselor sistemelor de sănătate publică, costuri care se vor ridica la 357 de miliarde de euro în următoarele trei decenii (Maresova și colab., 2016).

Contrar așteptărilor, există un număr relativ limitat de studii centrate pe stabilirea prevalenței și mortalității cauzate de PD. Ultimele statistici publicate indicau o prevalență globală de 6,1 milioane de cazuri și o mortalitate de 3,2 milioane în 2016 (Dorsey și colab., 2018). La nivelul Europei, prevalența estimată oscilează în jurul valorii de 65,6 - 12,500, iar incidența între 5 și 346 la 100,000 de locuitori (von Campenhausen și colab., 2005), cifre care sunt corelate cu vârsta, localizarea geografică și sexul indivizilor, în special la bărbații cvincvagenari (Pringsheim și colab., 2014).

În conformitate cu scala de clasificare a evoluției bolii definită prin cele cinci stadii ale severității introdusă de (Hoehn și Yahr, 1967), în paralel cu vârsta de debut ca prim factor de risc endogen, PD poate avea o formă juvenilă (< 20 ani), precoce (20 - 50 ani) și tardivă (> 50 ani) (Tysnes și Storstein, 2017).

Această patologie se caracterizează printr-o degenerare ireversibilă a neuronilor dopaminergici din SN, proces unidirecțional restricționat în stadiile prodromale doar la segmentul ventrolateral fără afectarea neuronilor dopaminergici mezencefalici. În consecință cauzează o inhibare a biosintezei de DA și conduce la o agregare a LB pozitivi pentru α S. Astfel, la pacienții diagnosticați s-a observat o predominanță a simptomelor motorii, dar și predispoziția către disfuncții non-motorii. Semnele clinice pentru un diagnostic diferențial propice reunite sub umbrela parkinsonismului includ tremor esențial, rigiditate și bradikinezie. Deteriorarea echilibrului postural survine gradual în decursul vieții pacientului (Poewe și colab., 2017).

În ciuda celor mai bune eforturi, etiologia PD rămâne obscură. Studiile recente au dezvăluit că PD posedă un substrat multifactorial, reflectat fie de o expresie anormală a genelor (Blauwendraat și colab., 2020), factori de stres endogeni și/sau exogeni, dar și stilul de viață (Ascherio și Schwarzschild, 2016). Datorită heterogenității clinice,

nomenclatura a fost constant reevaluată pentru a putea distinge PD de cauză idiopatică, suprapunerea demenței în PD, demența cu LB, dar și alte tipuri (Marras și colab., 2016).

Simptomatologia non-motorie este complexă, cu ramificații pregnante deoarece înglobează tulburări neuropsihiatrice frecvent observate în rândul populației sănătoase. Un rol subexplorat, dar crucial în PD este jucat de anxietate (Chen și Marsh, 2014) și depresie (Marsh, 2013) ca promotori și/sau indicatori ai PD. Analog pentru pacienții sănătoși expuși stărilor de stres prelungite ca grup de risc (Mah și colab., 2016; Trifu și colab., 2020). Mai mult decât atât, această paletă încorporează deficiențe ale somnului, autonome, senzoriale, dar și gastrointestinale (Chaudhuri și Schapira, 2009).

PD este o boală neurologică care beneficiază de tratament simptomatic (Charvin și colab., 2018), chirurgical sau alternativ după caz (Sharma și colab., 2020) în stadiile avansate ale bolii comparativ cu AD. Pe de cealaltă parte pot deriva circumstanțe particulare în care pacienții aflați sub tratament medicamentos cu antipsihotice pot manifesta efecte secundare, sindrom cunoscut sub pseudonimul de DIP (Brigo și colab., 2014). Farmaco-cinetica/dinamica este modelată în principal de GM care s-a dovedit a fi veriga lipsă în calitate de vector transportor, dar și modulator, în special al parametrilor mediului intern, independent de vârstă și sex (Scheperjans, 2016).

Scop, ipoteze și obiectivele tezei

Tema abordată orbitează în jurul potențialului neinvaziv al utilizării tulpinilor lactice probiotice ca strategie alternativă de management, concomitent cu emiterea unor ipoteze care vizează testarea unui anticonvulsivant, dar și a principalilor agenți administrați în boala Parkinson ca ultimă barieră defensivă.

În acest fel s-a urmărit cum expunerea cronică la concentrații diferite de rotenonă administrată singură sau în combinație cu acidul valproic, levodopa și carbidopa sau cu probioticele modifică parametrii interni la peștele zebură (*Danio rerio*) ca model de studiu al bolii Parkinson.

Deoarece este un domeniu de activitate relativ nou, ideea de manipulare a microflorei gastrointestinale în scopuri clinice este promițătoare și din păcate încă insuficient explorată. Astfel, în cadrul prezentei lucrări s-a urmărit:

➤ Evaluarea conformațiilor spațiale ale comportamentului social, anti-social, agresiv și locomotor în urma expunerii cronice a peștilor zebură la concentrații distincte de

rotenonă, personalizate de acid valproic, levodopa și carbidopa, respectiv concentrații prestabilite de tulpini lactice probiotice;

- Evaluarea statusului biomarkerilor oxidativi prin spectrofotometrie (SOD, GPx, MDA);
- Evaluarea expresiei genice prin RT-PCR a unui panel de gene specifice PD (*LRRK2*, *PINK1*, *PARKIN*, *alfa-SNCA*, *ACTIN*);
- Evaluarea nivelului de dopamină prin ELISA;
- Evaluarea modificărilor histologice prin intermediul protocoalelor de imunohistochimie (GFAP, S100b, PCNA, p53 și cox4i1).

Capitolul 1. Stadiul actual al cunoașterii

1.1. Aspecte introductive

HMP marcat de faza „Jumpstart” este lansat abia la finele anului 2007 și declarat oficial încheiat în anul 2013. A constituit cel mai promițător proiect de cercetare după HGP care a avut drept principale obiective: (I) explorarea relației simbiotice, (II) dezvoltarea unor noi algoritmi de lucru și (III) analiza computațională a variabilității microbiomului (Group și colab., 2009).

În vederea aprofundării acestei direcții de cercetare se naște iHMP un an mai târziu, fiind finalizat în anul 2016. În contrast cu predecesorul său, iHMP a fost orientat în principal către caracterizarea completă a microbiomului uman, în speță a impactului exercitat de etapele tranzitorii asupra structurii și compoziției GM: (I) sarcina, tipul de naștere și nașterea prematură, (II) patogeniza IBS și (III) influența stresorilor asupra pacienților cu prediabet (Consortium, 2019).

Numărul total de microorganisme comensale, simbiotice și patogene îl excede pe cel al celulelor eucariote cu un factor de zece. Aceste comunități sunt grupate în patru ecosisteme majore: piele (Byrd și colab., 2018), cavitate bucală (Kilian și colab., 2016), aparat urogenital (Jones-Freeman și colab., 2021) și tract digestiv (10^{14}) în următoarele segmente: stomac, intestin subțire (duoden, jejun, ileon), colon și apendice (Kastl și colab., 2020). Prin raportare la genomul uman, GM posedă de peste 150,000 de ori mai multe gene bacteriene (Turnbaugh și colab., 2007), a cărei producție de biomasă este superioară greutatea creierului uman (Macfarlane și Macfarlane, 2003).

GI găzduiește o mie cincizeci și șapte de specii în ponderi diferite (8, 92, 957) care au fost deja cultivate și analizate filogenetic, printre care se numără *Archaea*, *Eukarya* și *Bacteria* (Rajilić-Stojanović și de Vos, 2014), cu mențiunea că cele mai abundente colectivități aparțin încrengăturilor *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria* și *Verrucomicrobia* (Hollister și colab., 2014). Rezumativ, *Ruminococcus*, *Bacteroides* și *Prevotella* sunt enterotipurile constitutive ale GM (Arumugam și colab., 2011; Bäckhed și colab., 2005).

1.2. Funcționalitatea microflorei gastrointestinale

Homeostazia GM este asigurată de GBA prin două mecanisme: (1) segregare și (2) mediere. Segregarea implică delimitarea prin intermediul unei bariere fizice și biochimice microflora de celulele imune gazdă, pe când medierea impune emiterea de semnale dintre microfloră și celulele imune gazdă. Epiteliul intestinal alături de microorganismele comensale formează bariera gastrointestinală, principalul gardian care previne aderența patogenilor de peretele intestinal (Okumura și Takeda, 2017).

Sistematic, epiteliul intestinal este organizat în monostrat din criptele lui Lieberkühn (glande intestinale) situate în lamina propria și vilozități intestinale în lumen, înveliș care este reînnoit constant de IESC pluripotente care se regăsesc la baza criptelor. Funcțiile cheie precum proliferarea, diferențierea și potențialul funcțional sunt reglate de nișa celulelor stem aflate în proximitate (Crosnier și colab., 2006; van der Flier și Clevers, 2009).

Bariera intrinsecă reunește IESC secretoare printre care se numără GC, Paneth și EEC, cele din urmă reprezentând legătura dintre sistemul neuroendocrin enteric și cel neuroendocrin central care asigură funcția digestivă și previn penetrarea epiteliului intestinal. IEC sunt protejate de structuri imune cum ar fi plăcile Peyer și ale criptelor, dar și foliculi limfoizi, structuri reunite în GALT (Hill și Artis, 2010; Kamada și colab., 2013). GC ale intestinului subțire secretă MUC2 (Johansson și colab., 2008), cuplată de AMP și produsele secundare ale GC, TFF3 și RELM β care consolidează bariera extrinsecă împotriva acțiunii antagonice a LPS patogene (Bevins și Salzman, 2011).

În esență, instabilitatea creată se definește printr-o inflamație de grad scăzut, moarte celulară și un dezechilibru al energiei celulare (Noble și colab., 2017). Expresia anormală a CD1, CD4 și CD17 (Kamada și colab., 2013) inhibă răspunsurile celulelor imune periferice (Berer și Krishnamoorthy, 2012) ceea ce atrage după sine o perturbare a integrității BBB.

Limfocitele și macrofagele sunt preponderent responsabile de controlul cascadei imune. Expunerea prelungită stimulează permeabilitatea intestinală ca urmare a denaturării joncțiunilor strânse datorită acțiunii endotoxinelor patogene. În consecință induc așa-numitul „intestin permeabil” caracterizat printr-o disbioză/disbacterioză (Hakansson și Molin, 2011) care se răsfrânge asupra funcționalității și integrității HPA (Rea și colab., 2016).

Enterocitele sunt direct implicate în apărarea gazdă deoarece prezintă receptori conservați evolutiv, codificați pe linie germinativă numiți PPR. Acești senzori reunesc familii de receptori printre care TLR (Abreu, 2010; Kawai și Akira, 2011), NOD (Motta și colab., 2015), CLR (Brown și colab., 2018), RLR (Kell și Gale, 2015), ALR (Lugrin și Martinon, 2018), cGAS (Sun și colab., 2013) și RAGE (Palanissami și Paul, 2018) care marchează activarea factorilor de transcriere NF- κ B și IRF3.

NOD îndeplinește o funcție similară cu cea a enterocitelor prin vizarea unor șabloane microbiene cunoscute sub denumirea de PAMP. Adițional, PAMP activează NF- κ B, NOD, și DAMP (Williams și colab., 2010). Patogenii sechestrați sunt prezentați DC în calitate de APC (Williams și colab., 2010), iar alături de MC preiau APC și le prezintă mai departe celulelor CD4 naive, proces tranzitoriu diferențierii în celule Th și sintezei de IgA (Hooper și Macpherson, 2010).

Bacteriile comensale anaerobe stimulează fermentarea carbohidraților nedigerabili, pe de o parte rezultând SCFA (acetat, butirat și propionat), dar și produse secundare (Wang și colab., 2019). SCFA se leagă la rândul lor de GPCR, GPR41, GPR43 și GPR109a cu rol în reglarea balanței energetice și a reacțiilor inflamatorii (Levy și colab., 2017; Silva și colab., 2020). În timp ce butiratul este implicat în blocarea acumulării de produse secundare toxice și modularea descendentă a reacțiilor inflamatorii (Canani și colab., 2011), acetatul și propionatul traversează bariera sangvină enterică participând în calitate de substraturi la procesul de gluconeogeneză și lipogeneză (Krishnan și colab., 2015; Silva și colab., 2020).

De asemenea, GM este implicată și în sinteza complexului de vitamine B (Yoshii și colab., 2019), acid pantotenic (B₅) și cianocobalamina (B₁₂), dar și a unor neurotransmițători, în particular NA și DA (Strandwitz, 2018), dar și 5-HT. EC sunt responsabile în acest context de sinteza, stocarea și eliberarea de 5-HT în vederea reglării motilității intestinale. Implicarea *Bacteroides* spp., ASF și *Clostridium* formatoare de spori a fost descrisă anterior în timpul colonizării intestinale (Ma și colab., 2018). B₁₂ este un modulator al producției de ACh și cortizol în glanda suprarenală. Un nivel suboptimal al

acestor vitamine a fost raportat într-o multitudine de tulburări gastrointestinale, psihiatrice și hematologice (Chi și colab., 2017).

1.3. Ipoteza lui Braak privind patogeniza bolii Parkinson

Cercetătorii au emis în anii '80 o supoziție în ceea ce privește patodinamica structurilor Lewy potrivit căreia originea PD rezidă la nivelul GI (Edwards și colab., 1992). Studiile realizate au furnizat dovezi suplimentare referitoare la evoluția cronologică din spatele PD (Braak și colab., 1996), asociată cu modificări neuropatologice specifice în neuronii olfactivi și VN, ceea ce sugerează că PD ar putea fi declanșată într-un situs periferic înainte de a ținti creierul, agregate de α S fiind observate în plexul mienteric (Auerbach) al ENS. Definită prin șase stadii, progresia PD este descrisă prin sistemul propus de Braak; patologia rombencefalului în stadiul I și II, mezencefalul în stadiul III și IV, punct în care devin vizibile simptomele motorii, iar cele cognitive în stadiul V și VI când neocortexul este complet afectat (Braak și colab., 2003).

Braak alături de colaboratorii săi au înaintat cu nouăsprezece ani în urmă o nouă ipoteză „intestin-creier” conform căreia PD ar putea fi cauzată de un patogen neurotropic care penetrează bariera mucoasei (Hawkes și colab., 2007) și induce OS prin declanșarea unui răspuns inflamator imun prin care sunt produse gradual plieri deficitare ale α S. Agregatele produse migrează către ENS prin transport axonal anterograd și retrograd (Ulusoy și colab., 2017, 2013) prin VN către DNV și implicit în creier (Braak și colab., 2003). Incluziuni gastrice imunoreactive de α S au fost observate în plexurile Auerbach și submucos Meissner via neuroni postganglionici care pot declanșa formarea de α S și fibrile (Braak și colab., 2006). Astfel, această proteină aberantă ar putea juca rol de matriță pentru formarea altor structuri care se răspândesc de la neuron la neuron într-o manieră asemănătoare prionilor. În acest context, GM ar putea fi intermediarul deoarece o dereglare a eubiozei gazdă conduce la o reactivitate imună care perturbă BBB, cauzând o inflamație sistemică și neurodegenerare (Jan și colab., 2021).

1.4. Agregatele de lipofuscină și boala Parkinson

Îmbătrânirea, ca atribut inerent ciclului finit al vieții induce o dereglare progresivă a homeostaziei, în special anomalii moleculare (Riga și colab., 2015) motiv pentru care ascensiunea biomedicinei constituia o etapă imperativă (Jung și colab., 2007). Cele mai multe studii din literatura actuală au avut ca principal obiectiv stabilirea unei granițe între originea LF în comparație cu cea a ceroidului (Porta, 2002), principalii markeri ai

vulnerabilității creierului, OS și patologiilor legate de senescență/senilitate (Riga și Riga, 1995).

Chiar dacă influențează un spectru similar de boli, era necesară o diferențiere clară (Seehafer și Pearce, 2006). Profilurile caracteristice de îmbătrânire neuropatologică sunt influențate de concentrația lipopigmentului care generează o cascadă de evenimente negative la nivel subcelular. Aceste consecințe negative specifice și asociate acumulării de lipopigment au multiple efecte dăunătoare asupra homeostaziei neuronilor și gliei, de la funcția neuronală până la fiziologia SNC (Riga și Riga, 1995).

Astfel, agregatele granulare de LF, în paralel cu o supraexprimare a α S par a fi direct implicate în degenerarea selectivă a neuronilor dopaminergici (Lv și colab., 2011). Adicional, supraexprimarea DMT1 și inhibarea FPN1 se reflectă în nivelul de fier în SNC, ceea ce sugerează mai departe implicarea în degenerarea selectivă a neuronilor dopaminergici (Lv și colab., 2011).

S-a demonstrat că doar acele tipuri neuronale care conțin LF sau NM indică o susceptibilitate crescută la modificări patologice, inclusiv modificări citoscheletice și depozite de LB cu α S (Braak și colab., 2001). α S pare a fi un constituent al depozitelor de LF prezente în neuronii SN la pacienții cu PD și în neuronii nigrali ai șoarecilor tratați cu MPTP, sugerând că depozitele de LF pot avea un rol în degenerarea selectivă a neuronilor nigrali (Braak și colab., 2001; Meredith și colab., 2002).

În regiuni non-dopaminergice precum nucleii medulari care sunt afectați în fazele precoce ale PD (Braak și colab., 2001) se acumulează LB și granule de LF (Wellings și colab., 2017), identificată și în depozitele de LF ale neuronilor medulari (Braak și colab., 2003).

Capitolul 2. Simptome gastrointestinale

2.1. Manifestări acute

2.1.1. Disfagia acută

Este un simptom prevalent în PD cu debut gradual și evoluție acută sau cronică în cazuri particulare. Impactul pe care îl are bolusul alimentar sau un corp străin ar trebui întotdeauna luate în considerare, mai ales dacă funcțiile secretorii sunt afectate, de unde și prioritizarea efectuării unei endoscopii dacă disfagia acută este asociată cu debutul acut al odinofagiei (Suttrup și Warnecke, 2016).

2.1.2. Volvulusul colonic

Poate surveni fie la nivelul colonului sigmoid, fie în cecum, dar rar cauzează o obstrucție a intestinului gros, iar netratat progresează către gangrenă intestinală. Volvulusul cecal este comun la pacienții tineri, corelat cu o mobilitate cecală crescută, pe când cel sigmoid la bărbații septuagenari la care se adaugă tulburări neuropsihiatrice, constipație de lungă durată sau dismotilitate colonică. Chiar dacă prezentarea poate fi (sub)acută, asociată cu o agravare progresivă a durerilor abdominale, la mai bine din jumătate dintre pacienți se recurge la o radiografie abdominală sau la CT abdominal pentru a exclude suspiciunea de obstrucție. Managementul volvulusului colonic constă în reducerea endoscopică dacă nu se suspectează o necroză intestinală, deși există risc de recurență. În astfel de situații, rezecția electivă după reducerea endoscopică inițială poate fi necesară în vederea evitării riscului de recurență. În caz contrar se realizează o rezecție sigmoidiană de urgență dacă colonul nu este viabil sau perforat (Bauman și Evans, 2018; Gingold și Murrell, 2012).

2.1.3. Impactul fecal

Unul dintre numeroasele consecințe ale constipației prelungite constă în amplificarea riscului de declanșare a impactului fecal, uneori SC. Un DRE este recomandat tuturor pacienților. Repercusiunile impactului fecal se răsfrâng în regiunea rectului proximal și colonului sigmoid, motiv pentru care radiografia abdominală ar trebui efectuată dacă DRE este negativ. Strategiile de management actuale includ dezimpactarea colonică dacă cea manuală sau clismele eșuează (Fernando și Sarma, 2021; Obokhare, 2012).

2.1.4. Pseudo-obstrucția colonică acută

Cunoscută și sub numele de sindromul Ogilvie, ACPO reunește simptome de obstrucție colonică, dar cu absența oricărui blocaj mecanic. O serie de condiții asociate acestei afecțiuni au fost descrise, inclusiv perturbarea electrolică, infecțiile, medicația, intervențiile chirurgicale și bolile neurologice. În practică, diagnosticul este stabilit prin efectuarea radiografiei abdominale/CT abdominal pentru a putea exclude obstrucția mecanică. Terapia conservatoare trebuie demarată în faza incipientă prin repaus digestiv și corectarea dezechilibrelor (hidro)electrolitice și monitorizarea pentru potențialele ischemii intestinale și perforații. Neostigmina sau agonistul opioid metilnaltrexonă administrate intravenos sunt utilizate în caz de eșec în urma tratamentului suportiv, respectiv decompresia colonoscopică, chirurgicală sau percutanată dacă nu există nicio îmbunătățire a stării pacientului și în situațiile de urgență (Harnsberger, 2019; Jain și Vargas, 2012).

2.2. Manifestări cronice

2.2.1. Orofaringe și esofag

2.2.1.1. Sialoree

Hipersalivația debutează târziu în PD, probabil secundară unei pierderi a reflexului deglutiției și afectare motorie a mușchilor faringieni. Chiar dacă nu promovează comorbidități, simptomele motorii în PD, hipomimia și camptocormia ar putea exacerba secreția. O metodă convențională eficientă s-a dovedit a fi mestecatul de gumă. Efectele secundare asupra cavității bucale ale medicamentelor anticolinergice, glicopirilatului și atropinei trebuie luate în considerare înainte de inițierea unui tratament cu acestea. Bromura de ipratropiu este o alternativă deoarece posedă o toxicitate sistemică redusă, dar care nu a îmbunătățit obiectiv, ci doar subiectiv sialoreea, iar injecțiile glandelor parotide sau submandibulare cu toxină botulinică sunt administrate doar în situațiile severe (Lakraj și colab., 2013; Miller și colab., 2019).

Pacienții cu PD mai experimentează afecțiuni orale și dentare. Aceștia acordă o atenție infimă igienei orale în contrast cu pacienții sănătoși datorită diminuării dexterității periajului eficient și dificultății deschiderii maxilarului. Drept urmare, tulburări periodontale și temporomandibulare, bruxism, luxație mandibulară, dar și BMS sunt frecvent prezente în pacienții cu PD. Sialoreea ar putea induce modificări ale pH-ului, iar xerostomia influențează mecanismele de autocurățare ale cavității bucale (Zlotnik și colab., 2015).

2.2.1.2. Disfagia

Caracterizată prin dificultatea inițierii eficiente a deglutiției datorită simptomelor motorii ale bradikineziei și controlul motor al limbii, disfagia afectează negativ QOL (Keage și colab., 2015; Suttrup și Warnecke, 2016). În acest context, pacienții sunt îndrumați pentru o evaluare orofaringiană și/sau esofagiană ghidată de anamneza și starea clinică deoarece în perspectivă poate cauza malnutriție, scădere ponderală și pneumonie de aspirație (Suttrup și Warnecke, 2016). VF este considerată a fi standardul de aur în evaluarea disfuncției orofaringiene (Martin-Harris și Jones, 2008). LB au fost detectați în multiple situsuri printre care se numără plexul mienteric esofagian cu ajutorul sistemelor HRM, radiografiei cu bariu, dar și scintigrafiei care indică anomalii ale corpului esofagian și LES, dar și în nervul glosfaringian și superior intern al nervului laringian (Bushman și colab., 1989; Potulska și colab., 2003; Su și colab., 2017; Tanei și colab., 2021).

2.2.2. Stomac

2.2.2.1. Gastropareza

DGE este caracterizată printr-o reducere a motilității stomacului în absența obstrucției mecanice, simptomatic indicând o gastropareză, printre cele mai comune simptome numărându-se greață, balonare, vărsături, pierderea în greutate, apetit redus și sațietate precoce. Metodele scintigrafice sunt în prezent utilizate pentru măsurarea golirii gastrice, dintre care scintigrafia de masă solidă este frecvent utilizată pentru estimarea GET, iar WMC s-a dovedit a fi o alternativă fiabilă care măsoară cu acuratețe GET, SBTT, CTT și WGTT. Tratamentul constituie o adevărată provocare deoarece levodopa a fost documentată ca agent premergător al DGE într-o manieră dependentă de doză, pe când metoclopramida, domperidona, eritromicina, agonisti 5-HT, nizatidina, relamorelina sunt agenți care nu traversează BBB, nu au primit aprobare sau au fost retrași, studiile sunt limitate sau sunt în fază experimentală. Injectarea sfincterului piloric cu botulină ar putea avea un efect benefic în diminuarea gastroparezei, la fel și implantarea GES pentru cazurile refractare (Camilleri și colab., 2018; Parkman și colab., 2004; Usai-Satta și colab., 2020).

*2.2.2.2. Infecția cu *Helicobacter pylori**

Independent de implicarea *Helicobacter pylori* ca factor de risc în cancerul gastric și ulcerul peptic gastro-duodenal, inflamația cronică sistemică ar putea reprezenta un factor cauzal al PD. Cert este că prezența acestei bacterii interferează în strategiile actuale de management. Eradicarea *Helicobacter pylori* îmbunătățește nu numai absorbția levodopei, dar și simptomatologia motorie. Acest subiect este subexplorat, motiv pentru care au fost propuse două mecanisme teoretice cu scopul de a explica relația patofiziologică dintre infecția cu *Helicobacter pylori* și PD. Specific, cauzează un efect neurotoxic prin creșterea nivelului de glucozide colesterolice care provoacă distrugerea neuronilor dopaminergici (Schulz și colab., 2006) sau traversarea de către *Helicobacter pylori* a BBB prin inițierea apoptozei neuronilor dopaminergici (Dobbs și colab., 2008; Kountouras și colab., 2012).

2.2.3. Intestinul subțire

2.2.3.1. Suprapopularea bacteriană a intestinului subțire

Deși microflora intestinului subțire este o componentă integrativă a GM, la pacienții cu PD s-a confirmat existența unei suprapopulări bacteriene. Acest fenomen este cunoscut sub numele de SIBO, cel mai probabil cauzată de o afectare a motilității intestinale. SIBO se caracterizează printr-o concentrație mai mare de 10^5 CFU/mL și/sau prezența bacteriilor colonice în intestinul subțire (Gasbarrini și colab., 2007; Losurdo și colab., 2020). Expunerea prelungită amplifică permeabilitatea intestinală, invocând după sine o stimulare excesivă a sistemului imunitar înăscut, dar și o inflamație sistemică. Ambele mecanisme sunt implicate în inițierea depozitelor de α S (de Vos și de Vos, 2012; Klingelhoefer și

Reichmann, 2015; Visanji și colab., 2013). SIBO se diagnostichează prin culturi de aspirat jejunal, dar tehnica este invazivă, iar fiabilitatea este variabilă (Quigley și Quera, 2006) sau HBT (20 - 22%) și glucoză (0 - 12,5%) în vederea măsurării concentrației hidrogenului sau metanului (sensitivitate; 60 - 70%, specificitate; 40 - 80%) (Bohm și colab., 2013) produs de *Enterococci*, *Serratia*, *Pseudomonas*, *Streptococcus viridans* sau *Staphylococcus aureus* (Fasano și colab., 2013). S-a stabilit că eradicarea SIBO prin administrarea de antibiotice promovează o îmbunătățire a fluctuațiilor motorii, în paralel cu o sporire a absorbției levodopei (Dănău și colab., 2021; Losurdo și colab., 2020).

2.2.4. Colon

2.2.4.1. Constipația

Este singurul simptom recunoscut și documentat care precede caracteristicile motorii ale PD cu mai bine de douăzeci de ani înainte de debutul propriu-zis (Savica și colab., 2009; Schrag și colab., 2015), corelat cu mișcări intestinale (Gao și colab., 2011; Kamada și colab., 2013; Savica și colab., 2009), dar și severitatea (Edwards și colab., 1993; Lin și colab., 2014), persoanele în vârstă reprezentând categoria de risc (Mozaffari și colab., 2020; Yu și colab., 2018). În lipsa unui criteriu clar de diagnostic, ACG a oferit o definiție în 2005 a constipației (Longstreth și colab., 2006). Numărul de mișcări intestinale (< 3/7 zile) este cel mai utilizat criteriu al frecvenței (50%), urmat de încordare (33% - 83%) (Knudsen și colab., 2017), 64% vs. 49% în cazul fenotipului akinetic-rigid și tremor-dominant (Khedr și colab., 2013) în stadiile avansate sau 45% vs. 21% *de novo* (Pont-Sunyer și colab., 2015). Riscul de PD este de trei până la unsprezece ori mai mare în cazul indivizilor suferinzi de constipație cronică (Yu și colab., 2018). La bărbații de vârstă mijlocie cu mișcări intestinale rare sunt de patru ori mai predispuși la dezvoltarea PD în următorii 20 - 25 de ani, afecțiune care poate provoca complicații cum ar fi volvulus, perforație intestinală, megacolon și impact fecal (Bharucha și Lacy, 2020).

2.2.5. Anorectul

2.2.5.1. Defecația disinergică

Un alt motiv pentru constipația în PD este defecația disinergică. Funcționarea anorectală se bazează pe o serie de mișcări coordonate care includ relaxarea sfincterelor interne și externe împreună cu mușchiul puborectal. Adesea, disfuncția anorectală în PD este cauzată de contracția paradoxală a mușchiului puborectal sau eșecul relaxării anale în timpul efortului. În astfel de condiții trebuie realizată o HRAM. Incapacitatea de relaxare a sfincterelor anale este corelată cu constipația și anismul, în timp ce o scădere a tonusului anal în repaus cu incontinența fecală. O defecografie MR poate fi indicată în cazul unui

rectocel sau prolaps rectal intern. Biofeedback-ul este strategia de tratament cea mai recomandată în cazurile de defecație disinergetică, fără valoare la pacienții cu inerție colonică, dar ca alternativă se pot folosi injecțiile cu botulină în mușchii puborectali sau în sfincterul anal (Amieva-Balmori și Remes-Troche, 2020; Rao și Patcharatrakul, 2016).

2.2.5.2. Incontinența fecală

Tratamentul împotriva constipației conduce adesea către incontinență fecală în PD, la unii pacienți fiind observat un tonus anal de repaus scăzut, argument prin care se explică predispoziția crescută în urma utilizării laxativelor. HRAM poate fi aplicată în acest context pentru diagnosticarea disfuncției anorectale care poate precede incontinența fecală. Strategiile de management includ titrarea adecvată a agenților de volum și a laxativelor, tampoane pentru incontinență putând fi necesare ca măsură de precauție la prima titrare pentru constipația cronică, dar și biofeedback-ul dacă afecțiunea se datorează scăderii tonusului sfincterian sau tenesmelor (Saldana Ruiz și Kaiser, 2017; Wang și Abbas, 2013).

Capitolul 3. Tehnici dedicate reconstrucției microflorei

3.1. Pro-, pre- și sinbioticele

Mai mult de două decenii au trecut de când a fost oferită o definiție științifică a probioticelor cu linii directoare pentru a asigura utilizarea adecvată a terminologiei. Potrivit FAO, în paralel cu directivele stabilite de WHO, această formulă este catalogată ca „microorganisme vii care administrate în doze adecvate sporesc starea generală de sănătate a gazdei”, de unde au derivat alți doi termeni - prebiotice și sinbiotice. Prebioticele în schimb sunt suplimente care au fost definite ca „o componentă alimentară neviabilă care conferă beneficii pentru sănătatea gazdei asociate cu modularea microbiotei”. Sinbioticele constituie un amestec dintre cele două categorii menționate anterior, administrate de regulă în vederea sporirii duratei de viață a celor deja existente în tractul digestiv (Sanders și colab., 2019).

În ultima jumătate de deceniu au fost efectuate un număr limitat de studii cu scopul de a explora impactul GM în stadiile prodromale și timpurii ale PD (Mertsalmi și colab., 2017; Scheperjans, 2018). Din fericire, cel mai puternic vehicul utilizat în practica clinică curentă pentru a diminua simptomatologia legată de PD și comorbiditățile asociate cauzale sau nu sunt probioticele (Tan și colab., 2021a).

3.2. Transplantul de microbiotă fecală și terapia de transfer microbial

FMT este o altă tehnică dedicată reconstrucției GM. Este un procedeu relativ simplu care presupune transferul unor eșantioane de scaun de la un donator sănătos unui pacient pentru cazurile de CDI, IBD și IBS (Khoruts și Sadowsky, 2016). MTT este un protocol similar, cu utilitate și potențial substanțial în practica clinică. Au existat controverse în jurul acestui subiect deoarece compoziția microbială interindividuală este similară în procentaje mici, de unde și necesitatea implementării strategiilor personalizate (Khoruts și Sadowsky, 2016).

Mai există și LBP care spre deosebire de FMT sunt mai puțin diverse și conțin un număr redus de specii bacteriene, dar superioară utilizării probioticelor convenționale care reunesc doar câteva microorganisme (Paquet și colab., 2021). LBP sunt definite ca „produse biologice care conțin organisme vii, utilizate pentru prevenirea, tratarea și vindecarea unei boli sau afecțiuni la pacienții umani”.

Capitolul 4. Inducerea experimentală a bolii Parkinson

4.1. Generalități

Peștele zebură (*Danio rerio*) este o specie tropicală care a fost identificată în râul Kosi din Bengal și descrisă pentru prima dată în 1822 de către Francis Buchanan Hamilton (1762 - 1829) (Arunachalam și colab., 2013; McCluskey și Postlethwait, 2015). Etiologic, *Danio* își are originea din bengaleză „dhani” care poate fi tradus drept „cei din câmpul de orez” (Rainboth, 1994), asigurând continuitatea ca sursă de hrană pentru specii de *Channa*, *Notopterus notopterus*, *Ardeola grayii*, *Alcedo atthis* (Spence și colab., 2008).

Omologia fiziologică cu cea a indivizilor umani, timpul scurt de replicare și costul redus al reproducerii în contrast cu alte modele experimentale și fezabilitatea în studiile farmaceutice sunt doar câteva avantaje pentru utilizarea peștelui zebură (Vaz și colab., 2018).

4.2. Rotenona, agonist dopaminergic?

Această izoflavonă insipidă, inodoră și cristalină izolată de Emmanuel Geoffroy (1862 - 1894), este unul dintre cei mai vechi compuși naturali identificați în plante; *Robinia nicou*, actualmente *Lonchocarpus nicou* (nicolină) (Turner, 1932) și utilizată în mai multe produse comercializate pentru culturi ca insecticid, pesticid sau piscicid (Robea

și colab., 2020). Poate fi extrasă din frunzele, semințele și tulpina napului mexican (*Pachyrhizus erosus*), cunoscut sub numele de viță de vie Jicama și din rădăcinile familiei *Fabaceae* - genurile *Derris*, *Lonchocarpus*, *Tephrosia* și *Mundulea* (Gupta, 2012; Lawana și Cannon, 2020). Pe lângă *Lonchocarpus utilis* și *Nolina lindheimeriana*, native pentru America de Sud și de Nord, *Lonchocarpus nicou* și *Derris elliptica* sunt specii candidate pentru extragerea de rotenonă (Gupta, 2012; Lawana și Cannon, 2020), FIFRA înregistrând rotenona în 1947 (Gupta, 2007).

Deși implicațiile în cantități reduse sunt infime, în doze mai mari poate deveni toxică. În comparație cu absorbția incompletă de la nivelul GI la om și rozătoare, în cazul peștilor este totală din cauza absenței enzimelor degradante (Gupta, 2012). Astfel, a fost posibilă stabilirea unei relații cauzale între administrarea de rotenonă și PD la peștele zebură (Razali și colab., 2021), rozătoare (Innos și Hickey, 2021) și oameni (Tanner și colab., 2011).

Rotenona s-a dovedit a fi un agonist dopaminergic care traversează direct BBB și intră în SNC prin acumularea continuă în organele celulare, predominant în mitocondrii datorită structurii sale lipofile (Bové și colab., 2005; Robea și colab., 2020; Sherer și colab., 2003). Rotenona induce toxicitate neuronală (Bastías-Candia și colab., 2019), conducând la o scădere a generării de ATP și la exacerbară generării de ROS prin inhibarea complexului I al ETC (Yurtsever și colab., 2020). Astfel, rotenona determină activarea microgliei, reflectată de neuroinflamație (Gao și colab., 2013) și agregarea α S cunoscută pentru implicarea sa în patologia cu LB (Hijaz și Volpicelli-Daley, 2020).

PARTE EXPERIMENTALĂ

Capitolul 5. Materiale și metode de cercetare

5.1. Model experimental

Studiile experimentale din cadrul prezentei cercetări au vizat peștii zebură (*Danio rerio* - Hamilton, 1822), adulți (6 - 8 luni), WT, linie genetică AB, achiziționați de la un crescător local autorizat din județul Iași.

Indivizii au fost menținuți timp de 14 zile într-un acvariu de 90L dotat cu termometru și sistem de recirculare a apei, alimentat cu apă de sistem declorinată, etapă premergătoare fazei de aclimatizare.

Peștii zebură au fost transferați la finele perioadei de aclimatizare în acvarii noi de 10L pentru încă 7 zile în vederea adaptării la noile condiții experimentale. Aceștia au fost cazați în aceleași acvarii pe durata întregii perioade de analiză comportamentală.

Temperatura din cadrul laboratorului a fost menținută constant la $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$, pH 7,5 și un ciclu de 14h lumină/10h întuneric (Reed și Jennings, 2011). Regimul a constat în TetraMin Flakes de două ori pe zi, iar apa din fiecare rezervor experimental a fost schimbată zilnic.

Animalele au fost întreținute și tratate în conformitate cu Recomandarea Comisiei UE (2007), Directiva 2010/63/UE a Parlamentului European și a Consiliului din 22 Septembrie 2010, act normativ referitor la orientările în ceea ce privește găzduirea, îngrijirea și protecția animalelor utilizate în scopuri experimentale (Commission Recommendation, 2007; Directive 63, 2010). Experimentele au fost realizate în concordanță cu Declarația de la Helsinki, dar și a legislației României și UE referitoare la utilizarea animalelor în cercetarea biomedicală. Toate procedurile au fost realizate prin limitarea la un număr cât mai mic de indivizi conform liniilor directoare ARRIVE (Kilkenny și colab., 2010).

5.2. Tipologii comportamentale

Deși comportamentul peștelui zebură a devenit un atribut din ce în ce mai studiat în cercetările biomedicale (Klee și colab., 2011; Stewart și colab., 2011; Suriyampola și colab., 2015), există foarte puține date despre comportamentul natural al celui WT.

Deoarece comportamentul animal este complex și oferă răspunsuri la reacțiile interne (fiziologice și/sau biochimice) și externe (sociale sau de mediu), obiectivele comportamentale sunt mai sensibile și mai rapide în comparație cu metodele toxicologice clasice care evaluează mortalitatea, reproducerea și creșterea (Melvin și Wilson, 2013). În acest fel, schimbările ce au loc la nivel comportamental ca fiind efecte ale contaminanților pot fi cuantificate la scurt timp după expunere chiar dacă concentrația este redusă (Huang și colab., 2014).

5.2.1. Locomoția

Activitățile motorii sunt angrenate în mare parte la nivelul măduvei spinării și creierului posterior, structuri segmentate care posedă un număr relativ mic de seturi de neuroni identificabili în stadiul embrionar. Multe tipuri de neuroni, dar și cele două tipuri de celule musculare au fost clasificate în funcție de morfologia lor, semnale moleculare

pentru diferențierea celulară fiind identificate recent și izolate mutații care afectează dezvoltarea celulelor (Bae și colab., 2009).

Comportamentele motorii în stadiul embrionar survin secvențial și implică o fază precoce caracterizată de contracții tranzitorii, spontane. Ulterior se observă apariția unor răspunsuri de zvâcnire la atingere care se cristalizează prin dezvoltarea capacității de înot. Contracțiile spiralate sunt generate de o rețea cuplată electric a unui set de neuroni spinali în timp ce o unitate sinaptică glutamatergică și glicinerigică constituie pilonul care stă la baza răspunsurilor la atingere și a înotului. Înotul susținut în stadiul larvar apare odată cu dezvoltarea sistemului serotoninergic neuromodulator (Drapeau și colab., 2002).

5.2.2. Agresivitatea

Agresivitatea este o componentă importantă pe care se bazează gradul de adaptabilitate printre care se numără ierarhia, hrana și reproducerea. Așa cum era de așteptat, peștii zebra se angajează în lupte pentru stabilirea teritoriului în funcție de structura habitatului, preferat fiind cel cu vegetație bogată care micșorează spațiul vizual și le conferă în acest fel protecție și adăpost de prădători (Spence și colab., 2008).

Comportamentul agresiv este frecvent întâlnit în circumstanțe particulare cum ar fi perioada de depunere a icrelor, perturbarea ciclului nictemeral, dar compensat când peștii formează bancuri pașnice (Spence și Smith, 2005). Agresivitatea teritorială este o trăsătură normală a comportamentului agresiv în perioada de depunere a icrelor unde se pot observa adesea mușcăături ce pot cauza pierderea solzilor (Ruhl și colab., 2009).

5.2.3. Sociabilitatea

Un alt argument în favoarea rolului pe care îl joacă peștele zebra în cercetarea biomedicală se datorează repertoriului larg de care beneficiază, în special a tiparelor comportamentale (Kalueff și colab., 2013; Vaz și colab., 2018). Sunt specii în mod intrinsec colective care trăiesc în bancuri, motiv pentru care înfățișează o paletă variată de comportamente sociale.

5.3. Fenotipul asociat bolii Parkinson

În vederea aprofundării spectrului de cunoștințe prin intermediul modelelor animale, au fost induse artificial prin administrare cronică de rotenonă simptome specifice PD pe baza unor doze și intervale de expunere prestabilite.

5.3.1. Influența tulpinilor lactice probiotice asupra sociabilității și locomoției

În cadrul primului studiu s-a dorit stabilirea posibilului rol benefic exercitat de tulpinile lactice probiotice *Bifidobacterium longum* BB536 - 4×10^9 CFU (150 mg) și

Lactobacillus rhamnosus HN001 - 1×10^9 CFU (25 mg) și vitamina B₆ - 1,4 mg asupra comportamentului social și al activității locomotorii în labirintul T. Performanțele au fost înregistrate zilnic cu ajutorul camerei 2D. Indivizii au fost supuși unei expuneri cronice la 2 μg/L rotenonă timp de 21 de zile.

5.3.1.1. Planul experimental

S-au utilizat 60 de indivizi repartizați în patru grupuri experimentale egale (n = 15).

5.3.2. Influența acidului valproic, a combinației de levodopa și carbidopa și a tulpinilor lactice probiotice asupra sociabilității și stărilor de agresivitate

În cadrul celui de-al doilea studiu am evaluat cum acidul valproic (0,5 mg/mL), levodopa + carbidopa (250 mg + 25 mg) și probioticele (3 g - *Lactobacillus casei* W56, *Lactobacillus acidophilus* W22, *Lactobacillus paracasei* W20, *Lactobacillus salivarius* W24, *Lactobacillus lactis* W19, *Lactobacillus plantarum* W62, *Bifidobacterium lactis* W51, *Bifidobacterium lactis* W52 și *Bifidobacterium bifidum* W23) ar putea exacerba/diminua efectul neurotoxicologic al rotenonei după o expunere cronică timp de 32 zile la 2,5 μg/L. Obiectivele principale au constat în evaluarea modificărilor comportamentului social și/sau a stărilor de agresivitate în labirintul T prin utilizarea ca indicator neurologic rotirea în sens invers acelor de ceasornic. Performanțele au fost înregistrate la interval de 4 zile pentru evitarea stresului cronic. Am utilizat camera 2D pentru evaluarea comportamentului (anti)social, respectiv 3D pentru rotirea în sens invers acelor de ceasornic.

5.3.2.1. Planul experimental

S-au utilizat 40 de indivizi repartizați în opt grupuri experimentale egale (n = 5).

5.3.3. Influența acidului valproic, a combinației de levodopa și carbidopa și a tulpinilor lactice probiotice asupra locomoției

În cadrul ultimului studiu am urmărit cum acidul valproic (0,5 mg/mL), levodopa + carbidopa (250 mg + 25 mg) și probioticele (3 g - *Lactobacillus casei* W56, *Lactobacillus acidophilus* W22, *Lactobacillus paracasei* W20, *Lactobacillus salivarius* W24, *Lactobacillus lactis* W19, *Lactobacillus plantarum* W62, *Bifidobacterium lactis* W51, *Bifidobacterium lactis* W52 și *Bifidobacterium bifidum* W23) ar putea acționa în calitate de modulatori ai axei GBA prin evaluarea activității locomotorii în 3D după o expunere cronică la 2,5 μg/L rotenonă timp de 32 de zile. Performanțele au fost înregistrate la interval de 4 zile pentru evitarea stresului cronic.

5.3.3.1. Planul experimental

S-au utilizat 120 de indivizi repartizați în opt grupuri experimentale egale ($n = 15$).

5.4. Ant(agoniștii) utilizați

5.4.1. Administrarea de rotenonă

Rotenona (5 g) a fost achiziționată de la Toronto Research Chemicals, North York, Canada, (Cat # R700580), având aspectul unei pulberi de culoare albă.

5.4.2. Administrarea de acid valproic

Acidul valproic (100 g) a fost achiziționat de la Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, SUA, (#SLBC9758V), având aspectul unei pulberi de culoare albă.

5.4.3. Administrarea de levodopa și carbidopa

Isicom - ((250 mg levodopa + 25 mg carbidopa - 10 pastile/blister x 3) - Desitin Arzneimittel GmbH, Hamburg, Germania) a fost achiziționat de la o farmacie locală sub formă de comprimate.

5.4.4. Administrarea de probiotice

Zircombi (ALFASIGMAS.p.A.) este un supliment alimentar având aspectul unei pulberi albe care a fost achiziționat de la o farmacie locală. Conține două tulpini - *Bifidobacterium longum* BB536 - 4×10^9 CFU (150 mg) și *Lactobacillus rhamnosus* HN001 - 1×10^9 CFU (25 mg) și vitamina B₆ - 1,4 mg.

OMNi BIOTIC STRESS Repair- Institut Allergosan Pharmazeutische Produkte Forschungs- und Vertriebs GmbH, Graz, Austria (3 g) a fost achiziționat de la o farmacie locală. Conține următoarele tulpini: *Lactobacillus casei* W56, *Lactobacillus acidophilus* W22, *Lactobacillus paracasei* W20, *Lactobacillus salivarius* W24, *Lactobacillus lactis* W19, *Lactobacillus plantarum* W62, *Bifidobacterium lactis* W51, *Bifidobacterium lactis* W52 și *Bifidobacterium bifidum* W23.

5.5. Justificarea concentrațiilor administrate

5.5.1. Rotenona

Am efectuat o serie de testări preliminare înainte de implementarea propriu-zisă a protocolului în care până la 5 subiecți per rezervor au fost expuși la trei doze diferite (de la 2 $\mu\text{g/L}$, 2,5 $\mu\text{g/L}$ până la 5 $\mu\text{g/L}$) pentru 24h, până la 72h și am concluzionat că 2,5 $\mu\text{g/L}$ ar putea fi doza optimă deoarece 5 $\mu\text{g/L}$ cauzează o mortalitate excesivă (datele nu sunt prezentate) (Ilie și colab., 2022a, 2022b).

5.5.2. Acidul valproic

O abordare similară a fost aplicată și pentru acidul valproic în care am testat patru doze (0,5 mg/mL, 2 mg/mL, 5 mg/mL și 10 mg/mL). Concentrațiile de 5 mg/mL și 10 mg/mL de acid valproic au condus la o mortalitate excesivă, în timp ce la 2 mg/mL peștii zebră prezentau episoade de imobilitate la atingere (datele nu sunt prezentate) în primele 6h - 12h după administrare. Pe baza acestor considerente am reușit să menținem constantă rata de supraviețuire în rândul subiecților pe toată perioada analizată prin administrarea a 0,5 mg/mL (Ilie și colab., 2022a, 2022b).

5.5.3. Levodopa și carbidopa

În ceea ce privește doza asociată de levodopa și carbidopa am folosit ca suport informatic studiul lui (Idalencio și colab., 2021).

5.5.4. Tulpinile lactice probiotice

Nu există restricții în ceea ce privește doza și raportul de bacterii, acestea fiind personalizate în funcție de conceptul studiului, tulpinile reunite în produsul utilizat dacă este unul comercializat la scară largă și CFU mai degrabă decât sexul și speciile.

5.6. Testarea comportamentală

5.6.1. Testul de interacțiune (anti)socială, agresivitatea și locomoția

Citirile comportamentale au fost efectuate într-un labirint încrucișat multifuncțional închis de o fantă transparentă de plexiglas și transformat într-un labirint în formă de T umplut cu apă de sistem (5 cm) declorinată.

Durata fiecărei testări a fost de 4 min per individ cu 30 sec perioadă de acomodare într-un acvariu de 10L care recrează condițiile habituale, dar umplut pe jumătate din volumul total (5L). Imaginile au fost înregistrate cu o cameră profesională în infraroșu plasată deasupra camerei experimentale conectată la un computer și analizate folosind software-ul EthoVision XT 11.5 (Noldus Information Technology, Wageningen, Olanda) calibrat anterior pentru acest tip de teste.

5.6.2. Testul de activitate locomotorie

Analiza activității locomotorii s-a realizat, de asemenea, în 3D prin utilizarea unui acvariu de 10L care recrează condițiile habituale care a fost umplut cu 6L apă declorinată de sistem.

Durata fiecărei testări a fost de 4 min per individ cu 30 sec perioadă de acomodare, imagini care au fost înregistrate cu o cameră profesională în infraroșu plasată deasupra și în lateralul camerei experimentale conectate la un computer și analizate folosind modulul

Track3D al software-ului de urmărire video EthoVisionXT 14 (Noldus Information Technology, Wageningen, Olanda).

5.7. Eutanasierea, recoltarea și repartizarea probelor

Animalele au fost eutanasiate conform procedurilor standard prin imersie în apă cu gheață la 2 - 4°C timp de 10 min până la dispariția mișcărilor operculare.

Câte cinci probe au fost alocate pentru fiecare analiză ulterioară în tuburi Eppendorf de 1,5 mL și stocate la -20°C.

5.8. Determinarea biomarkerilor stresului oxidativ

5.8.1. Determinarea activității superoxid dismutazei

Kitul de determinare a SOD (19160-1KT-F) a fost achiziționat de la Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, SUA și utilizat urmând instrucțiunile producătorului. Lungimea de undă la care s-au realizat citirile a fost de 450 nm.

5.8.2. Determinarea activității glutatión peroxidazei

Kitul de determinare a GPx (CGP1-1KT) a fost achiziționat de la Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, SUA și utilizat urmând instrucțiunile producătorului. Lungimea de undă la care s-au realizat citirile a fost de 340 nm.

5.8.3. Determinarea nivelului malondialdehidei

Nivelul de MDA a fost determinat conform metodei descrise de (Ciobica și colab., 2012). Lungimea de undă la care s-au realizat citirile a fost de 532 nm.

5.8.4. Metoda Bradford de cuantificare a proteinelor solubile

Analog tehnicii de obținere a omogenatului, acest protocol se bazează pe dozarea conținutului proteic conform metodei descrise de (Bradford, 1976) și adaptată de (Artenie, 2008).

5.9. Reacția de polimerizare în lanț în timp real

ARN-ul total din creier a fost extras folosind peqGOLD TriFast (Peqlab Biotechnologie, Erlangen, Germania), iar revers transcrierea într-o etapă unică cu GoTaq 1-Step RT-qPCR (Madison, Wisconsin, SUA) urmând instrucțiunile producătorului.

Reacțiile au fost efectuate pe sistemul AriaMx Real-Time PCR (Santa Clara, California, SUA).

Secvențele utilizate (IDTDNA, San Diego, California, SUA) sunt următoarele: *PINK* 1 (NM_001008628.1) (2088 bp) forward: 5'-GGCAATGAAGATGATGTGGAAC-

3', *PINK 1* reverse: 5'-TTGTGGGCATGAAGGAACTAAC-3', *PARKIN* (NM_001017635.1) (1465 bp) forward: 5'-GAGGAGTTTCACGAGGGTCC-3', *PARKIN* reverse: 5'-TGAGTGGTTTTGGTGATGGTC-3', *LRRK2* (NM_001201456.2) (9170 bp) forward: 5'-ACTCGGATTAAGTTCCACCAGA-3', *LRRK2* reverse: 5'-CAGTGAGGGTTGATGGTCTGTA-3', *alfa-SNCA* (NM_001017567.2) (1294 bp) forward: 5'-ATGCACTGAAGAAGGGATTCTC-3', *alfa-SNCA* reverse: 5'-AGATTTGCCTGGTCAGTTGTTT-3' și *ACTIN* (NM_181601.5) (1843 bp) forward: 5'-GGCATCACACCTTCTACAATGA-3', *ACTIN* reverse: 5'-TACGACCAGAAGCGTACAGAGA-3' servind ca genă de referință.

Am implicat și o curbă de topire pentru sporirea specificității în eventualitatea formării dimerilor de primeri. Protocolul de amplificare a fost următorul: RT: 20:00 de min la 38°C (1 ciclu), start la cald: 10:00 min la 95°C (1 ciclu), amplificare: 00:10 sec la 95°C, 00:30 sec la x°C (în funcție de genă), 00:30 sec la 72°C (40 de cicluri), curba de topire: 00:30 sec la x°C (în funcție de genă) x 2 și 00:30 sec la 95°C (1 ciclu); *ACTIN*, *PINK1* și *alfa-SNCA* la 55°C, *LRRK2* la 57,5°C, iar *PARKIN* la 58,5°C.

Expresia relativă a fost determinată folosind formula $2^{-\Delta\Delta C_t}$, rezultatele finale fiind normalizate în funcție de *ACTIN*.

5.10. Determinarea nivelului de dopamină

DA din probele de creier a fost măsurat prin ELISA utilizând kit-ul Fish Dopamine (antibodies, Aachen, Germania) conform instrucțiunilor producătorului. Citirile au fost efectuate prin utilizarea Tecan Sunrise (Tecan, Crailsheim, Germania) la lungimea de undă de 450 nm.

Calcululele folosind standarde au fost efectuate prin aplicarea unei regresii polinomiale cu formula: $y = a + bx + c/x^2$.

5.11. Analiza histologică și imunohistologică

Probele de organe au fost fixate în soluție Bouin timp de 24h, iar secțiunile cu grosimea de aproximativ 0,5 cm au fost deshidratate într-o soluție de etanol în concentrație descrescătoare, apoi limpezite în xilen și încorporate în parafină. Dintre secțiunile realizate la microtom, au fost selectate câte zece lame pentru microscop din fiecare bloc de parafină, colorate specific și citite la microscopul Olympus CX41 (Olympus Europa SE & Co, Wendenstraße, Hamburg, Germania).

Acestea au fost inițial colorate cu HE apoi IHC folosind 5 anticorpi; GFAP, S100b, PCNA, p53 și cox4i1, au fost utilizate pentru a efectua colorația IHC. După ce secțiunile au fost deparafinate în xilen, hidratate în etanol și încălzite cu microunde timp de 10 min la 95°C în 10 mmol tampon acid citrat pH 6, acestea au fost răcite timp de 20 de min, apoi spălate de două ori în PBS timp de 5 min. Secțiunile au fost tratate cu peroxid de hidrogen 3% și clătite cu PBS, după care au fost incubate peste noapte la 4°C într-o atmosferă umedă cu anticorpi primari în diluții de 1:1000 GFAP și S100b; 1:250 pentru PCNA, p53 și Cox4i1. Lamele au fost spălate de 3 ori în PBS timp de 5 min, fiind incubate cu anticorpi secundari. S-a folosit anticorp secundar IgG anti- iepure generați de capră pentru GFAP, S100b, p53 și PCNA. Lamele de microscop au fost dezvoltate în DAB și în final colorate cu hematoxilină.

5.12. Analiza statistică

Software-ul pentru calcul tabelar Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corporation, Redmond, Washington, SUA) a fost utilizat pentru editarea, sortarea și codificarea datelor brute care au fost ulterior testate pentru normalitate și distribuție prin testul Shapiro-Wilk utilizând fie software-ul Graph Pad Prism (v 9.1.0.221, San Diego, California, SUA) sau OriginPro (v 9.3-2016, OriginLab Corporation, Northampton, Massachusetts, SUA). Comparățiile între grupuri sau între zilele de testare au fost efectuate prin ANOVA unidirecțională urmată de teste parametrice post-hoc cum ar fi Tukey HSD sau Dunnett. Datele sunt exprimate ca medie $\pm$ SEM. Valoarea $p < 0,05$ a fost considerat semnificativ statistic.

Capitolul 6. Rezultate

6.1. Testul de interacțiune socială

6.1.1. Expunerea la 2 μ g/L rotenonă

Nu s-au observat modificări semnificative pentru lotul CONTROL și ROT ($p > 0,05$ ANOVA). Administrarea unică în grupurile ROT și PROBIO nu a avut niciun efect asupra sociabilității peștilor zebură după 21 de zile de expunere cronică la 2 μ g/L rotenonă așa cum se poate observa în Figura 6.1. Mai mult, un efect similar a fost observat și în grupul ROT + PROBIO, cu excepția Z_19 în comparație cu perioada de pretratament ($182,5 \pm 16,5$ sec față de $56,2 \pm 19,8$ sec, $p = 0,01$ Tukey, ANOVA).

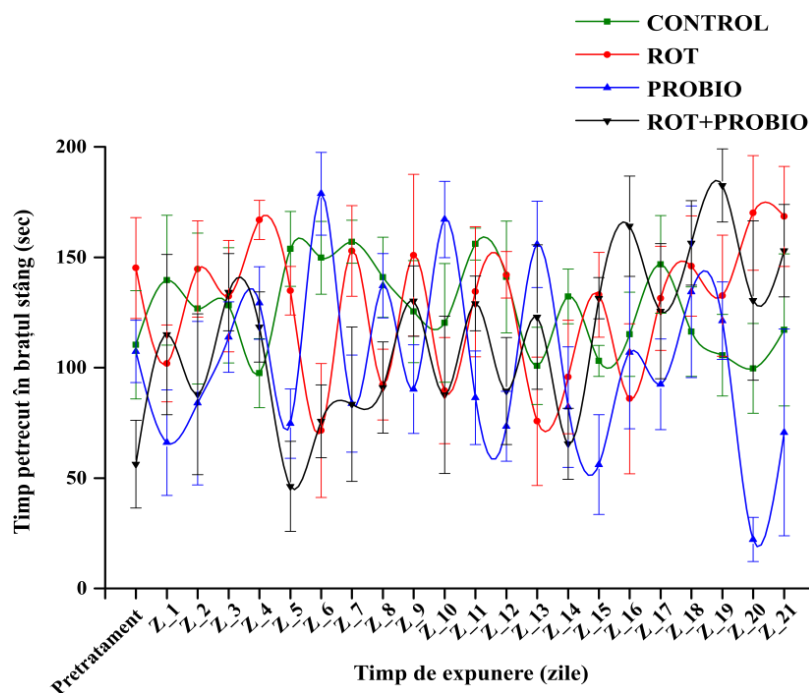


Figura 6.1. Timpul petrecut în brațul stâng în testul de interacțiune socială ($n = 15$). Media grupurilor a fost comparată cu media zilelor de pretratament și rezultatele au fost reprezentate ca medie $\pm$ SEM

6.2. Testul comportamentului anti-social

6.2.1. Expunerea la 2,5 $\mu\text{g/L}$ rotenonă

S-au observat diferențe semnificative statistic în zile separate după centralizarea și analiza datelor referitoare la timpul petrecut în brațul drept și central. Astfel, grupul (b) suplimentat doar cu VPA a înregistrat o preferință față de brațul drept în Z_1 - $p = 0,006$ și Z_8 - $p = 0,022$, în timp ce grupul (c) cărui i s-a administrat LEV/CARB doar în Z_12 - $p = 0,008$. În ceea ce privește grupul (e) ROT și grupul (f) ROT + VPA, peștii zebra prezintă un comportament antisocial în Z_1 - $p = 0,002$ și Z_4 - $p = 0,011$. Capacitatea exploratorie a fost oarecum influențată întrucât comportamentul corespundea unei stări de anxietate în Z_4 - $p = 0,004$, Z_20 - $p = 0,002$, Z_28 - $p = 0,003$, Z_32 - $p = 0,048$ în (b) VPA, iar în Z_4 - $p = 0,028$, Z_24 - $p = 0,021$, Z_28 și Z_32 $p < 0,001$ în grupul (c) LEV/CARB. Grupurile (f) ROT + VPA și (g) ROT + LEV/CARB au fost singurele în comparație cu (e) ROT și (h) ROT + PROBIO în care au existat schimbări vizibile; Z_12 - $p = 0,041$, Z_16 - $p = 0,005$ în (e) (ROT) și Z_8 - $p = 0,008$, Z_24 - $p = 0,033$ în (f) ROT + VPA. Interesantă este lipsa de eficacitate a tulpinilor lactice administrate în grupurile (d) PROBIO și (h) ROT + PROBIO ($p > 0,05$), dar și în grupul (g) ROT + LEV/CARB. Grupul (a) CONTROL și-a menținut o tendință liniară pe parcursul întregului experiment (Figura 6.2).

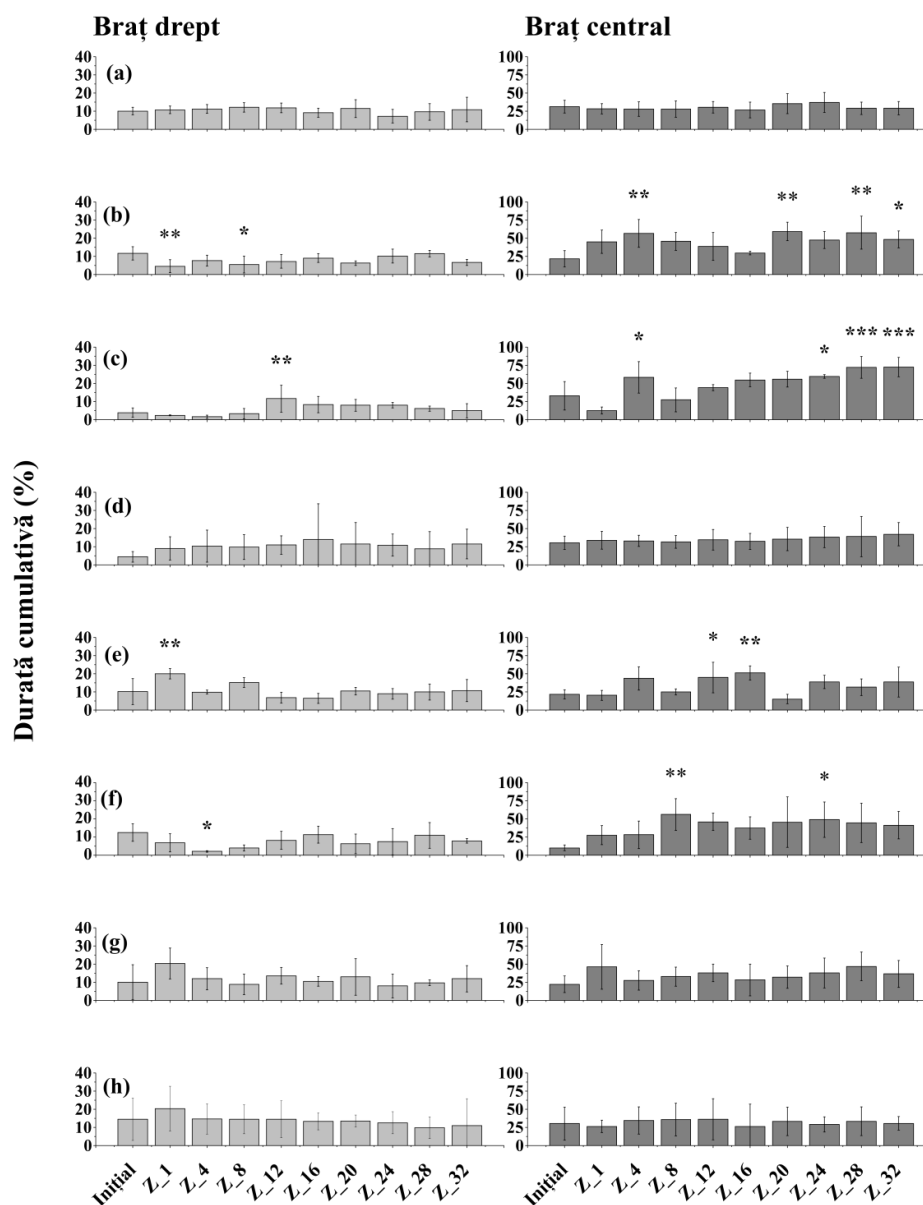


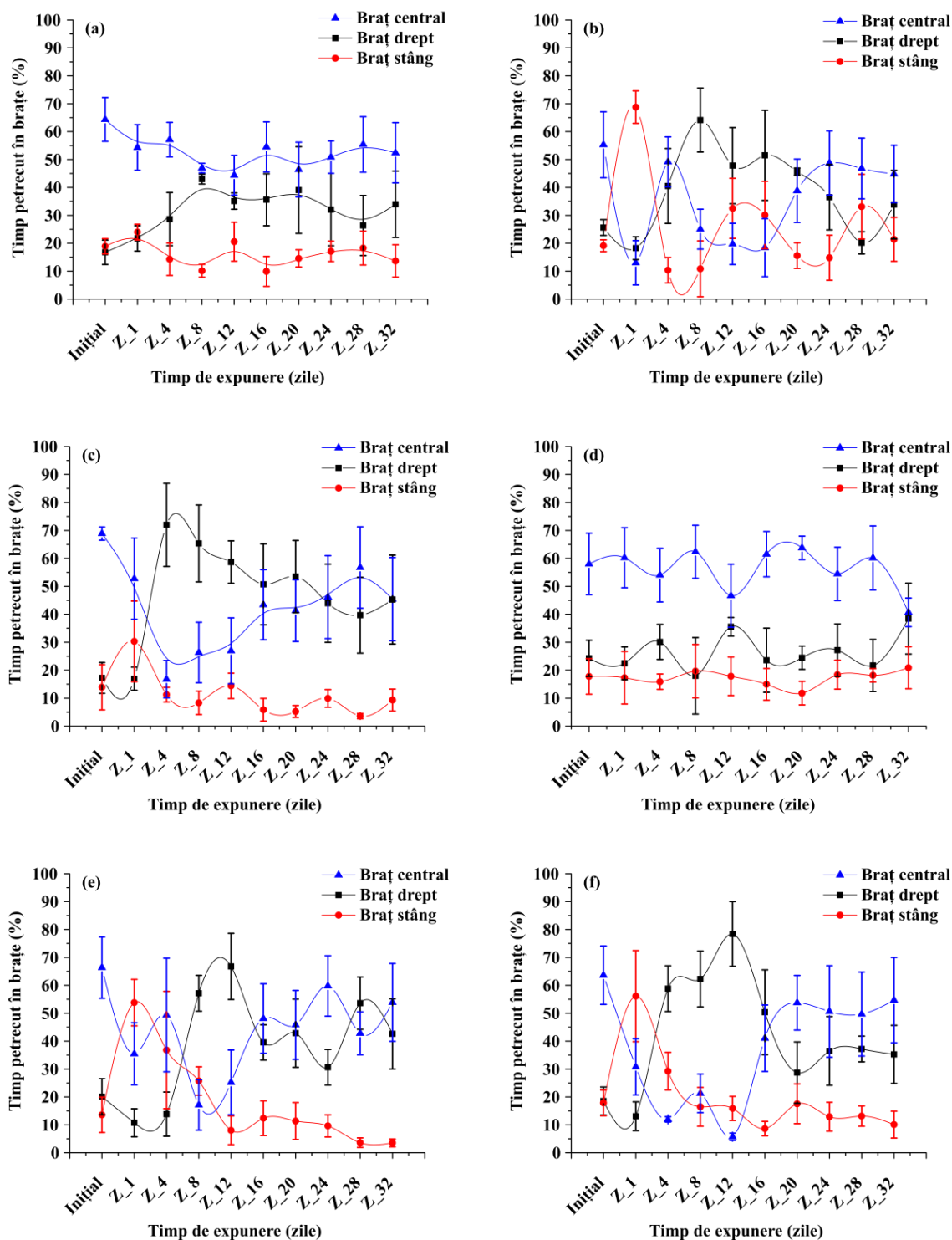
Figura 6.2. Modelul antisocial la *Danio rerio* (n = 5) și tendințele lor către ambele brațe (valori exprimate ca medie cu SEM urmat de testul Dunnett; * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,005$, *** - $p < 0,0005$)

6.3. Testul oglinzii

6.3.1. Expunerea la 2,5 $\mu\text{g/L}$ rotenonă

Comparativ cu perioada de pretratament, chiar și în grupul (a) CONTROL s-a observat un fenotip deductibil pe baza testului efectuat. Nu a existat nicio diferență semnificativă statistic ($p > 0,05$) între comportamentul de bază și timpul petrecut în brațul stâng. Analog pentru brațul drept și central la (a) CONTROL, dar și la cei din (b) VPA, (c) LEV/CARB, (d) PROBIO sau în combinație cu ROT (e - h), modele specifice de agresivitate fiind înregistrate ($p < 0,05$, 0,005 și 0,001) fie în raport cu stadiul inițial, fie între zile diferite. De remarcat, însă, lipsa de semnificație în grupul (d) PROBIO ($p > 0,05$)

referitor la timpul petrecut în brațul stâng, dar și prin comparație cu pretratatamentul ($p > 0,05$) în celelalte două brațe. Se poate concluziona că probioticele administrate au avut într-adevăr un efect benefic, argument care nu este valabil în cazul grupului (h) ROT + PROBIO (Figura 6.3).



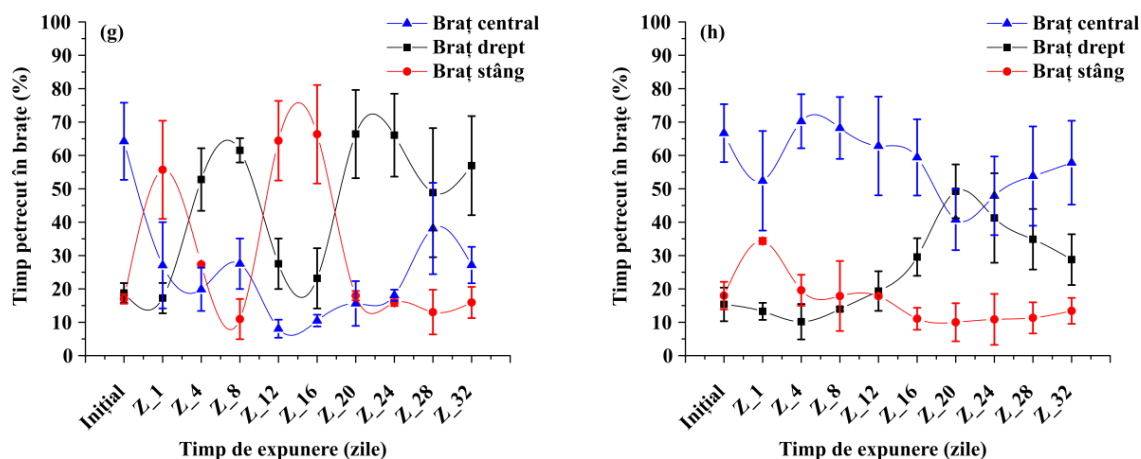


Figura 6.3. Modelele de tip agresiv la *Danio rerio* (n = 5) și tendințele lor către toate cele trei brațe (valori exprimate ca medie cu SEM urmat de testul Dunnett)

6.4. Evaluarea activității locomotorii

6.4.1. Expunerea la 2 $\mu\text{g/L}$ rotenonă

6.4.1.1. Distanța totală înotată

În pofida așteptărilor noastre și contrar datelor existente în literatura de specialitate, nu au fost observate modificări semnificative în urma administrării de rotenonă sau probiotice după 21 de zile conform parametrilor noștri de interes; distanța totală înotată (cm), viteza medie (cm/sec) și starea activă (sec).

Mai precis, în grupul CONTROL per distanța totală înotată (cm) au existat situații particulare în care peștii zebră au atins puncte maxime în decursul perioadei experimentale în contrast cu zilele de pretratament: Z_10 ($1240,03 \pm 169,9$ cm, $p = 0,01$ Tukey, ANOVA), Z_13 ($1209,58 \pm 71,7$ cm, $p = 0,02$ Tukey, ANOVA) și Z_15 ($1220,13 \pm 104,2$ cm, $p = 0,02$ Tukey, ANOVA) vs. $620,7 \pm 127,8$ cm. Grupul ROT nu a fost influențat semnificativ, diferențe semnificative statistic fiind notate în Z_6 ($1369,2 \pm 255,8$ cm, $p = 0,008$ Tukey, ANOVA) și Z_14 ($1642,9 \pm 165,1$ cm, $p = 0,002$ Tukey, ANOVA). Mai mult decât atât, în grupul PROBIO s-a observat o creștere a distanței înotate în primele zile ale tratamentului cu cea mai mare valoare înregistrată în Z_5 ($1626,4 \pm 138,2$ cm, $p = 0,006$ Tukey, ANOVA). În ceea ce privește grupul ROT + PROBIO, valorile obținute pentru acest parametru nu au fost semnificative ($p > 0,05$ ANOVA) (Figura 6.4).

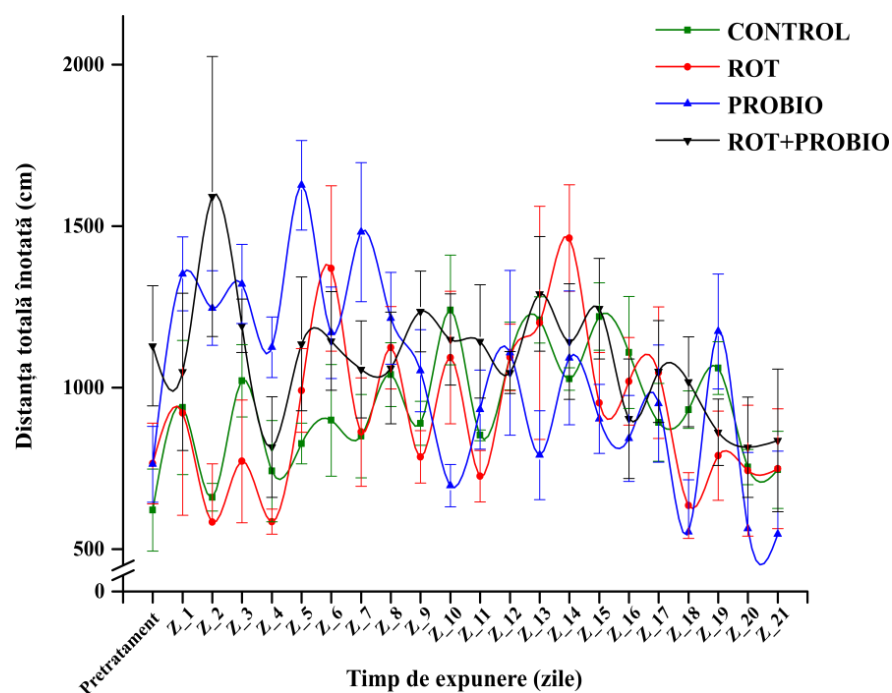


Figura 6.4. Distanța totală înotată în timpul testului de activitate locomotorie (n = 15). Media grupurilor a fost comparată cu media zilelor de pretratament și rezultatele au fost reprezentate ca medie $\pm$ SEM

6.4.1.2. Viteza de înot

Analog parametrului de mai sus, nu s-au observat modificări semnificative pentru grupul CONTROL, ROT și ROT + PROBIO în ceea ce privește parametrul vitezei (cm/sec) ($p > 0,05$ ANOVA). Tendința a fost similară și pentru grupul PROBIO, cu excepția unui tipar de hiperlocomoție în Z_5 ($6,77 \pm 0,57$ cm/sec, $p = 0,005$ Tukey, ANOVA) comparativ cu pretratamentul: $3,18 \pm 0,42$ cm/sec (Figura 6.5).

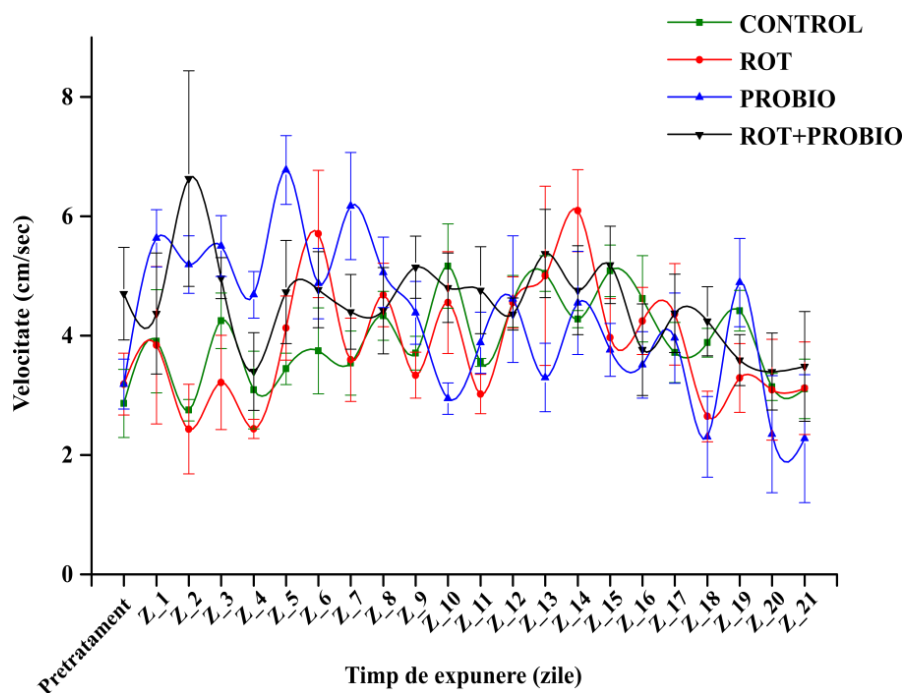


Figura 6.5. Viteza de înot în timpul testului de activitate locomotorie (n = 15). Media grupurilor a fost comparată cu media zilelor de pretratament și rezultatele au fost reprezentate ca medie $\pm$ SEM

6.4.1.3. Starea activă

De asemenea, am determinat starea activă (sec) care măsoară timpul petrecut de peștii activi în timpul sesiunii. În zilele de pretratament peștii din grupul CONTROL au manifestat o scădere a timpului de mișcare, dar activitatea pe toată perioada experimentală a urmat o tendință constantă. Grupul ROT a înregistrat creșteri ale timpului petrecut în mișcare ca Z_6 ($224,8 \pm 10,8$ sec, $p = 0,03$ Tukey, ANOVA), Z_8 ($228,8 \pm 5,22$ sec, $p = 0,02$ Tukey, ANOVA), Z_12 ($227,2 \pm 3,52$ sec, $p = 0,02$ Tukey, ANOVA), Z_14 ($236,3 \pm 1,50$ sec, $p = 0,007$ Tukey, ANOVA), Z_16 ($232,1 \pm 3,78$ sec, $p = 0,01$ Tukey, ANOVA) și Z_17 ($223,5 \pm 4,55$ sec, $p = 0,04$ Tukey, ANOVA) în comparație cu $139,8 \pm 12,7$ sec la pretratament. În ceea ce privește activitatea pentru grupul PROBIO, activitatea a fost similară cu cele observate pentru parametrii menționați mai sus; creștere în prima parte a administrării, iar apoi este fluctuantă. În grupul ROT + PROBIO nu au fost observate modificări semnificative ($p > 0,05$ ANOVA) (Figura 6.6).

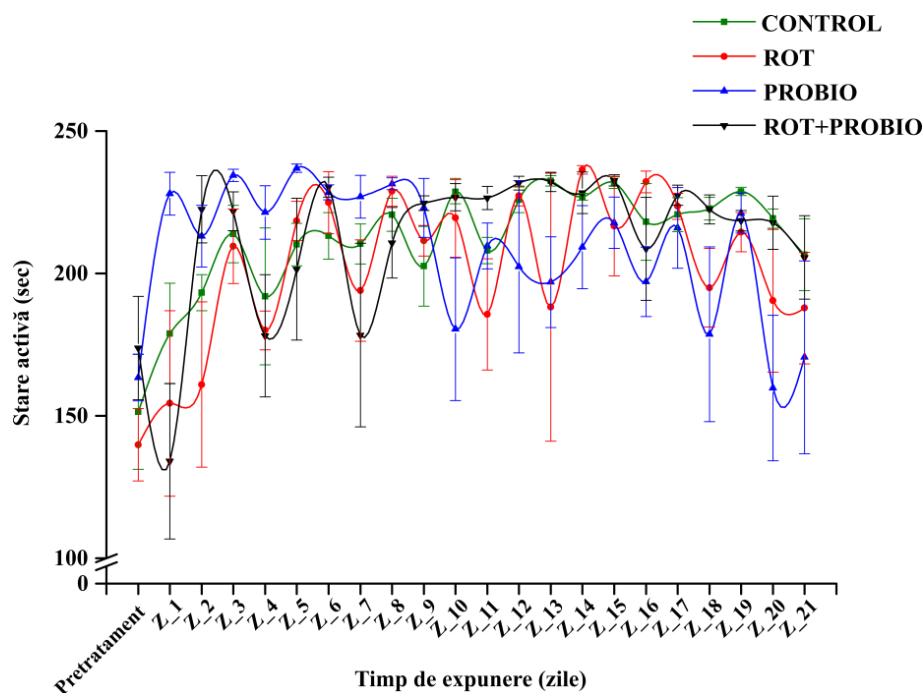


Figura 6.6. Starea activă în timpul testului de activitate locomotorie (n = 15). Media grupurilor a fost comparată cu media zilelor de pretratament și rezultatele au fost reprezentate ca medie $\pm$ SEM

6.4.2. Expunerea la 2,5 $\mu\text{g/L}$ rotenonă

Cu scopul de a evalua efectul neurotoxicologic al rotenonei după 32 de zile de administrare cronică și posibilul efect neuroactiv al acidului valproic, combinației de levodopa și carbidopa și a probioticelor, am efectuat testul de activitate locomotorie 3D. Conformații spațiale pot fi observate în urma reconstituirii traseelor de înot 3D (Figura 6.7). Parametrii de interes analizați precum distanța de înot (mm), viteza (mm/sec) și episoadele de îngheț (sec) sunt detaliate în Figura 6.8 - Figura 6.10.

Așa cum era de așteptat, în cazul celor patru grupuri care nu sunt expuse la rotenonă (a - d), peștii zebură își păstrează comportamentul explorator pe întreaga perioadă analizată, cu ușoare modificări fenotipice în (b) VPA și (c) LEV/CARB definite prin „atingerea suprafeței apei” indicând posibilul potențial neuroactiv al acestor doi agenți, în timp ce în grupul (d) PROBIO se poate observa un model comportamental similar cu (a) CONTROL. Pe de altă parte, grupurile expuse la rotenonă (e - h) manifestă o afinitate față de fundul acvariului, așa cum se observă în (e) ROT și (g) ROT + LEV/CARB. Mai mult, modelele de înot din (f) ROT + VPA și (h) ROT + PROBIO sunt antitetice în contrast cu (e) ROT și (g) ROT + LEV/CARB.

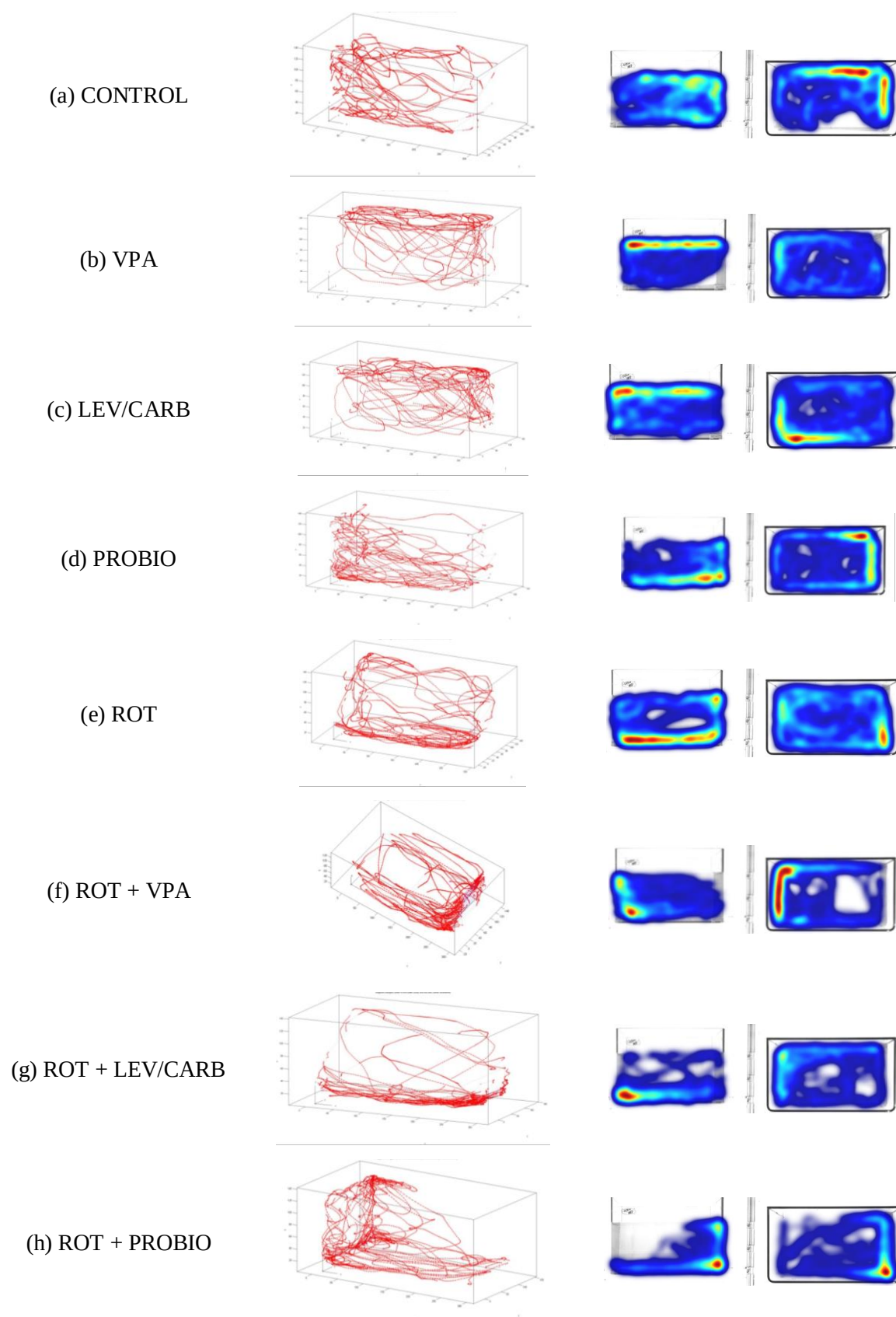


Figura 6.7. Rezultatele traseelor de înot în 3D pentru *Danio rerio* (n = 5) în (a) CONTROL și grupurile tratate cu (b) VPA - 0,5 mg/mL, (c) LEV/CARB - 250 mg + 25 mg, (d) PROBIO - 3 g, (e) ROT - 2,5 µg/L, (f) ROT + VPA - 2,5 µg/L + 0,5 mg/mL, (g) ROT + LEV/CARB - 2,5 µg/L + 250 mg LEV + 25 mg

CARB și (h) ROT + PROBIO - 2,5 µg/L + 3 g. O integrare automată folosind software-ul Track3D are ca rezultat traseele de înot 3D reflectate de culoarea roșie, panoul din dreapta indicând imaginea verticală (X, Y) și laterală (Y, Z) în testul de 240 sec

6.4.2.1. Distanța înotată

În ceea ce privește parametrul distanței de înot (mm) înregistrat, apar diferențe semnificative între (a) CONTROL și mai multe grupuri experimentale: comparativ cu (e) ROT, $p = 0,002/p < 0,0001$, și (h) ROT + PROBIO, $p = 0,004/p = 0,000$, conform ambelor camere, în timp ce în (d) PROBIO, $p = 0,002$; (f) ROT + VPA, $p = 0,004$; și (g) ROT + LEV/CARB, $p = 0,000$ pe baza înregistrărilor realizate numai de camera laterală. Alte circumstanțe în care am observat diferențe au fost în (b) VPA în comparație cu (e) ROT, $p = 0,009/p = 0,038$, de asemenea, pe baza ambelor camere, și (h) ROT + PROBIO, $p = 0,014$, de către camera verticală. În plus, grupul (c) LEV/CARB a prezentat diferențe față de (e) ROT, $p = 0,001$; (g) ROT + LEV/CARB, $p = 0,022$; și (h) ROT + PROBIO, $p = 0,025$ (Figura 6.8).

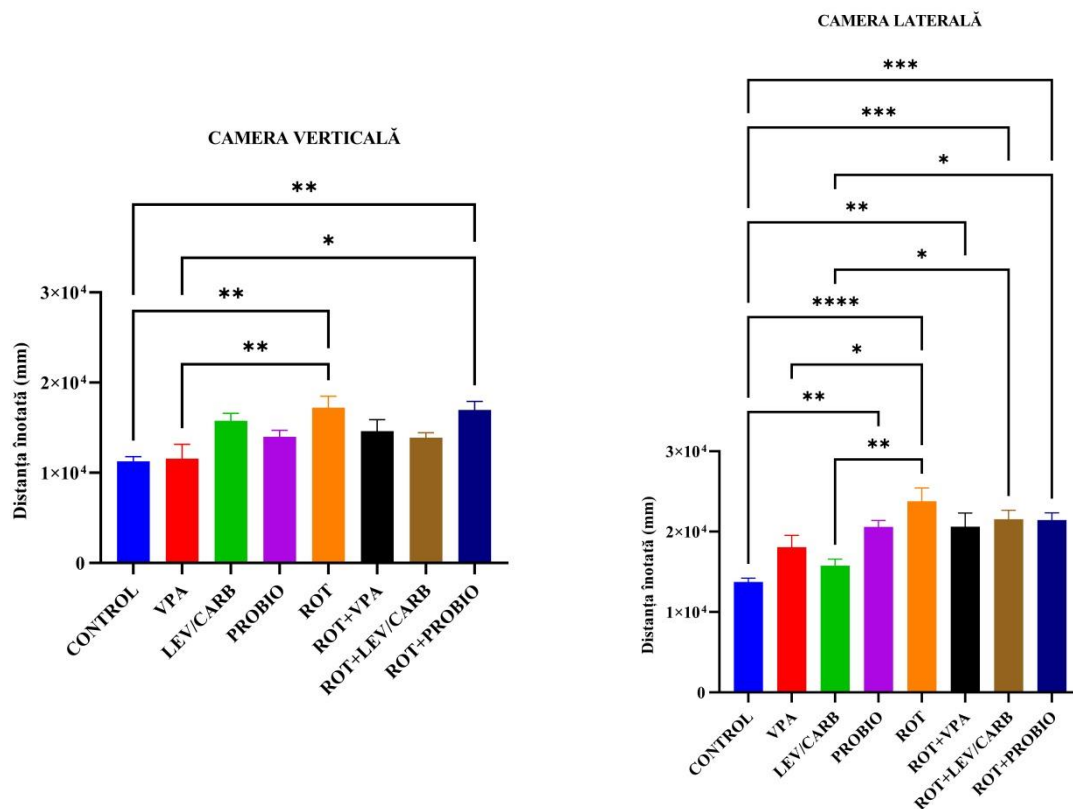


Figura 6.8. Modele de distanță de înot (mm) în grupurile *Danio rerio* studiate (n = 5) (* - $p < 0,05$; ** - $p < 0,005$; *** - $p < 0,0005$; **** - $p < 0,0001$; valori exprimate ca medie cu SEM urmat de testul Tukey HSD)

6.4.2.2. Velocitatea

Modele comportamentale interesante au fost observate în continuare în urma centralizării datelor atribuite parametrului vitezei (mm/sec) în (a) CONTROL prin comparație cu grupurile experimentale. Mai precis, singurul grup în care nu am observat o diferență semnificativă a fost în (b) VPA ($p > 0,05$) și cu un caz particular în (c) LEV/CARB, $p = 0,024$ conform înregistrării realizate de camera laterală. Continuând cu acest concept, am notat diferențe majore între peștele zebură sănătos și (d) PROBIO, $p = 0,004/p = 0,004$; (e) ROT, $p = 0,000/p = 0,000$; (f) ROT + VPA, $p = 0,008/p = 0,007$; (g) ROT + LEV/CARB, $p = 0,019/p = 0,005$; și (h) ROT + PROBIO, $p = 0,003/p = 0,000$, pe baza înregistrărilor realizate de ambele camere (Figura 6.9).

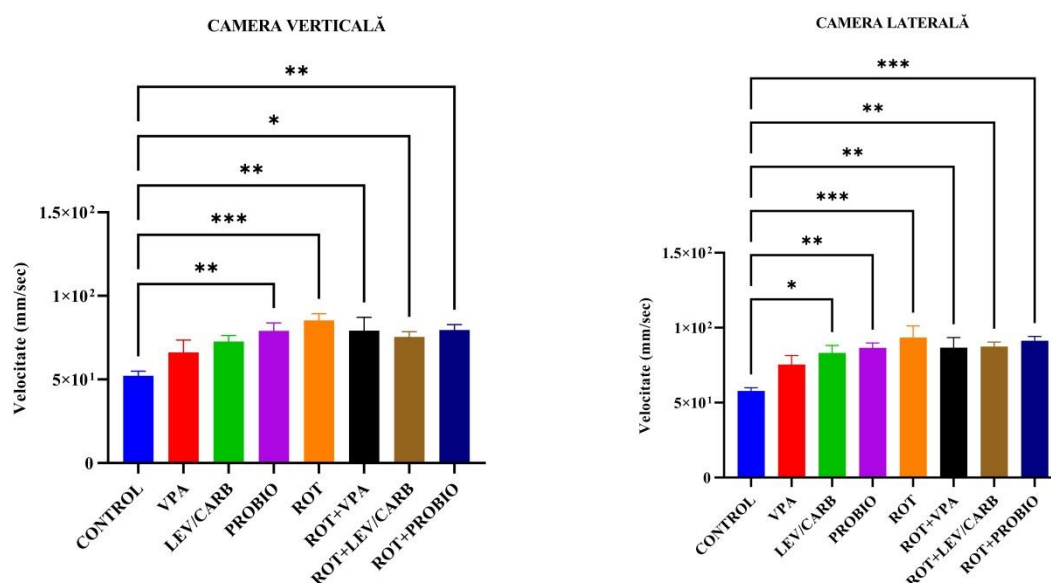


Figura 6.9. Modele de viteză (mm/sec) în grupurile *Danio rerio* ($n = 5$) studiate (* - $p < 0,05$; ** - $p < 0,005$; * - $p < 0,0005$; valori exprimate ca medie cu SEM urmat de testul Tukey HSD)**

6.4.2.3. Episoadele de îngheț

În completare cu observațiile făcute în lumina celor doi parametri de mai sus, în (a) CONTROL au fost observate mai multe episoade de inactivitate în (e) ROT prin raportare la (c) LEV/CARB, $p = 0,000/p = 0,010$ și (d) PROBIO, $p = 0,031/p = 0,042$ conform camerei vertical și laterale și între (e) ROT, $p = 0,007$ și (g) ROT + LEV/CARB, $p = 0,036$ de către camera laterală. Două cazuri unice în care am observat diferențe au fost în (b) VPA în contrast cu (c) LEV/CARB, $p = 0,013$ conform înregistrării de camera verticală și (e) ROT cu (f) ROT + VPA, $p = 0,045$ de camera laterală (Figura 6.10).

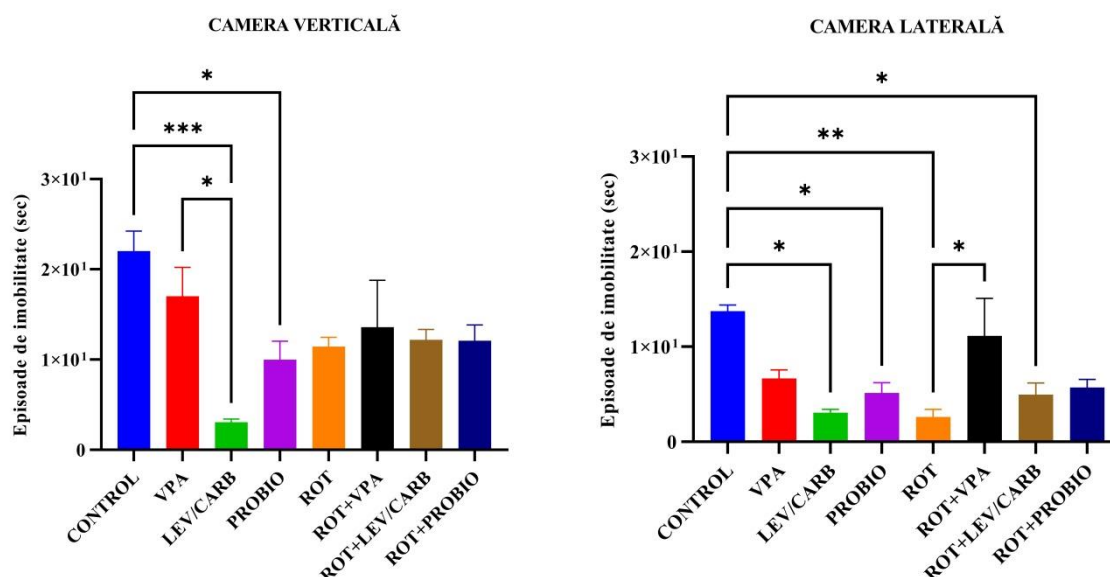
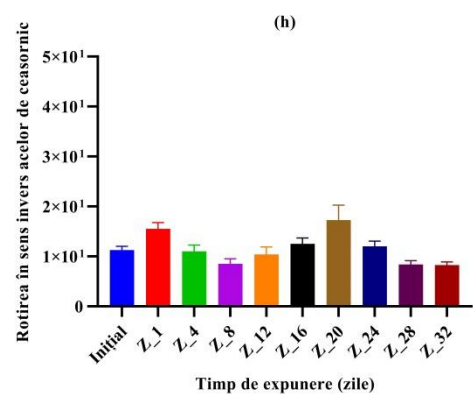
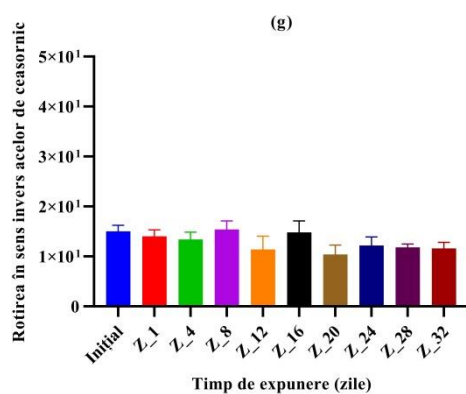
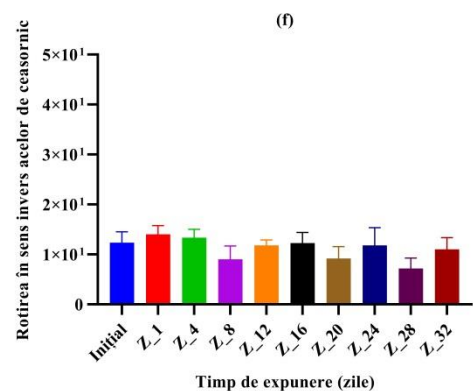
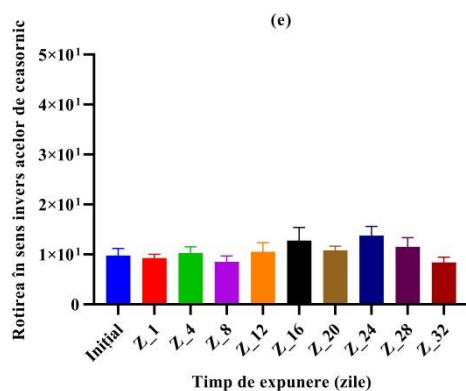
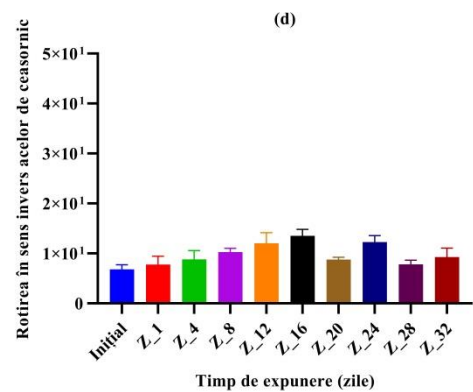
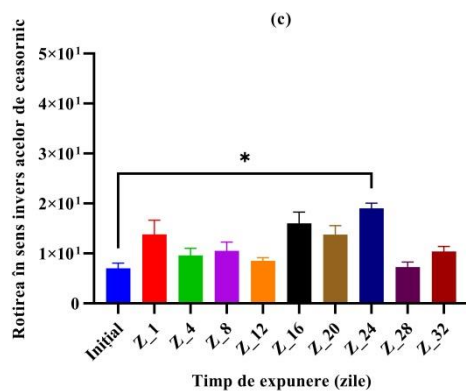
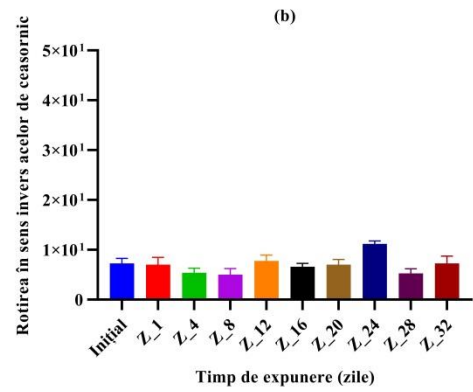
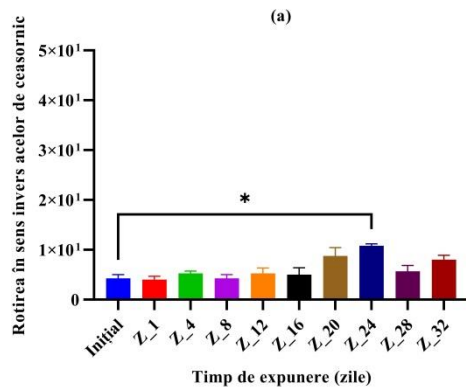


Figura 6.10. Episoade de inactivitate (sec) în grupurile *Danio rerio* (n = 5) studiate (* - $p < 0,05$; ** - $p < 0,005$; *** - $p < 0,0005$; valori exprimate ca medie cu SEM urmat de testul Tukey HSD)

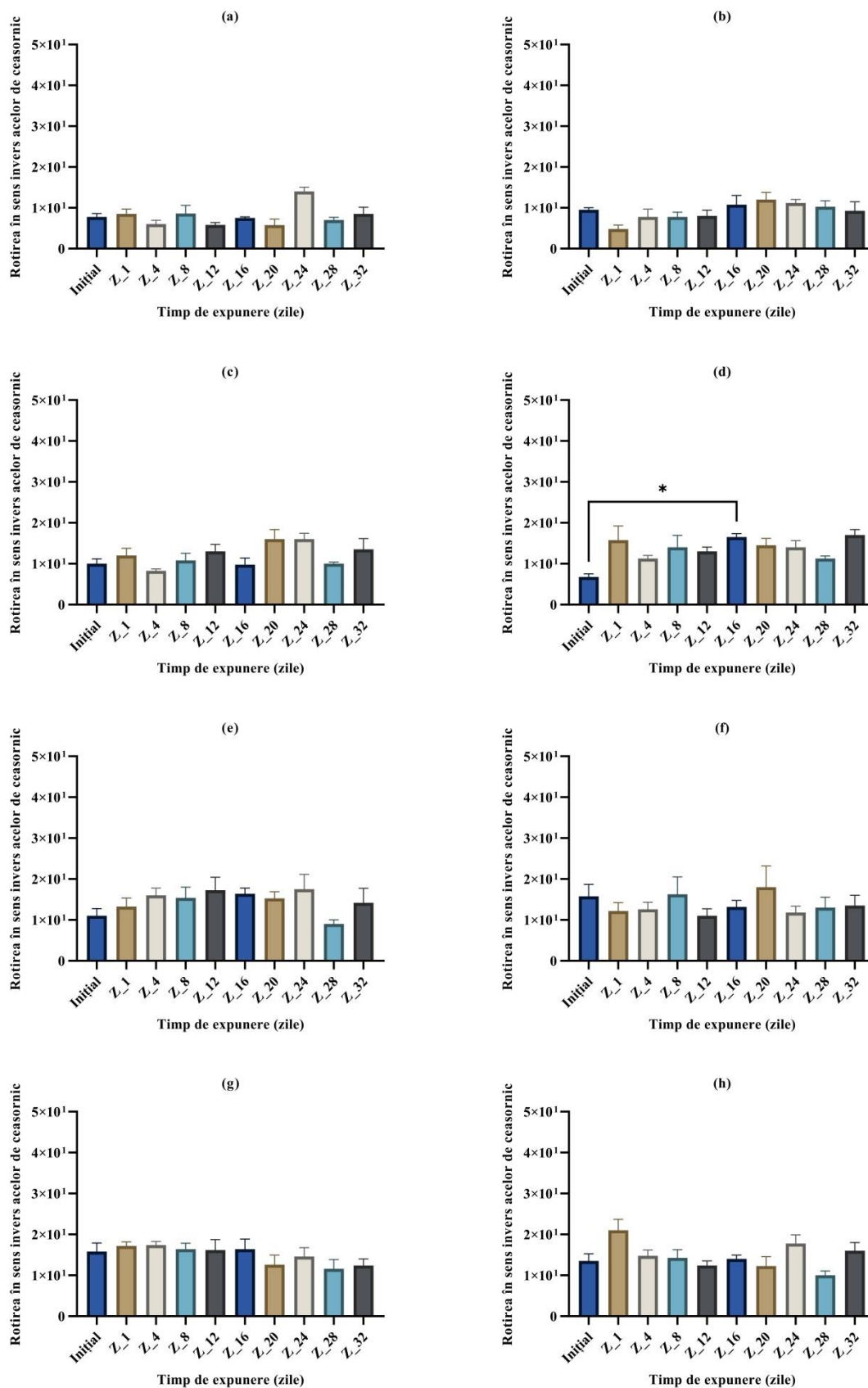
6.5. Rotirea în sens invers acelor de ceasornic

6.5.1. Expunerea la 2,5 $\mu\text{g/L}$ rotenonă

Deși fluctuațiile tiparelor comportamentale sunt observabile în toate cele opt grupuri, doar în trei am observat o diferență semnificativă statistic pe parcursul a 32 de zile de analiză. Am observat un model anormal reflectat de tendințele lor de rotire în grupul (a) CONTROL în Z₂₄ - $p = 0,026$ și (c) grup LEV/CARB în Z₂₄ - $p = 0,013$ în aceeași zi conform înregistrărilor realizate de camera verticală. Mai mult decât atât, a fost observată o diferență semnificativă în grupul (d) PROBIO în Z₁₆ - $p = 0,022$ pe baza traseului filmat de camera laterală. Tipare comportamentale anormale în celelalte cinci grupuri nu au mai fost notate ($p > 0,05$). Cu toate acestea, în grupurile care nu au fost expuse la rotenonă (a - d) se poate observa un model de rotație în continuă creștere. În celelalte patru grupuri (e - h) care au primit rotenonă în combinație cu alți agenți, acest comportament a fost amplificat, dar nesemnificativ statistic (Figura 6.11).



CAMERA VERTICALĂ



CAMERA LATERALĂ

Figura 6.11. Parametrul de rotație în sens invers acelor de ceasornic în grupurile *Danio rerio* (n = 5) studiate (valori exprimate ca medie cu SEM urmat de testul lui Dunnett; * - $p < 0,05$)

6.6. Evaluarea biomarkerilor oxidativi

6.6.1. Expunerea la 2 µg/L rotenonă

Analizând datele referitoare la OS după 21 de zile de administrare cronică a rotenonei la indivizii de pește zebură, am observat mai multe modificări în cazul biomarkerilor oxidativi (Figura 6.12). Pentru SOD nu a existat nicio diferență semnificativă între grupul CONTROL și celelalte trei ($p > 0,05$), ci mai degrabă atunci când am comparat grupul ROT cu PROBIO ($p = 0,014$) și ROT + PROBIO ($p = 0,011$). Activitatea enzimatică a scăzut în grupul ROT comparativ cu grupul CONTROL, dar nesemnificativ statistic. În schimb, grupul PROBIO a arătat o creștere a activității enzimatice a SOD, rezultat care confirmă datele din literatura de specialitate conform căror probioticele pot spori expresia SOD în celulele vii (Kong și colab., 2020) și răspunsul diferențial al organului investigat (Ünal și colab., 2019). Între timp, ultimul grup ROT + PROBIO a avut, de asemenea, o creștere a activității SOD, dar fără nicio schimbare considerabilă în comparație cu grupul CONTROL.

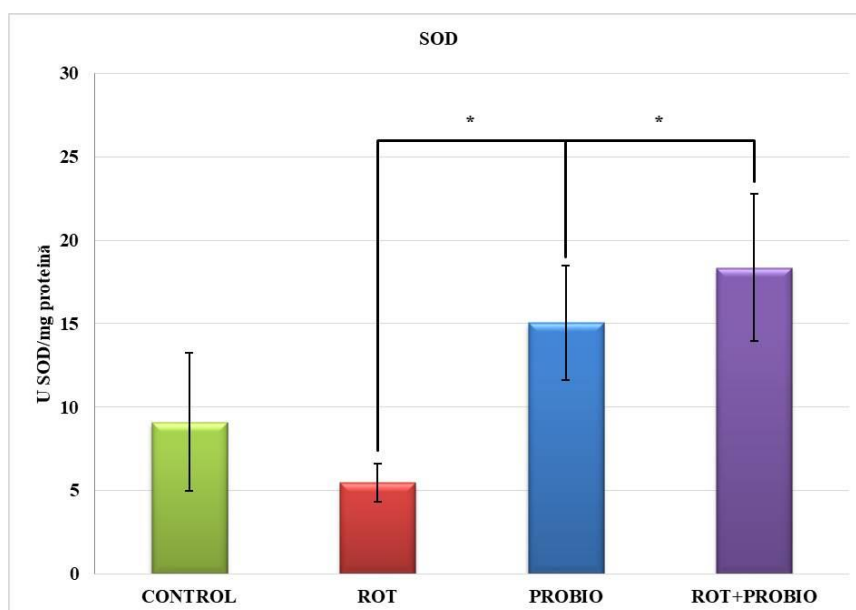


Figura 6.12. Activitatea enzimatică a SOD. Datele sunt exprimate ca medie $\pm$ SEM (* - $p < 0,05$)

În cazul GPx s-au obținut rezultate similare deoarece nu au existat diferențe semnificative statistic între grupul CONTROL și restul grupurilor investigate ($p > 0,05$). Pe de altă parte, a existat o schimbare semnificativă a expresiei GPx în comparație cu ROT și PROBIO ($p = 0,001$) și ROT + PROBIO ($p = 0,004$) (Figura 6.13).

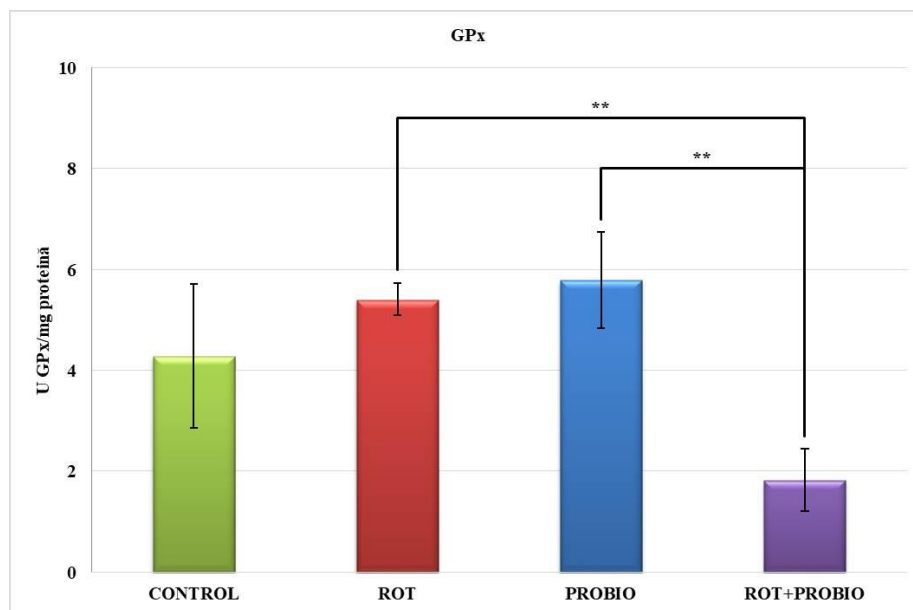


Figura 6.13. Activitatea enzimatică a GPx. Datele sunt exprimate ca medie $\pm$ SEM (- $p < 0,005$)**

Mai mult, principalul marker al peroxidării lipidice a prezentat un nivel ridicat ($p < 0,05$) în grupul CONTROL în comparație cu PROBIO ($p = 0,033$) și în contrast cu ROT + PROBIO ($p = 0,032$). De asemenea, au existat modificări semnificative în ceea ce privește nivelul de MDA între grupul ROT și PROBIO ($p = 0,009$), respectiv ROT + PROBIO ($p = 0,01$) (Figura 6.14).

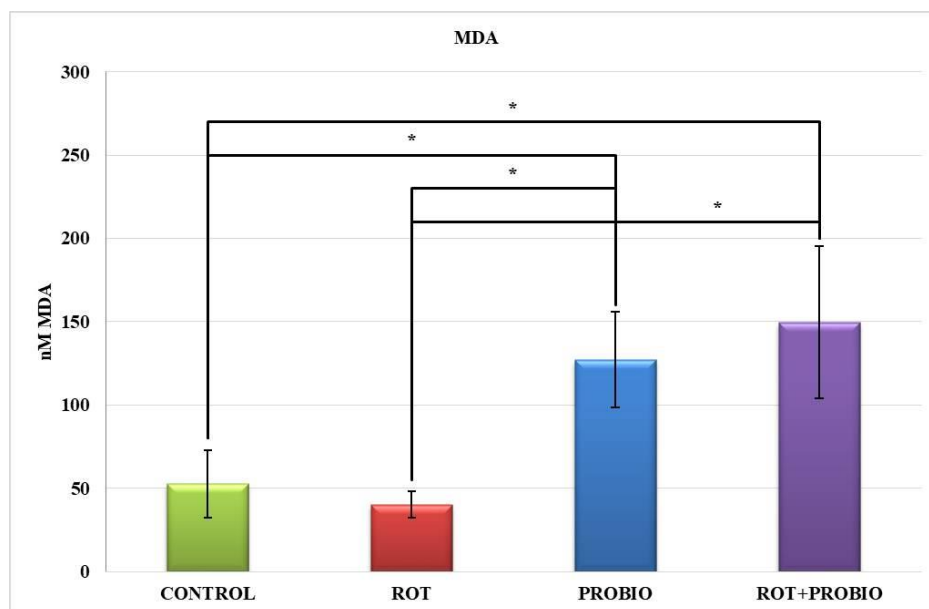


Figura 6.14. Nivelul MDA. Datele sunt exprimate ca medie $\pm$ SEM (* - $p < 0,05$)

6.6.2. Expunerea la 2,5 $\mu\text{g/L}$ rotenonă

Evaluarea biomarkerilor oxidativi a revelat o diferență semnificativă statistic în nivelul MDA între (b) VPA și (c) LEV/CARB ($p = 0,023$) și în comparație cu (d) PROBIO ($p = 0,009$). Există, de asemenea, modificări în activitatea enzimatică a SOD atunci când se

compară aceleași grupuri ($p = 0,025$). Activitatea enzimatică a SOD este mai mică în (e) ROT comparativ cu (c) LEV/CARB ($p = 0,034$), în raport cu nivelul MDA din grupul (e) ROT. Contrar așteptărilor noastre, nu există nicio diferență între grupul (a) CONTROL și grupurile experimentale expuse la rotenonă. Chiar dacă activitatea enzimatică a SOD în (f) ROT + VPA este similară cu cea a (e) ROT, nu există nicio diferență notabilă atunci când se compară rezultatele între grupurile expuse la rotenonă ($p > 0,05$). Sunt observabile ușoare modificări ale nivelului MDA în (f) ROT + VPA, (g) ROT + LEV/CARB și (h) ROT + PROBIO analog cu (a) CONTROL și (h) ROT + PROBIO în SOD (Figura 6.15).

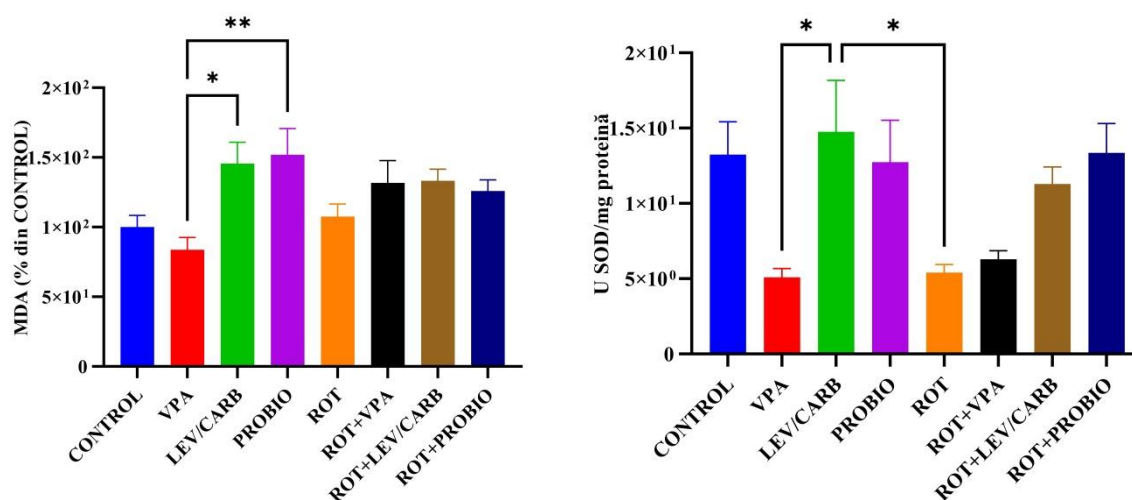


Figura 6.15. Activitatea enzimatică a SOD și nivelul MDA în grupurile *Danio rerio* studiate ($n = 5$) (* - $p < 0,05$; ** - $p < 0,005$; valori exprimate ca medie cu SEM urmat de testul Tukey HSD)

6.7. Determinarea modificărilor expresiei genice

6.7.1. Expunerea la 2,5 $\mu\text{g/L}$ rotenonă

Analizând rezultatele a patru gene legate de PD la peștele zebră expus la rotenonă, s-a constatat că nu a existat nicio diferență semnificativă statistic în *LRRK2* și *alpha-SNCA* ($p > 0,05$). Există diferențe semnificative statistic în *PARKIN* reflectat de o supraexprimare în (g) ROT + LEV/CARB comparativ cu fiecare grup experimental. Prin urmare, am observat în (a) CONTROL vs. (g) ROT + LEV/CARB, $p = 0,000$; (b) VPA vs. (g) ROT + LEV/CARB, $p = 0,000$; (c) LEV/CARB vs. (g) ROT + LEV/CARB, $p = 0,000$; (d) PROBIO vs. (g) ROT + LEV/CARB, $p = 0,000$; (e) ROT vs. (g) ROT + LEV/CARB, $p = 0,001$; (f) ROT + VPA vs. (g) ROT + LEV/CARB, $p = 0,002$; și (g) ROT + LEV/CARB vs. (h) ROT + PROBIO, $p = 0,007$. În cele din urmă, o altă expresie exacerbată a *PINK1* în (e) ROT a promovat trei situații în care am observat o diferență semnificativă statistic: (d)

PROBIO vs. (e) ROT, $p = 0,007$; (e) ROT vs. (g) ROT + LEV/CARB, $p = 0,010$; și (e) ROT vs. (h) ROT + PROBIO, $p = 0,008$ (Figura 6.16).

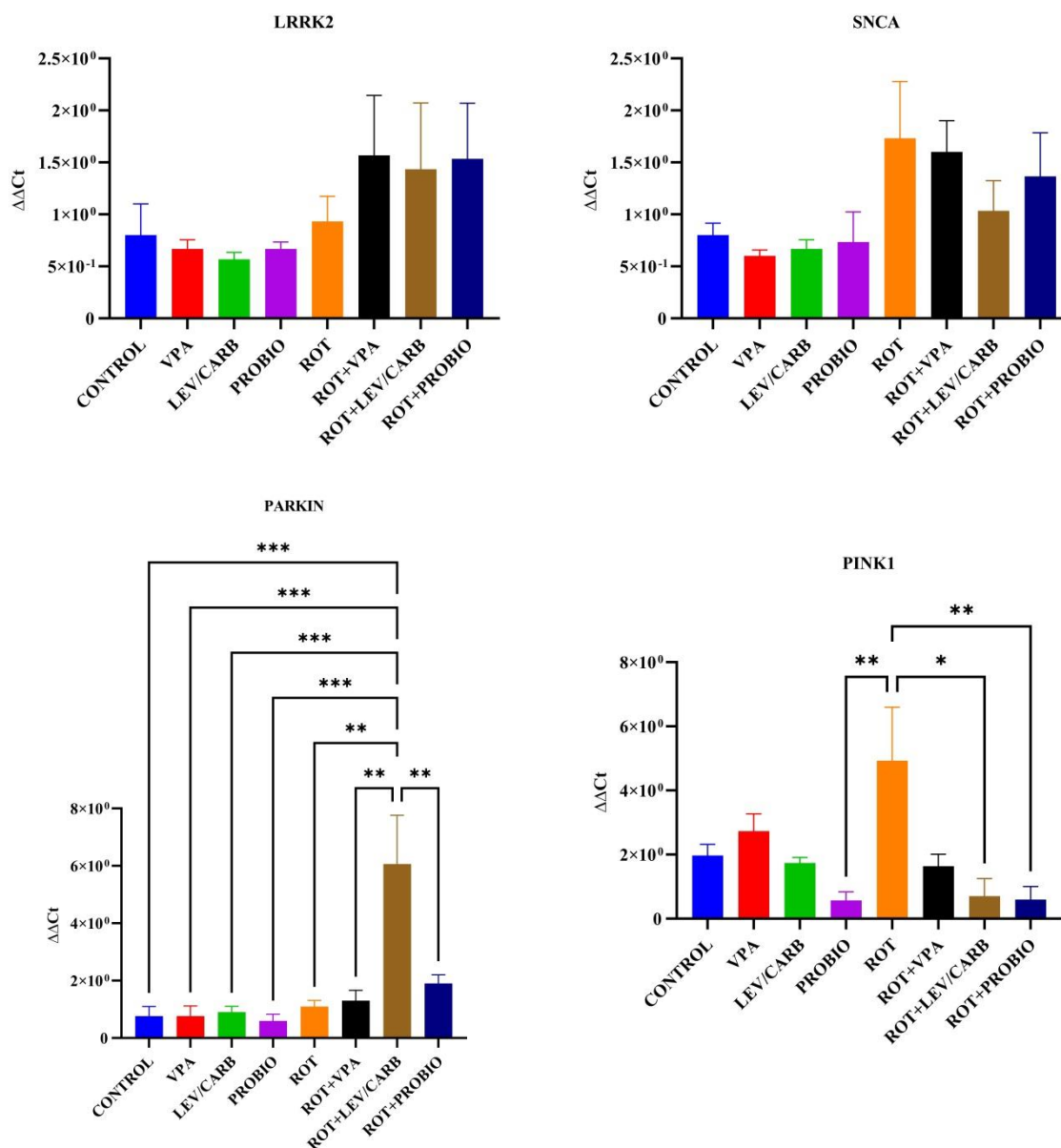


Figura 6.16. Valorile expresiilor relative pentru *LRRK2*, *alfa-SNCA*, *PARKIN* și *PINK1* în creierul grupurilor *Danio rerio* ($n = 3$) studiate (*- $p < 0,05$; ** - $p < 0,005$; *** - $p < 0,0005$; valori exprimate ca medie cu SEM urmat de testul Tukey HSD)

6.8. Stabilirea nivelului de dopamină

6.8.1. Expunerea la 2,5 μg/L rotenonă

Nivelul DA a atins un vârf în grupul (a) CONTROL, depășind toate grupurile experimentale cu excepția (b) VPA unde nu există nicio semnificație ($p > 0,05$). Există diferențe statistice în următoarele cazuri: (c) LEV/CARB, $p = 0,000$; (d) PROBIO, $p = 0,000$; (e) ROT, $p = 0,001$; (f) ROT + VPA, $p = 0,002$; (g) ROT + LEV/CARB, $p <$

0,0001; și (h) ROT + PROBIO, $p = 0,000$. De asemenea, în grupul (b) VPA au existat trei situații în care nivelul DA este crescut în comparație cu (c) LEV/CARB, $p = 0,024$; (g) ROT + LEV/CARB, $p = 0,009$; și (h) ROT + PROBIO, $p = 0,048$ (Figura 6.17).

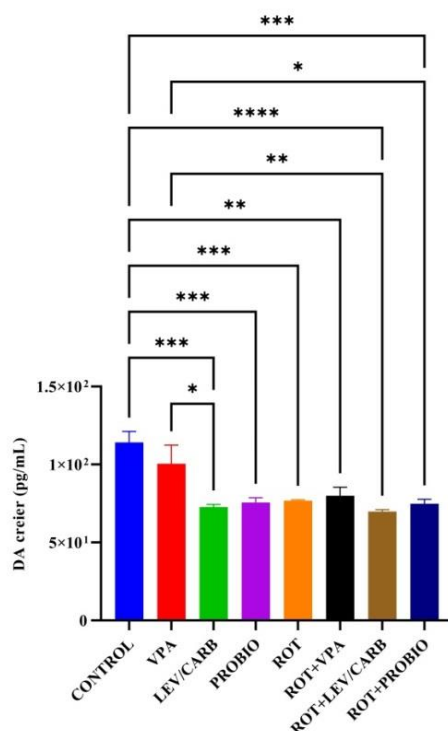


Figura 6.17. Nivelul DA din creier în grupurile *Danio rerio* ($n = 5$) studiate (*- $p < 0,05$; ** - $p < 0,005$; *** - $p < 0,0005$; **** - $p < 0,0001$; valori exprimate ca medie cu SEM urmat de testul Tukey HSD)

6.9. Evidențierea alterărilor histologice prin imunohistochimie

6.9.1. Expunerea la 2,5 $\mu\text{g/L}$ rotenonă

La nivelul tectumului optic din lotul (a) CONTROL s-a observat un marcaj moderat pe baza markerilor IHC utilizați unde PCNA marchează două zone mici de NSC și, respectiv, neuroblaste.

În (b) VPA pot fi observate zone de neurogeneză în mezencefal și angieneză în zona cenușie periventriculară. Markerii PCNA, S100b, GFAP și cox4i1 prezintă o expresie intensă în torus longitudinalis, torus semicircularis (zona periventriculară cenușie) și tegmentul bazal. Imunoreactivitatea proteinei S100b a fost detectată în special în tectusul optic mezencefalic, marcând fibrele nervoase, în special profilurile mai degrabă decât celulele. De fapt, imunoreactivitatea a fost concentrată în profilurile de fibre care traversează tectumul optic perpendicular pe partea exterioară în întregime. Mai mult, imunoreactivitatea proteinei S100b a fost localizată în continuare în zonele mediale și laterale ale valvulei cerebrale. Zona internă a tectumului optic situat în ventriculul tectal a

fost, de asemenea, căptușită cu celule pozitive pentru proteinele S100b și GFAP care prezintă caracteristici morfologice ale celulelor ependimale și celulelor subependimale. Celulele ependimale sunt mari și de formă rotundă, în timp ce celulele subependimale și celulele gliale prezintă procese radiale lungi care trec prin tectul optic și ajung la suprafața pială. Părțile dorsale și laterale ale torusului longitudinal au fost acoperite de celule ependimale care au proteina S100b, iar fibrele nervoase care formează comisura în partea ventrală a torusului longitudinal au fost, de asemenea, pozitive pentru proteina S100b.

Grupul (c) LEV/CARB a arătat insule de celule PCNA în comparație cu celelalte grupuri, capilare nou formate în diencefal și mezencefal. Markerii S100b și GFAP au fost etichetați pozitiv într-un număr mai mare de celule, în timp ce cox4i1 și p53 au prezentat un marcaj moderat.

În grupul (d) PROBIO a fost observat un marcaj pozitiv, în special pentru PCNA, S100b și GFAP și moderat pentru p53 și cox4i1.

Pe de altă parte, în (e) ROT s-a observat o reducere până la absență pentru PCNA, GFAP, S100b și un marcaj moderat pentru p53 și cox4i1.

În (f) ROT + VPA, (g) ROT + LEV/CARB și (h) ROT + PROBIO a existat o creștere a tuturor markerilor IHC, iar în (h) ROT + PROBIO, PCNA a marcat un număr mic de celule.

Rotenona a provocat o reducere a etichetării PCNA, ceea ce poate sugera o scădere a neurogenezei și, implicit, o creștere a disfuncției neuronale prin reducerea etichetării GFAP și S100b. Acest lucru ar putea fi explicat prin expresia p53 și cox4i1, care indică în continuare apoptoză și disfuncție mitocondrială.

Cu toate acestea, în grupurile (b) VPA, (c) LEV/CARB și (d) PROBIO există un marcaj pozitiv pentru neurogeneză (PCNA), apoptoză (p53) și prezența neuronilor radiali maturi, activi și a celulelor gliale (GFAP și S100b). Cox4i1 are pozitivitate în aceste grupuri, ceea ce denotă activitate mitocondrială intensă.

În cerebel au fost evidențiate RGC și neuroni din materia cenușie din stratul molecular, Purkinje și granular marcați cu GFAP, S100b, p53 și cox4i1 de intensitate apropiată cu tectul optic din fiecare experiment. Modelul de distribuție al proteinei S100b în cerebel diferă de cel al altor segmente ale SNC deoarece a fost localizat în principal în neuroni, mai frecvent decât în celulele gliale. În corpul cerebelului, proteina S100b a marcat neuronii mici din stratul molecular superficial. În plus, neuronii care alcătuiesc corpul cerebelos și nucleii profunzi au fost, de asemenea, imunoreactivi pentru S100b.

Neuronii Purkinje localizați în zona bazală au arătat o reacție puternică la proteina S100b atât în pericarion, cât și în arborele dendritic (Figura 6.18).

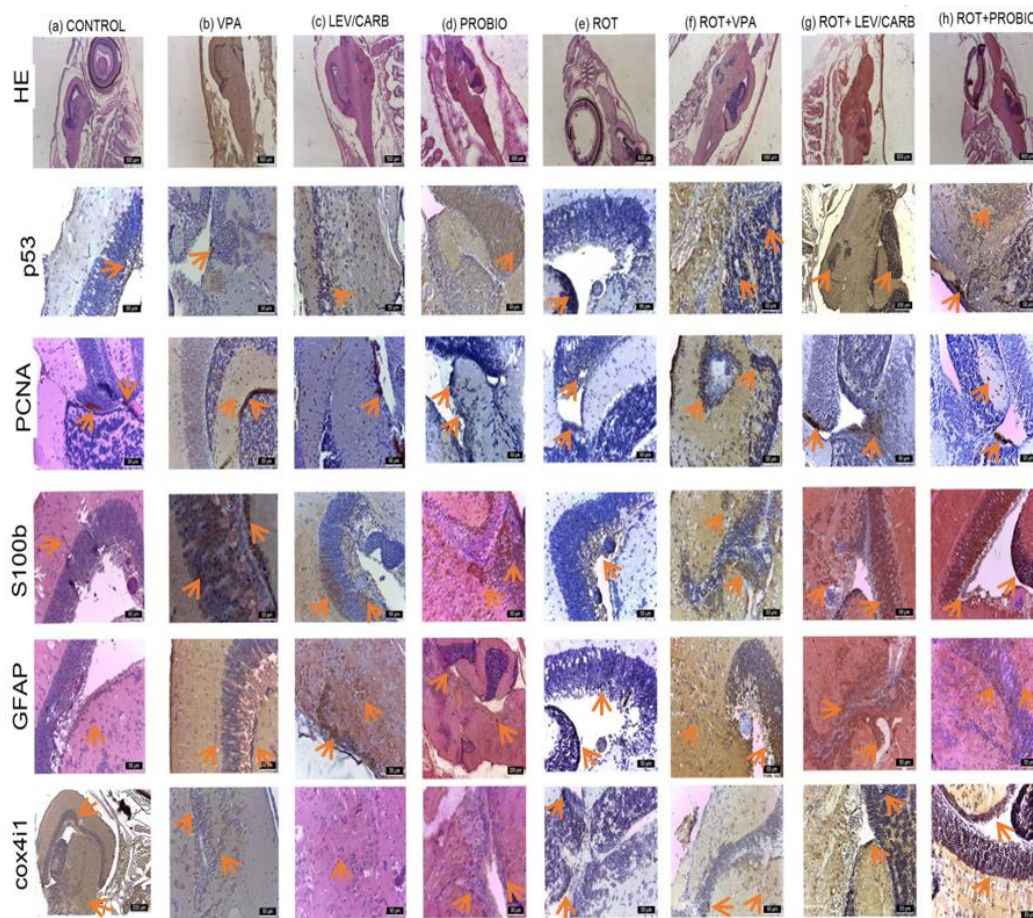


Figura 6.18. Reactivitatea sistemului nervos în grupurile *Danio rerio* studiate (n = 5) la HE, p53, PCNA, S100b, GFAP și cox4i1

Capitolul 7. Discuții

7.1. Impactul a 2 $\mu\text{g/L}$ rotenonă asupra sociabilității și locomoției

Am observat că administrarea a 2 $\mu\text{g/L}$ rotenonă a modificat valorile unui singur parametru dintre toți cei specifici locomoției. Astfel, rezultatele asociate distanței totale înotate sunt congruente cu un alt studiu existent în literatură care descrie inducerea unui fenotip non- și motor ușor după administrarea aceleiași concentrații pentru 28 de zile (Wang și colab., 2017).

Este interesant că starea activă a fost diferită în cazul celui de-al doilea și al patrulea grup care au primit rotenonă, respectiv, rotenonă și probiotice în prima zi de tratament. Administrarea de rotenonă a condus la o activitate anormală a peștilor zebură pe toată

perioada în comparație cu grupul expus la rotenonă și probiotice a căror activitate a fost ajustată după numai o săptămână de tratament cu probiotice. Când rotenona și probioticele au fost administrate împreună acest parametru nu a fost influențat semnificativ. Acesta ar putea fi un efect declanșat de prezența probioticelor în mediu, fapt sugerat de rezultatele obținute pentru grupul al treilea expus doar la probiotice, caz în care activitatea lor a fost crescută în prima săptămână de tratament comparativ cu fenotipul înregistrat în pretratament. Din nefericire spectrul cunoștințelor este limitat doar la prezentul studiu în ceea ce privește afectarea și evaluarea componentei sociale în paralel cu activitatea locomotorie în peștii zebură.

7.2. Impactul a 2,5 µg/L rotenonă asupra caracterului anti-social și agresivității

Observăm un fenotip specific în grupul (a) CONTROL și (c) LEV/CARB ($p < 0,05$), dar și în grupul (d) PROBIO în comparație cu referința inițială ($p < 0,05$). Intrigant, nu au existat modificări comportamentale adiționale importante în parametrul de rotație în sens invers acelor de ceasornic în grupurile expuse la acid valproic și rotenonă singură sau în combinație. În (a) CONTROL, (d) PROBIO, (g) ROT + LEV/CARB și (h) ROT + PROBIO nu au fost observate oscilații anormale semnificative în comportament. În (b) VPA, (c) LEV/CARB, (e) ROT și (f) ROT + VPA au fost observate cele mai pronunțate tipare comportamentale atipice cu cel mai mult timp petrecut în ambele brațe ($p < 0,05$, $0,005$, $0,001$). Grupurile (a) CONTROL și (d) PROBIO au prezentat un grad redus de agresivitate, comparabil cu fluctuațiile afișate în (b) VPA, (c) LEV/CARB, (e) ROT, (f) ROT + VPA, (g) ROT + LEV/CARB și (h) ROT + PROBIO.

7.3. Impactul a 2,5 µg/L asupra activității locomotorii

S-a demonstrat că 2,5 µg/L rotenonă nu a influențat în mod semnificativ niciunul dintre parametrii evaluați. Animalele care au primit această doză au prezentat un comportament normal peste medie în comparație cu restul grupurilor experimentale deoarece au înregistrat cea mai mare distanță la înot cu cea mai mare viteză și cele mai puține episoade de îngheț. Rezultatele noastre sunt congruente cu cele ale studiului nostru anterior (Ilie și colab., 2021) și studiului lui (Wang și colab., 2017) în urma administrării a 2 µg/L rotenonă timp de 21 - 28 de zile.

Totuși, din acest punct pot deriva trei scenarii de caz ipotetice prin care s-ar putea explica această situație: peștele zebură începe să metabolizeze rotenona administrată, calea de administrare nu asigură ingestia adecvată a compusului sau perioada de expunere nu

este suficientă la concentrația selectată. Mai mult, există și alte variabile referitoare la analizele comportamentale legate de stres. Am emis ipoteza conform căreia testarea zilnică ar putea accelera rata metabolică, ceea ce poate stimula și mai mult efectul rotenonei, reflectat de generarea anormală de radicali liberi. Pe de altă parte, testarea la intervale specifice ar putea să nu exercite un impact puternic asupra ratei metabolice. Din păcate, cele mai multe dintre datele actuale referitoare la disfuncțiile locomotorii au fost raportate pe săptămână (Khotimah și colab., 2015a, 2015b) sau nu sunt specificate (Cansız și colab., 2021; Ünal și colab., 2020) și nu au vizat informații referitoare la reînnoirea substanțelor utilizate.

7.4. Impactul a 2 µg/L rotenonă asupra biomarkerilor oxidativi

În studiul nostru am observat mai multe modificări ale activității enzimatică a principalilor antioxidanți, dar și a nivelului markerului specific peroxidării lipidice.

Tratamentul cu 2 µg/L rotenonă timp de 21 de zile duce la o scădere a activității enzimatică a SOD care a fost în acord cu cea a lui (Khan și Ali, 2018) la pacienții cu PD. Pe de altă parte, activitatea SOD și GPx a fost sporită de probiotice așa cum s-a demonstrat prin administrarea de *Lactobacillus fermentum* la porcine (Wang și colab., 2009).

7.5. Impactul a 2,5 µg/L rotenonă asupra biomarkerilor oxidativi

Activitatea enzimatică a SOD și nivelul MDA în grupul CONTROL au fost nesemnificativ mai mari decât cele ale grupului ROT ($p > 0,05$) și mai mici decât cei care au primit *Bifidobacterium longum* BB536 și *Lactobacillus rhamnosus* HN001 singur sau în combinație cu rotenona în cazul MDA ($p < 0,05$) (Ilie și colab., 2021).

Deși au existat diferențe ușoare în nivelul MDA în contrast cu activitatea enzimatică a SOD, aceste niveluri au atins un vârf în grupurile (c) LEV/CARB și (d) PROBIO. Interesant, nu au existat diferențe semnificative între (a) CONTROL și grupurile experimentale, în special la peștii zebură expuși la rotenonă.

Deși nivelul de MDA este mai scăzut în contrast cu cele patru grupuri expuse la rotenonă, nu există modificări semnificative, similare activității enzimatică a SOD care este în mod obiectiv mai mare pentru aceleași grupuri, dar nesemnificativ ($p > 0,05$). Aceste date nu sunt în acord cu studiul nostru anterior (Ilie și colab., 2021), dar acesta este al doilea studiu care evaluează statusul markerilor oxidativi la concentrații mici folosind individul întreg, nu numai creierul sau intestinul (Cansız și colab., 2021; Ünal și colab., 2020). În timp ce activitatea enzimatică a SOD este mai mare la peștii zebură adulți

sănătoși, peștii zebură tratați cu rotenonă au avut un nivel ridicat de MDA în creier și intestin comparativ cu indivizii sănătoși în unele circumstanțe.

O posibilă explicație care ar trebui testată pentru lipsa de semnificație este că acidul valproic, levodopa și carbidopa și probioticele combinate cu rotenona exercită un fenomen antagonic, anulându-și reciproc efectele.

7.6. Impactul a 2,5 $\mu\text{g/L}$ rotenonă asupra expresiei genelor

Rezultatele noastre consolidează și mai mult observațiile făcute de (Ünal și colab., 2020) și le contrazic pe cele ale lui (Wang și colab., 2017). În timp ce rotenona în grupurile expuse la rotenonă (e - h) sporește expresia *LRRK2* în comparație cu celelalte patru loturi care nu au fost expuse la rotenonă (a - d), nu inhibă expresia *alfa-SNCA*, o tendință similară cu cea a *LRRK2*. Mai mult, rotenona amplifică expresia *PINK1* și a *PARKIN*, posibil atribuită potențialului neuroactiv al levodopei și carbidopei. Rezultatele lui (Ünal și colab., 2020) și (Wang și colab., 2017) sunt confirmate într-o oarecare măsură deoarece susțin că rotenona diminuează expresia *PINK1* și a *PARKIN*, dar în cazuri particulare.

7.7. Impactul a 2,5 $\mu\text{g/L}$ rotenonă asupra nivelului de dopamină

Nivelul de DA din creier în grupul (a) CONTROL a fost superior în șase situații distincte, susținut de o diferență semnificativă statistic, în paralel cu cele trei situații din grupul (b) VPA. *Centella asiatica* (Khotimah și colab., 2015a) și mitochinona (Ünal și colab., 2020) sporesc nivelul de DA la peștii zebură care suferă o depleție cauzată de expunerea la rotenonă (Khotimah și colab., 2015b). Unul dintre cele mai elocvente exemple ale efectului rotenonei asupra nivelului de DA este oferit de studiile lui (Alam și Schmidt, 2002) și (Biehlmaier și colab., 2007). Ip cu 1,5 mg/kg, 2 mg/kg/zi și 2,5 mg/kg între 10 zile și 2 luni induce degenerarea neuronilor dopaminergici (Landau și colab., 2021) în partea posterioară a striatului, PFC și SN.

7.8. Modificările histologice asociate administrării a 2,5 $\mu\text{g/L}$

Majoritatea NSC în condiții homeostatice sunt considerate RGC de tip I repaus, un model notabil în grupul (a) CONTROL. Când telencefalul este deteriorat și supus agresiunii, mai multe NSC sunt activate, intră în ciclul celular și încep să exprime markeri de proliferare (März și colab., 2010), situație observată în fiecare grup experimental, cu excepția (e) ROT. În plus, în toate grupurile experimentale cu excepția (e) ROT a fost

observată o expresie intensă a GFAP ventriculară și S100b a telencefalului și mezencefalului, care sunt dens populate de corpurile celulare ale RGC.

Acidul valproic atenuează leziunile tisulare și neuronale, îmbunătățește restaurarea funcțională și stimulează neurogeneza și integrarea operațională. Această stimulare a neurogenezei a fost observată în (b) VPA și (f) ROT + VPA. În acest experiment, am sugerat că efectele levodopei observate în (g) ROT + LEV/CARB s-au datorat absorbției sale în sistemul neuronal sau glial din citoplasma celulelor. Celulele gliale ale SVZ joacă un rol esențial în neurogeneza peștilor zebură adulți (Wasel și Freeman, 2020), ceea ce explică prezența expresiei GFAP și S100b în SVZ la pești în toate grupurile experimentale, cu excepția (e) ROT. În mod interesant, angiogeneza a fost observată în acest experiment de trei ori: în grupul (b) VPA, (c) LEV/CARB și (g) ROT + LEV/CARB.

Concluzii generale

Judecând prin prisma rezultatelor preconizate, obținute și reliefate în cadrul prezentei teze doctorale derivă o serie de concluzii.

1. Peștele zebură (*Danio rerio*) poate fi privit drept un organism model ideal în cercetarea biomedicală pe baza repertoriului vast de care beneficiază, în principal a tipologiilor comportamentale care asigură decodificarea mecanismelor din spatele tulburărilor neurodegenerative printre care și fenotipul asociat bolii Parkinson.

2. Rotenona este un agent viabil cu spectru larg de aplicabilitate în neuroștiință, al cărui profil neurotoxicologic permite inducerea unor particularități ale comportamentului într-o manieră dependentă de durata de expunere și doza administrată care mimează specific tabloul simptomatic al bolii Parkinson.

3. Deși în literatura de specialitate se argumentează utilizarea cu succes a 5 $\mu\text{g/L}$, aceasta s-a dovedit a fi letală, motiv pentru care am considerat oportună o evaluare preliminară concluzionând că 2 $\mu\text{g/L}$, respectiv 2,5 $\mu\text{g/L}$ pentru 21 - 32 pot fi administrate cu succes pentru a menține constantă rata de supraviețuire.

4. Concentrația de 2 $\mu\text{g/L}$ rotenonă a fost insuficientă pentru a modifica notabil comportamentul indivizilor în testul de interacțiune socială administrată în paralel cu sau fără *Bifidobacterium longum* BB536 (150 mg) și *Lactobacillus rhamnosus* HN001 (25 mg) la finele celor 21 de zile de testare în labirintul T (2D).

5. Contrar așteptărilor noastre, indivizii expuși doar la 2 $\mu\text{g/L}$ rotenonă, respectiv *Bifidobacterium longum* BB536 (150 mg) și *Lactobacillus rhamnosus* HN001 (25 mg) în doză mixtă au afișat tipare comportamentale diametral opuse celor tipice expunerii cronice per parametrii locomotorii analizați în labirintul T (2D) așa cum este indicat de distanța totală înotată, viteza și starea activă la încheierea perioadei de analiză la 21 de zile.

6. Doar patru dintre cele opt grupuri experimentale au manifestat preferință față de brațul drept și central în timpul sesiunii în labirintul T (2D), ceea ce sugerează mai departe potențialul neuroactiv al acidului valproic (0,5 mg/mL) administrat singur sau în combinație cu rotenona (2,5 $\mu\text{g/L}$) și cel al levodopei și carbidopei (250 mg + 25 mg) pe baza intervalului prestabilit de expunere cronică timp de 32 de zile.

7. *Lactobacillus casei* W56, *Lactobacillus acidophilus* W22, *Lactobacillus paracasei* W20, *Lactobacillus salivarius* W24, *Lactobacillus lactis* W19, *Lactobacillus*

plantarum W62, *Bifidobacterium lactis* W51, *Bifidobacterium lactis* W52 și *Bifidobacterium bifidum* W23 (3 g) modulează comportamentul agresiv al peștilor zebra în testul oglinzii efectuat în labirintul T (2D), observație care nu este validă în cazul celorlalte șapte grupuri, inclusiv cel căruia s-a administrat rotenonă (2,5 µg/L) în paralel timp de 32 de zile.

8. Valorile asociate rotirii în sens invers acelor de ceasornic efectuat în 3D ca parametru de referință pentru o posibilă tulburare neurologică au fost constante în toate cele opt grupuri experimentale pe durata întregii perioade de analiză comportamentală, inclusiv când acidul valproic (0,5 mg/mL), levodopa și carbidopa (250 mg + 25 mg) și *Lactobacillus casei* W56, *Lactobacillus acidophilus* W22, *Lactobacillus paracasei* W20, *Lactobacillus salivarius* W24, *Lactobacillus lactis* W19, *Lactobacillus plantarum* W62, *Bifidobacterium lactis* W51, *Bifidobacterium lactis* W52 și *Bifidobacterium bifidum* W23 (3 g) au fost administrate singure la peștii zebra sau concomitent cu rotenona (2,5 µg/L) pentru 32 de zile.

9. Similar observațiilor realizate în urma expunerii la 2 µg/L rotenonă pentru 21 de zile, peștii sănătoși care nu au fost expuși niciunui compus chimic exogen adițional au parcurs cea mai mică distanță la cea mai redusă viteză de înot cuplate cu cele mai numeroase episoade de imobilitate în contrast cu celelalte grupuri experimentale, în special prin raportare la cele expuse la 2,5 µg/L rotenonă pentru 32 de zile în 3D.

10. Concentrația de 2 µg/L rotenonă nu a influențat semnificativ statusul biomarkerilor oxidativi, ci a cauzat o diferență interindividuală, mai precis în peștii zebra expuși la rotenonă și *Bifidobacterium longum* BB536 (150 mg) și *Lactobacillus rhamnosus* HN001 (25 mg) unde s-a observat o creștere a activității SOD și a nivelului de MDA comparativ cu GPx unde raportul s-a modificat între loturile expuse la rotenonă singură sau în doză mixtă cu *Bifidobacterium longum* BB536 (150 mg) și *Lactobacillus rhamnosus* HN001 (25 mg).

11. Concentrația de 2,5 µg/L rotenonă nu a influențat semnificativ statusul biomarkerilor oxidativi, ci s-a constatat o exacerbare a activității enzimatică a SOD și a nivelului de MDA în lotul căruia s-a administrat levodopa și carbidopa (250 mg + 25 mg), analog și pentru grupul suplimentat cu *Lactobacillus casei* W56, *Lactobacillus acidophilus* W22, *Lactobacillus paracasei* W20, *Lactobacillus salivarius* W24, *Lactobacillus lactis* W19, *Lactobacillus plantarum* W62, *Bifidobacterium lactis* W51, *Bifidobacterium lactis* W52 și *Bifidobacterium bifidum* W23 (3 g).

12. Deși obiectiv s-a observat o amplificare a expresiei în *LRRK2* și *alfa-SNCA* în loturile expuse la 2,5 µg/L rotenonă, acestea nu au fost semnificative, dar a promovat o exacerbare a expresiei genei *PARKIN* sau în doză mixtă cu levodopa și carbidopa (250 mg + 25 mg) în *PINK1*.

13. Concentrația de 2,5 µg/L rotenonă nu a cauzat o depleție a nivelului de dopamină din creier în cele patru loturi experimentale expuse, inclusiv în cazul loturilor expuse la *Lactobacillus casei* W56, *Lactobacillus acidophilus* W22, *Lactobacillus paracasei* W20, *Lactobacillus salivarius* W24, *Lactobacillus lactis* W19, *Lactobacillus plantarum* W62, *Bifidobacterium lactis* W51, *Bifidobacterium lactis* W52 și *Bifidobacterium bifidum* W23 (3 g) și levodopa și carbidopa (250 mg + 25 mg).

14. Acidul valproic (0,5 mg/mL), levodopa și carbidopa (250 mg + 25 mg) și *Lactobacillus casei* W56, *Lactobacillus acidophilus* W22, *Lactobacillus paracasei* W20, *Lactobacillus salivarius* W24, *Lactobacillus lactis* W19, *Lactobacillus plantarum* W62, *Bifidobacterium lactis* W51, *Bifidobacterium lactis* W52 și *Bifidobacterium bifidum* W23 (3 g) exercită un efect neuroprotector prin susținerea angiogenezei și neurogenezei împotriva acțiunii antagonice a 2,5 µg/L rotenonă unde s-a notat angrenarea procesului de apoptoză.

15. Deși se certifică efectul neuroactiv protector exercitat de agenții ipotetizați a fi inhibitori ai rotenonei, în cadrul prezentei cercetări nu s-a realizat o cuantificare a proteinelor prin ELISA sau Western blot sau a citokinelor inflamatorii pentru a confirma neuroinflamația.

16. Cumulativ, dorim o extrapolare prin crearea și aplicarea unor protocoale de lucru care vizează analiza microflorei gastrointestinale la peștii zebră pentru a stabili atât raportul, cât și încărcătura microbiană ca o consecință a administrării de rotenonă, acid valproic, levodopa și carbidopa și probiotice.

Bibliografie selectivă

- Abreu, M.T., 2010. Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal function. *Nat. Rev. Immunol.* 10, 131–144.
- Alam, M., Schmidt, W.J., 2002. Rotenone destroys dopaminergic neurons and induces parkinsonian symptoms in rats. *Behav. Brain Res.* 136, 317–324.
- Amieva-Balmori, M., Remes-Troche, J.M., 2020. Chapter 32 - Dyssynergic defecation and defecation disorders. In: Rao, S.S.C., Lee, Y.Y., Ghoshal, U.C. (Eds.). *Clinical and Basic Neurogastroenterology and Motility*. Academic Press, pp. 445–461.
- Artenie, V., Ungureanu, E., Negura, A.M., 2008. Metode de investigare a metabolismului glucidic si lipidic. Edit. Pim, Iași, pp. 149–152.
- Arumugam, M., Raes, J., Pelletier, E., Le Paslier, D., Yamada, T., Mende, D.R., Fernandes, G.R., Tap, J., Bruls, T., Batto, J.-M., Bertalan, M., Borruel, N., Casellas, F., Fernandez, L., Gautier, L., Hansen, T., Hattori, M., Hayashi, T., Kleerebezem, M., Kurokawa, K., Leclerc, M., Levenez, F., Manichanh, C., Nielsen, H.B., Nielsen, T., Pons, N., Poulain, J., Qin, J., Sicheritz-Ponten, T., Tims, S., Torrents, D., Ugarte, E., Zoetendal, E.G., Wang, J., Guarner, F., Pedersen, O., de Vos, W.M., Brunak, S., Doré, J., Consortium, M., Antolín, M., Artiguenave, F., Blottiere, H.M., Almeida, M., Brechot, C., Cara, C., Chervaux, C., Cultrone, A., Delorme, C., Denariáz, G., Dervyn, R., Foerstner, K.U., Friss, C., van de Guchte, M., Guedon, E., Haimet, F., Huber, W., van Hylckama-Vlieg, J., Jamet, A., Juste, C., Kaci, G., Knol, J., Lakhdari, O., Layec, S., Le Roux, K., Maguin, E., Mérieux, A., Melo Minardi, R., M'rini, C., Muller, J., Oozeer, R., Parkhill, J., Renault, P., Rescigno, M., Sanchez, N., Sunagawa, S., Torrejon, A., Turner, K., Vandemeulebrouck, G., Varela, E., Winogradsky, Y., Zeller, G., Weissenbach, J., Ehrlich, S.D., Bork, P., 2011. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*. 473, 174–180.
- Arunachalam, M., Raja, M., Vijayakumar, C., Malaiammal, P., Mayden, R.L., 2013. Natural history of zebrafish (*Danio rerio*) in India. *Zebrafish*. 10, 1–14.
- Ascherio, A., Schwarzschild, M.A., 2016. The epidemiology of Parkinson's disease: risk factors and prevention. *Lancet Neurol.* 15, 1257–1272.
- Bäckhed, F., Ley, R.E., Sonnenburg, J.L., Peterson, D.A., Gordon, J.I., 2005. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science*. 307, 1915–1920.
- Bae, Y.-K., Kani, S., Shimizu, T., Tanabe, K., Nojima, H., Kimura, Y., Higashijima, S., Hibi, M., 2009. Anatomy of zebrafish cerebellum and screen for mutations affecting

- its development. *Dev. Biol.* 330, 406–426.
- Bastías-Candia, S., Zolezzi, J.M., Inestrosa, N.C., 2019. Revisiting the Paraquat-Induced Sporadic Parkinson's Disease-Like Model. *Mol. Neurobiol.* 56, 1044–1055.
- Bauman, Z.M., Evans, C.H., 2018. Volvulus. *Surg. Clin. North Am.* 98, 973–993.
- Berer, K., Krishnamoorthy, G., 2012. Commensal gut flora and brain autoimmunity: a love or hate affair? *Acta Neuropathol.* 123, 639–651.
- Bevins, C.L., Salzman, N.H., 2011. Paneth cells, antimicrobial peptides and maintenance of intestinal homeostasis. *Nat. Rev. Microbiol.* 9, 356–368.
- Bharucha, A.E., Lacy, B.E., 2020. Mechanisms, Evaluation, and Management of Chronic Constipation. *Gastroenterology.* 158, 1232-1249.e3.
- Biehlmaier, O., Alam, M., Schmidt, W.J., 2007. A rat model of Parkinsonism shows depletion of dopamine in the retina. *Neurochem. Int.* 50, 189–195.
- Blauwendraat, C., Nalls, M.A., Singleton, A.B., 2020. The genetic architecture of Parkinson's disease. *Lancet Neurol.* 19, 170–178.
- Bohm, M., Siwiec, R.M., Wo, J.M., 2013. Diagnosis and Management of Small Intestinal Bacterial Overgrowth. *Nutr. Clin. Pract.* 28, 289–299.
- Bové, J., Prou, D., Perier, C., Przedborski, S., 2005. Toxin-induced models of Parkinson's disease. *NeuroRX.* 2, 484–494.
- Braak, E., Sandmann-Keil, D., Rüb, U., Gai, W.P., de Vos, R.A.I., Jansen Steur, E.N.H., Arai, K., Braak, H., 2001. alpha-synuclein immunopositive Parkinson's disease-related inclusion bodies in lower brain stem nuclei. *Acta Neuropathol.* 101, 195–201.
- Braak, H., Braak, E., Yilmazer, D., de Vos, R.A.I., Jansen, E.N.H., Bohl, J., 1996. Pattern of brain destruction in Parkinson's and Alzheimer's diseases. *J. Neural Transm (Vienna).* 103, 455–490.
- Braak, H., de Vos, R.A.I., Bohl, J., Del Tredici, K., 2006. Gastric alpha-synuclein immunoreactive inclusions in Meissner's and Auerbach's plexuses in cases staged for Parkinson's disease-related brain pathology. *Neurosci. Lett.* 396, 67–72.
- Braak, H., Rüb, U., Gai, W.P., Del Tredici, K., 2003. Idiopathic Parkinson's disease: possible routes by which vulnerable neuronal types may be subject to neuroinvasion by an unknown pathogen. *J. Neural Transm (Vienna).* 110, 517–536.
- Braak, H., Tredici, K., Del, Rüb, U., de Vos, R.A.I., Jansen Steur, E.N.H., Braak, E., 2003. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol. Aging.* 24, 197–211.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram

- quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Brigo, F., Erro, R., Marangi, A., Bhatia, K., Tinazzi, M., 2014. Differentiating drug-induced parkinsonism from Parkinson's disease: An update on non-motor symptoms and investigations. *Parkinsonism Relat. Disord.* 20, 808–814.
- Brown, G.D., Willment, J.A., Whitehead, L., 2018. C-type lectins in immunity and homeostasis. *Nat. Rev. Immunol.* 18, 374–389.
- Bushmann, M., Dobmeyer, S.M., Leeker, L., Perlmutter, J.S., 1989. Swallowing abnormalities and their response to treatment in Parkinson's disease. *Neurology.* 39, 1309–1314.
- Byrd, A.L., Belkaid, Y., Segre, J.A., 2018. The human skin microbiome. *Nat. Rev. Microbiol.* 16, 143–155.
- Camilleri, M., Chedid, V., Ford, A.C., Haruma, K., Horowitz, M., Jones, K.L., Low, P.A., Park, S.-Y., Parkman, H.P., Stanghellini, V., 2018. Gastroparesis. *Nat. Rev. Dis. Primers.* 4, 41.
- Canani, R.B., Costanzo, M. Di, Leone, L., Pedata, M., Meli, R., Calignano, A., 2011. Potential beneficial effects of butyrate in intestinal and extraintestinal diseases. *World J. Gastroenterol.* 17, 1519–1528.
- Cansız, D., Ünal, İ., Üstündağ, Ü.V., Alturfan, A.A., Altinoz, M.A., Elmacı, İ., Emekli-Alturfan, E., 2021. Caprylic acid ameliorates rotenone induced inflammation and oxidative stress in the gut-brain axis in Zebrafish. *Mol. Biol. Rep.* 48, 5259–5273.
- Charvin, D., Medori, R., Hauser, R.A., Rascol, O., 2018. Therapeutic strategies for Parkinson disease: beyond dopaminergic drugs. *Nat. Rev. Drug Discov.* 17, 804–822.
- Chaudhuri, K.R., Schapira, A.H. V, 2009. Non-motor symptoms of Parkinson's disease: dopaminergic pathophysiology and treatment. *Lancet Neurol.* 8, 464–474.
- Chen, J.J., Marsh, L., 2014. Anxiety in Parkinson's disease: identification and management. *Ther. Adv. Neurol. Disord.* 7, 52–59.
- Chi, L., Bian, X., Gao, B., Tu, P., Ru, H., Lu, K., 2017. The Effects of an Environmentally Relevant Level of Arsenic on the Gut Microbiome and Its Functional Metagenome. *Toxicol. Sci.* 160, 193–204.
- Ciobica, A., Olteanu, Z., Padurariu, M., Hritcu, L., 2012. The effects of pergolide on memory and oxidative stress in a rat model of Parkinson's disease. *J. Physiol. Biochem.* 68, 59–69.
- Commission Recommendation, 2007. Guidelines for the accommodation and care of

- animals used for experimental and other scientific purposes (notified under document number C(2007) 2525). Off. J. Eur. Union 50.
- Consortium, I.H.M.P. (iHMP) R.N., 2019. The Integrative Human Microbiome Project. *Nature*. 569, 641–648.
- Crosnier, C., Stamataki, D., Lewis, J., 2006. Organizing cell renewal in the intestine: stem cells, signals and combinatorial control. *Nat. Rev. Genet.* 7, 349–359.
- Dănău, A., Dumitrescu, L., Lefter, A., Tulbă, D., Popescu, B.O., 2021. Small Intestinal Bacterial Overgrowth as Potential Therapeutic Target in Parkinson’s Disease. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 11663.
- de Vos, W.M., de Vos, E.A.J., 2012. Role of the intestinal microbiome in health and disease: from correlation to causation. *Nutr. Rev.* 70 Suppl 1, S45–S56.
- Directive 63, 2010. The protection of animals used for scientific purposes. Off. J. Eur. Union 53.
- Dobbs, R.J., Dobbs, S.M., Weller, C., Charlett, A., Bjarnason, I.T., Curry, A., Ellis, D.S., Ibrahim, M.A.A., McCrossan, M. V, O’Donohue, J., Owen, R.J., Oxlade, N.L., Price, A.B., Sanderson, J.D., Sudhanva, M., Williams, J., 2008. Helicobacter hypothesis for idiopathic parkinsonism: before and beyond. *Helicobacter*. 13, 309–322.
- Dorsey, E.R., Constantinescu, R., Thompson, J.P., Biglan, K.M., Holloway, R.G., Kieburtz, K., Marshall, F.J., Ravina, B.M., Schifitto, G., Siderowf, A., Tanner, C.M., 2007. Projected number of people with Parkinson disease in the most populous nations, 2005 through 2030. *Neurology*. 68, 384–386.
- Dorsey, E.R., Elbaz, A., Nichols, E., Abd-Allah, F., Abdelalim, A., Adsuar, J.C., Ansha, M.G., Brayne, C., Choi, J.-Y.J., Collado-Mateo, D., Dahodwala, N., Do, H.P., Edessa, D., Endres, M., Fereshtehnejad, S.-M., Foreman, K.J., Gankpe, F.G., Gupta, R., Hankey, G.J., Hay, S.I., Hegazy, M.I., Hibstu, D.T., Kasaeian, A., Khader, Y., Khalil, I., Khang, Y.-H., Kim, Y.J., Kokubo, Y., Logroscino, G., Massano, J., Mohamed Ibrahim, N., Mohammed, M.A., Mohammadi, A., Moradi-Lakeh, M., Naghavi, M., Nguyen, B.T., Nirayo, Y.L., Ogbo, F.A., Owolabi, M.O., Pereira, D.M., Postma, M.J., Qorbani, M., Rahman, M.A., Roba, K.T., Safari, H., Safiri, S., Satpathy, M., Sawhney, M., Shafieesabet, A., Shiferaw, M.S., Smith, M., Szoeki, C.E.I., Tabarés-Seisdedos, R., Truong, N.T., Ukwaja, K.N., Venketasubramanian, N., Villafaina, S., weldegwergrs, K. gidey, Westerman, R., Wijeratne, T., Winkler, A.S., Xuan, B.T., Yonemoto, N., Feigin, V.L., Vos, T., Murray, C.J.L., 2018. Global, regional, and national burden of Parkinson’s disease, 1990-2016: a systematic analysis for the

- Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Neurol.* 17, 939–953.
- Drapeau, P., Saint-Amant, L., Buss, R.R., Chong, M., McDearmid, J.R., Brustein, E., 2002. Development of the locomotor network in zebrafish. *Prog. Neurobiol.* 68, 85–111.
- Edwards, L., Quigley, E.M.M., Hofman, R., Pfeiffer, R.F., 1993. Gastrointestinal symptoms in parkinson disease: 18-month follow-up study. *Mov. Disord.* 8, 83–86.
- Edwards, L.L., Quigley, E.M.M., Pfeiffer, R.F., 1992. Gastrointestinal dysfunction in Parkinson's disease. *Neurology.* 42, 726–732.
- Fasano, A., Bove, F., Gabrielli, M., Petracca, M., Zocco, M.A., Ragazzoni, E., Barbaro, F., Piano, C., Fortuna, S., Tortora, A., Di Giacopo, R., Campanale, M., Gigante, G., Lauritano, E.C., Navarra, P., Marconi, S., Gasbarrini, A., Bentivoglio, A.R., 2013. The role of small intestinal bacterial overgrowth in Parkinson's disease. *Mov. Disord.* 28, 1241–1249.
- Fernando, S., Sarma, D.R., 2021. Rare but relevant: a systematic review of stercoral perforation. *Br. J. Hosp. Med. (Lond).* 82, 1–7.
- Gao, F., Chen, D., Hu, Q., Wang, G., 2013. Rotenone Directly Induces BV2 Cell Activation via the p38 MAPK Pathway. *PLoS One.* 8, e72046.
- Gao, X., Chen, H., Schwarzschild, M.A., Ascherio, A., 2011. A prospective study of bowel movement frequency and risk of Parkinson's disease. *Am. J. Epidemiol.* 174, 546–551.
- Gasbarrini, A., Lauritano, E.C., Gabrielli, M., Scarpellini, E., Lupascu, A., Ojetti, V., Gasbarrini, G., 2007. Small intestinal bacterial overgrowth: diagnosis and treatment. *Dig. Dis.* 25, 237–240.
- Gingold, D., Murrell, Z., 2012. Management of colonic volvulus. *Clin. Colon Rectal Surg.* 25, 236–244.
- Group, N.I.H.H.M.P.W., Peterson, J., Garges, S., Giovanni, M., McInnes, P., Wang, L., Schloss, J.A., Bonazzi, V., McEwen, J.E., Wetterstrand, K.A., Deal, C., Baker, C.C., Di Francesco, V., Howcroft, T.K., Karp, R.W., Lunsford, R.D., Wellington, C.R., Belachew, T., Wright, M., Giblin, C., David, H., Mills, M., Salomon, R., Mullins, C., Akolkar, B., Begg, L., Davis, C., Grandison, L., Humble, M., Khalsa, J., Little, A.R., Peavy, H., Pontzer, C., Portnoy, M., Sayre, M.H., Starke-Reed, P., Zakhari, S., Read, J., Watson, B., Guyer, M., 2009. The NIH Human Microbiome Project. *Genome Res.* 19, 2317–2323.
- Gupta, R.C., 2007. Chapter 42 - Rotenone. In: Gupta, R.C. (Ed.). *Veterinary Toxicology*.

- Basic and Clinical Principles*. Academic Press, pp. 499–501.
- Gupta, R.C., 2012. Chapter 52 - Rotenone. In: Gupta, R.C. (Ed.). *Veterinary Toxicology*. (Second Edition). *Basic and Clinical Principles*. Academic Press, pp. 620–623.
- Hakansson, A., Molin, G., 2011. Gut microbiota and inflammation. *Nutrients*. 3, 637–682.
- Harnsberger, C.R., 2019. Acute colonic pseudo-obstruction (Ogilvie's syndrome). *Semin. Colon Rectal Surg.* 30, 100690.
- Hawkes, C.H., Del Tredici, K., Braak, H., 2007. Parkinson's disease: a dual-hit hypothesis. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 33, 599–614.
- Hijaz, B.A., Volpicelli-Daley, L.A., 2020. Initiation and propagation of α -synuclein aggregation in the nervous system. *Mol. Neurodegener.* 15, 19.
- Hill, D.A., Artis, D., 2010. Intestinal bacteria and the regulation of immune cell homeostasis. *Annu. Rev. Immunol.* 28, 623–667.
- Hoehn, M.M., Yahr, M.D., 1967. Parkinsonism: onset, progression and mortality. *Neurology*. 17, 427–442.
- Hollister, E.B., Gao, C., Versalovic, J., 2014. Compositional and functional features of the gastrointestinal microbiome and their effects on human health. *Gastroenterology*. 146, 1449–1458.
- Hooper, L. V, Macpherson, A.J., 2010. Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. *Nat. Rev. Immunol.* 10, 159–169.
- Huang, Y., Zhang, J., Han, X., Huang, T., 2014. The use of zebrafish (*Danio rerio*) behavioral responses in identifying sublethal exposures to deltamethrin. *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 11, 3650–3660.
- Idalencio, R., Lopes, T.M., Soares, S.M., Pompermaier, A., de Alcantara Barcellos, H.H., Kalichak, F., Fagundes, M., de Oliveira, C.M., Barcellos, L.J.G., 2021. Effect of levodopa/carbidopa on stress response in zebrafish. *J. Comp. Physiol. A. Neuroethol. Sens. Neural Behav. Physiol.* 207, 393–399.
- Ilie, O.-D., Duta, R., Balmus, I.-M., Savuca, A., Petrovici, A., Nita, I.-B., Antoci, L.-M., Jijie, R., Mihai, C.-T., Ciobica, A., Nicoara, M., Popescu, R., Dobrin, R., Solcan, C., Trifan, A., Stanciu, C., Doroftei, B., 2022a. Assessing the Neurotoxicity of a Sub-Optimal Dose of Rotenone in Zebrafish (*Danio rerio*) and the Possible Neuroactive Potential of Valproic Acid, Combination of Levodopa and Carbidopa, and Lactic Acid Bacteria Strains. *Antioxidants (Basel)*. 11, 2040.
- Ilie, O.-D., Duta, R., Jijie, R., Nita, I.-B., Nicoara, M., Faggio, C., Dobrin, R., Mavroudis, I., Ciobica, A., Doroftei, B., 2022b. Assessing Anti-Social and Aggressive Behavior

- in a Zebrafish (*Danio rerio*) Model of Parkinson's Disease Chronically Exposed to Rotenone. *Brain Sci.* 12, 898.
- Ilie, O.-D., Paduraru, E., Robea, M.-A., Balmus, I.-M., Jijie, R., Nicoara, M., Ciobica, A., Nita, I.-B., Dobrin, R., Doroftei, B., 2021. The Possible Role of *Bifidobacterium longum* BB536 and *Lactobacillus rhamnosus* HN001 on Locomotor Activity and Oxidative Stress in a Rotenone-Induced Zebrafish Model of Parkinson's Disease. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2021, 9629102.
- Innos, J., Hickey, M.A., 2021. Using Rotenone to Model Parkinson's Disease in Mice: A Review of the Role of Pharmacokinetics. *Chem. Res. Toxicol.* 34, 1223–1239.
- Jain, A., Vargas, H.D., 2012. Advances and challenges in the management of acute colonic pseudo-obstruction (ogilvie syndrome). *Clin. Colon Rectal Surg.* 25, 37–45.
- Jan, A., Gonçalves, N.P., Vaegter, C.B., Jensen, P.H., Ferreira, N., 2021. The Prion-Like Spreading of Alpha-Synuclein in Parkinson's Disease: Update on Models and Hypotheses. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 8338.
- Johansson, M.E. V, Phillipson, M., Petersson, J., Velcich, A., Holm, L., Hansson, G.C., 2008. The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 15064–15069.
- Jones-Freeman, B., Chonwerawong, M., Marcelino, V.R., Deshpande, A. V, Forster, S.C., Starkey, M.R., 2021. The microbiome and host mucosal interactions in urinary tract diseases. *Mucosal Immunol.* 14, 779–792.
- Jung, T., Bader, N., Grune, T., 2007. Lipofuscin: formation, distribution, and metabolic consequences. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1119, 97–111.
- Kalueff, A. V, Gebhardt, M., Stewart, A.M., Cachat, J.M., Brimmer, M., Chawla, J.S., Craddock, C., Kyzar, E.J., Roth, A., Landsman, S., Gaikwad, S., Robinson, K., Baatrup, E., Tierney, K., Shamchuk, A., Norton, W., Miller, N., Nicolson, T., Braubach, O., Gilman, C.P., Pittman, J., Rosemberg, D.B., Gerlai, R., Echevarria, D., Lamb, E., Neuhauss, S.C.F., Weng, W., Bally-Cuif, L., Schneider Henning, and the Z.N.R.C. (ZNRC), 2013. Towards a comprehensive catalog of zebrafish behavior 1.0 and beyond. *Zebrafish.* 10, 70–86.
- Kamada, N., Seo, S.-U., Chen, G.Y., Núñez, G., 2013. Role of the gut microbiota in immunity and inflammatory disease. *Nat. Rev. Immunol.* 13, 321–335.
- Kastl, A.J., Terry, N.A., Wu, G.D., Albenberg, L.G., 2020. The Structure and Function of the Human Small Intestinal Microbiota: Current Understanding and Future Directions. *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.* 9, 33–45.

- Kawai, T., Akira, S., 2011. Toll-like Receptors and Their Crosstalk with Other Innate Receptors in Infection and Immunity. *Immunity*. 34, 637–650.
- Keage, M., Delatycki, M., Corben, L., Vogel, A., 2015. A systematic review of self-reported swallowing assessments in progressive neurological disorders. *Dysphagia*. 30, 27–46.
- Kell, A.M., Gale, M.J., 2015. RIG-I in RNA virus recognition. *Virology*. 479–480, 110–121.
- Khan, Z., Ali, S.A., 2018. Oxidative stress-related biomarkers in Parkinson's disease: A systematic review and meta-analysis. *Iran. J. Neurol*. 17, 137–144.
- Khedr, E.M., El Fetoh, N.A., Khalifa, H., Ahmed, M.A., El Beh, K.M.A., 2013. Prevalence of non motor features in a cohort of Parkinson's disease patients. *Clin. Neurol. Neurosurg*. 115, 673–677.
- Khoruts, A., Sadowsky, M.J., 2016. Understanding the mechanisms of faecal microbiota transplantation. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol*. 13, 508–516.
- Khotimah, H., Ali, M., Sumitro, S.B., Widodo, M.A., 2015a. Decreasing α -synuclein aggregation by methanolic extract of *Centella asiatica* in zebrafish Parkinson's model. *Asian Pac. J. Trop. Biomed*. 5, 948–954.
- Khotimah, H., Sumitro, S., Widodo, M., 2015b. Zebrafish Parkinson's model: Rotenone decrease motility, dopamine, and increase α -synuclein aggregation and apoptosis of zebrafish brain. *Int. J. PharmTech Res*. 8, 614–621.
- Kilian, M., Chapple, I.L.C., Hannig, M., Marsh, P.D., Meuric, V., Pedersen, A.M.L., Tonetti, M.S., Wade, W.G., Zaura, E., 2016. The oral microbiome – an update for oral healthcare professionals. *Br. Dent. J*. 221, 657–666.
- Kilkenny, C., Browne, W.J., Cuthill, I.C., Emerson, M., Altman, D.G., 2010. Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. *PLOS Biol*. 8, e1000412.
- Klee, E.W., Ebbert, J.O., Schneider, H., Hurt, R.D., Ekker, S.C., 2011. Zebrafish for the study of the biological effects of nicotine. *Nicotine Tob. Res*. 13, 301–312.
- Klingelhoefer, L., Reichmann, H., 2015. Pathogenesis of Parkinson disease--the gut-brain axis and environmental factors. *Nat. Rev. Neurol*. 11, 625–636.
- Knudsen, K., Krogh, K., Østergaard, K., Borghammer, P., 2017. Constipation in parkinson's disease: Subjective symptoms, objective markers, and new perspectives. *Mov. Disord*. 32, 94–105.
- Kong, L., Xiong, Z., Song, X., Xia, Y., Zhang, H., Yang, Y., Ai, L., 2020. Enhanced

- Antioxidant Activity in *Streptococcus thermophilus* by High-Level Expression of Superoxide Dismutase. *Front. Microbiol.* 11, 579804.
- Kountouras, J., Zavos, C., Polyzos, S.A., Deretzi, G., Vardaka, E., Giartza-Taxidou, E., Katsinelos, P., Rapti, E., Chatzopoulos, D., Tzilves, D., Stergiopoulos, C., Christodoulou, K., 2012. Helicobacter pylori infection and Parkinson's disease: apoptosis as an underlying common contributor. *Eur. J. Neurol.* 19, e56–e56.
- Krishnan, S., Alden, N., Lee, K., 2015. Pathways and functions of gut microbiota metabolism impacting host physiology. *Curr. Opin. Biotechnol.* 36, 137–145.
- Lakraj, A.A., Moghimi, N., Jabbari, B., 2013. Sialorrhea: anatomy, pathophysiology and treatment with emphasis on the role of botulinum toxins. *Toxins (Basel)*. 5, 1010–1031.
- Landau, R., Halperin, R., Sullivan, P., Zibly, Z., Leibowitz, A., Goldstein, D., Sharabi, Y., 2021. The rat rotenone model reproduces the abnormal pattern of central catecholamine metabolism found in Parkinson's disease. *Dis. Model. Mech.* 15, dmm049082.
- Lawana, V., Cannon, J.R., 2020. Chapter Five - Rotenone neurotoxicity: Relevance to Parkinson's disease. In: Aschner, M., Costa, L.G. (Eds.). *Advances in Neurotoxicology*. Academic Press, pp. 209–254.
- Levy, M., Blacher, E., Elinav, E., 2017. Microbiome, metabolites and host immunity. *Curr. Opin. Microbiol.* 35, 8–15.
- Lin, C.-H., Lin, J.-W., Liu, Y.-C., Chang, C.-H., Wu, R.-M., 2014. Risk of Parkinson's disease following severe constipation: a nationwide population-based cohort study. *Parkinsonism Relat. Disord.* 20, 1371–1375.
- Longstreth, G.F., Thompson, W.G., Chey, W.D., Houghton, L.A., Mearin, F., Spiller, R.C., 2006. Functional bowel disorders. *Gastroenterology*. 130, 1480–1491.
- Losurdo, G., Salvatore D'Abramo, F., Indelicati, G., Lillo, C., Ierardi, E., Di Leo, A., 2020. The Influence of Small Intestinal Bacterial Overgrowth in Digestive and Extra-Intestinal Disorders. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 3531.
- Lugrin, J., Martinon, F., 2018. The AIM2 inflammasome: Sensor of pathogens and cellular perturbations. *Immunol. Rev.* 281, 99–114.
- Ly, Z., Jiang, H., Xu, H., Song, N., Xie, J., 2011. Increased iron levels correlate with the selective nigral dopaminergic neuron degeneration in Parkinson's disease. *J. Neural Transm (Vienna)*. 118, 361–369.
- Ma, N., Guo, P., Zhang, J., He, T., Kim, S.W., Zhang, G., Ma, X., 2018. Nutrients Mediate

- Intestinal Bacteria-Mucosal Immune Crosstalk. *Front. Immunol.* 9, 5.
- Macfarlane, S., Macfarlane, G.T., 2003. Regulation of short-chain fatty acid production. *Proc. Nutr. Soc.* 62, 67–72.
- Mah, L., Szabuniewicz, C., Fiocco, A.J., 2016. Can anxiety damage the brain? *Curr. Opin. Psychiatry.* 29 56–63.
- Maresova, P., Klimova, B., Novotny, M., Kuca, K., 2016. Alzheimer's and Parkinson's Diseases: Expected Economic Impact on Europe-A Call for a Uniform European Strategy. *J. Alzheimer's Dis.* 54, 1123–1133.
- Marras, C., Lang, A., van de Warrenburg, B.P., Sue, C.M., Tabrizi, S.J., Bertram, L., Mercimek-Mahmutoglu, S., Ebrahimi-Fakhari, D., Warner, T.T., Durr, A., Assmann, B., Lohmann, K., Kostic, V., Klein, C., 2016. Nomenclature of genetic movement disorders: Recommendations of the international Parkinson and movement disorder society task force. *Mov. Disord.* 31, 436–457.
- Marsh, L., 2013. Depression and Parkinson's disease: current knowledge. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* 13, 409.
- Martin-Harris, B., Jones, B., 2008. The videofluorographic swallowing study. *Phys. Med. Rehabil. Clin. N. Am.* 19, 769–785.
- März, M., Chapouton, P., Diotel, N., Vaillant, C., Hesl, B., Takamiya, M., Lam, C.S., Kah, O., Bally-Cuif, L., Strähle, U., 2010. Heterogeneity in progenitor cell subtypes in the ventricular zone of the zebrafish adult telencephalon. *Glia.* 58, 870–888.
- McCluskey, B.M., Postlethwait, J.H., 2015. Phylogeny of zebrafish, a "model species," within *Danio*, a "model genus". *Mol. Biol. Evol.* 32, 635–652.
- Melvin, S.D., Wilson, S.P., 2013. The utility of behavioral studies for aquatic toxicology testing: a meta-analysis. *Chemosphere.* 93, 2217–2223.
- Meredith, G.E., Totterdell, S., Petroske, E., Santa Cruz, K., Callison, R.C., Lau, Y.-S., 2002. Lysosomal malfunction accompanies alpha-synuclein aggregation in a progressive mouse model of Parkinson's disease. *Brain Res.* 956, 156–165.
- Mertsalmi, T.H., Aho, V.T.E., Pereira, P.A.B., Paulin, L., Pekkonen, E., Auvinen, P., Scheperjans, F., 2017. More than constipation - bowel symptoms in Parkinson's disease and their connection to gut microbiota. *Eur. J. Neurol.* 24, 1375–1383.
- Miller, N., Walshe, M., Walker, R., 2019. Sialorrhea in Parkinson's disease: prevalence, impact and management strategies. *Res. Rev. Park* 2019, 17–28.
- Motta, V., Soares, F., Sun, T., Philpott, D.J., 2015. NOD-like receptors: versatile cytosolic sentinels. *Physiol. Rev.* 95, 149–178.

- Mozaffari, S., Nikfar, S., Daniali, M., Abdollahi, M., 2020. The pharmacological management of constipation in patients with Parkinson's disease: a much-needed relief. *Expert Opin. Pharmacother.* 21, 701–707.
- Noble, E.E., Hsu, T.M., Kanoski, S.E., 2017. Gut to Brain Dysbiosis: Mechanisms Linking Western Diet Consumption, the Microbiome, and Cognitive Impairment. *Front. Behav. Neurosci.* 11, 9.
- Obokhare, I., 2012. Fecal impaction: a cause for concern? *Clin. Colon Rectal Surg.* 25, 53–58.
- Okumura, R., Takeda, K., 2017. Roles of intestinal epithelial cells in the maintenance of gut homeostasis. *Exp. Mol. Med.* 49, e338–e338.
- Palanissami, G., Paul, S.F.D., 2018. RAGE and Its Ligands: Molecular Interplay Between Glycation, Inflammation, and Hallmarks of Cancer-a Review. *Horm. Cancer.* 9, 295–325.
- Paquet, J.-C., Claus, S.P., Cordaillat-Simmons, M., Mazier, W., Rawadi, G., Rinaldi, L., Elustondo, F., Rouanet, A., 2021. Entering First-in-Human Clinical Study With a Single-Strain Live Biotherapeutic Product: Input and Feedback Gained From the EMA and the FDA. *Front. Med (Lausanne)*. 8:716266.
- Parkman, H.P., Hasler, W.L., Fisher, R.S., 2004. American Gastroenterological Association technical review on the diagnosis and treatment of gastroparesis. *Gastroenterology.* 127, 1592–1622.
- Poewe, W., Seppi, K., Tanner, C.M., Halliday, G.M., Brundin, P., Volkmann, J., Schrag, A.-E., Lang, A.E., 2017. Parkinson disease. *Nat. Rev. Dis. Primers.* 3, 17013.
- Pont-Sunyer, C., Hotter, A., Gaig, C., Seppi, K., Compta, Y., Katzenschlager, R., Mas, N., Hofeneder, D., Brücke, T., Bayés, A., Wenzel, K., Infante, J., Zach, H., Pirker, W., Posada, I.J., Álvarez, R., Ispuerto, L., De Fàbregues, O., Callén, A., Palasí, A., Aguilar, M., Martí, M.J., Valldeoriola, F., Salamero, M., Poewe, W., Tolosa, E., 2015. The onset of nonmotor symptoms in Parkinson's disease (the ONSET PD study). *Mov. Disord.* 30, 229–237.
- Porta, E.A., 2002. Pigments in aging: an overview. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 959, 57–65.
- Potulska, A., Friedman, A., Królicki, L., Spychala, A., 2003. Swallowing disorders in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat. Disord.* 9, 349–353.
- Pringsheim, T., Jette, N., Frolkis, A., Steeves, T.D.L., 2014. The prevalence of Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis. *Mov. Disord.* 29, 1583–1590.
- Quigley, E.M.M., Quera, R., 2006. Small intestinal bacterial overgrowth: roles of

- antibiotics, prebiotics, and probiotics. *Gastroenterology*. 130 Suppl 1, S78–S90.
- Rainboth, W., 1994. Inland fishes of India and adjacent countries. *Rev. Fish Biol. Fish.* 4, 135–136.
- Rajilić-Stojanović, M., de Vos, W.M., 2014. The first 1000 cultured species of the human gastrointestinal microbiota. *FEMS Microbiol. Rev.* 38, 996–1047.
- Rao, S.S.C., Patcharatrakul, T., 2016. Diagnosis and Treatment of Dyssynergic Defecation. *J. Neurogastroenterol. Motil.* 22, 423–435.
- Razali, K., Othman, N., Mohd Nasir, M.H., Doolaanea, A.A., Kumar, J., Ibrahim, W.N., Mohamed Ibrahim, N., Mohamed, W.M.Y., 2021. The Promise of the Zebrafish Model for Parkinson's Disease: Today's Science and Tomorrow's Treatment. *Front. Genet.* 12, 655550.
- Rea, K., Dinan, T.G., Cryan, J.F., 2016. The microbiome: A key regulator of stress and neuroinflammation. *Neurobiol. Stress.* 4, 23–33.
- Reed, B., Jennings, M., 2011. Guidance on the housing and care of Zebrafish (*Danio rerio*). RSPCA: Horsham, UK, 2011.
- Riga, D., Riga, S., Luka, E., Teodorescu, C., Ispas, S., 2015. TRANSDISCIPLINARITY OF TIME RESEARCH IN BIO-MEDICINE. *Proc. Rom. Acad. Ser. B.* 17, 165–177.
- Riga, S., Riga, D., 1995. An antistress and antiaging neurometabolic therapy. Accelerated lipofuscinolysis and stimulated anabolic regeneration by the antagonic-stress synergistic formula. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 771, 535–550.
- Robea, M.-A., Balmus, I.-M., Ciobica, A., Strungaru, S., Plavan, G., Gorgan, L.D., Savuca, A., Nicoara, M., 2020. Parkinson's Disease-Induced Zebrafish Models: Focussing on Oxidative Stress Implications and Sleep Processes. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2020, 1370837.
- Ruhl, N., McRobert, S.P., Currie, W.J.S., 2009. Shoaling preferences and the effects of sex ratio on spawning and aggression in small laboratory populations of zebrafish (*Danio rerio*). *Lab Anim. (NY)*. 38, 264–269.
- Saldana Ruiz, N., Kaiser, A.M., 2017. Fecal incontinence - Challenges and solutions. *World J. Gastroenterol.* 23, 11–24.
- Sanders, M.E., Merenstein, D.J., Reid, G., Gibson, G.R., Rastall, R.A., 2019. Probiotics and prebiotics in intestinal health and disease: from biology to the clinic. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 16, 605–616.
- Savica, R., Carlin, J.M., Grossardt, B.R., Bower, J.H., Ahlskog, J.E., Maraganore, D.M., Bharucha, A.E., Rocca, W.A., 2009. Medical records documentation of constipation

- preceding Parkinson disease: A case-control study. *Neurology*. 73, 1752–1758.
- Scheperjans, F., 2016. Can microbiota research change our understanding of neurodegenerative diseases? *Neurodegener. Dis. Manag.* 6, 81–85.
- Scheperjans, F., 2018. The prodromal microbiome. *Mov. Disord.* 33, 5–7.
- Schrag, A., Horsfall, L., Walters, K., Noyce, A., Petersen, I., 2015. Prediagnostic presentations of Parkinson's disease in primary care: a case-control study. *Lancet Neurol.* 14, 57–64.
- Schulz, J.D., Hawkes, E.L., Shaw, C.A., 2006. Cycad toxins, *Helicobacter pylori* and parkinsonism: cholesterol glucosides as the common denominator. *Med. Hypotheses*. 66, 1222–1226.
- Seehafer, S.S., Pearce, D.A., 2006. You say lipofuscin, we say ceroid: defining autofluorescent storage material. *Neurobiol. Aging*. 27, 576–588.
- Sharma, V.D., Patel, M., Miocinovic, S., 2020. Surgical Treatment of Parkinson's Disease: Devices and Lesion Approaches. *Neurotherapeutics*. 17, 1525–1538.
- Sherer, T.B., Betarbet, R., Testa, C.M., Seo, B.B., Richardson, J.R., Kim, J.H., Miller, G.W., Yagi, T., Matsuno-Yagi, A., Greenamyre, J.T., 2003. Mechanism of toxicity in rotenone models of Parkinson's disease. *J. Neurosci.* 23, 10756–10764.
- Silva, Y.P., Bernardi, A., Frozza, R.L., 2020. The Role of Short-Chain Fatty Acids From Gut Microbiota in Gut-Brain Communication. *Front. Endocrinol (Lausanne)*. 11, 25.
- Spence, R., Gerlach, G., Lawrence, C., Smith, C., 2008. The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 83, 13–34.
- Spence, R., Smith, C., 2005. Male territoriality mediates density and sex ratio effects on oviposition in the zebrafish, *Danio rerio*. *Anim. Behav.* 69, 1317–1323.
- Stewart, A., Wong, K., Cachat, J., Gaikwad, S., Kyzar, E., Wu, N., Hart, P., Piet, V., Utterback, E., Elegante, M., Tien, D., Kalueff, A. V., 2011. Zebrafish models to study drug abuse-related phenotypes. *Rev. Neurosci.* 22, 95–105.
- Strandwitz, P., 2018. Neurotransmitter modulation by the gut microbiota. *Brain Res.* 1693, 128–133.
- Su, A., Gandhi, R., Barlow, C., Triadafilopoulos, G., 2017. Clinical and manometric characteristics of patients with Parkinson's disease and esophageal symptoms. *Dis. Esophagus*. 30, 1–6.
- Sun, L., Wu, J., Du, F., Chen, X., Chen, Z.J., 2013. Cyclic GMP-AMP synthase is a cytosolic DNA sensor that activates the type I interferon pathway. *Science*. 339, 786–791.

- Suriyampola, P.S., Shelton, D.S., Shukla, R., Roy, T., Bhat, A., Martins, E.P., 2015. Zebrafish Social Behavior in the Wild. *Zebrafish*. 13, 1–8.
- Suttrup, I., Warnecke, T., 2016. Dysphagia in Parkinson's Disease. *Dysphagia*. 31, 24–32.
- Tan, A.H., Hor, J.W., Chong, C.W., Lim, S.-Y., 2021a. Probiotics for Parkinson's disease: Current evidence and future directions. *JGH Open*. 5, 414–419.
- Tanei, Z., Saito, Y., Ito, S., Matsubara, T., Motoda, A., Yamazaki, M., Sakashita, Y., Kawakami, I., Ikemura, M., Tanaka, S., Sengoku, R., Arai, T., Murayama, S., 2021. Lewy pathology of the esophagus correlates with the progression of Lewy body disease: a Japanese cohort study of autopsy cases. *Acta Neuropathol*. 141, 25–37.
- Tanner, C.M., Kamel, F., Ross, G.W., Hoppin, J.A., Goldman, S.M., Korell, M., Marras, C., Bhudhikanok, G.S., Kasten, M., Chade, A.R., Comyns, K., Richards, M.B., Meng, C., Priestley, B., Fernandez, H.H., Cambi, F., Umbach, D.M., Blair, A., Sandler, D.P., Langston, J.W., 2011. Rotenone, paraquat, and Parkinson's disease. *Environ. Health Perspect.* 119, 866–872.
- Trifu, S.C., Trifu, A.C., Aluaş, E., Tătaru, M.A., Costea, R.V., 2020. Brain changes in depression. *Rom. J. Morphol. Embryol*. 61, 361–370.
- Turnbaugh, P.J., Ley, R.E., Hamady, M., Fraser-Liggett, C.M., Knight, R., Gordon, J.I., 2007. The human microbiome project. *Nature*. 449, 804–810.
- Turner, N., 1932. Notes on rotenone as an insecticide. *J. Econ. Entomol*. 25, 1228–1237.
- Tysnes, O.-B., Storstein, A., 2017. Epidemiology of Parkinson's disease. *J. Neural Transm. (Vienna)*. 124, 901–905.
- Ulusoy, A., Phillips, R.J., Helwig, M., Klinkenberg, M., Powley, T.L., Di Monte, D.A., 2017. Brain-to-stomach transfer of α -synuclein via vagal preganglionic projections. *Acta Neuropathol*. 133, 381–393.
- Ulusoy, A., Rusconi, R., Pérez-Revuelta, B.I., Musgrove, R.E., Helwig, M., Winzen-Reichert, B., Monte, D.A. Di, 2013. Caudo-rostral brain spreading of α -synuclein through vagal connections. *EMBO Mol. Med*. 5, 1119–1127.
- Ünal, İ., Çalışkan-Ak, E., Üstündağ, Ü. V, Ateş, P.S., Alturfan, A.A., Altinoz, M.A., Elmaci, I., Emekli-Alturfan, E., 2020. Neuroprotective effects of mitoquinone and oleandrin on Parkinson's disease model in zebrafish. *Int. J. Neurosci*. 130, 574–582.
- Ünal, İ., Üstündağ, Ü. V, Ateş, P.S., Eğilmezer, G., Alturfan, A.A., Yiğitbaşı, T., Emekli-Alturfan, E., 2019. Rotenone impairs oxidant/antioxidant balance both in brain and intestines in zebrafish. *Int. J. Neurosci*. 129, 363–368.
- Usai-Satta, P., Bellini, M., Morelli, O., Geri, F., Lai, M., Bassotti, G., 2020. Gastroparesis:

- New insights into an old disease. *World J. Gastroenterol.* 26, 2333–2348.
- van der Flier, L.G., Clevers, H., 2009. Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium. *Annu. Rev. Physiol.* 71, 241–260.
- Vaz, R.L., Outeiro, T.F., Ferreira, J.J., 2018. Zebrafish as an Animal Model for Drug Discovery in Parkinson's Disease and Other Movement Disorders: A Systematic Review. *Front. Neurol.* 9, 347.
- Visanji, N.P., Brooks, P.L., Hazrati, L.-N., Lang, A.E., 2013. The prion hypothesis in Parkinson's disease: Braak to the future. *Acta Neuropathol. Commun.* 1, 2.
- von Campenhausen, S., Bornschein, B., Wick, R., Bötzel, K., Sampaio, C., Poewe, W., Oertel, W., Siebert, U., Berger, K., Dodel, R., 2005. Prevalence and incidence of Parkinson's disease in Europe. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 15, 473–490.
- Wang, A.N., Yi, X.W., Yu, H.F., Dong, B., Qiao, S.Y., 2009. Free radical scavenging activity of *Lactobacillus fermentum* in vitro and its antioxidative effect on growing-finishing pigs. *J. Appl. Microbiol.* 107, 1140–1148.
- Wang, G., Huang, S., Wang, Y., Cai, S., Yu, H., Liu, H., Zeng, X., Zhang, G., Qiao, S., 2019. Bridging intestinal immunity and gut microbiota by metabolites. *Cell. Mol. Life Sci.* 76, 3917–3937.
- Wang, J.Y., Abbas, M.A., 2013. Current management of fecal incontinence. *Perm. J.* 17, 65–73.
- Wang, Y., Liu, W., Yang, J., Wang, F., Sima, Y., Zhong, Z., Wang, H., Hu, L.-F., Liu, C.-F., 2017. Parkinson's disease-like motor and non-motor symptoms in rotenone-treated zebrafish. *Neurotoxicology.* 58, 103–109.
- Wasel, O., Freeman, J.L., 2020. Chemical and Genetic Zebrafish Models to Define Mechanisms of and Treatments for Dopaminergic Neurodegeneration. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 5981.
- Wellings, T.P., Brichta, A.M., Lim, R., 2017. Altered neurofilament protein expression in the lateral vestibular nucleus in Parkinson's disease. *Exp. Brain Res.* 235, 3695–3708.
- Williams, A., Flavell, R.A., Eisenbarth, S.C., 2010. The role of NOD-like Receptors in shaping adaptive immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 22, 34–40.
- Yoshii, K., Hosomi, K., Sawane, K., Kunisawa, J., 2019. Metabolism of Dietary and Microbial Vitamin B Family in the Regulation of Host Immunity. *Front. Nutr.* 6, 48.
- Yu, Q.-J., Yu, S.-Y., Zuo, L.-J., Lian, T.-H., Hu, Y., Wang, R.-D., Piao, Y.-S., Guo, P., Liu, L., Jin, Z., Li, L.-X., Chan, P., Chen, S.-D., Wang, X.-M., Zhang, W., 2018. Parkinson disease with constipation: clinical features and relevant factors. *Sci. Rep.* 8,

567.

- Yurtsever, İ., Üstündağ, Ü.V., Ünal, İ., Ateş, P.S., Emekli-Alturfan, E., 2020. Rifampicin decreases neuroinflammation to maintain mitochondrial function and calcium homeostasis in rotenone-treated zebrafish. *Drug Chem. Toxicol.* 45, 1544–1551.
- Zlotnik, Y., Balash, Y., Korczyn, A.D., Giladi, N., Gurevich, T., 2015. Disorders of the oral cavity in Parkinsons disease and parkinsonian syndromes. *Parkinsons Dis.* 2015, 379482.

Articole publicate

Articole ISI cu IF

Sinteză a literaturii

Ilie, O.-D., Ciobica, A., McKenna, J., Doroftei, B., Mavroudis, I., 2020. Minireview on the Relations between Gut Microflora and Parkinson's Disease: Further Biochemical (Oxidative Stress), Inflammatory, and Neurological Particularities. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 4518023, <https://doi.org/10.1155/2020/4518023> (IF 5,076).

Date originale

Ilie, O.-D., Paduraru, E., Robea, M.-A., Balmus, I.-M., Jijie, R., Nicoara, M., Ciobica, A., Nita, I.-B., Dobrin, R., Doroftei, B., 2021. The Possible Role of *Bifidobacterium longum* BB536 and *Lactobacillus rhamnosus* HN001 on Locomotor Activity and Oxidative Stress in a Rotenone-Induced Zebrafish Model of Parkinson's Disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 9629102, <https://doi.org/10.1155/2021/9629102> (IF 6,543).

Ilie, O.-D., Duta, R., Jijie, R., Nita, I.-B., Nicoara, M., Faggio, C., Dobrin, R., Mavroudis, I., Ciobica, A., Doroftei, B., 2022. Assessing Anti-Social and Aggressive Behavior in a Zebrafish (*Danio rerio*) Model of Parkinson's Disease Chronically Exposed to Rotenone. *Brain Sciences*. 12(7), 898, <https://doi.org/10.3390/brainsci12070898> (IF 3,333).

Ilie, O.-D., Duta, R., Balmus, I.-M., Savuca, A., Petrovici, A., Nita, I.-B., Antoci, L.-M., Jijie, R., Mihai, C.-T., Ciobica, A., Nicoara, M., Popescu, R., Dobrin, R., Solcan, C., Trifan, A., Stanciu, C., Doroftei, B., 2022. Assessing the Neurotoxicity of a Sub-Optimal Dose of Rotenone in Zebrafish (*Danio rerio*) and the Possible Neuroactive Potential of Valproic Acid, Combination of Levodopa and Carbidopa, and Lactic Acid Bacteria Strains. *Antioxidants*. 11(10), 2040, <https://doi.org/10.3390/antiox11102040> (IF 7,675).

Articole complementare tezei de doctorat

Sinteză a literaturii

Balmus, I.-M., **Ilie, O.-D.**, Ciobica, A., Cojocariu, R.-O., Stanciu, C., Trifan, A., Cimpeanu, M., Cimpeanu, C., Gorgan, L., 2020. Irritable Bowel Syndrome between Molecular Approach and Clinical Expertise-Searching for Gap Fillers in the Oxidative

Stress Way of Thinking. Medicina. 56(1), 38, <https://doi.org/10.3390/medicina56010038> (IF 1,205).

Antioch, I., **Ilie, O.-D.**, Ciobica, A., Doroftei, B., Fornaro, M., 2020. Preclinical Considerations about Affective Disorders and Pain: A Broadly Intertwined, yet Often Under-Explored, Relationship Having Major Clinical Implications. Medicina. 56(10), 504, <https://doi.org/10.3390/medicina56100504> (IF 1,205).

Doroftei, B., **Ilie, O.-D.**, Cojocariu, R.-O., Ciobica, A., Maftai, R., Grab, D., Anton, E., McKenna, J., Dhunna, N., Simionescu, G., 2020. Minireview Exploring the Biological Cycle of Vitamin B3 and Its Influence on Oxidative Stress: Further Molecular and Clinical Aspects. Molecules 25(15), 3323, <https://doi.org/10.3390/molecules25153323> (IF 3,267).

Ilie, O.-D., Ciobica, A., Riga, S., Dhunna, N., McKenna, J., Mavroudis, I., Doroftei, B., Ciobanu, A.-M., Riga, D., 2020. Mini-Review on Lipofuscin and Aging: Focusing on The Molecular Interface, The Biological Recycling Mechanism, Oxidative Stress, and The Gut-Brain Axis Functionality. Medicina. 56(11), 626, <https://doi.org/10.3390/medicina56110626> (IF 1,205).

Abstracte publicate în volumele conferințelor internaționale la secțiunea postere

Balmus, I.M., Cojocariu, R., **Ilie, O.**, Lefter, R., Ciobica, A., Trifan, A., Stanciu, C., 2020. Microbiome-Dependent Antioxidant, Gastrointestinal and Neurological Modulation of Irritable Bowel Syndrome Symptomatology. European Psychiatry. 63, S434-S434, (IF 5,361) (<https://www.cambridge.org/core/journals/european-psychiatry/article/eposter-viewing/D36C52D45873073B3F9642A91F6EB46C> - accesat la data de 22/09/2022).

Participări la conferințe internaționale la secțiunea postere

PROBIOTICS DID NOT IMPROVE SOCIAL INTERACTION IN A ZEBRAFISH (DANIO RERIO)-MODEL OF PARKINSON'S DISEASE #2649 - WORLD PSYCHIATRIC ASSOCIATION 2022

IS ZEBRAFISH SUITABLE FOR MODELING GASTROINTESTINAL DISEASES? #2660 - WORLD PSYCHIATRIC ASSOCIATION 2022

LACTIC ACID BACTERIA STRAINS IN MEDIATING PARKINSON'S DISEASE-RELATED CONSTIPATION #2661 - WORLD PSYCHIATRIC ASSOCIATION 2022

Disclosure: Balmus Ioana - Miruna, Lefter Radu, Alin Ciobica are supported by a Young Research Teams supporting research grant PN-III-P1-1.1-TE2016-1210, named "Complex study on oxidative stress status, inflammatory processes and neurological manifestations correlati

Keywords: oxidative stress; functional gastrointestinal disorder; animal behavior

EPV0768

Microbiome-dependent antioxidant, gastrointestinal and neurological modulation of irritable bowel syndrome symptomatology

I.M. Balmus^{1,*}, R. Cojocariu², O. Ilie², R. Lefter³, A. Ciobica^{3,4,5}, A. Trifan⁶ and C. Stanciu³

¹Alexandru Ioan Cuza University of Iasi, Department of Interdisciplinary Research In Science, Iasi, Romania; ²Alexandru Ioan Cuza University of Iasi, Biology, Iasi, Romania; ³Romanian Academy, Center Of Biomedical Research, Iasi, Romania; ⁴Alexandru Ioan Cuza^{*} University of Iasi, Department of Research, Iasi, Romania; ⁵Academy of Romanian Scientists, Science, Bucharest, Romania and ⁶Gr. T. Popa University of Medicine and Pharmacy, Medicine, Iasi, Romania

*Corresponding author.

Introduction: Irritable bowel syndrome (IBS) is a multifactorial, multigenic and environmental-dependent disorder exhibiting a wide range of functional gastrointestinal symptoms. IBS pathophysiology includes the immune system activation, disturbance of intestinal function accompanied by inflammatory process and dysbiosis which lead to brain-gut axis impairments. The bidirectional brain-gut communication contribution is suggested by comorbidity between gastrointestinal and psychiatric illnesses.

Objectives: Given that the microbiome was recently described as a key modulator in mood and brain development, neurodegeneration, ageing, inflammatory processes and oxidative stress, our main goal was to review the existing data that addresses this topic of high interest, the relationship between microbiome and antioxidant, gastrointestinal and neuropsychiatric modulation in IBS.

Methods: The literature search was conducted using the keywords "irritable bowel syndrome", "microbiome", "gut-brain axis" "stress", "depression", "behavior", "antioxidants" in Science Direct, Oxford Journals, Medline and Google Scholar databases. Only English publications have been taken into consideration. This inquiry was conducted by three separate researchers. Any differences of opinions were solutioned by common consent.

Results: Mood disorders, also modulated by the microbiome, affect more than half of IBS patients, antidepressants being commonly administered to IBS patients for both gastrointestinal and neuropsychiatric symptoms. However, it was observed that the changes in gut microbial species could lead to several gastrointestinal and neuropsychiatric symptoms. Moreover, the microbiota impairments could lead to colonic cells and systemic inflammatory processes and oxidative stress.

Conclusions: The discussed modulatory potential of microbiome in gastrointestinal tract, nervous system and molecular pathways suggested that the microbiome –gut–brain axis could be the key component in an IBS future treatment.

Disclosure: PN-III-P1-1.1-TE2016-1210, named "Complex study on oxidative stress status, inflammatory processes and neurological

manifestations correlations in irritable bowel syndrome pathophysiology (animal models and human patients)"

Keywords: Microbiome; oxidative stress; neuropsychiatric comorbidities; Irritable bowel syndrome

EPV0770

Preventing the progression of cognitive impairments in epilepsy

I. Blazhina^{1,*} and V. Korostiy²

¹Bucovinian State Medical University, Department of Nervous Diseases Psychiatry And Medical Psychology, Chernivtsi, Ukraine and ²Kharkiv National Medical University, Department of Psychiatry, Narcology And Medical Psychology, Kharkiv, Ukraine

*Corresponding author.

Introduction: Varying different degrees of cognitive impairments have a considerable effect on the functioning of patients, their socialization, and the level of disability. Cognitive deficits deteriorate the quality of patients life.

Objectives: The aims of research were detection of versatile cognitive impairments in epilepsy and studying the results of cognitive training.

Methods: We studied the features of Clinical and psychopathological manifestations in patients suffering from epilepsy. The study covered 100 patients (35 men and 65 women) who were in inpatient care. The following psychodiagnostic techniques were used: the Toronto Cognitive Assessment TorCA, the test of 10 words of Luria, the MOCA test, the Münsterberg test, the quality of life scale, the Hamilton scale of depression and anxiety.

Results: The following results of the study were observed: decreased memory in 88 % patients, mild dementia in 48%, moderate dementia in 24% and severe dementia in 16%. We used non-pharmacological rehabilitation methods for correction of cognitive impairment with patients who have mild and moderate memory decreas.

Conclusions: The results of the conducted research indicate the need for further study of the features of cognitive disorders in epilepsy and implementation of training aimed at improving cognitive function and preventing the progression of cognitive impairment.

Conflict of interest: No

Keywords: Cognitive disorders; Epilepsy

EPV0771

Comparison of visual p300 amplitude and latency in people with schizophrenia and bipolar disorder

A. Cavieres^{1,*}, V. Koscina², L. Zepeda², R. Maldonado², P. Prado² and W. El-Deredy²

¹Universidad de Valparaíso, Psiquiatría, Viña del Mar, Chile and

²Universidad de Valparaíso, Psiquiatría, Valparaíso, Chile

*Corresponding author.

Introduction: Reduction in the amplitude of P300, is found more frequently in the auditory mode but has also been reported using visual stimulus in people with schizophrenia. Previous research may imply that visual P300 alterations are specific markers of schizophrenia, but they have small sample sizes, and few make comparisons with other psychiatric disorders.



PSYCHIATRY 2022
THE NEED FOR
EMPATHY AND
ACTION



CME/CPD Certificate

This is to certify that

Ovidiu Dumitru Ilie PhD

participated in the

22nd WPA World Congress of Psychiatry

Bangkok, Thailand

3-6 August 2022

and received 23 credits

Afzal Javed
Congress President &
President WPA

Danuta Wasserman
Scientific Committee Co-Chair

Norman Sartorius
Scientific Program Advisor

European Accreditation Council for Continuing Medical Education (UEMS/EACCME)

The 22nd WPA World Congress of Psychiatry is accredited by the European Accreditation Council for Continuing Medical Education (EACCME) to provide the following CME activity for medical specialists. The EACCME is an institution of the European Union of Medical Specialists (UEMS): www.uems.net.

The 22nd WPA World Congress of Psychiatry is designated for a maximum of, or up to, 23 European external CME credits. Each medical specialist should claim only those hours of credit that he/she actually spent in the educational activity.

American Medical Association (AMA)

Through an agreement between the European Union of Medical Specialists and the American Medical Association, physicians may convert EACCME credits to an equivalent number of *AMA PRA Category 1 Credits™*. Information on the process to convert EACCME credit to AMA credit can be found at www.ama-assn.org/education/ama-pra-credit-system/agreement-european-union-medical-specialties-uems.

Royal College of Physicians and Surgeons of Canada

Live educational activities, occurring outside of Canada, recognized by the UEMS-EACCME for ECMEC credits are deemed to be Accredited Group Learning Activities (Section 1) as defined by the Maintenance of Certification Program of The Royal College of Physicians and Surgeons of Canada. For more information, visit: www.royalcollege.ca/rcsite/cpd/providers/international-accreditation-agreements-e.