

UNIVERSITATEA „ALEXANDRU IOAN CUZA” DIN IAȘI
FACULTATEA DE BIOLOGIE
ȘCOALA DOCTORALĂ DE BIOLOGIE

**Impactul unor flavonoide naturale cu acțiune
favorabilă în afecțiunile neurodegenerative**

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Coordonator științific
Prof. univ. dr. habil. Lucian HRIȚCU

Student doctorand
Ion BRÎNZA

IAȘI
-2024-

Cuprins:

CUVINTE CHEIE.....	4
INTRODUCERE.....	6
CAPITOLUL I. DEMENȚA ASOCIATĂ BOLII ALZHEIMER.....	8
I.1 Prevalența și incidența bolii Alzheimer	8
I.2 Impactul global al bolii Alzheimer	9
I.3 Etiologie.....	9
I.4 Factori de risc pentru boala Alzheimer	11
I.5 Patologie	12
I.6 Simptomele bolii Alzheimer	14
I.7 Diagnostic și tratament	14
CAPITOLUL II. FLAVONOIDELE ȘI BOALA ALZHEIMER.....	15
II.1 Flavonoide. Aspecte generale.....	15
II.2 Flavonoidele și boala Alzheimer	16
II.3 Roifolina	16
II.4 Baicaleina 5,6-dimetil eter.....	17
II.5 Agatisflavona.....	17
CAPITOLUL III MODELUL ANIMAL	18
III.1 Utilizarea modelelor animale pentru studiul bolii Alzheimer.....	18
III.2 Danio rerio - model animal în cercetarea biomedicală	18
III.3 Dezavantajele utilizării peștelui zebra ca model animal în neuroștiință	19
CAPITOLUL IV MATERIAL ȘI METODE.....	20
IV.1 Studii in silico	20
IV.2 Materialul vegetal	23
IV.3 Modelul animal și modul de administrarea a tratamentului.....	23
IV.4 Evaluarea parametrilor comportamentali.....	24
IV.5 Evaluarea parametrilor biochimici din probele de creier de la peștii zebra...	26

IV.6 Evaluarea expresiei genelor	29
IV.7 Imunodetecția proteinei CREB1, transferate pe membrane de nitroceluloză	29
IV.8 Analiza statistică	30
CAPITOLUL V. REZULTATE ȘI DISCUȚII	32
V.1 Proprietățile fizico-chimice ale roifolinei, baicalein 5,6-dimetil eter și ale agatisflavonei.....	32
V.2 Evidențierea structurilor de alertă biomedicală ale celor 3 flavonoide	33
V.3 Predicțiile structurilor de alertă biomedicală ale celor 3 flavonoide	34
V.4 Profilul farmacocinetic estimat in silico ale celor 3 flavonoide	35
V.5 Predicția activității biologice in silico ale celor 3 flavonoide	38
V.6 Predicția țintelor proteice in silico ale celor trei flavonoide	40
V.7 Predicția aprobării pe piața farmaceutică a roifolinei, baicalein 5,6-dimetil eter și a agatisflavonei	43
V.8 Efectele roifolinei, baicaleinei 5,6-dimetil eter și a agatisflavonei asupra stării asemănătoare anxietății și a memoriei.....	44
V.9 Efectele roifolinei, baicaleinei 5,6-dimetil eter și ale agatisflavonei asupra stresului oxidativ la modelul de pește zebră al bolii Alzheimer.....	63
V.10 Efectele roifolinei baicaleinei 5,6-dimetil eter și a agatisflavonei asupra activității acetilcolinesterazei	70
V.11 Efectele roifolinei, baicaleinei 5,6-dimetil eter și a agatisflavonei asupra expresiei genelor.....	71
V.12 Efectele roifolinei, baicaleinei 5,6-dimetil eter și a agatisflavonei asupra nivelului poteinelor de interes	76
V.13 Corelații Pearson între parametrii comportamentali, biochimici și moleculari	77
CONCLUZII	80
BIBLIOGRAFIE	81
ACTIVITATE ȘTIINȚIFICĂ	98

CUVINTE CHEIE

- ACh – acetilcolină (*engl.* Acetylcholine);
- AChE – acetilcolinesterază (*engl.* Acetylcholinesterase);
- AD – boala Alzheimer (*engl.* Alzheimer's Disease);
- APOE – apolipoproteina E (*engl.* Apolipoprotein E);
- APP – proteina precursoră a amiloidului (*engl.* Amyloid precursor protein);
- A β – Beta amiloid (*engl.* Amyloid beta);
- Baic – baicalein 5,6-dimetil eter;
- BBB - bariera hematoencefalică (*engl.* The blood–brain barrier);
- BDNF – factorul neurotrofic derivat din creier (*engl.* Brain-Derived Neurotrophic Factor)
(BDNF – proteina BDNF umană/rozătoare; Bdnf – proteina Bdnf de la peștele zebură; *BDNF* – gena *BDNF* umană; *Bdnf* -gena *Bdnf* de la rozătoare; *bdnf* -gena *bdnf* de la peștele zebură);
- CAT - catalaza (*engl.* Catalase);
- CREB – proteina receptoare pentru legarea AMPc (*engl.* cAMP response element-binding protein) (CREB – proteina CREB umană/rozătoare; Creb – proteina Creb de la peștele zebură; *CREB* – gena *CREB* umană; *Creb* -gena *Creb* de la rozătoare; *creb* -gena *creb* de la peștele zebură);
- EGR-1 - proteina 1 de răspuns a creșterii timpurii (*engl.* Early growth response protein 1)
(EGR-1 – proteina EGR-1 umană/rozătoare; Egr-1 – proteina Egr-1 de la peștele zebură; *EGR-1* – gena *EGR-1* umană; *Egr-1* -gena *Egr-1* de la rozătoare; *egr-1* -gena *egr-1* de la peștele zebură);
- Fab - agatisflavonă ;
- GAL – galantamină;
- GPX - glutation peroxidaza (*engl.* Glutathione peroxidase);
- GSH - glutation (*engl.* Glutathione);
- GSK3 β - glicogen sintaza kinaza 3 beta (*engl.* Glycogen synthase kinase 3 beta);
- GST - glutation S - transferaza (*engl.* Catalase);
- LCR – lichidul cefalorahidian (*engl.* Cerebrospinal fluid);
- MAPK/MEK - protein kinazele activate de mitogen (*engl.* mitogen-activated protein kinase);
- MCI – deficit cognitiv minor (*engl.* Mild cognitive impairment);
- MDA- malondialdehidă (*engl.* Malondialdehyde);

NOR – testul de recunoaștere a obiectului nou, cunoscut și ca NOP (engl. Novel object recognition test);

NPs - plăci de β amiloid neuritice (*engl.* neuritic plaques);

NPY – AD (*engl.* Neuropeptide Y) (NPY – proteina NPY umană/rozătoare; Npy – proteina Npy de la peștele zebură; *NPY* – gena *NPY* umană; *Npy* -gena *Npy* de la rozătoare; *npy* -gena *npy* de la peștele zebură);

NRF2 - factorul nuclear 2 legat de factorul eritroid 2 (*engl.* Nuclear factor erythroid 2-related factor 2) (NRF2 – proteina NRF2 umană/rozătoare; Nrf2 – proteina Nrf2 de la peștele zebură; *NRF2* – gena *NRF2* umană; *Nrf2* -gena *Nrf2* de la rozătoare; *nrf2* -gena *nrf2* de la peștele zebură);

NTT – testul de scufundare într-un acvariu nou (engl. Novel tank test);

OF – obiect familiar;

ON – obiect nou;

OS – stres oxidativ (*engl.* Oxidative stress);

ROS – specii reactive de oxigen (*engl.* Reactive oxygen species);

Sco -scopolamină;

SNC - sistemul nervos central;

SNP - sistemului nervos periferic;

SOD – superoxid dismutază (*engl.* Superoxide dismutase);

TNF- α – factor de necroză tumorală α (*engl.* Tumor necrosis factor α);

TREM2 - receptorul declanșator exprimat pe celulele mieloide de tip 2 (engl. Triggering Receptor Expressed On Myeloid Cells 2);

Trk- familia receptorilor tirozin kinazelor (*engl.* Tropomyosin receptor kinase);

INTRODUCERE

Boala Alzheimer (AD) este o tulburare neurodegenerativă complexă, multifactorială, caracterizată printr-o progresie lentă și ireversibilă, fiind cea mai răspândită formă de demență (1). Durata medie de viață de la debutul simptomelor clinice până la deces este de aproximativ 8,5 ani (2). AD se manifestă printr-o scădere treptată a funcțiilor cognitive, însoțită de tulburări comportamentale (3), și este asociată cu atrofierea cerebrală, scăderea volumului și greutateii cerebrale, extinderea șanțurilor corticale și a sistemului ventricular (4).

Printre semnele patologice ale bolii se disting ghemuri neurofibrilare (NFT) care se formează în urma hiperfosforilării proteinei tau (τ), plăcile amiloidice ce sunt formate din peptida β -amiloid ($A\beta$), prezența în cortex a degenerescenței neurofibrilare, a degenerescenței granulo-vacuolare, a disfuncției mitocondriale, a disfuncției colinergice și instaurarea stresului oxidativ (OS) (5). Aceste schimbări duc la pierderea neuronilor în cortexul cerebral și hipocamp, iar neuronii rămași prezintă degenerare sinaptică, deteriorarea dendritelor și a neuropilului, contribuind astfel la declinul cognitiv și la tulburările comportamentale și neuropsihiatrice observate la pacienții cu AD (6).

Factorii de risc pentru dezvoltarea AD includ vârsta înaintată, istoricul familial, mutațiile genetice, leziunile oxidative și afecțiunile neurovasculare (7). În ciuda cercetărilor intensive, nu există în prezent un tratament eficient pentru AD, medicamentele care vizează proteinele $A\beta$ și tau nu au oferit rezultate clinice semnificative, iar tratamentele disponibile, care includ inhibitori ai colinesterazei și medicamente psihotropice, oferă doar ameliorări limitate ale simptomelor (8). Un factor important în AD este proteina nucleară CREB1, care joacă roluri esențiale în diferite regiuni ale creierului (9). CREB1 reglează transcrierea unor gene esențiale (10) cum ar fi *bdnf* (11), *egr-1*, *nrf2* (12) și *npy* (13). Atât BDNF, EGR-1 cât și NPY, sunt niște neuropeptide care. BDNF (factorul neurotrofic derivat din creier) este crucial pentru supraviețuirea și diferențierea neuronilor în timpul dezvoltării și reglează transmiterea sinaptică și plasticitatea dependentă de activitate (14). EGR-1 controlează expresia genelor implicate în creșterea celulară, supraviețuire și menținerea potențării de lungă durată (LTP), un proces esențial pentru memoria pe termen lung (15). NPY modulează excitabilitatea neuronilor hipocampici și acționează ca un modulator al neuroplasticității și neurotransmisiei (16). NRF2 este implicat în protecția neuronală împotriva stresului oxidativ și inflamator și reglează căile mitocondriale (17).

Tratamentele actuale pentru bolile neurodegenerative, inclusiv AD, sunt ineficiente (18) sau au numeroase efecte adverse (19). Recent, datorită eficienței ridicate a flavonoidelor (20) se manifestă un interes ridicat în selectarea acestor compuși naturali drept potențiali agenți neuroprotectori (21). Studiile experimentale au arătat că flavonoidele precum roifolina (Rho), baicaleina 5,6-dimetil eter (Baic) și agatisflavona (Fab) prezintă proprietăți neuroprotectoare. Fab protejează neuronii împotriva excitotoxicității induse de glutamat (26), Rho protejează neuronii de neurotoxicitatea mediată de peptida A β (34), iar Baic poate ameliora patologia legată de proteina A β și disfuncția cognitivă (27,28).

Peștele zebură (*Danio rerio*) este din ce în ce mai utilizat în cercetările neurofarmacologice datorită asemănărilor sale neurofiziologice și genetice cu omul, precum și a ușurinței de manipulare (29). Acest pește prezintă o barieră hemato-encefalică (BBB) similară cu cea a omului și toate sistemele majore de neurotransmițători, ceea ce îl face un model adecvat pentru studiile de neurodegenerare (30).

Teza de doctorat prezintă ultimele noutăți din literatura științifică națională și internațională în ceea ce privește demența asociată AD, precum și mecanismele de acțiune ale flavonoidelor în îmbunătățirea simptomatologiei acestei boli. De asemenea, prezenta teză propune utilizarea unui model animal de demență exemplificat de peștele zebură care este indus prin administrarea prin imersie a unui blocant al receptorilor colinergici muscarinici reprezentat de scopolamină (Sco). Este prezentată și metodologia de cercetare propusă pentru studierea impactului celor trei flavonoide asupra parametrilor comportamentali, a celor biochimici și a aspectelor moleculare ale AD din creierul modelului animal.

Studiul a urmărit evaluarea stării de anxietate, a proceselor de învățare și memorare, a statusului oxidativ, a expresiei genice absolute a *bdnf*, *npv*, *egr-1*, *nrf2* și *creb1*, și a nivelului relativ a proteinei Creb1, raportat la GAPDH (prin teste comportamentale, biochimice și moleculare specifice).

CAPITOLUL I. DEMENȚA ASOCIATĂ BOLII ALZHEIMER

Boala Alzheimer (AD) este cea mai comună tulburare neurodegenerativă (27), ireversibilă (28) și progresivă (29), fiind principala cauză de demență la persoanele în vârstă (30). AD afectează aproximativ 10% dintre cei peste 65 de ani și peste 32% dintre cei peste 85 de ani (31). În 2021, a fost a cincea cauză de deces la persoanele în vârstă (32). Clinica bolii începe cu o degradare subtilă a memoriei (insuficiență cognitivă ușoară) care progresează la afectarea limbajului și deficite vizual-spațiale, iar în stadiul final, pacienții devin rigizi și inconștienți, necesitând ajutor pentru sarcini de bază (8).

Semnele neuropatologice includ atrofia creierului și pierderea neuronilor colinergici, în special din hipocamp și cortex, asociate cu acumularea de plăci amiloidice și ghemuri neurofibrilare (NFT) (37). Factorii critici în dezvoltarea AD includ disfuncția neurovasculară, mutațiile genetice, stresul oxidativ (OS), și procesele inflamatorii. Deși există cinci medicamente pentru gestionarea simptomelor, acestea nu pot stagna evoluția bolii (37). Evoluția bolii poate dura de la unu la 25 de ani, însă durată tipică a bolii este de 8-10 ani (32). Abordările terapeutice pentru gestionarea simptomelor AD sunt limitate datorită naturii protectoare a BBB care împiedică direcționarea medicamentelor către neuroni (34). Moartea survine de obicei prin complicații secundare, iar costurile globale ale îngrijirii pacienților cu AD depășesc un miliard de dolari (35).

I.1 Prevalența și incidența bolii Alzheimer

Prevalența AD crește exponențial odată cu înaintarea în vârstă, dublându-se la fiecare cinci ani (41). În China, prevalența AD variază de la 0,2% la persoanele între 55-59 de ani, la 48,2% între 95-99 de ani (42). În Occident, prevalența este sub 0,6% la cei sub 65 de ani, dar depășește 33% la cei peste 85 de ani (2). AD este mai frecventă la femei decât la bărbați, conform unei meta-analize din 2017, care arată că femeile au de două ori mai multe șanse de a dezvolta această boală decât bărbații (38).

Incidența AD variază semnificativ în funcție de regiune, fiind raportată între 2,0 și 16,8 cazuri noi la o mie de persoane peste 60 de ani în SUA (39), Europa (38) Japonia (40) și China (41). Această variație se datorează diferențelor în caracteristicile populației, intervalele de vârstă, perioadele studiate și criteriile de diagnostic (40). O meta-analiză din Europa a arătat că incidența AD crește odată cu durata de viață (42). Rata anuală estimată a demenței variază de la 10,5% în America de Nord la 8% în China (48). În 2015, numărul

global de cazuri de AD a depășit 32,8 milioane, cu o creștere anticipată la 13 milioane până în 2050, pe măsură ce populația vârstnicilor se dublează (48).

I.2 Impactul global al bolii Alzheimer

AD prezintă una dintre cele mai rapide rate de creștere a mortalității, cu un timp mediu de supraviețuire de 3-6 ani după diagnosticare (5,44), iar îngrijirea pacienților impune costuri globale semnificative, estimate să depășească 2,8 trilioane USD până în 2030 (49). Aproape jumătate dintre pacienți necesită îngrijire intensivă, fie în instituții, fie la domiciliu, cu variații mari în funcție de dezvoltarea economică a țărilor (50).

I.3 Etiologie

AD are o etiologie multifactorială, cu o patogenie complexă ce implică factori genetici, de mediu, metabolici și vasculari (47). AD poate avea un debut tardiv (LOAD) sau precoce (EOAD), forma familială (FAD) fiind rară și asociată cu mutații genetice specifice, în timp ce forma sporadică (SAD) este mult mai frecventă și influențată de factori variabili (48). Vârsta reprezintă principalul factor de risc, peste 95% din cazuri fiind diagnosticate la persoane de peste 60 de ani (53). Manifestările clinice includ pierderea progresivă a memoriei, declin cognitiv și tulburări comportamentale. Deși există mai multe ipoteze pentru a explica etiologia AD, patogeniza exactă rămâne neclară (50).

1.3.1 Ipoteza stresului oxidativ și a disfuncției mitocondriale

Mitocondriile joacă un rol esențial în producția de energie celulară prin fosforilare oxidativă și în reglarea semnalizării celulare, inclusiv a calciului și a speciilor reactive de oxigen (ROS) (51). Ele conțin un genom semi-autonom (ADNmt) care codifică componente ale lanțului de transport al electronilor (ETC) (52). Pe lângă producția de ATP, mitocondriile sunt implicate în diferite procese celulare, cum ar fi răspunsul la OS și hipoxic, controlul ciclului celular și apoptoza (53). Dezechilibrul între producția de ROS și apărarea antioxidantă duce la OS, care este asociat cu îmbătrânirea și patogeniza AD (54). Acest dezechilibru cauzează leziuni oxidative ale ADN-ului și proteinelor, afectând funcția cognitivă și contribuind la formarea plăcilor de beta-amiloid (A β) și a NFT, marcatori caracteristici ai AD, accelerând moartea celulară prin apoptoză (55).

1.3.2 Ipoteza ionilor metalici

Homeostazia ionilor de Cu²⁺, Zn²⁺ și Fe²⁺ este crucială pentru funcțiile cerebrale normale, iar dezechilibrul lor poate contribui la apariția și progresia AD (60). Acest

dezechilibru afectează căi celulare esențiale, ducând la plierea eronată a A β și la formarea NFT (42). În creier acești ioni sunt concentrați în plăcile amiloide, iar modificările nivelurilor lor sunt observate atât în lichidul cefalorahidian (LCR), cât și în materia neocorticală (61).

1.3.3 Ipoteza colinergică

Ipoteza colinergică sugerează că reducerea funcțiilor colinergice în anumite părți ale creierului, în special în neocortex și hipocamp, este asociată cu severitatea bolii (58,59). Acest deficit colinergic este cauzat de atrofia și degenerarea neuronilor colinergici, care joacă un rol crucial în memorie, învățare și orientare spațială (31,62). Neuronii colinergici modulând activitatea prin acetilcolină (ACh), un neurotransmițător esențial, a cărei scădere în AD este legată de moartea neuronilor, hiperfosforilarea proteinei τ , și depunerea plăcilor amiloide (61). Activitatea crescută a acetilcolinesterazei (AChE), care degradează ACh, contribuie la disfuncțiile cognitive, sugerând o relație sinergică între scăderea nivelurilor de ACh și progresia patologiei AD (62).

1.3.4 Ipoteza amiloidă

Peptida A β , formată din 38 până la 43 aminoacizi, provine din fragmentarea proteinei precursor APP (66). APP conține un domeniu N-terminal extracelular mare și un domeniu C-terminal mai scurt, având rol în sinapsă, transportul neuronal și exportul de fier. Pe membrana neuronală, APP este scindată de β -secretază (BACE) și γ -secretază, generând A β_{40} și, într-o mică proporție, A β_{42} . γ -secretaza, un complex multimeric, produce majoritar A β_{40} (70), iar α -secretaza, mediată de ADAM10, scindează APP pentru a preveni formarea plăcilor amiloide (74). Mutațiile în APP și PSEN1 cresc producția de A β_{42} , care se acumulează în plăci. A β_{42} (66) se agregă în oligomeri, protofibrile și fibrile amiloide, care au rol semnificativ în degenerarea neuronală și vasculară, perturbând activitatea enzimatică și a receptorilor cerebrali (73,75). Această legătură provoacă o serie de efecte în aval, inclusiv OS, disfuncție colinergică, hiperfosforilare a proteinei τ și activare a microgliilor. Activarea microgliilor conduce la producerea și eliberarea de citokine proinflamatorii precum IL-1 β , TNF- α și IFN- γ , care, la rândul lor, stimulează astrocitele adiacente să producă mai mulți oligomeri A β_{42} (71).

1.3.5 Ipoteza proteinei tau

Proteina τ (tau) este esențială pentru stabilizarea microtubulilor în axoni, interacționând cu tubulina (70). În mod normal, proteina τ este reglată prin modificări post-tranlaționale precum glicozilarea și fosforilarea, dar în AD, această fosforilare crește

semnificativ, cu până la nouă grupări fosfat pe moleculă (71). Hiperfosforilarea perturbă echilibrul dintre kinaze și fosfataze, favorizând fibrilizarea și agregarea proteinei τ în NFT care sunt fibre insolubile în interiorul neuronilor (48). NFT-urile sunt compuse din filamente helicoidale pereche și pot forma filamente ocazionale simple (SF), ce conțin o formă anormală și hiperfosforilată a proteinei τ (72).

Extinderea SF și a NFT este asociată cu pierderea neuronilor și a sinapselor, atrofia creierului și dilatarea ventriculelor laterale din cauza pierderii de țesut cerebral (87). Aceste anomalii sunt legate de gravitatea demenței și durata bolii, afectând direct funcția cerebrală (74). NFT-urile și SF-urile sunt prezente în hipocamp, unde contribuie la deteriorarea memoriei, și în cortexul de asociere, unde afectează funcțiile cognitive superioare (75). Deteriorarea progresivă a diferitelor zone corticale este asociată cu disfuncții cognitive variate. Totuși, nu este clar dacă NFT-urile contribuie direct la moartea neuronală sau sunt un mecanism de răspuns al neuronilor afectați deteriorați (76).

1.3.6 Ipoteza răspunsului neuroinflamator

Neuroinflamația joacă un rol crucial în dezvoltarea AD, amplificând patologia A β și τ . Studiile de imagistică au demonstrat creșterea activității microgliei și inflamației în creierul pacienților cu AD (91). Peste 50% dintre genele implicate în FAD sunt asociate cu funcțiile imune și microgliale, inclusiv APOE și TREM2, ale căror disfuncții agravează patologia A β prin reducerea clearance-ului fagocitar (93). Nivelurile crescute de citokine proinflamatorii sunt observate atât în serul pacienților cu AD, cât și în creierul acestora (79). Răspunsul inflamator în AD include activarea diverselor celule și sisteme, generând NO, ROS și citokine proinflamatorii, ceea ce duce la infiltrarea celulelor imune periferice, neuroinflamație, contribuind astfel la progresia bolii și moartea neuronală (98).

1.4 Factori de risc pentru boala Alzheimer

Numeroase studii indică o asociere între mai mulți factori de risc și AD (104). Studiile epidemiologice și genetice, evidențiază mai multe corelații semnificative din punct de vedere statistic între prevalența AD și vârsta înaintată (47). Simultan, mecanismele patogenetice cum ar fi inflamația și generarea de radicali liberi, sugerează o legătură causală între boala aterosclerotică, diabet, hipertensiune arterială (HA), obezitate, fibrilația arterială (FA), nivelul de educație, activitatea fizică, consumul de alcool și fumatul asupra prevalenței AD (105). În plus, AD este corelată și cu factorii de risc genetic, dintre care cel mai semnificativ rol îi aparține alelei APOE4 (54).

I.5 Patologie

Din punct de vedere patologic, AD se caracterizează prin atrofierea cerebrală cu scăderea volumului și a greutateii cerebrale, atrofierea convoluțiilor cortexului cu extinderea șanțurilor corticale și a sistemului ventricular (4). În AD, cele mai afectate regiuni ale creierului sunt cele asociate cu funcțiile mentale superioare, în special neocortexul și hipocampul (31). Trăsăturile patologice, specifice și cardinale ale bolii includ reducerea funcțiilor colinergice, disfuncția mitocondriilor (2), prezența în creier a plăcilor amiloide formate din A β și a NFT (5). Aceste aglomerate moleculare patologice se dispun în special în cortexul frontal, temporal, parietal, în hipocamp și în nucleii colinergici ai antebrațului bazal (4,175). Plăcile amiloide nu par să aibă un model definit de depunere, probabil datorită numeroaselor mecanisme capabile să elimine aceste proteine la nivel extracelular, în timp ce depunerea de NFT pare să urmeze un model bine definit (84). Numeroase studii au indicat că una dintre cele mai timpurii modificări ale AD implică pierderea sinapselor (4) care se corelează cu declinul cognitiv, ducând în cele din urmă la pierderea marcantă a celulelor în mai multe zone ale creierului. De asemenea, se remarcă faptul că nu există forme de AD, în absența altor procese de boală coexistente, cum ar fi alte forme de demență, bolile cardiovasculare sau diabet (85).

1.5.1 Caracteristicile moleculare

1.5.1.1 Factorul neurotrofic derivat din creier (BDNF)

Factorul neurotrofic derivat din creier (BDNF), este cea mai răspândită neurotrofină din SNC și joacă rol major în LTP, în reglarea plasticității sinaptice, creșterea și ghidarea axonală și dendritică și participă la eliberarea neurotransmițătorilor, la supraviețuirea și diferențierea neuronală (86). BDNF joacă un rol major în metabolismul energetic, în durere și apoptoză (87). În ceea ce privește AD, BDNF s-a dovedit a accentua supraviețuirea și diferențierea neuronilor colinergici bazali ai creierului (88). BDNF stimulează eliberarea de ACh, ceea ce sugerează că deficiențele sintezei BDNF ar putea participa la deteriorarea homeostaziei celulare declanșând AD (89).

1.5.1.2 Neuropeptida Y (NPY)

Neuropeptida Y (NPY) este cea mai abundentă neuropeptidă din SNC, având 36 de reziduuri de aminoacizi și fiind extrem de conservată între mamifere (90). NPY joacă un rol crucial în învățare, memorie și diverse funcții fiziologice, inclusiv reglarea stării de spirit,

homeostazia cardiovasculară, și motilitatea gastro-intestinală. Studiile au arătat că pacienții cu AD prezintă niveluri scăzute de NPY comparativ cu controalele sănătoase (91). NPY mediază concentrațiile intracelulare de Ca^{2+} , reduce excitotoxicitatea glutamatului, protejează celulele hipocampului și promovează neurogeneza prin activarea receptorilor specifici, atenuază neuroinflamația și contribuie la protecția neuronală în AD (92).

1.5.1.3 Proteina 1 de răspuns a creșterii timpurii (EGR1)

Proteina 1 de răspuns a creșterii timpurii 1 (EGR-1), reglează gene implicate în creștere, supraviețuire și plasticitate sinaptică, inclusiv menținerea LTP (15). EGR-1 este constitutiv exprimată în cortex și indusă rapid în lobul prefrontal și hipocamp în urma stimulii precum expunerea la noutate sau condiționarea fricii (93). EGR-1 reglează expresia genei PSEN2 și influențează funcțiile colinergice, având un impact semnificativ asupra învățării și memoriei (94). Reducerea expresiei EGR-1 afectează LTP și memoria în sarcini precum navigarea spațială și recunoașterea obiectelor, iar șoarecii mutați EGR-1 nu rețin informații despre locația spațială sau caracteristicile obiectelor. EGR-1 îmbunătățește învățarea și memoria prin remodelarea sinapselor și creșterea noilor conexiuni sinaptice (95).

1.5.1.4 Factorul nuclear 2 legat de factorul eritroid 2 α (NRF2)

Factorul nuclear 2 legat de factorul eritroid 2 (NRF2), membru al familiei de factori de transcripție Cap'n'collar (CNC), reglează expresia a peste 250 de gene care conțin elementul de răspuns antioxidant (ARE) în promotorii lor (96). Aceste gene sunt implicate în detoxifierea, metabolismul glutationului, producția de NADPH, oxidarea acizilor grași, metabolismul fierului și procesele proteazomale și autofagice. Nivelurile NRF2 sunt reduse la pacienții AD (97). Studiile pe șoareci arată că lipsa NRF2 agravează acumularea de A β și proteine τ (98), și deficitul cognitiv în modele de AD. Activarea NRF2, prin intervenții genetice și farmaceutice, oferă un rol neuroprotector în AD (99).

1.5.1.5 Proteina de legare a elementului de răspuns a AMPc (CREB)

CREB1 (engl. cAMP Response Element-Binding Protein) este o proteină nucleară de 43 kDa exprimată în toate celulele cerebrale, care reglează expresia genelor implicate în supraviețuirea neuronală și plasticitatea sinaptică, fiind esențială pentru învățare și memorie (100). Alterarea căilor enzimatice ce duc la fosforilarea CREB și interacțiunea cu mecanismele de transcriere, afectează funcția CREB și contribuie la disfuncția sinaptică și pierderea memoriei în AD (101). Studiile au demonstrat că expresia CREB este redusă în

AD, cu scăderea nivelurilor de CREB total și fosforilat în lobul prefrontal și hipocamp (102). Deficitele cognitive în AD sunt asociate cu scăderea activității CREB, afectând expresia BDNF și fiind mediate de oligomeri A β care blochează funcția CREB (103) iar intensificarea funcției CREB ar putea ameliora deficitele de memorie în AD (104).

I.6 Simptomele bolii Alzheimer

Simptomele AD includ declinul cognitiv, schimbări comportamentale și psihologice, observate în toate etapele bolii (105). Printre manifestările comune se numără afazia, disfuncția executivă, apatia și schimbările de personalitate. Deși deficitele cognitive nememorative pot apărea devreme, declinul memoriei este considerat principalul simptom (106). Alte simptome includ deteriorarea competențelor lingvistice și sociale, scăderea entuziasmului și creșterea agresivității. Abilitățile vizual-spațiale se deteriorează gradual, iar disfuncția executivă începe devreme și se agravează pe parcursul bolii (105).

I.7 Diagnostic și tratament

Testele de diagnostic bazate pe evaluarea aptitudinilor cognitive, cum ar fi testul MMSE (35). Diagnosticul includ diferite combinații de depreciere a abilităților cognitive, emoționale și sociale, ulterior diagnosticul AD se confirmă sau nu cu ajutorul tehnicilor de măsurare *in vivo* a neuropatologiei, folosind diverși biomarkeri a AD (107) cum ar fi: memoria de recunoaștere (108) și memoria pe termen lung (109).

Tratamentul AD se bazează pe medicamente inhibitoare ale colinesterazei, precum donepezilul, rivastigmina și GAL, și pe memantina (110). Aceste medicamente sunt aprobate de FDA și contribuie la ameliorarea simptomelor, dar nu promovează proliferarea neuronală sau inhibă apoptoza (10). Donepezilul, rivastigmina și GAL funcționează prin inhibarea colinesterazei, crescând astfel nivelurile de ACh în creier. Memantina acționează prin blocarea canalelor NMDA suprastimulate. Cu toate acestea, aceste tratamente prezintă efecte adverse și nu abordează cauza de bază a bolii (8).

CAPITOLUL II. FLAVONOIDELE ȘI BOALA ALZHEIMER

II.1 Flavonoide. Aspecte generale

Flavonoidele sunt polifenoli vegetali bioactivi cu roluri importante în natura și sănătate, provenind din metabolismul plantelor și fungilor (111). Acestea influențează culoarea și aroma florilor și fructelor, reglează creșterea plantelor și le oferă protecție contra stresului biotic și abiotic (112). Acești polifenoli prezintă o lungă istorie de utilizare medicală datorită efectelor lor antioxidante, prevenind formarea de radicali liberi și influențând funcția celulară prin interacțiunea cu receptori și căile de semnalizare intracelulară (113). Flavonoidele acționează prin diverse mecanisme antioxidante, inclusiv eliminarea radicalilor liberi, chelarea ionilor metalici și inhibarea enzimelor pro-oxidante, fiind utilizate cu succes în aplicații nutraceutice și farmaceutice (114).

II.1.1 Structura chimică, biodisponibilitatea și metabolismul flavonoidelor

Flavonoidele prezintă un schelet de 15 atomi de carbon și o structură de bază formată din două inele benzenice și un inel piranic (69). Acești polifenoli sunt biosintetizate din fenilalanină prin calea acidului shikimic. Structura lor poate include grupări de hidroxili, metoxil și glicozidice, iar clasificarea lor se bazează pe gradul de oxidare și saturație al inelului piran (115). Flavonoidele pot avea structuri variate, iar diferențele de structură afectează biodisponibilitatea și activitățile lor biochimice și farmacologice (116).

Absorbția, metabolismul și excreția flavonoidelor implică procese complexe care modifică structura acestor compuși în diverse țesuturi și compartimente celulare. Biodisponibilitatea flavonoidelor este esențială pentru evaluarea efectelor lor ca agenți chimiopreventivi (117). Flavonoidele suferă transformări extinse, inclusiv în ficat și intestin, unde sunt hidrolizate în aglicone mai lipofile, facilitând absorbția (118). Acestea sunt ulterior conjugate și detoxificate pentru a îmbunătăți solubilitatea în apă, iar metabolizii lor sunt excretați în urină și bilă. Bioactivitatea acestora variază în funcție de structura chimică și țesutul țintă, influențând efectele terapeutice și toxicitatea acestora (117).

II.1.2 Localizarea flavonoidelor în țesutul cerebral

Unele flavonoide și metaboliții lor pot traversa BBB și accesa direct țesuturile cerebrale, iar capacitatea acestora de a face acest lucru depinde de lipofilitatea lor (120). Exemple includ detectarea quercetin-3-O-glucuronidei în țesutul cerebral și acumularea flavonoidelor în diferite regiuni ale creierului la animale (121). Deși nivelurile flavonoidelor

în creier sunt adesea foarte mici, unele clase sunt reținute mai mult în țesutul neural decât în plasmă, ceea ce amplifică efectele lor directe asupra creierului (122,123).

II.2 Flavonoidele și boala Alzheimer

Flavonoidele sunt investigate ca agenți neuroprotectori datorită capacității lor de a influența procesele neurologice prin reglarea căilor de semnalizare neuronală și glială (124). Acestea îmbunătățesc funcția vasculară, stimulează plasticitatea sinaptică, și pot preveni deteriorarea oxidativă și disfuncția mitocondrială (18). Acești polifenoli naturali pot modifica procesele neurodegenerative și cognitive prin inhibarea colinesterazelor și prin modularea căilor de semnalizare, cum ar fi ERK și PI3K/Akt (116).

Numeroase flavonoide au demonstrat capacitatea de a ameliora patologia A β prin favorizarea procesării non-amiloidogene și inhibarea agregării, rezultând într-o scădere a nivelului de A β_{42} (125). De asemenea, acestea prezintă efecte neuroprotectoare prin modularea activității GSK-3 β și prin reducerea fosforilării mediate de A β (126). Simultan, flavonoidele protejează neuronii prin modularea căilor de semnalizare celulară, interacționând cu căile de semnalizare MAPK, în special MEK1 și MEK2, care controlează procesele celulare prin traducerea semnalelor extracelulare în răspunsuri intracelulare (127). În plus, activarea căilor anti-apoptotice ERK1/2 și PI3K/AKT, și reglarea în jos a căilor pro-apoptotice JNK de către flavonoide, oferă protecție împotriva stresului oxidativ (128).

II.3 Roifolina

Roifolina (C₂₇H₃₀O₁₄), cunoscută și sub numele de apigenin-7-O- β -neohesperidosidă, este o glicozidă dihidroxiflavonică galbenă cu masa molară de 578,5 g/mol, aparținând familiei apigeninei (129). Numele „roifolină” provine de la arborele japonez *Rhus succedanea*, de unde a fost izolată pentru prima dată, și a fost ulterior identificată și în frunzele altor plante din diverse familii botanice, precum: Theaceae, Urticaceae, Euphorbiaceae, și în sucurile și extractele din citrice, banane, roșii și struguri (130).

Rho prezintă o serie de proprietăți farmacologice remarcabile, inclusiv activități antivirale, antibacteriene, antiinflamatoare, antiproliferative (131) și antioxidante (132) având efecte benefice asupra infecțiilor virale, diabetului, inflamației și OS (133). De asemenea, Rho a demonstrat efecte anticancerigene (134), antihipertensive și hepatoprotectoare, precum și un potențial neuroprotector împotriva neurotoxicității mediate de peptida A β (131).

II.4 Baicaleina 5,6-dimetil eter

Baicaleina 5,6-dimetil eter (Baic, $C_{17}H_{14}O_5$) este o flavonoidă O-metilată galbenă cu masa molară de 298,0841 g/mol, izolată inițial din rădăcinile plantei *Scutellaria baicalensis* (familia Lamiaceae), utilizată în medicina tradițională din nord-estul Asiei pentru diverse afecțiuni (135). Baic a fost, de asemenea, găsită în alte specii de *Scutellaria* și în plante din genul *Alnus* (familia Betulaceae), cunoscute pentru proprietățile lor antioxidante, antiinflamatorii, antimicrobiene, antivirale și hepatoprotectoare (136).

Baic excelează în proprietăți antioxidante, demonstrând capacitatea de a proteja mitocondriile și de a reduce stresul oxidativ. În plus, a arătat efecte hepato-protectoare notabile, prevenind steatoza hepatică și reducând peroxidarea lipidelor. Proprietățile antidiabetice ale Baic includ scăderea semnificativă a glicemiei și îmbunătățirea microbiotei intestinale (137). De asemenea, Baic are efecte antiinflamatorii remarcabile, reducând semnificativ markerii inflamatori precum NF- κ B, TNF- α , IL-6 și IL-1 β . În ceea ce privește protecția neurovasculară, Baic a demonstrat efecte neuroprotectoare, protejând neuronii și îmbunătățind funcția cognitivă (138). Cu toate acestea, nu există dovezi actuale care să sugereze că Baic ar putea ameliora simptomele amnezice la peștii zebra tratați cu Sco.

II.5 Agatisflavona

Agatisflavona (Fab, $C_{27}H_{30}O_{14}$), cunoscută și ca 6,8"-Biapigenin, este un biflavonoid galben cu masa molară de 538,457 g/mol și densitate de 1,656 g/cm³, găsiindu-se în frunzele, tulpinile, fructele și rădăcinile plantelor precum *Caesalpinia pyramidalis*, *Anacardium occidentale* și *Rhus parviflora*, și poate fi extrasă cu solvenți polari sau bipolari, cum ar fi metanolul și etanolul (139).

Fab prezintă activități biologice notabile, incluzând efecte antivirale, antimicrobiene și neuroprotectoare (140). Fab protejează neuroni *in vitro* de excitotoxicitate prin reglarea glutamatului și influențarea microgliei către un fenotip M2 antiinflamator, reducând astfel moartea celulară și nivelurile de citokine proinflamatorii (22).

CAPITOLUL III MODELUL ANIMAL

III.1 Utilizarea modelelor animale pentru studiul bolii Alzheimer

În ciuda progreselor în metodele de studiu non-animale, utilizarea modelelor animale rămâne esențială în cercetarea neuroștiințifică, datorită complexității creierului (141). Modelele animale, precum șoarecii și peștele zebură, oferă perspective esențiale asupra mecanismelor AD și eficienței tratamentelor, fiind mai accesibile și mai ușor de manipulat genetic comparativ cu alte mamifere (54).

III.2 *Danio rerio* - model animal în cercetarea biomedicală

În cercetarea biomedicală, modelele animale rămân esențiale pentru înțelegerea patogenezei bolilor umane și dezvoltarea de noi terapii, în ciuda progreselor în metodele alternative (142–144). Peștele zebură (*Danio rerio*) a devenit tot mai popular datorită avantajelor sale, cum ar fi dezvoltarea rapidă, diversitatea genetică și tactibilitatea în manipularea genetică (141). Acest organism model este util pentru studierea proceselor neurodegenerative și pentru evaluarea noilor substanțe terapeutice datorită căilor metabolice conservate cu mamiferele (145).

III.2.1 *Danio rerio*, ca model animal al AD

Peștele-zebră apare rapid ca un organism model promițător pentru a studia diferite tulburări ale SNC, inclusiv AD (146). Neurochimia creierului acestor pești este foarte asemănătoare cu ce a mamiferelor, prezentând toate sistemele neuromediatoare majore, transmițătorii, receptorii, enzimele de sinteză și de metabolism ce sunt asemănătoare cu cele de la om (147). Totodată principalele tipuri de celule găsite în creierul mamiferelor, cum ar fi microgliile, oligodendrocitele, neuronii motorii și astrocitele sunt prezente și în SNC a acestor pești (148). O altă asemănare importantă dintre mamifere și acest pește o reprezintă dezvoltarea BBB, cu permeabilitate selectivă pentru diferite macromolecule (149). De asemenea, comportamentul tipic al peștilor zebură poate fi considerat drept un indicator esențial a stabilirii modelelor de demență sau a verificării eficacității medicamentelor. În plus, acești pești răspund într-o manieră asemănătoare la toate clasele de medicamente neurotrope, inclusiv la antipsihotice, stimulante, halucinogene, anxiolitice, antidepresive, antiepileptice, sedative, hipnotice, anestezice, analgezice și amplificatori cognitivi (150).

III.2.2 Asemănări între comportamentul peștelui zebra și cel al mamiferilor

Deși creierul peștelui-zebră este mai mic și mai simplu decât cel al mamiferelor, mecanismele genetice, neuronale și fiziologice responsabile de răspunsurile comportamentale sunt similare cu ale mamiferelor (151). Peștii-zebră prezintă regiuni omoloage ale creierului care îndeplinesc funcții similare cu cele din creierul mamiferelor, cum ar fi reglarea stărilor emoționale și procesele de învățare și memorare (108).

III.2.3 Asemănări între neuroanatomia peștelui zebra și cea a mamiferilor

Datorită proximității filogenetice față de om, peștele zebra este recunoscut ca un model de încredere pentru studiile ce vizează comportamentul, circuitele neuronale și bolile neurodegenerative (148). Deși peștii diferă de mamifere în structura organizatorică a SNC, mai multe nuclee cerebrale din creierul peștelui-zebră, inclusiv ganglionii bazali, striatul, hipocampusul și amigdala, prezintă o omogenitate ridicată cu cele ale mamiferelor (152).

III.3 Dezavantajele utilizării peștelui zebra ca model animal în neuroștiință

Peștele zebra oferă numeroase avantaje ca sistem model pentru studiul AD, inclusiv ușurința administrării medicamentelor în mediul apos, ceea ce permite evaluarea eficacității, biodisponibilității și toxicității în diverse etape (146). Cu toate acestea, există și limitări semnificative, cum ar fi diferențele în calea de administrare a medicamentelor comparativ cu cea umană, posibilitatea de absorbție a medicamentelor prin piele sau alte organe, și complexitatea interpretării interacțiunii circuite-comportament datorită dezvoltării incomplete a anumitor regiuni cerebrale și structurii SNC la peștii zebra (150).

CAPITOLUL IV MATERIAL ȘI METODE

IV.1 Studii in silico

Cercetarea compușilor chimici naturali cu potențial farmaceutic este un proces complex de 12-20 ani, care implică descoperirea și dezvoltarea medicamentului. Compușii sunt respinși adesea din cauza unui comportament farmacocinetic inadecvat, motiv pentru care aceste studii sunt efectuate cât mai devreme pentru a selecta doar compușii cu potențial ridicat pentru dezvoltare (153).

În contextul analizei computaționale, am adoptat o metodă simplificată de reprezentare a structurilor chimice folosind sistemul canonic SMILE (sistem simplificat de inserție moleculară în linie) pentru Sco, GAL și cele trei flavonoide naturale (Rho, Baic și Fab) (Tabelul IV.1).

Tabelul IV.1 Datele SMILE pentru scopolamină (Sco), galantamină (GAL), roifolină (Rho), baicalein 5,6-dimetil eter (Baic) și a agatisflavonă (Fab)

Compușii	SMILE (sistem simplificat de inserție moleculară în linie)
Sco	<chem>CN1C2CC(CC1C3C2O3)OC(=O)C(CO)C4=CC=CC=C4</chem>
GAL	<chem>CN1CCC23C=CC(CC2OC4=C(C=CC(=C34)C1)OC)O</chem>
Rho	<chem>CC1C(C(C(C(O1)OC2C(C(C(OC2OC3=CC(=C4C(=C3)OC(=CC4=O)C5=CC=C(C=C5)O)O)CO)O)O)O)O</chem>
Baic	<chem>C1=CC=C(C=C1)C2=CC(=O)C3=C(O2)C=C(C(=C3O)O)O</chem>
Fab	<chem>C1=CC(=CC=C1C2=CC(=O)C3=C(O2)C=C(C(=C3O)C4=C(C=C(C5=C4OC(=CC5=O)C6=CC=C(C=C6)O)O)O)O)O</chem>

IV.1.1 Evaluarea proprietăților fizico-chimice a compușilor

Proprietățile fizico-chimice și moleculare sunt factori critici care influențează procesele farmacocinetice și farmacodinamice, afectând astfel siguranța și eficacitatea medicamentelor. Evaluarea acestor proprietăți, alături de analiza ADME, este esențială în descoperirea medicamentelor, ajutând la prioritizarea candidaților cu potențial ridicat. Platformele online gratuite, precum pKCSM (<https://biosig.lab.uq.edu.au/pkcsm/>) și SwissADME (<http://www.swissadme.ch/index.php#>), sunt utilizate pentru a evalua caracteristicile esențiale ale compușilor, oferind informații despre solubilitate, hidrofobicitate și interacțiuni chimice.

IV.1.2 Evaluarea structurilor de alertă biomedicală a compușilor testați

Pentru a evalua potențialele alerte biomedicale ale compușilor Sco, GAL, Rho, Baic și Fab, s-a utilizat platforma SwissADME. Evaluarea a inclus detectarea compușilor de interferență prin metoda PAINS, identificarea fragmentelor structurale problematice conform listei Brenk, și analiza asemănării cu plumbul pentru a determina potențialul medicamentelor. De asemenea, s-a estimat accesibilitatea sintetică (SA) a compușilor, oferind un scor care reflectă probabilitatea dificultăților de sinteză (154).

IV.1.3 Predicție compușilor, analogie cu medicamentele

Conceptul de "asemănare cu medicamentul" evaluează probabilitatea ca o moleculă să devină un medicament oral, concentrându-se pe biodisponibilitate. Instrumente precum SwissADME și MolSoft MolSoft (<https://www.molsoft.com/>) sunt utilizate pentru a analiza criteriile structurale și fizico-chimice, aplicând reguli precum cea a lui Lipinski, Weber, Ghose, și Egan, pentru a filtra moleculele care nu îndeplinesc condițiile necesare pentru un profil farmacocinetic adecvat. Aceste evaluări ajută la identificarea și selectarea compușilor cu cel mai mare potențial de a deveni agenți terapeutici eficienți (155).

IV.1.4 Profilul farmacocinetic estimat in silico al compușilor

În cadrul analizei computaționale, am utilizat sistemul simplificat de inserție moleculară în linie (SMILES) pentru Sco, Gal, Rho, Baic și Fab care au fost preluate de pe platforma Pubchem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>). Am folosit 4 calculatoare gratuite (PASS Online (<https://www.way2drug.com/PASSOnline/predict.php>), În analiza computațională a compușilor Sco, GAL, Rho, Baic și Fab, am utilizat reprezentările SMILES preluate de pe platforma PubChem. Am folosit patru calculatoare gratuite, inclusiv PASS Online, pKCSM, ADMETlab 2.0 și ProTox-II, pentru a obține predicții legate de diverse proprietăți farmacocinetice și toxicologice ale acestor compuși. Pentru a facilita compararea predicțiilor obținute de pe aceste platforme cu datele experimentale, a fost esențială standardizarea unităților de măsură și conversia unor parametri în categorii binare. Printre proprietățile analizate s-au numărat solubilitatea în apă, permeabilitatea Caco2, absorbția intestinală, permeabilitatea cutanată, toxicitatea și interacțiunile cu enzimele CYP.

IV.1.5 Predicția activității biologice a compușilor prin intermediul platformelor PharmMapper și PASS

În analiza computațională a compușilor, am utilizat (<https://www.lilab-ecust.cn/pharmmapper/>), PASS (Prediction of Activity Spectra for Substances) (<https://www.way2drug.com/PASSOnline/predict.php>), pentru a evalua activitatea biologică și efectele secundare. PharmMapper (156) analizează interacțiunile moleculare comparând structura compușilor cu modelele farmacofore din baze de date extinse, folosind scoruri Z pentru a evalua relevanța țintelor de medicamente. PASS (157) estimează probabilitatea ca o substanță să aibă anumite activități biologice, oferind scoruri Pa și Pi care indică șansa de a fi activ sau inactiv. Aceste informații ajută la determinarea potențialului terapeutic și a diverselor acțiuni ale compușilor.

IV.1.6 Predicția țintelor proteice a compușilor studiați prin intermediul platformelor Molinspiration și SwissTargetPrediction

Pentru a evalua potențialul țintelor proteice ale compușilor studiați, am folosit platformele Molinspiration (<https://www.molinspiration.com/>) și SwissTargetPrediction (<http://www.swisstargetprediction.ch/>). Molinspiration (158) a oferit evaluări ale activităților biologice ale moleculelor, indicând că scoruri mai mari de 0,00 sugerează activitate biologică semnificativă. SwissTargetPrediction (159) a efectuat analize de similaritate 2D și 3D pentru a prezice țintele proteice, folosind un Scor Combinat care a identificat posibile ținte comune și a ghidat selecția compușilor pentru experimentele ulterioare.

IV.1.7 Predicția compușilor studiați de la stadiul de cercetare până la posibila aprobare a acestora pe piață prin intermediul platformei miDruglikeness

Predicția posibilității de aprobat pe piața farmaceutică a compușilor Sco, GAL, Rho, Baic și Fab a fost realizată folosind platforma miDruglikeness (<http://www.pkumdl.cn:8000/midruglikeness>). Această platformă oferă o evaluare cuprinzătoare a potențialului medicamentelor, analizând capacitatea *in vivo*, potențialul de a deveni medicamente noi de cercetare (IND) și estimările pentru aprobarea pe piață (160). miDruglikeness furnizează informații esențiale pentru orientarea resurselor și deciziilor de dezvoltare a medicamentelor, contribuind astfel la selecția compușilor cu cel mai mare potențial de succes comercial.

IV.2 Materialul vegetal

Studiul a analizat trei flavonoide naturale, Rho, Baic și Fab, cunoscute pentru efectele lor benefice asupra sănătății și absența reacțiilor adverse. Rho reduce inflamația și protejează neuronii de neurotoxicitate (161), Baic are efecte anti-neuroinflamatoare și reglează expresia TNF- α și IL-6 (162), iar Fab stimulează generarea neuronilor și protejează împotriva excitotoxicității glutamatului (163). Aceste flavonoide au fost izolate și caracterizate la Universitatea Ain Shams, Cairo Egipt, sub coordonarea științifică a Prof. univ. dr. Omayma Eldahshan. Pentru mai multe detalii a se vedea ANEXELE 1, 2 și 3.

IV.3 Modelul animal și modul de administrarea a tratamentului

În acest studiu, am investigat impactul administrării cronice a trei flavonoide naturale asupra unui model de demență la peștele-zebură. Au fost utilizate 120 pești-zebură adulți (*Danio rerio*), de tip sălbatic cu înotătoare scurte, cu vârste între 3 și 4 luni și lungimi de 3-4 cm la începutul experimentului, în proporție de 50% femele și 50% masculi, achiziționați de la un crescător autorizat (Pet Product S.R.L., București, România). După achiziție, peștii au fost aclimatizați în două acvarii de 70 L, echipate cu pompe de aer Tetrattec® (Tetra, Melle, Germania), într-o cameră de testare la Facultatea de Biologie. Apa declorurată, tratată cu Tetra AquaSafe (Tetra, Germania), a fost înlocuită la fiecare două zile și parametrii de calitate ai apei au fost monitorizați zilnic. Peștii au fost menținuți într-o fotoperiodă naturală, cu un ciclu de 14 ore lumină și 10 ore întuneric și au fost hrăniți de două ori pe zi cu fulgi de alge NovoMalawi (JBL, Neuhofen, Germania).

După 10 zile de aclimatizare, peștii au fost împărțiți aleatoriu în 11 grupuri experimentale, fiecare cu câte 10 animale, plasate în acvarii de 10 L, care conțineau apă declorurată tratată cu Tetra AquaSafe, înlocuită la fiecare două zile. Din cei 120 de pești, 10 au fost utilizați ca grup de control (Ctr), 10 au fost tratați cu Sco (100 μ M; Sigma-Aldrich, Germania), 10 au fost tratați cu Sco (100 μ M) + Galantamină (GAL, 1 mg/L; Sigma-Aldrich, Germania) iar restul de 90 au fost împărțiți în alte 9 grupuri, după cum urmează: (a) Sco (100 μ M) + Rho (1, 3 și 5 μ g/L); (b) Sco (100 μ M) + Baic (1, 3 și 5 μ g/L); și (c) Sco (100 μ M) + Fab (1, 3 și 5 μ g/L). Flavonoidele naturale (Rho, Baic și Fab) au fost administrate cronic pe durata a 10 zile înainte de testele comportamentale, diluate în soluție de dimetilsulfoxid (DMSO) 1%. Starea asemănătoare demenței a fost indusă prin administrarea acută de Sco (100 μ M) timp de 30 de minute înainte de testul NTT și procedura de eutanasiere, iar pentru testele Y maze și NOR, Sco (100 μ M) a fost administrat la 30 de minute după

sesiunea de antrenament. Grupul de control a fost expus doar la apă declorurată cu soluție de DMSO 1%.

Studiul a fost aprobat de Comitetul de Etică pentru Animale al Facultății de Biologie, Universitatea Alexandru Ioan Cuza, Iași, România (Numărul aprobării proiectului: 370/4.02.2022), iar toate măsurile au fost luate pentru a minimiza durerea și disconfortul animalelor, conform Directivei 2010/63/EU privind protecția animalelor de laborator. Nu s-au înregistrat decese sau semne de intoxicație în timpul experimentului.

IV.4 Evaluarea parametrilor comportamentali

Pentru a evalua impactul administrării cronice a celor trei flavonoide naturale asupra comportamentului animalelor incluse în acest studiu, am monitorizat activitatea peștilor zebrafi folosind o cameră digitală Logitech HD Webcam C922 Pro Stream. Această cameră are o rezoluție Full HD de 1080 pixeli și o rată de cadre de 30 pe secundă și este fabricată de Logitech, Lausanne, Elveția. Videoclipurile obținute au fost ulterior analizate folosind software-ul ANY-maze®, versiunea 6.3, furnizat de Stoelting Co., Wood Dale, IL, SUA.

IV.4.1 Testul de scufundare într-un acvariu nou (NTT)

Studiile au arătat că testele de anxietate la rozătoare sunt esențiale pentru identificarea profilurilor comportamentale legate de anxietate și evaluarea impactului medicamentelor (164), iar peștii zebra, folosind teste parțial analoge, oferă rezultate comparabile. Aceste teste au demonstrat asemănări semnificative în măsurarea comportamentelor precum explorarea redusă și tigmotaxia, subliniind utilitatea peștilor zebra în studiile de anxietate și în evaluarea factorilor genetici și farmacologici (165).

Pentru a investiga efectul compușilor Rho, Baic și Fab asupra stării de anxietate la peștii zebrafi tratați acut cu Sco (100 μ M), am aplicat protocolul stabilit de Cachat (166). Am utilizat un acvariu cu pereți trapezoidali, confecționat din sticlă transparentă, cu dimensiuni precise: înălțime de 15,1 cm, lungime de bază de 23,9 cm, lungime superioară de 28,9 cm și lățime de 6,1 cm. Acvariul a fost împărțit orizontal în două secțiuni egale: una superioară și una inferioară. În timpul experimentului, am umplut rezervorul de testare cu 1,5 litri de apă prelevată din acvariul de cazare al peștilor și l-am plasat pe o suprafață albă plană. Fiecare pește a fost evaluat individual pentru o durată de 6 minute.

Pe parcursul testului, am măsurat comportamentul de anxietate prin intermediul timpului petrecut în zona superioară/inferioară a acvariului (s), perioadei de latență (s) și distanța parcursă în partea superioară a acvariului (m). În plus, în cadrul testului de nouă

(NTT), am evaluat fenotipurile legate de locomotie ale peștilor zebrafi prin înregistrarea parametrilor precum: distanța totală parcursă (m), viteza medie de înot (m/s) și durata de imobilitate/îngheț. Aceste măsurători au permis o examinare detaliată atât a comportamentului de anxietate, cât și a răspunsului locomotor al peștilor în mediul nou.

IV.4.2 Testul labirintului Y (Y-maze)

Pentru evaluarea proprietăților farmacologice ale Rho, Baic și Fab asupra proceselor cognitive a peștilor zebra amnezici, am folosit testul labirintului Y, urmând protocolul descris anterior de către Cognato *et al.*, (167).

Testul labirintului Y se bazează pe tendința naturală a peștilor zebra de a explora răspunsul la noutate (168). Sarcina principală a acestui test presupune implicarea mai multor regiuni ale creierului cum ar fi hipocampusul, septul, creierul bazal și cortexul prefrontal, fiind foarte sensibil la deteriorarea funcțiilor hipocampusului și la medicamentele amnezice (169).

Acvariul utilizat pentru acest test a fost construit din sticlă transparentă și avea forma literei Y, având trei brațe egale, fiecare cu dimensiunile de 25 cm lungime, 8 cm lățime și 15 cm înălțime, formând un unghi de 120 de grade. Pentru a facilita analiza video, fundul acvariului a fost acoperit cu un material plastic alb, iar celelalte suprafețe au fost îmbrăcate în plastic negru, pe care au fost aplicate repere vizuale sub formă de pătrate, cercuri și triunghiuri. În etapa de antrenament, peștilor li s-a permis să exploreze doar două dintre cele trei brațe ale labirintului—brațul de start și brațul familiar—în timp ce al treilea braț, reprezentând brațul nou, a fost blocat. În sesiunea de testare, peștii au fost reintroduși în brațul de start, având acces liber la toate cele trei brațe timp de 5 minute. Activitatea locomotivă a fost evaluată prin înregistrarea numărului total de intrări în brațe, a distanței totale parcurse (m) și a unghiului de rotire (°). Pentru evaluarea proceselor de învățare și memorare a peștilor zebra a fost înregistrat procentul de alternare spontană (%). Pentru evaluarea memoriei spațio-temporale s-au înregistrat numărul de linii traversate și timpul petrecut în cele 3 brațe (s).

IV.4.3 Testul de recunoaștere a obiectului nou (NOR)

Testul de recunoaștere a obiectului nou (*engl.* new object recognition test – NOR), se bazează pe preferința naturală a vertebratelor de a explora obiecte noi (ON) în detrimentul celor familiare (OF) (170). NOR este un test utilizat pentru evaluarea modificărilor cognitive ale animalelor în urma tulburărilor sistemului nervos, neurodegenerative sau a celor induse de anumite substanțe chimice. De asemenea, cu ajutorul acestui test este posibilă evaluarea

oricărui tip de memorie, inclusiv a memoriei de scurtă și de lungă durată prin simpla manipulare a intervalului de retenție, definit ca fiind perioada de timp dintre sesiunea de antrenament și cea de testare (54).

Pentru a evalua impactul celor trei flavonoide asupra memoriei de recunoaștere la peștii zebrafi, am implementat testul NOR, conform protocolului stabilit de Stefanello (171). Am utilizat un rezervor din sticlă cu formă cubică, având dimensiuni de 30 cm lățime și înălțime. Pereții externi ai rezervorului au fost acoperiți cu un material textil negru pentru a reduce stresul peștilor și a minimiza erorile experimentale. Rezervorul a fost plasat pe o suprafață plană și umplut cu apă prelevată din acvariul de cazare al peștilor, nivelul apei fiind menținut la 5 cm de marginea superioară a rezervorului de testare.

Testul a fost desfășurat pe parcursul a patru zile. În primele trei zile, fiecare pește a fost familiarizat cu acvariul de testare timp de 5 minute, de două ori pe zi, cu un interval de 5 ore între sesiuni. Sesiunea de antrenament, realizată la 12 ore după ultima sesiune de familiarizare, a implicat explorarea a două obiecte identice (cubi galbeni cu latura de 2,5 cm) timp de 10 minute. Cubii au fost așezați în două colțuri opuse ale rezervorului, orientați paralel, cu o distanță de 10 cm între ei. După antrenament, a urmat o perioadă de retenție de o oră, în care unul dintre cubii galbeni a fost înlocuit cu un cub albastru. Astfel, cubul galben a fost considerat familiar (OF), iar cubul albastru, nou (ON). În sesiunea de testare, fiecare pește a avut ocazia să exploreze cele două cuburi timp de 10 minute. Memoria de recunoaștere a fost evaluată ca procent de preferință, calculată după formula: $\text{Timpul de explorare în ON} / (\text{Timpul de explorare în OF} + \text{Timpul de explorare în ON}) * 100$; Prin urmare, peștii cu o memorie de referință mai bună își vor aminti OF și vor petrece mai mult timp explorând ON.

IV.5 Evaluarea parametrilor biochimici din probele de creier de la peștii zebrafi

Imediat după efectuarea testelor comportamentale, peștii au fost supuși eutanasierii prin răcire rapidă. Procedura a implicat scăderea temperaturii apei la 2-4°C prin adăugarea de gheață (în proporție de 5 părți gheață și 1 parte apă), evitând contactul direct al peștilor cu gheața înainte de a deveni inconștienți (172). După eutanasiere, peștii au fost disecați conform metodei descrise de Gupta și Mullins (173). Peștii au fost scoși din apa rece și transferați pe un suport de disecție. După decapitare, capetele au fost supuse unei disecții precise într-o soluție tampon fosfat salin (PBS) 1X, pH 7,4. Creierele întregi au fost extrase și plasate în microeprubete de 0,5 ml. În cadrul testelor biochimice, trei creiere de pește

zebrafi au fost considerate o singură probă. Țesutul cerebral (reprezentat de cele 3 creiere) a fost cântărit (~15 mg) și omogenizat (1:10, w/v) timp de 1 minut la 1000 rpm, pe gheață, într-o soluție tampon de extracție (soluție tampon fosfat de potasiu 0,1 M, pH 7,4 cu 1,15% KCl), utilizând moara Mikro-Dismembrator U (Sartorius, New York, SUA) dotată cu bile magnetice de 3 mm (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Goettingen, Germania). Omogenatul a fost centrifugat timp de 15 minute la 14000 rpm și 4°C pentru clarificare, iar supernatantul a fost utilizat ulterior pentru determinarea conținutului total de proteine, evaluarea activității specifice a enzimelor SOD, CAT, GPX și AChE, și estimarea conținutului total de GSH, MDA și proteine carbonilate.

IV.5.1 Determinarea concentrației de proteine solubile. Metoda Bradford

Conținutul de proteine a fost cuantificat folosind metoda Bradford (174). Metoda Bradford este o tehnică colorimetrică utilizată pentru cuantificarea proteinelor, bazată pe schimbarea culorii a unui reactiv de colorare, Coomassie Brilliant Blue, care se leagă de proteine, generând o absorbție măsurabilă la 595 nm, proporțională cu concentrația de proteine în probe.

IV.5.2 Determinarea activității superoxid-dismutazei

În acest studiu, activitatea superoxid dismutazei (SOD, E.C. 1.15.1.1) a fost determinată pe baza protocolului descris de Winterbourn și colab. (175). Pe scurt, s-a monitorizat capacitatea enzimei de a inhiba reducerea Nitro Blue Tetrazoliului (NBT) de către radicalii liberi de superoxid care au fost generați în mediul de reacție prin fotoreducerea riboflavinei. Activitatea enzimei a fost exprimată în unități/mg proteină.

IV.5.3 Determinarea activității catalazei

Pentru determinarea activității catalazei (CAT, EC 1.11.1.6) am utilizat o metodă colorimetrică simplă, ce a fost descrisă pentru prima dată de Sinha (176). Metoda dată se bazează pe faptul că bicromatul de potasiu este redus în mediu acid (acid acetic) la acetat cromic în prezența căldurii și a H₂O₂ și poate fi determinat spectrofotometric la 570 nm.

IV.5.4 Determinarea activității glutatation peroxidazei

În acest studiu activitatea glutatation peroxidazei (GPx, E.C. 1.11.1.9) a fost evaluată prin utilizarea protocolului descris de Fukuzawa și Tokumura (177). Această metodă se bazează pe faptul că GPx catalizează descompunerea H₂O₂ cu GSH-ul în calitate de reducător, rezultând astfel glutatation oxidat (GSSG) și apă. Această reacție este importantă

în eliminarea nivelurilor scăzute de H_2O_2 care ar putea deteriora celula. GSH-ul rămas în exces reacționează cu DTNB formând un complex galben. Intensitatea culorii a fost măsurată spectrofotometric, întrucât diferența dintre cantitatea inițială și cea finală este direct proporțională cu activitatea enzimatică. Activitatea enzimatică a GPx a fost exprimată ca unități/mg proteină.

IV.5.5 Determinarea nivelului de glutation redus

În acest studiu pentru determinarea conținutului de glutation redus (γ -L-glutamil-L-cisteinil-glicină- GSH, E.C.1.8.4.4), s-a utilizat metoda descrisă de Salbitani și colab. (178). GSH reprezintă un component esențial al sistemului de apărare antioxidant celular și joacă un rol direct în menținerea homeostaziei redox și în reglarea concentrațiilor scăzute de ROS. Cantitatea de GSH a fost raportată la concentrația de proteine și a fost exprimată în μ g GSH/mg proteină.

IV.5.6 Determinarea nivelului de malondialdehidă

Determinarea nivelului de Malondialdehida (MDA, E.C. 542.78.9), în creierele de pește zebrafi a fost realizată conform protocolului descris de Ohkawa și colab., (179). Acest protocol se bazează pe interacția peroxididelor de lipide din țesuturile animale cu acidul tiobarbituric, generând o colorare roz, care a fost măsurată la 532 nm.

IV.5.7 Determinarea nivelului de proteine carbonilate

Pentru a evalua nivelul proteinelor carbonilate în creierele de pește zebrafi, am aplicat metoda descrisă de Oliver și colab., (180). Aceasta implică reacția dintre 2,4-dinitrofenilhidrazină și reziduurile de proteine din creierul peștilor, generând 2,4-dinitrofenilhidrazone. Aceste complexe au fost cuantificate la 370 nm, utilizând un amestec de GuHCl și KH_2PO_4 ca referință. Rezultatele au fost exprimate în nmoli DNPH pe mg de proteină.

IV.5.8 Determinarea activității acetilcolinesterazei

Pentru determinarea activității acetilcolinesterazei (AChE E.C. 3.1.1.7) din omogenate, s-a utilizat metoda fotometrică descrisă de Ellman și colab. (181). Substratul iodură de ACh (Sigma, SUA) și reactivul acid ditiobisnitrobenzoic (DTNB) (Sigma, SUA) au fost adăugate împreună cu tamponul fosfat (pH 7,4). Iodura de ACh a fost hidrolizată la tiocolină și acetat de AChEEnzima acționează asupra ACh, formându-se în mediu tiocolină și acetat. Tiocolina rezultată reacționează rapid cu DTNB din mediul de reacție și duce la

formarea anionului 5-tio-2-nitrobenzoat de culoare galbenă produsă din reacția dintre tiocolină și DTNB. Rata de dezvoltare a culorii a fost utilizată ca măsură a activității AchE. Un profil cinetic al activității enzimatică a fost studiat spectrofotometric la 412 nm. Activitatea enzimatică a fost exprimată în nmoli ATC/min/mg de proteină.

IV.6 Evaluarea expresiei genelor

IV.6.1 Extracția ARN total din probele de creier prelevate de la peștii zebra

Extracția ARN-ului total din creierul de pești zebrafi a fost realizată folosind EZ-RNA II Total RNA Isolation Kit (fără cloroform) Cat. No.: 20-410-100 (182). Creierul, cântărit individual (aprox. 5 mg), au fost omogenizate în 0,25 ml soluție de denaturare și incubate timp de 5 minute. După adăugarea fenolului saturat și a 1-bromo-3-cloropropan, amestecul a fost centrifugat, iar supernatantul a fost tratat cu izopropanol și centrifugat din nou. Pelleturile au fost spălate cu etanol 75% și uscate la aer, iar ARN-ul a fost dizolvat în apă fără nucleaze. Probele de ARN au fost normalizate la 100 ng/μl, iar concentrația și puritatea au fost măsurate cu NanoDrop. ARN-ul a fost convertit în cDNA folosind Omniscript Reverse Transcription Kit (QIAGEN).

IV.6.2 Evaluarea expresiei genelor *bdnf*, *npv*, *egr-1*, *nrf2*, și *creb1*

Probele de ARN total au fost dezghețate lent la 4 °C, fiind ulterior cuantificate. Pentru a exclude erorile de cuantificare a expresiei genice, provocate de diferențe ale concentrației de ARN introdus în reacțiile de amplificare, toate probele au fost normalizate la concentrația de 100 ng/μl. Pentru cuantificarea expresiei absolute a genelor de interes (*bdnf*, *npv*, *egr-1*, *nrf2* și *creb*), atât revers-transcriere cât și amplificarea prin RT-qPCR au fost realizate utilizând un kit într-un singur pas GoTaq® 1-Step RT-qPCR System (Promega, Madison, WI, SUA), pe o mașină PCR rotativă în timp real HRM Rotor-Gene 6000 (Corbett, CA, SUA) cu 5 plexuri. Amestecurile de reacție au fost realizate în duplicat, fiecare amestec de reacție având un volum de 10 μl. În calitate de control intern în RT-qPCR am utilizat *β-actina*. Astfel, am îmbunătățit precizia și fiabilitatea datelor noastre privind expresia genică.

IV.7 Imunodetecția proteinei CREB1, transferate pe membrane de nitroceluloză

Detecția proteinelor de interes, CREB-1 și GAPDH, a fost realizată prin tehnici de imunoblotting, conform analizei utilizate anterior de Koehler (183). Creierul a fost omogenizat individual cu un mojar cu bile (Mikro-Dismembrator U; Sartorius, New York,

SUA), echipat cu bile magnetice de 3 mm (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Goettingen, Germania) într-un tampon de extracție (0,1 M tampon fosfat de potasiu, pH 7,4, cu 1,15% KCl și inhibitori de protează SIGMAFAST™, Tablete Inhibitoare de Protează, S8820), conținând inhibitori solubili ai proteazelor (AEBSF, E-64, bestatină, leupeptină, aprotină și EDTA (sare de sodiu)) cu specificitate largă pentru inhibarea proteazelor serinice, cisteinice și metaloproteazelor. Omogenatul a fost centrifugat la 14.000 rpm timp de 15 minute la 4°C, iar supernatantul (~130 μl) a fost colectat în tuburi sterile de 1,5 ml. Concentrația optimă a extractului proteic pentru încărcarea în puțuri a fost determinată utilizând metoda Bradford (174). Cantități egale de proteine au fost diluate în tampon de încărcare (200 mM Tris-HCl, pH 6,8, SDS 10%, bromofenol albastru 0,4%, 40% glicerină și 1M beta-mercaptoetanol) și încălzite la 90°C timp de 10 minute pentru a facilita denaturarea. După denaturare, probele au fost centrifugate la 2500 rpm timp de 10 secunde și apoi separate prin electroforeză pe un gel de poliacrilamidă 10% utilizând electroforeza SDS-PAGE.

Proteinele, ordonate în funcție de masele lor moleculare pe gelul de poliacrilamidă, au fost transferate electrostatic pe o membrană de nitroceluloză (0,45 μm) (Watman, Germania) folosind un sistem de migrare semi-uscat. Membranele au fost blocate timp de 30 de minute într-o soluție tampon de blocare (TTBS) conținând 500 mM TRIS-HCl, 1,5 M NaCl și 0,1% Tween 20%. Apoi, au fost incubate timp de două ore la temperatura camerei în soluție tampon TBS cu două anticorpi primari (anti-GAPDH și anti-CREB-1, produse în iepure), așa cum este descris în Tabelul 2. După spălare cu soluție TTBS, membranele au fost incubate timp de o oră în soluție tampon TBS cu anticorp secundar (IgG, anti-iepure, produs în capră). După o spălare finală, membranele de nitroceluloză au fost incubate timp de 10 minute la temperatura camerei în tampon de carbonat (0,1 M NaHCO₃, 1 mM MgCl₂, pH 9,8). În final, membranele de nitroceluloză au fost dezvoltate într-un tampon de dezvoltare (7,5 g BCIP în 20 ml tampon carbonat + 60 μl NBT), agitând ușor până când benzile au apărut (~2-5 minute). Benzile au fost fotografiate cu dispozitivul Fluor-S MultiImager (Bio-Rad, SUA), iar analiza imaginilor pentru cuantificarea proteinelor de interes a fost realizată folosind software-ul Image Lab (Bio-Rad, SUA).

IV.8 Analiza statistică

Rezultatele s-au exprimat ca medie ± eroarea standard a mediei (S.E.M). Datele privind comportamentul, statusul colinergic și cel oxidativ, expresia genelor *bdnf*, *npv*, *creb1*, *egr1*, *nrf2* și nivelul de proteină Creb1 au fost analizate printr-o analiză

unidirecțională a variantei (ANOVA), urmată de testul de comparație multiplu *post-hoc* al lui Tukey, luând în considerare ca factor tratamentul cu Rho, Baic și Fab.

Toate analizele statistice au fost efectuate cu ajutorul software-ului GraphPad 9.2 (GraphPad Software 9.2, Inc., San Diego, CA, SUA), iar semnificația statistică a fost stabilită la un $p < 0,05$. Corelația dintre starea similară anxietății, performanța neurocognitivă, a OS a statusului colinergic, expresia genelor de interes *bdnf*, *npv*, *creb1*, *egr1*, *nrf2* și a nivelului de proteină CREB1 a fost stabilită prin intermediul corelațiilor Pearson (r).

CAPITOLUL V. REZULTATE ȘI DISCUȚII

V.1 Proprietățile fizico-chimice ale roifolinei, baicalein 5,6-dimetil eter și ale agatisflavonei

Această lucrare completează cercetările anterioare prin compararea proprietăților fizico-chimice ale compușilor Sco, GAL, Rho, Baic și Fab, folosind date din PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) și analizându-le cu platforma online pKCSM (<https://biosig.lab.uq.edu.au/pkcsm/>) și platforma online SwissADME (<http://www.swissadme.ch/index.php#>).

Studiul s-a concentrat pe compușii naturali Rho, Baic și Fab, din cauza prezenței lor istorice în alimentația umană. În Figura 5 este reprezentat radarul de biodisponibilitate pentru Sco, GAL, Rho, Baic și Fab, care prezintă șase proprietăți fizico-chimice: lipofilitate (LIPO), dimensiune (SIZE), polaritate (POLAR), solubilitate (INSOLU), flexibilitate (FLEX) și saturație (INSASTU). Rezultatele arată că Sco și GAL sunt compuși solubili oral, în timp ce flavonoidele naturale (Rho, Baic, Fab) nu sunt biodisponibile oral din cauza polarității ridicate, dimensiunii mari și altor caracteristici fizico-chimice.



Figura 5.1. Zona roz reprezintă intervalul optim pentru fiecare dintre proprietăți (lipofilitate: LogP între $-0,7$ și $+5,0$, dimensiune: Greutate moleculară între 150 și 500 g/mol, polaritate: TPSA între 20 și 130 Å, solubilitate: LogS nu mai mare de 6 , saturație: fracțiunea de atomi de carbon în hibridizarea sp^3 nu mai puțin de $0,25$ și flexibilitate: nu mai mult de 9 legături rotative. În acest exemplu, se prevede că compusul nu este biodisponibil oral, deoarece este prea flexibil și prea polar.

Tabelul V.1 detaliază proprietățile fizico-chimice esențiale pentru evaluarea compușilor cu potențial farmaceutic, conform criteriilor stabilite de Xiong și colab., (191). Aceste criterii includ greutatea moleculară (100-600 g/mol), numărul de acceptori și donatori de legături de hidrogen, suprafața polară accesibilă solvenților (TPSA), solubilitatea, lipofilitatea și numărul de legături rotative. Aceste proprietăți sunt cruciale pentru optimizarea și selecția compușilor cu potențial terapeutic.

Tabelul V.1 Proprietăți fizico-chimice ale scopolaminei (Sco), Galantaminei (GAL), roifolinei (Rho), baicalein 5,6-dimetil eter (Baic) și a agatisflavonei (Fab) obținute cu ajutorul platformelor Pkcsm și SwissADME.

Descriptor	Sco	GAL	Rho	Baic	Fab
Formula moleculară	C ₁₇ H ₂₁ NO ₄	C ₁₇ H ₂₁ NO ₃	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₄	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	C ₃₀ H ₁₈ O ₁₀
Greutate moleculară	303.358	287.359	578.523	314.293	538.464
nHA	5	4	14	6	10
nHD	1	1	8	2	6
Număr de atomi grei	22	21	41	20	40
Număr de atomi grei aromatici	6	6	16	16	32
LogP	0.9181	1.8503	-1.0983	2.8884	5.134
LogS	-2.596	1.243	-3.834	-3.441	-4.310
Fractiune Csp ³	0.59	0.53	0,44	0,00	0.00
Legături rotative	4	1	6	3	3
Refracție molară	83.48	84.05	137.33	73.99	146.97
Suprafață	129.371	1.8503	231.312	130.682	222.664
TPSA	62.30 Å ²	41.93 Å ²	228.97 Å ²	90.90 Å ²	181.80 Å ²

LogP (coeficientul de partiție octanol/apă)

TPSA (Aria de suprafață a donatorilor și acceptorilor)

V.2 Evidențierea structurilor de alertă biomedicală ale celor 3 flavonoide

Dintre compușii analizați, doar Baic prezintă o alertă PAINS legată de inhibarea catecol-O-metiltransferazei (COMT), sugerând un potențial redus comparativ cu ceilalți compuși, așa cum se poate observa în Tabelul V.2.

Tabelul V.2 Proprietățile asociate structurilor de alertă biomedicală ale scopolaminei, galantaminei, roifolinei, baicalein 5,6-dimetil eter și a agatisflavonei obținute cu ajutorul platformei SwissADME.

Compuși	Sco	GAL	Rho	Baic	Fab
PAINS	0 alert	0 alert	0 alerte	1 alertă: catecol_A	0 alerte

Brenk	1 alertă: Trei membrii_hetero ciclu	1 alertă: izolat_ alchenă	0 alerte	1 alertă: Catecol	0 alerte
Asemănare cu plumb	Da	Da	Nu; 1 încălcare: MW>350	Da	Nu; 2 încălcări: MW>350, LogP>3.5
SA	4.03	4.57	6.33	3.02	4.17

MW- greutate moleculară

Sco prezintă o alertă Brenk legată de un nucleu heterociclic cu trei atomi, ceea ce poate influența negativ farmacocinetica și poate indica un potențial toxic. GAL are o alertă Brenk pentru „izolat_ alchenă”, sugerând posibile efecte adverse asupra farmacologiei sale, iar Baic prezintă o alertă „Catecol”, indicând riscuri similare. Rho și Fab nu au alerte Brenk, dar ambele flavonoide au o greutate moleculară mare și lipofilitate scăzută, indicând o solubilitate redusă și dificultăți în optimizarea plumbului, deși toate compușii sunt accesibili sintetic, conform scorurilor SA validate (192).

V.3 Predicțiile structurilor de alertă biomedicală ale celor 3 flavonoide

Rezultatele predicțiilor structurilor de alertă biomedicală ale Sco, GAL, Rho, Baic și Fab sunt prezentate în Tabelul V.3. Analiza a arătat că Sco, GAL și Baic îndeplinesc cele cinci filtre farmacocinetice, fiind considerați potențiali candidați pentru dezvoltarea medicamentelor, în timp ce Rho și Fab nu respectă complet aceste reguli și au o biodisponibilitate moderată. Scorul de biodisponibilitate Abbot sugerează o probabilitate moderată de biodisponibilitate orală pentru Sco, GAL și Baic, dar una scăzută pentru Rho și Fab (Figura 5.2.). Aceste analize *in silico* oferă o evaluare preliminară și necesită confirmare prin experimente de laborator pentru a valida potențialul acestor compuși ca medicamente.

Tabelul V.3 Predicțiile asociate structurilor de alertă biomedicală ale scopolaminei, galantaminei, roifolinei, baicalein 5,6-dimetil eter și a agatisflavonei obținute cu ajutorul platformei SwissADME.

Compuși	Sco	Gal	Rho	Baic	Fab
Lipinski	Da; 0 încălcări	Da; 0 încălcări	Nu; 3 încălcări: MW > 500, NorO > 10, NHorOH > 5	Da ; 0 încălcări	Nu; 2 încălcări: MW>500, NHorOH>5
Ghose	Da	Da	Nu; 4 încălcări : MW > 480, WLOGP < -0.4, MR > 130, #atomi> 70	Da	Nu; 2 încălcări: MW>480, MR>130
Veber	Da	Da	Nu; 1 încălcare : TPSA >140	Da	Nu; 1 încălcare: TPSA>140
Egan	Da	Da	Nu; 1 încălcare: TPSA>131.6	Da	Nu; 1 încălcare : TPSA>131.6

Muegge	Da	Da	Nu; 3 încălcări: TPSA >150, H-acc >10, H-don >5 2	Da	Nu; 3 încălcări: XLOGP3 > 5, TPSA >150, H-don>5
Abbot	0.55	0.55	0.17	0.55	0.17

Utilizarea Molsoft (193) a permis prezicerea unor proprietăți esențiale ale moleculelor, cum ar fi biodisponibilitatea și afinitatea față de proteine, contribuind la selecția celor mai promițători compuși pentru dezvoltarea ulterioară.

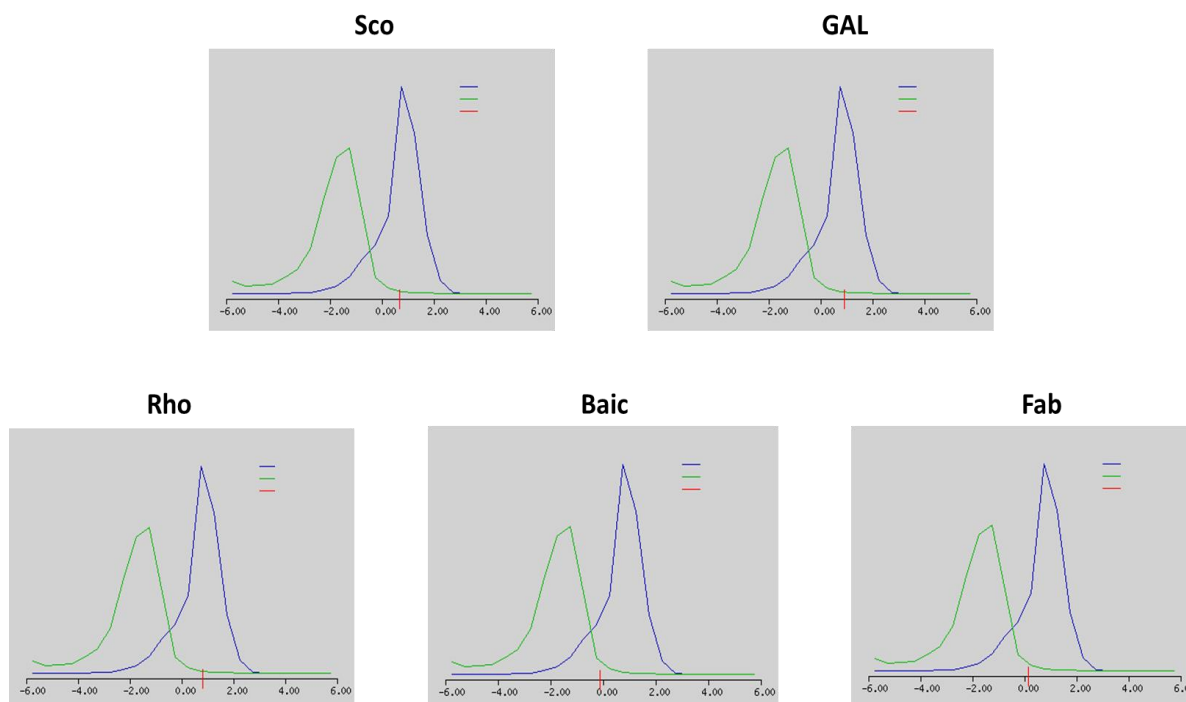


Figura 5.2 Reprezentarea analogiei ale scopolaminei (Sco), Galantaminei (GAL), roifolinei (Rho), baicalein 5,6-dimetil eter (Baic) și a agatisflavonei (Fab) cu medicamentele. Linia albastră indică scorul pentru medicamente, linia verde indica scorul pentru compușii care nu sunt medicamente iar linia roșie indică localizarea compusului analizat. Scorul modelului asemănător medicamentului a fost: 0.68 pentru Sco, 0.90 pentru GAL, 0.81 pentru Rho, - 0.10 pentru Baic și 0.14 pentru Fab.

V.4 Profilul farmacocinetic estimat in silico ale celor 3 flavonoide

Moleculele cu potențial medicamentos influențează țintele celulare prin legarea la receptori și ajustarea mecanismelor celulare, dar trebuie să parcurgă un traseu complex în organism pentru a-și manifesta efectul terapeutic. Farmacocinetica studiază etapele absorbției, distribuției, metabolismului și excreției (ADME) ale medicamentelor, începând cu absorbția din tractul intestinal și continuând cu metabolismul hepatic și distribuția în organism. După generarea efectului terapeutic, medicamentele trebuie eliminate eficient pentru a preveni bioacumularea și efectele secundare toxice, care pot apărea și prin interferența cu alte medicamente din cauza inducției enzimatică. Astfel, este esențial să se

monitorizeze și să se gestioneze aceste interacțiuni pentru a asigura siguranța și eficiența tratamentului (194).

Pentru evaluarea potențialului farmacocinetic al Sco, GAL, Rho, Baic și Fab, am analizat proprietăți precum absorbția, distribuția, metabolismul, excreția și toxicitatea. Solubilitatea, un parametru esențial și ușor de măsurat, poate fi clasificată în solubilitate netamponată, tamponată și intrinsecă, și datele referitoare la solubilitatea în apă a acestor compuși sunt prezentate în Tabelul V.4.

Tabelul V.4 Farmacocinetica. Pk_{cs}m/ ADMETlab 2.0 și ProTox-II: Solubilitatea în apă, predicția permeabilității Caco2, absorbția intestinală, substrat de glicoproteină P, inhibitor al glicoproteinei PI/II, permeabilitatea pielii, VD_{ss}, permeabilitatea barierei hemato-encefalice (BBB), permeabilitatea SNC, substratul CYP3A4, inhibitor CYP1A2, clearance-ul total, substratul OCT2 renal, toxicitatea AMES max. doză tolerată (la om), toxicitate acută orală la șobolan (DL50), toxicitate cronică orală la șobolan (LOAEL), hepatotoxicitate, sensibilizare a pielii.

Proprietăți	Compus Numele proprietății	Sco	Gal	Rho	Baic	Fab	Unit
Absorbție	Solubilitate în apă	-1.601	-2.641	-2.862	-3.302	-2.892	Numeric (log mol/L)
	Permeabilitatea Caco2	0.059	1.594	-0.942	1.219	0.057	Numeric (log P _{app} în 10 ⁻⁶ cm/s)
	Absorbție intestinală (umană) (scăzută <30%, mare > 30%)	72.626	94.994	24.308	94.004	96.086	Numeric (% absorbit)
	Substrat de glicoproteină P	Da	Nu	Da	Da	Da	Categoric (Da/Nu)
	Inhibitor al glicoproteinei PI/II	Nu	Nu	Nu	Nu	Da	Categoric (Da/Nu)
	Permeabilitatea pielii	-4.097	-3.75	-2.735	-2.737	-2.735	Numeric (log K _p)
Distribuire	VD _{ss} (uman)	0.583	0.89	1.14	0.369	-1.052	Numeric (log L/kg)
	Fracție nelegată (umană)	0.414	0.36	0.152	0.071	0.271	Numeric (Fu)
	Permeabilitatea BBB (log BB > 0,3 traversează BBB, log BB < 0,1 nu traversează BBB)	-0.043	-0.081	-1.702	-0.448	-1.825	Numeric (log BB)
	Permeabilitatea SNC (log PS > -2, penetrează SNC, log PS < -3 nu penetrează)	-3.031	-2.511	-4.798	-2.29	-3.133	Numeric (log PS)

Metabolism	Substraturi ale CYP2D6	Nu	Nu	Nu	Nu	Nu	Categoric (Da/Nu)
	CYP1A2 inhibitor	Da	Da	Nu	Nu	Da	Categoric (Da/Nu)
	CYP2C19 inhibitor	Nu	Nu	Nu	Da	Nu	Categoric (Da/Nu)
	Inhibitor al CYP2C9	Nu	Nu	Nu	Nu	Nu	Categoric (Da/Nu)
	Inhibitor al CYP2D6	Nu	Nu	Nu	Da	Nu	Categoric (Da/Nu)
	CYP3A4 inhibitor	Nu	Nu	Nu	Nu	Nu	Categoric (Da/Nu)
Excreție	Clearance-ul total	1.096	0.991	-0.005	0.675	0.407	Numeric (log ml/min/kg)
	Subsubstrat renal OCT2	Nu	Da	Nu	Nu	Nu	Categoric (Da/Nu)
Toxicitate	Toxicitate AMES	Nu	Nu	Nu	Nu	Nu	Categoric (Da/Nu)
	Doza max. tolerată (umană) (minim < 0,447, maxim > 0,477)	-0.319	-0.423	0.492	0.094	0.438	Numeric (log mg/kg și zi)
	Toxicitate acută orală la șobolan (DL50)	2.234	2.728	2.498	2.21	2.507	Numeric (mol/kg)
	Șobolan oral cronic Toxicity (LOAEL)	0.736	0.966	4.443	1.746	3.353	Numerice (log mg/kg_b w/zi)
	Hepatotoxicitate	Nu	Da	Nu	Nu	Nu	Categoric (Da/Nu)
	Sensibilizarea pielii	Nu	Nu	Nu	Nu	Nu	Categoric (Da/Nu)

Potrivit platformei pkCSM, solubilitatea în apă a compușilor la 25°C variază, Sco având cea mai mare solubilitate (-1.601 log mol/L) și Baic cea mai mică (-3.302 log mol/L). Coeficientul de permeabilitate Caco-2, indicând absorbția intestinală, variază semnificativ, cu Baic și GAL având valori mari, sugerând o absorbție eficientă, în timp ce Sco și Fab au coeficiente scăzute, indicând o absorbție slabă. GAL și Baic pot traversa BBB, în timp ce Sco, Rho și Fab au permeabilitate scăzută.

În ceea ce privește farmacocinetica, Sco prezintă o biodisponibilitate variabilă în funcție de calea de administrare, cea mai mare fiind prin aplicare intranasală. GAL are un profil farmacocinetic liniar cu biodisponibilitate orală mare. Valoarea Vdss este ridicată pentru majoritatea compușilor, GAL având cel mai mare volum de distribuție, în timp ce Fab are valoarea cea mai scăzută. Frația nelegată în plasmă (Fu) variază, Sco și GAL având valori mai mari comparativ cu Baic și Rho.

Sco, GAL și Fab acționează ca inhibitori ai CYP1A2, fără a fi substraturi pentru enzimele CYP, iar Baic inhibă CYP2C19 și CYP2D6, dar nu este substrat pentru nici o enzimă CYP. GAL este metabolizată semnificativ de CYP2D6 și CYP3A4. Clearance-ul Sco este mare, GAL având clearance renal semnificativ. GAL este un substrat OCT2, în timp ce ceilalți compuși nu sunt.

Testele AMES indică absența potențialului mutagenic pentru toți compușii. Toleranța umană variază, Rho având cea mai mare toleranță, iar Sco și GAL cea mai scăzută. Toxicitatea acută orală variază, Baic și Sco având LD50 cele mai mici, iar GAL cea mai mare. Toxicitatea cronică orală este scăzută pentru Sco și GAL, dar mai mare pentru Rho, Fab și Baic. Prognoza sugerează că Sco și flavonoidele nu prezintă toxicitate pentru piele și ficat, dar GAL poate afecta ficatul.

V.5 Predicția activității biologice in silico ale celor 3 flavonoide

Predicțiile obținute cu ajutorul platformei PharmMapper, au sugerat un număr impresionat de ținte pentru compușii analizați. Astfel, Sco ar putea interacționa cu aproximativ 5184 de liganzi, GAL cu 9651, Rho cu 5281599, Baic cu 5282150 iar Fab ar putea interacționa cu 5281605 de liganzi.

Pentru studiul nostru am selectat ca ținte predictibile pentru Sco, GAL, Rho, Baic și Fab AChE și colinesteraza. În Figura 5.3 este prezentat scorul Z de potrivire a compușilor analizați cu țintele proteice. Într-o ordine descrescătoare cel mai mare scor Z de potrivire cu AChE l-a avut Sco (1.27597), care a fost urmată de Rho (0.610554), Fab (0.497188), Baic (0.368358) și GAL (0.27972). În ceea ce privește scorul de potrivire pentru colinesterază, cea mai mare valoare a avut-o GAL (0.628381), Rho (0.178299) și Baic (0.0301671) iar cele mai mici Fab (-0.501857) și Sco (-0.104149).

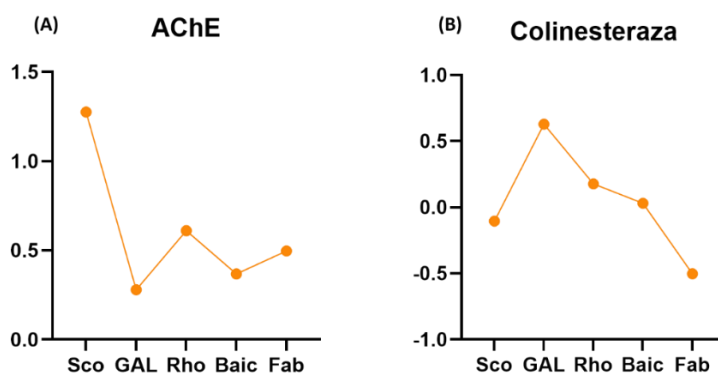


Figura 5.3 Scorul Z de interacțiune al scopolaminei (Sco), Galantaminei (GAL), roifolinei (Rho), baicalein 5,6-dimetil eter (Baic) și a agatisflavonei (Fab) cu (A) Acetilcolinestereaza (AChE) și (B) colinesteraza, evaluat cu ajutorul platformei PharmMapper.

Prin utilizarea scorurilor Pa și Pi, predicția PASS oferă un instrument eficient pentru evaluarea potențialului activ sau inactiv al unui compus în contextul unor acțiuni biologice specifice (157). Rezultatele predicției PASS sun reprezentate în Figura 5.4.

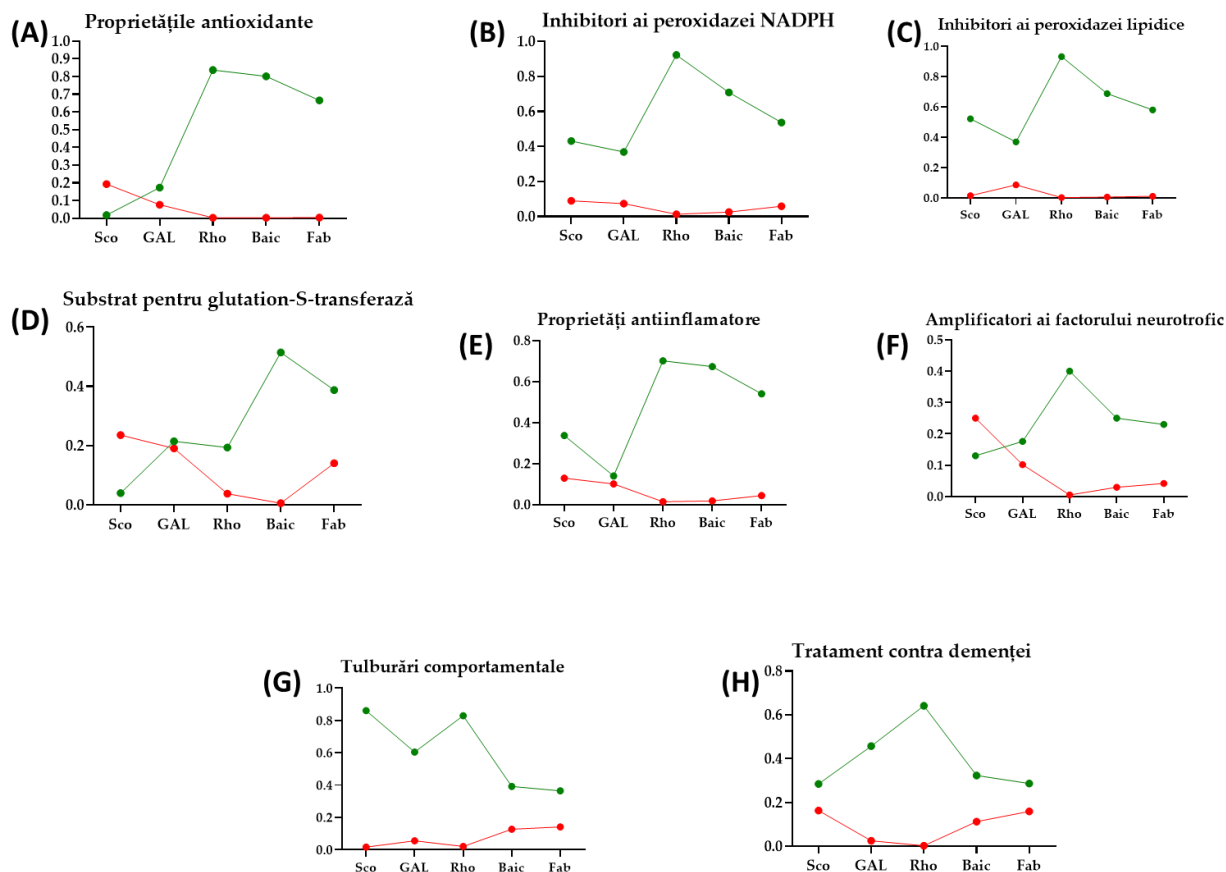


Figura 5.4 Rezultatele prezicerii PASS ale scopolaminei (Sco), Galantaminei (GAL), roifolinei (Rho), baicalein 5,6-dimetil eter (Baic) și a agatisflavonei (Fab) asupra (A) proprietăților antioxidante, (B) a potențialului de a inhiba peroxidaza NADPH (nicotinamid dinucleotid fosfat), (C) de a inhiba peroxidaza lipidică, (D) a posibilității de a constitui un substrat pentru glutatation-S-transferază, (E) asupra proprietăților antiinflamatoare, (F) a potențialului de a amplifica factorul neurotrofic, (G) a potențialului de a induce tulburări comportamentale și (H) a potențialului farmacologic asupra demenței.

Predicția PASS a sugerat că Sco ($Pa = 0.018$; $Pi = 0.193$) și GAL ($Pa = 0.173$; $Pi = 0.076$) nu prezintă proprietăți antioxidante, pe când Rho ($Pa = 0.837$; $Pi = 0.003$), Baic ($Pa = 0.801$; $Pi = 0.003$) și Fab ($Pa = 0.665$; $Pi = 0.004$) pot fi considerați niște agenți antioxidanți eficienți (Figura 5.4 A). Totodată compușii Sco ($Pa = 0.431$; $Pi = 0.009$) și GAL ($Pa = 0.369$; $Pi = 0.074$) nu pot fi considerați inhibitori al NADPH, pe când Rho ($Pa = 0.923$; $Pi = 0.013$), Baic ($Pa = 0.709$; $Pi = 0.025$) și Fab ($Pa = 0.537$; $Pi = 0.059$) pot inhiba într-un mod eficient peroxidaza NADPH (Figura 5.4 B). Cu excepția GAL ($Pa = 0.369$; $Pi = 0.085$) toți ceilalți compuși testați s-au dovedit că pot inhiba peroxidaza lipidică ($Pa = 0.931$; $Pi = 0.002$) pentru

Rho, $P_a = 0.687$; $P_i = 0.005$, pentru Baic, $P_a = 0.580$; $P_i = 0.010$ pentru Fab și $P_a = 0.521$; $P_i = 0.269$ pentru Sco) (Figura 5.4 C). Conform predicțiilor PASS doar Baic ($P_a = 0.515$; $P_i = 0.006$) poate constitui un substrat pentru glutathion-S-transferază, ($P_a = 0.04$; $P_i = 0.236$), pe când ceilalți compuși analizați nu pot constitui un substrat pentru glutathion-S-transferază (Figura 5.4D). De asemenea, Sco ($P_a = 0.338$; $P_i = 0.130$) și GAL ($P_a = 0.140$; $P_i = 0.130$) nu prezintă efecte antiinflamatoare, pe când Rho ($P_a = 0.702$; $P_i = 0.015$), Baic ($P_a = 0.674$; $P_i = 0.019$) și Fab ($P_a = 0.541$; $P_i = 0.045$) pot fi considerați ca candidați pentru studiile ce vizează selectarea compușilor cu potențial antiinflamator (Figura 5.4 E).

În ceea ce privește interacțiunea cu factorul neurotrofic, doar Rho prezintă potențialul de a amplifica ($P_a = 0.400$; $P_i = 0.005$), însă ceilalți compuși par a fi ineficienți (Figura 5.4 F). induce modificări comportamentale ($P_a = 0.861$; $P_i = 0.016$) (Figura 5.4 G). Cu excepția Baic ($P_a = 0.392$; $P_i = 0.127$) și a Fab ($P_a = 0.365$; $P_i = 0.141$) toți ceilalți compuși sunt predispuși de a induce modificări comportamentale ($P_a = 0.861$; $P_i = 0.016$ pentru Sco, $P_a = 0.830$; $P_i = 0.002$, pentru Rho, și $P_a = 0.605$; $P_i = 0.055$ pentru GAL) (Figura 5.4 G). De asemenea, conform prezicerii PASS, doar Rho ar putea manifesta potențialul de a servi drept un medicament anti demență ($P_a = 0.642$; $P_i = 0.003$) (Figura 5.4H).

V.6 Predicția țintelor proteice in silico ale celor trei flavonoide

Activitatea tuturor compușilor analizați a fost supusă unei analize riguroase, luând în considerare patru criterii distincte pentru activitatea unui potențial medicament de succes. Aceste criterii includ activitatea asupra ligandului receptorului cuplat cu proteina G (GPCR), modularea canalelor ionice, inhibarea kinazelor, proteazelor și a altor enzime, precum și activitatea asupra liganzilor receptorilor nucleari. În acest scop, am utilizat software-ul Molinspiration Cheminformatics pentru a calcula activitățile medicamentoase asociate celor 21 de complexe medicamentoase, iar aceste rezultate sunt prezentate sub formă de grafice în Figura 5.5. Pentru interpretarea acestor activități medicamentoase, am adoptat o abordare specifică bazată pe scorurile de bioactivitate. Astfel, o moleculă cu un scor de bioactivitate mai mare de 0,00 sunt susceptibili să manifeste activități biologice semnificative. În cazul moleculelor cu valori între -0,50 și 0,00, se anticipează o activitate moderată, în timp ce scorurile mai mici de -0,50 indică, în general, o probabilitate mai mare de inactivitate (158).

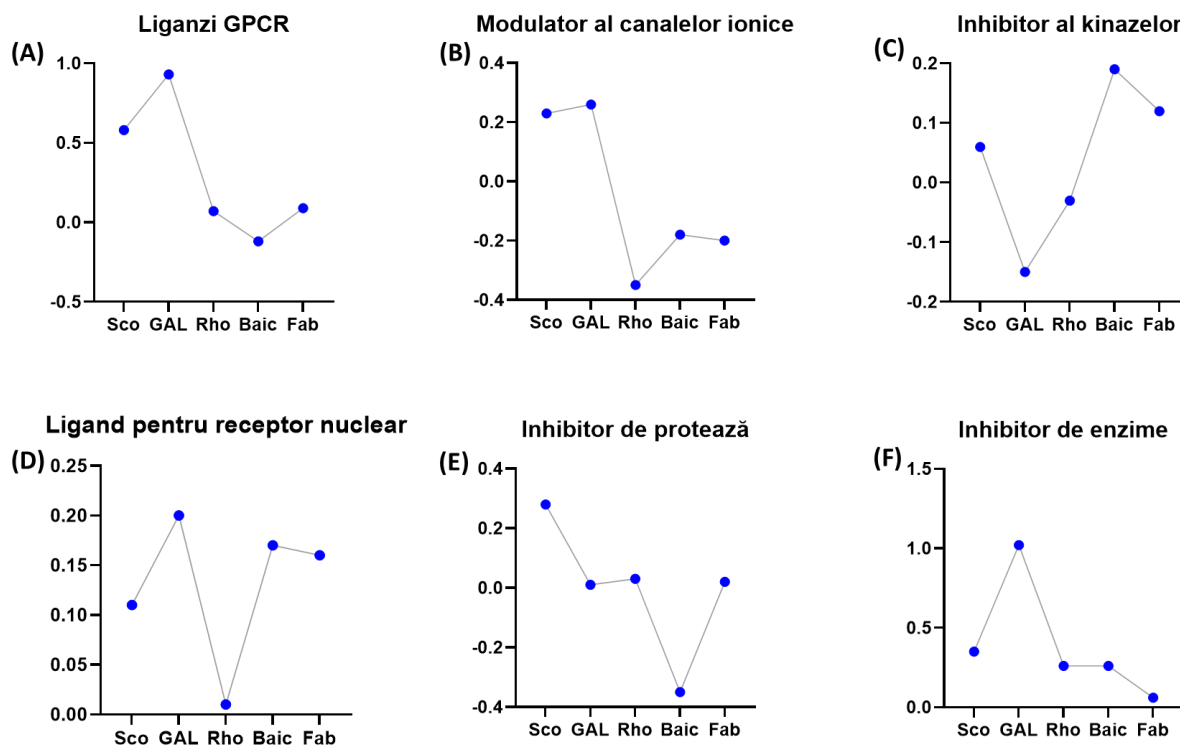


Figura 5.5 Scorul de bioactivitate al scopolaminei (Sco), Galantaminei (GAL), roifolinei (Rho), baicalein 5,6-dimetil eter (Baic) și a agatisflavonei (Fab) calculat cu ajutorul software-ului Molinspiration Cheminformatics asupra (A) Ligandului pentru receptorul cuplat la proteina G (GPCR), (B) Modulării canalelor ionice, (C) inhibării kinazelor, (D) Ligandului pentru receptorul nuclear, (E) Inhibitorilor de protează și (F) Inhibitorilor enzimatici.

Scorul de bioactivitate a compușilor asupra activității ligandului GPCR, calculat cu ajutorul software-ului Molinspiration Cheminformatics indică că Sco (0.58) și GAL (0.93), Rho (0.07) și Fab (0.09) prezintă un scor mai mare de 0,00 și prin urmare sunt susceptibile să manifeste activități biologice semnificative asupra acestui ligand. În contrast, se anticipează ca Baic (-0.12) să prezinte o activitate moderată asupra activității ligandului (Figura 5.5 A). În ceea ce privește modularea canalelor ionice cel mai mare scor l-au obținut Sco (0.23) și GAL (0.26) (Figura 5.5 B). Pe când cele trei flavonoide naturale au prezentat un efect moderat asupra posibilității modulării canalelor ionice (-0.35 pentru Rho, -0.18 pentru Baic și -0.20 pentru Fab) (Figura 5.5 B). GAL prezintă cel mai mic potențial de a inhiba activitatea kinazelor (-0.15) comparativ cu Sco (0.06), Rho (-0.03), Baic (0.19) și Fab (0.12) (Figura 5.5 C). Conform Figura 5.5 D, toți compușii au obținut un scor de bioactivitate mai mare de 0,00 (0.11 pentru Sco, 0.20 pentru GAL, 0.01 pentru Rho, 0.17 pentru Baic și 0.16 pentru Fab) și astfel sunt susceptibili să manifeste activități biologice semnificative asupra ligandului pentru receptorul nuclear (Figura 5.5 D). În ceea ce privește potențialul de a inhiba proteazele, Baic s-a dovedit a fi cea mai puțin eficientă (-0.35), pe când Sco (0.28),

GAL (0.01), Rho (0.03) și Fab (0.02) ar putea inhiba într-un mod semnificativ activitatea proteazelor (Figura 5.5 E). De asemenea, toți compușii analizați ar putea inhiba într-un mod semnificativ activitatea diferitor enzime (0.35 pentru Sco, 1.02 pentru GAL, 0.26 pentru Rho, 0.26 pentru Baic și 0.06 pentru Fab).

Rezultatele obținute evidențiază clar că acțiunile fiziologice ale complexelor de medicamente pot implica mecanisme multiple, fiind posibil să se datoreze interacțiunilor cu liganzii GPCR, liganzii receptorilor nucleari și inhibitorii proteazelor și altor enzime. Scorurile de bioactivitate furnizate sunt semnificativ sugestive pentru o interacțiune moderată cu toate țintele medicamentului, oferind informații cruciale pentru înțelegerea potențialului terapeutic și a mecanismelor de acțiune asociate compușilor analizați.

Pentru a îmbunătăți și a extinde previziunile referitoare la eficiența crescută și probabilitatea țintelor proteice asociate atât cu Sco și GAL cât și cu cele trei flavonoide naturale studiate, am apelat la utilizarea instrumentului online SwissTargetPrediction. Rezultatele indică faptul că Sco prezintă o probabilitate egală de a inhiba proteazele și fosfatazele (20.0 %) sau de a acționa asupra proteinelor cuplate cu receptorii de tip G (GPCR) (20.0 %) (Figura 5.6 A). GAL în schimb, prezintă o probabilitate echitabilă estimată pentru a acționa asupra țintelor GPCR (36.0 %) și într-o măsură mai mică asupra fosfodiesterazelor și a altor enzime (12.0 %) (Figura 5.6 B). Pe de altă parte, Rho și Baic prezintă o probabilitate mai mare de a acționa asupra ligazelor (24.0 %) sau pot interveni și în modularea activității altor enzime (20.0 %) (Figura 5.6 C și D). De asemenea, Rho prezintă o probabilitate semnificativă să acționeze ca țintă GPCR (16.0 %) (Figura 5.6C), în timp ce Baic este mai susceptibilă să acționeze ca modulator al kinazelor (16.0 %) (Figura 5.6 D). În contrast, Fab are o probabilitate estimată mai mare de a acționa ca modulator al Kinazelor (20.0 %) și ca țintă GPCR (16.0 %) (Figura 5.6 E). Aceste rezultate subliniază diversitatea posibilelor acțiuni ale Sco, GAL, Rho, Baic și Fab, sugerând că acestea ar putea interacționa cu multiple ținte proteice, oferind perspective ample pentru explorarea ulterioară a mecanismelor lor de acțiune.

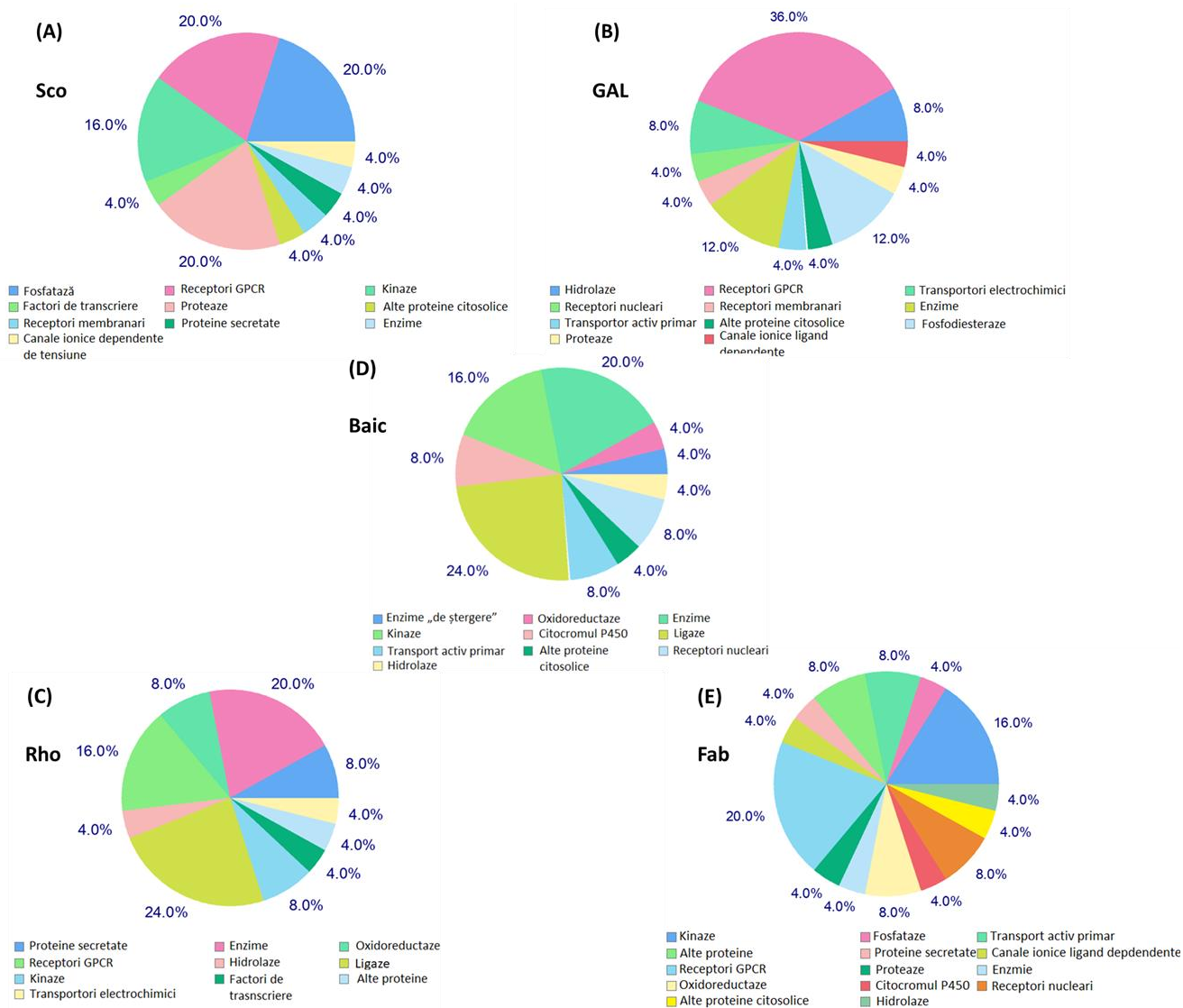


Figura 5.6 Țintele biologice prezise ale (A) scopolaminei (Sco), (B) Galantaminei (GAL), (C) roifolinei (Rho), (D) baicalein 5,6-dimetil eter (Baic) și a (E) agatisflavonei (Fab) folosind instrumentul online SwissTargetPrediction.

V.7 Predicția aprobării pe piața farmaceutică a roifolinei, baicalein 5,6-dimetil eter și a agatisflavonei

În Figura 5.7 sunt evidențiate rezultatele predicției asemănării Sco, GAL, Rho, Baic și a Fab cu medicamentelor pentru diferite etape subdivizoare ale cercetării acestora. Conform instrumentul online miDlikeness toți compușii analizați prezintă probabilitatea de a manifesta efecte în studiile *in vivo* (0.6626 pentru Sco, 0.7241 pentru GAL, 0.8487 pentru Rho, 0.9992 pentru Baic și 0.9872 pentru Fab) (Figura 5.7 A).

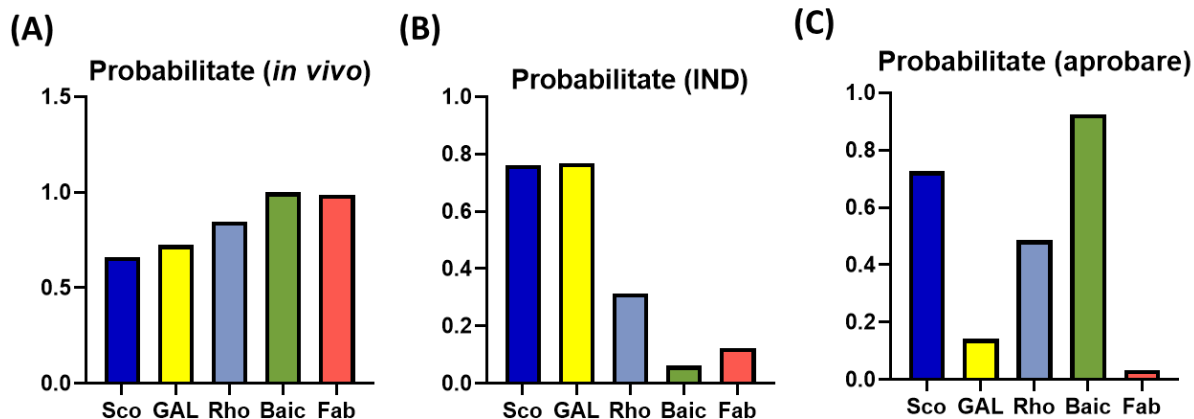


Figura 5.7 Predicția asemănării scopolaminei (Sco), Galantaminei (GAL), roifolinei (Rho), baicalein 5,6-dimetil eter (Baic) și a agatisflavonei (Fab) cu medicamentelor pentru diferite etape subdivizoare ale cercetării acestora. (A) prezicerea efectelor *in vivo*, (B) prezicerea interesului pentru IND (medicament nou de cercetare) și (C) prezicerea potențialului compusului de a fi aprobat pe piața farmaceutică folosind instrumentul online miDlikeness.

În ceea ce privește interesului pentru IND a compușilor analizați, rezultatele obținute prin intermediul miDlikeness sugerează că cel mai pronunțat interes îl vor avea Sco și GAL (0.7625 și 0.7683) (Figura 5.7 B). Pe de altă parte Rho poate prezenta un interes mai moderat (0.3145) (Figura 5.7 B), pe când Baic și Fab au indicat o probabilitate mică pentru IND (0.0609 și 0.1235) (Figura 5.7 B). Într-un mod surprinzător Baic prezintă cea mai mare probabilitate de a fi aprobată pe piața farmaceutică (0.9255), fiind urmată de GAL (0.7265), Rho (0.4872), Sco (0.1417) și în cele de urmă de Fab (0.0341) (Figura 5.7 C).

V.8 Efectele roifolinei, baicaleinei 5,6-dimetil eter și a agatisflavonei asupra stării asemănătoare anxietății și a memoriei

Pentru evaluarea comportamentală, în acest studiu am utilizat mai multe labirinturi, astfel pentru evaluarea anxietății am utilizat testul NTT, pentru evaluarea activității locomotorii și a memoriei spațiale am utilizat labirintul Y, iar pentru evaluarea memoriei de referință am utilizat testul NOR.

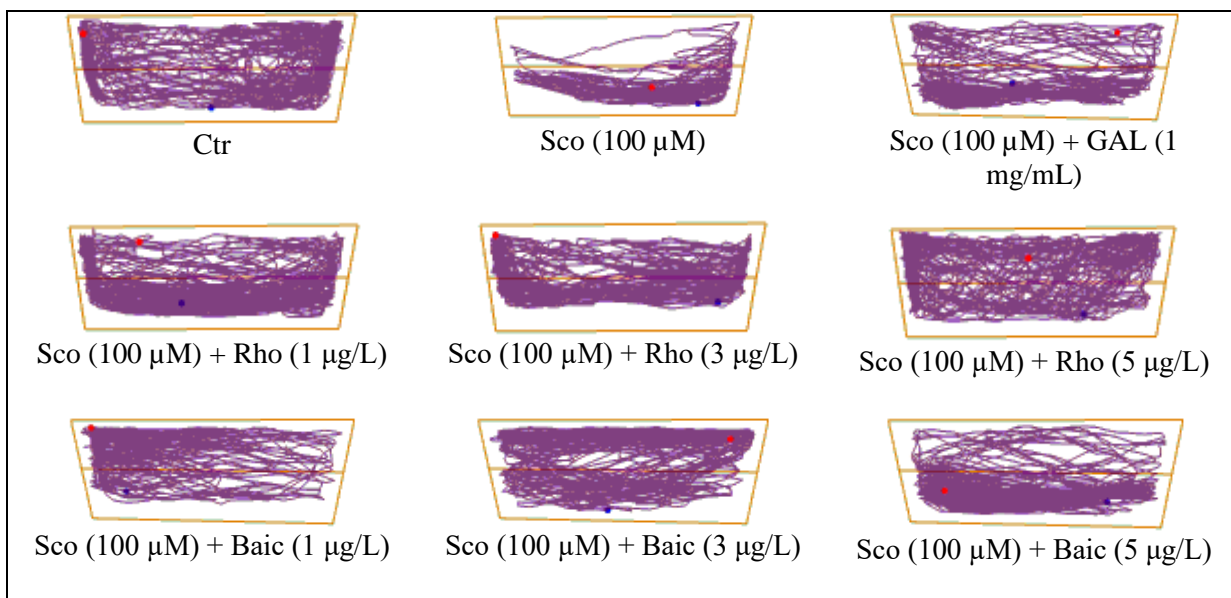
Studiul a evaluat efectele neuro-farmacologice ale flavonoidelor naturale Rho, Baic și Fab asupra performanței neurocognitive, cu scopul de a îmbunătăți memoria și de a aborda simptomele AD. Deși aceste compuși sunt cunoscuți pentru efectele lor benefice la doze mici și fără reacții adverse, nu au fost studiate impactul lor asupra simptomelor AD până acum. Studiul a utilizat peștele zebură (*Danio rerio*) ca model animal pentru demență, indus printr-un blocant al receptorilor colinergici muscarinici (Sco) pentru a evalua potențialul neurocognitiv al acestor flavonoide. Peștele zebură se dovedește a fi un model promițător în cercetarea biomedicală și testarea medicamentelor neuroactive (195). Cele trei flavonoide

naturale ce au fost testate în cadrul acestui studiu, au fost administrate cronic, prin imersie peștilor zebră o dată pe zi, timp de 20 de zile, în concentrații de 1, 3 și 5 $\mu\text{g/L}$. Drept control pozitiv, în acest studiu am utilizat galantamina (GAL, 1mg/ml). GAL, fiind unul dintre medicamentele actuale ce sunt folosite pe larg în tratarea tulburărilor de comportament și neurocognitive a pacienților umani cu AD.

V.8.1 Efectele roifolinei, baicaleinei 5,6-dimetil eter și agatisflavonei asupra comportamentului anxios indus de scopolamină în testul labirintului nou (NTT)

În NTT, modelele reprezentative de urmărire a locomoției scot în evidență multiplele variații de înot a cohortelor de animale testate (Figura 5.8). Astfel, la peștii din lotul de control (Ctr) a existat o tendință de a parcurge o distanță mai mare în zona superioară a acvariului, scoțând în evidență înotul normal al peștilor zebră în testul NTT, pe când grupul de pești tratat cu Sco (100 μM) a prezentat o preferință crescută pentru zona inferioară, indicând un nivel înalt de anxietate a peștilor și profilul anxiogenic al Sco (196,197).

O îmbunătățire a activității locomotorii în zona superioară a acvariului s-a observat la animalele ce au fost supuse tratamentului cronic cu Rho (1, 3 și 5 $\mu\text{g/L}$), Baic (1, 3 și 5 $\mu\text{g/L}$) și Fab (1, 3 și 5 $\mu\text{g/L}$), în special în concentrația de 5 $\mu\text{g/L}$, într-un mod asemănător cu peștii tratați cu GAL. În timpul testării, peștii din toate cele douăsprezece loturi au preferat să exploateze mai întâi zona inferioară a acvariului, cât mai aproape de bază / perete, apoi treptat, în dependență de nivelul de anxietate al fiecărui animal, au început să înoate într-o direcție verticală (196,197).



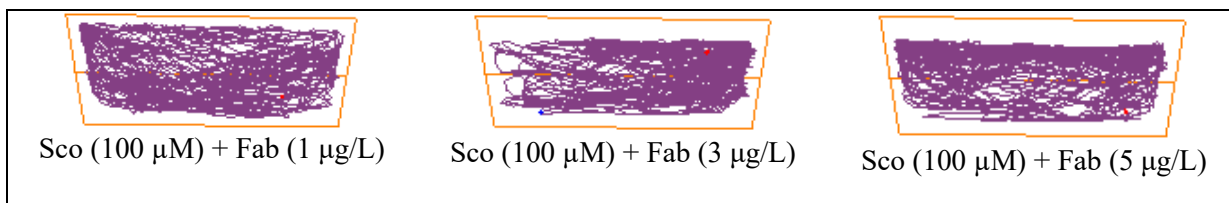


Figura 5.8 Reprezentarea grafică a înotului peștilor zebură în cadrul testului NTT; Testul este alcătuit dintr-un acvariu din sticlă în formă de trapezoid. Acvariul a fost împărțit virtual în două zone egale (superioară și inferioară). Începutul traseului peștilor zebură este reprezentat de punctul de culoare albastră ●, iar sfârșitul traseului peștilor este reprezentat de punctul de culoare roșie ●.

În conformitate cu datele obținute, în experimentele noastre, după cum se poate observa în Figura 5.9, în cadrul testului NTT, administrarea tratamentului cu Sco (100 μM), peștilor zebură, a generat un puternic răspuns anxiogen cuantificat prin creșterea semnificativă a perioadei de latență necesară peștilor de a începe explorarea verticală a acvariului ($p < 0.0001$; Figura 5.9 A, D și G), prin reducerea semnificativă a timpului evaluat în secunde (s) petrecut de pești în zona superioară a acvariului și prin creșterea semnificativă a perioadei de timp petrecută de pești în zona inferioară a acvariului față de grupul de control ($p < 0.0001$; Figura 5.9 B, D și H) și prin micșorarea raportului dintre distanța parcursă prin înot a peștilor zebură în zona superioară / inferioară a acvariului comparativ cu lotul de control ($p < 0.0001$; Figura 5.9 C, F și I) (196,197). Administrarea ulterioară a tratamentului cu Rho a avut un efect benefic asupra perioadei de latență necesară explorării zonei superioare, scăzând într-un mod semnificativ în toate cele trei concentrații testate (1, 3 și 5 μg/L), timpul necesar pentru începerea explorării zonei superioare, comparativ cu lotul tratat doar cu Sco ($p < 0.0001$), într-un mod asemănător cu peștii ce au fost supuși tratamentului cu GAL (1 mg/mL) (Figura 5.9 A). De asemenea, tratamentul cu Rho, a crescut într-o manieră doză-dependentă raportul dintre timpul petrecut de pești în zona superioară/inferioară a acvariului, în special în concentrația de 3 μg/L ($p < 0.001$) și 5 μg/L ($p < 0.0001$), însă nu a manifestat nici un efect din punct de vedere statistic în concentrația de 1 μg/L (Figura 5.9). Mai mult, tratamentul cu Rho, a reușit să restabilească raportul dintre distanța parcursă de pești în zona superioară/inferioară a acvariului, ce a fost diminuată în urma administrării tratamentului cu Sco (100 μM), manifestând o semnificație statistică pentru concentrațiile de 3 și 5 μg/L ($p < 0.0001$) (Figura 5.9 C) (196,197). În ceea ce privește tratamentul cu Baic, s-a observat că această flavonoidă a prezentat un efect anxiogen puternic în cadrul testului NTT, reușind să restabilească în toate cele trei concentrații testate (1, 3 și 5 μg/L) ($p < 0.0001$), perioada de latență, necesară explorării zonei superioare a acvariului (Figura 5.9 D). De asemenea, tratamentul cu Baic în concentrațiile de 3 și 5 μg/L a reușit să restabilească timpul de

explorare ($p < 0,01$ pentru Baic în concentrația de $3 \mu\text{g/L}$ și $p < 0,001$ pentru tratamentul cu Baic în concentrația de $5 \mu\text{g/L}$; Figura 5.9 E) și distanța parcursă ($p < 0,05$ pentru Baic în concentrația de $3 \mu\text{g/L}$ și $p < 0,0001$ pentru tratamentul cu Baic în concentrația de $5 \mu\text{g/L}$; Figura 5.9 F) în zona superioară a acvariului de testare (196,197).

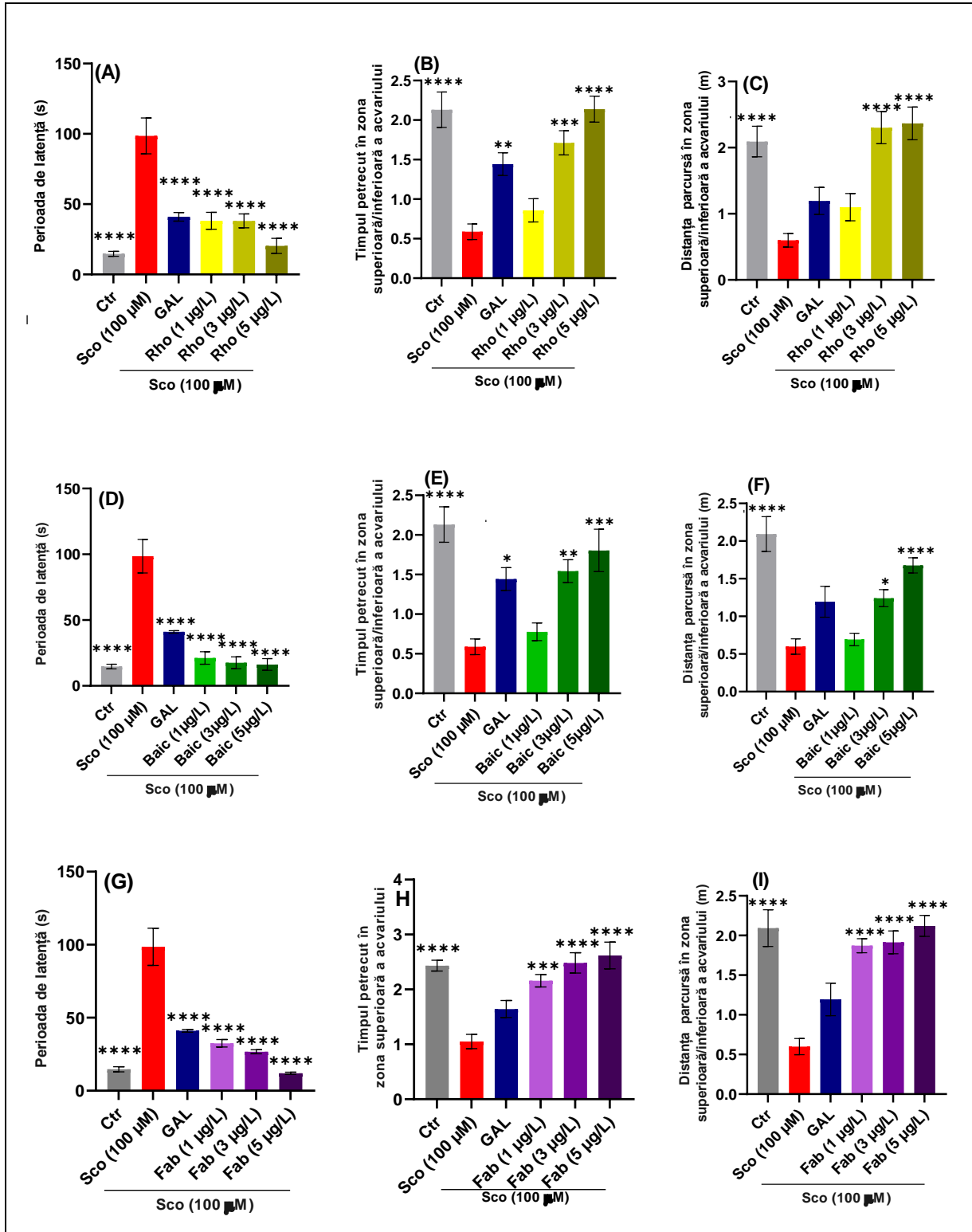


Figura 5.9 Efectele administrării tratamentului cu Rho (1, 3 și $5 \mu\text{g/L}$) (A, B, C), Baic (1, 3 și $5 \mu\text{g/L}$) (D, E, F) și Fab (1, 3 și $5 \mu\text{g/L}$) (G, H, I) asupra perioadei de latență necesară peștilor de a începe să exploreze zona

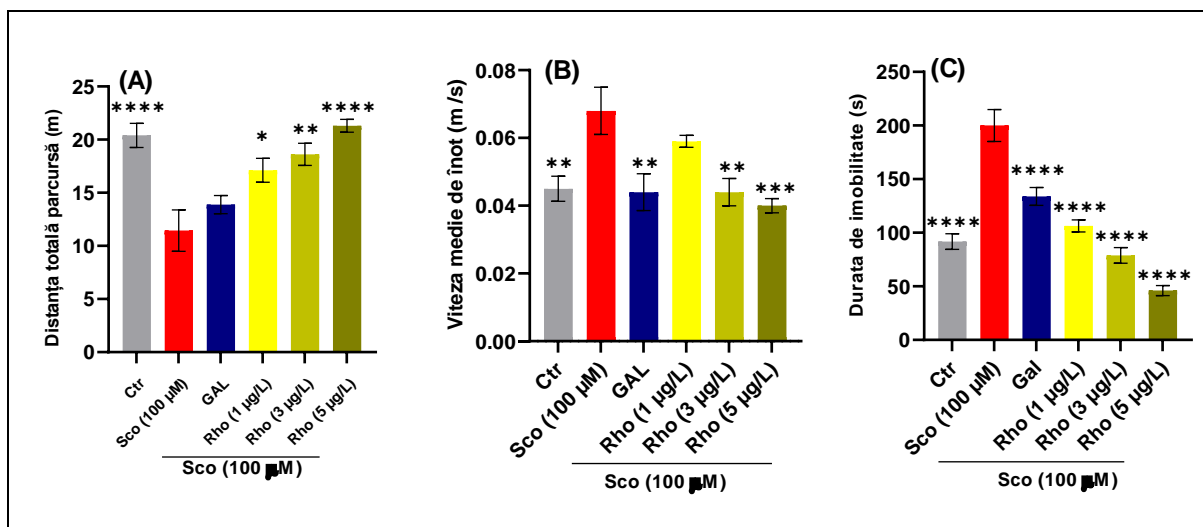
superioară a acvariului (A, D, G), a timpului petrecut de pești în zona superioară a acvariului (B, E, H) și asupra raportului dintre distanța parcursă de pești în zona superioară și cea inferioară a acvariului (C, F, I). Valorile sunt exprimate ca medii \pm S.E.M., (n = 10 animale pe grup). ANOVA a relevat un efect semnificativ al tratamentului asupra perioadei de latență (A) (F (5, 54) = 20.24, $p < 0.0001$); (D) (F (5, 54) = 28.19, $p < 0.0001$); (G) (F (5, 54) = 34.83, $p < 0.0001$); timpului petrecut în zona superioară a acvariului (B) (F (5, 54) = 16.47, $p < 0.0001$); (E) (F (5, 54) = 11.42, $p < 0.0001$); (H) (F (5, 54) = 34.32, $p < 0.0001$); și asupra raportului dintre distanța parcursă în zona superioară și cea inferioară a acvariului (C) (F (5, 54) = 12.21, $p < 0.0001$); (F) (F (5, 54) = 14.37, $p < 0.0001$) (I) (F (5, 54) = 14.57, $p < 0.0001$); Pentru analizele post-hoc ale lui Tukey: * $p < 0,01$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$ și **** $p < 0,00001$.

Un efect anxiolitic robust, în cadrul testului NTT a fost manifestat și de către tratamentul cu Fab, care a redus într-un mod semnificativ, timpul necesar pentru începerea explorării zonei superioare în toate cele trei concentrații testate (1, 3 și 5 $\mu\text{g/L}$), ($p < 0.0001$; Figura 5.9 G). Deopotrivă, tratamentul cu Fab a restabilit într-un mod semnificativ raportul dintre timpul petrecut în zona superioară/inferioară a acvariului, unde a prezentat o semnificație mai modestă pentru concentrația de 1 $\mu\text{g/L}$ ($p < 0.001$), însă a prezentat o semnificație robustă din punct de vedere statistic pentru concentrațiile de 3 și 5 $\mu\text{g/L}$ ($p < 0.0001$; Figura 5.9 H). Mai mult, tratamentul cu Fab s-a dovedit a fi capabil să restabilească în toate cele trei concentrații testate ($p < 0.0001$) raportul dintre distanța parcursă în zona superioară/inferioară de către peștii zebură ce au fost expuși în prealabil tratamentului acut cu Sco (100 μM) (Figura 5.9 I) (196,197).

În acest studiu, administrarea tratamentului cu Sco (100 μM) peștilor zebură a produs un efect hipolocomotor, reducând semnificativ distanța totală parcursă ($p < 0.0001$; Figura 5.10 A, D, G), sugernându-se efectul său anxiogen asupra animalelor testate. Simultan, expunerea peștilor la tratamentul cu Sco, a crescut într-un mod semnificativ viteza medie de înot ($p < 0.01$; Figura 5.10 B, D, H) și durata de imobilitate a peștilor în timpul celor 6 minute de testare ($p < 0.0001$; Figura 5.10 C, F, I), sugerându-se degradarea activității locomotorii a animalelor testate în urma administrării Sco în concentrația de 100 μM (196,197)..

În cadrul testului NTT, administrarea cronică a tratamentului cu Rho (1, 3 și 5 $\mu\text{g/L}$) peștilor amnezici a restabilit într-o manieră semnificativă distanța totală parcursă de pești în acvariul de testare, în special în concentrația de 5 $\mu\text{g/L}$ ($p < 0.0001$), însă a prezentat o semnificație statistică mai modestă în concentrațiile de 1 ($p < 0.05$) și 3 $\mu\text{g/L}$ ($p < 0.01$; Figura 5.10 A). În ceea ce privește efectele tratamentului cu Rho, asupra vitezei medii de înot, s-a observat un patern diferențiat de eficiență. Astfel, s-a observat că tratamentul cu Rho în concentrația de 1 $\mu\text{g/L}$, nu a prezentat nici un efect din punct de vedere statistic asupra vitezei medii de înot, pe când tratamentul cu Rho în concentrațiile de 3 și 5 $\mu\text{g/L}$, a reușit să restabilească într-un mod semnificativ viteza medie de înot a peștilor zebură ($p < 0.01$, $p <$

0.001), într-o manieră asemănătoare cu cea a tratamentului cu GAL ($p < 0.01$; Figura 5.10 B). De asemenea, tratamentul cu Rho, a scăzut într-un mod semnificativ durata de imobilitate a animalelor amnezice, în toate cele trei concentrații testate (1, 3 și 5 $\mu\text{g/L}$, $p < 0.0001$), într-o manieră asemănătoare cu cea a tratamentului cu GAL ($p < 0.0001$; Figura 5.10 C), sugerându-se efectele benefice ale tratamentului cu Rho asupra comportamentului spontan necondiționat al peștilor zebra, prin restabilirea deficitului locomotor indus de tratamentul cu Sco (196,197). Tratamentul cu Baic în concentrația de 3 $\mu\text{g/L}$, a prezentat un efect doză-dependent, reușind să crească într-un mod semnificativ distanța totală parcursă de pești în NTT ($p < 0.1$). Un efect similar asupra distanței totale l-a prezentat și tratamentul cu Baic în concentrația de 5 $\mu\text{g/L}$ ($p < 0.001$; Figura 5.10 D), pe când, tratamentul cu Baic în concentrația de 1 $\mu\text{g/L}$, s-a dovedit a fi neeficient (Figura 5.10 D). Cu toate acestea, tratamentul cu Baic, a fost capabil să restabilească viteza medie de înot a peștilor, în toate cele trei concentrații testate ($p < 0.0001$), într-o manieră asemănătoare cu cea a tratamentului cu GAL ($p < 0.01$; Figura 5.10 E). De asemenea, administrarea tratamentului cu Baic, a avut drept efect scăderea semnificativă a duratei medii de imobilitate a peștilor amnezici, în toate cele trei concentrații testate ($p < 0.0001$; Figura 5.10F) (196,197).



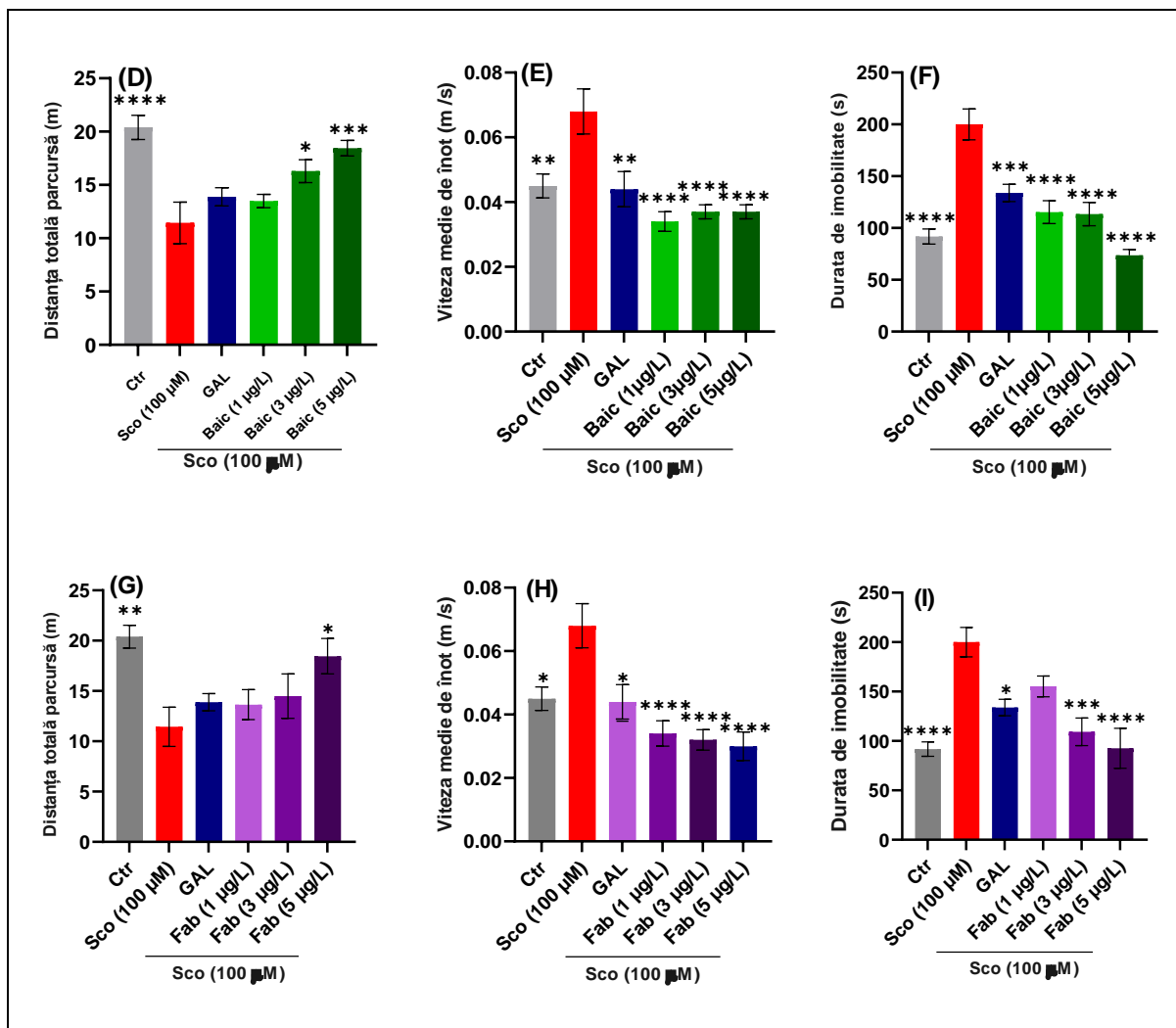


Figura 5.10 Efectele administrării tratamentului cu Rho (1, 3 și 5 µg/L) (A, B, C), Baic (1, 3 și 5 µg/L) (D, E, F) și Fab (1, 3 și 5 µg/L) (G, H, I) asupra distanței totale parcurse (A, D, G), a vitezei medii de înot (B, E, H) și a duratei totale de imobilitate a peștilor zebură în NTT (C, F, I). Valorile sunt exprimate ca medii ± S.E.M., (n = 10 animale pe grup). ANOVA, a relevat un efect semnificativ al tratamentului asupra distanței totale parcurse (A) (F (5, 54) = 10.30, p < 0.0001); (D) (F (5, 54) = 8.559); (G) (F (5, 54) = 4.219, p=0.0026); a vitezei medii de înot (B) (F (5, 54) = 6.264, p < 0.0001); (E) (F (5, 54) = 8.444, p < 0.0001); (H) (F (5, 54) = 8.647, p < 0.0001); și a duratei totale de imobilitate (C) (F (5, 54) = 37.52, p < 0.0001); (F) (F (5, 54) = 19.73, p < 0.0001); (I) (F (5, 54) = 10.03, p < 0.0001); Pentru analizele post-hoc ale lui Tukey: *p < 0,01, ** p < 0,001, *** p < 0,0001 și **** p < 0,00001.

În ceea ce privește tratamentul cu Fab s-a observat un efect semnificativ al tratamentului asupra distanței totale parcurse doar în concentrația de 5 µg/L (p < 0.1), iar tratamentul cu Fab în concentrațiile de 1 și 3 µg/L s-a dovedit a fi neeficient în restabilirea distanței totale parcurse de peștii zebură în testul NTT (Figura 5.10 G). În ceea ce privește efectele tratamentului cu Fab asupra vitezei medii de înot s-a observat că tratamentul cu Fab a reușit să restabilească viteza medie de înot a peștilor în toate cele trei concentrații testate (p < 0.0001), într-o manieră asemănătoare cu cea a tratamentului cu GAL (p < 0.01) (Figura 5.10 H). Simultan, tratamentul cu Fab a scăzut durata de imobilitate a peștilor zebură în timpul perioadei de testare în testul NTT, unde a manifestat un efect semnificativ de concentrația

de 3 $\mu\text{g/L}$ ($p < 0.001$) și în concentrația de 5 $\mu\text{g/L}$ ($p < 0.0001$), la un nivel apropiat de cel al tratamentului cu GAL ($p < 0.1$), pe când tratamentul cu Fab în concentrația de 1 $\mu\text{g/L}$ s-a dovedit a fi neeficient din punct de vedere statistic (Figura 5.10 I) (196,197).

Astfel, expunerea peștilor zebură la tratamentul cu Sco (100 μM) timp de 30 de minute a produs un efect hipolocomotor, reducând într-un mod semnificativ distanța totală parcursă în cadrul testului NTT ($p < 0.0001$), sugerându-se degradarea sistemului dopaminoergic al peștilor zebură. În plus, în cadrul testului NTT, administrarea tratamentului cu Sco (100 μM), peștilor zebură a generat un puternic răspuns anxiogen, exemplificat prin creștere semnificativă a perioadei de latență necesară peștilor pentru a începe explorarea verticală a acvariului ($p < 0.0001$) prin reducerea semnificativă a timpului de explorare a zonei superioare a acvariului, evaluat în secunde (s) și prin creșterea tigmotaxiei față de grupul de control ($p < 0.0001$) (196,197).

Expunerea ulterioară a animalelor de laborator la tratamentele cu cele trei flavonoide naturale a avut drept efect scăderea timpului necesar pentru începerea explorării zonei superioare, comparativ cu lotul tratat doar cu Sco ($p < 0.0001$), a restabilit distanța totală parcursă de pești în cele 6 minute de testare și a scăzut într-un mod semnificativ durata de imobilitate a animalelor amnezice, într-o manieră doză-dependentă, exercitând cel mai pronunțat efect în concentrația de 5 $\mu\text{g/L}$ ($p < 0.0001$) într-o manieră asemănătoare cu cea a tratamentului cu GAL ($p < 0.001$) (196,197).

V.8.2 Efectele roifolinei, baicaleinei 5,6-dimetil eter și agatisflavonei asupra memoriei spațiale a peștilor zebură evaluată în testul labirintului Y

În Figura 5.11, sunt ilustrate modelele reprezentative de urmărire a locomoției peștilor zebură și preferința lor pentru unul dintre cele trei brațe din cadrul labirintului Y. S-a observat că în timpul celei de a doua sesiunii complete de 5 min la peștii din lotul de control a existat o tendință de a parcurge o distanță aproximativ egală în brațul de start (A) și brațul nou (C), în detrimentul celuilalt braț (B).

Grupurile tratate cu Sco (100 μM) au prezentat o scădere a activității locomotorii și o preferință crescută pentru brațul de start (A) și brațul (B), explorând într-o măsură mai mică brațul nou (C), sugerându-se degradarea memoriei peștilor în urma administrării tratamentului cu Sco.

Degradarea locomoției peștilor zebură declanșată în urma administrării Sco în brațul nou, a fost ulterior îmbunătățită prin administrarea tratamentului cu Rho, Baic și Fab, într-o manieră asemănătoare cu cea a tratamentului cu GAL (196,197).

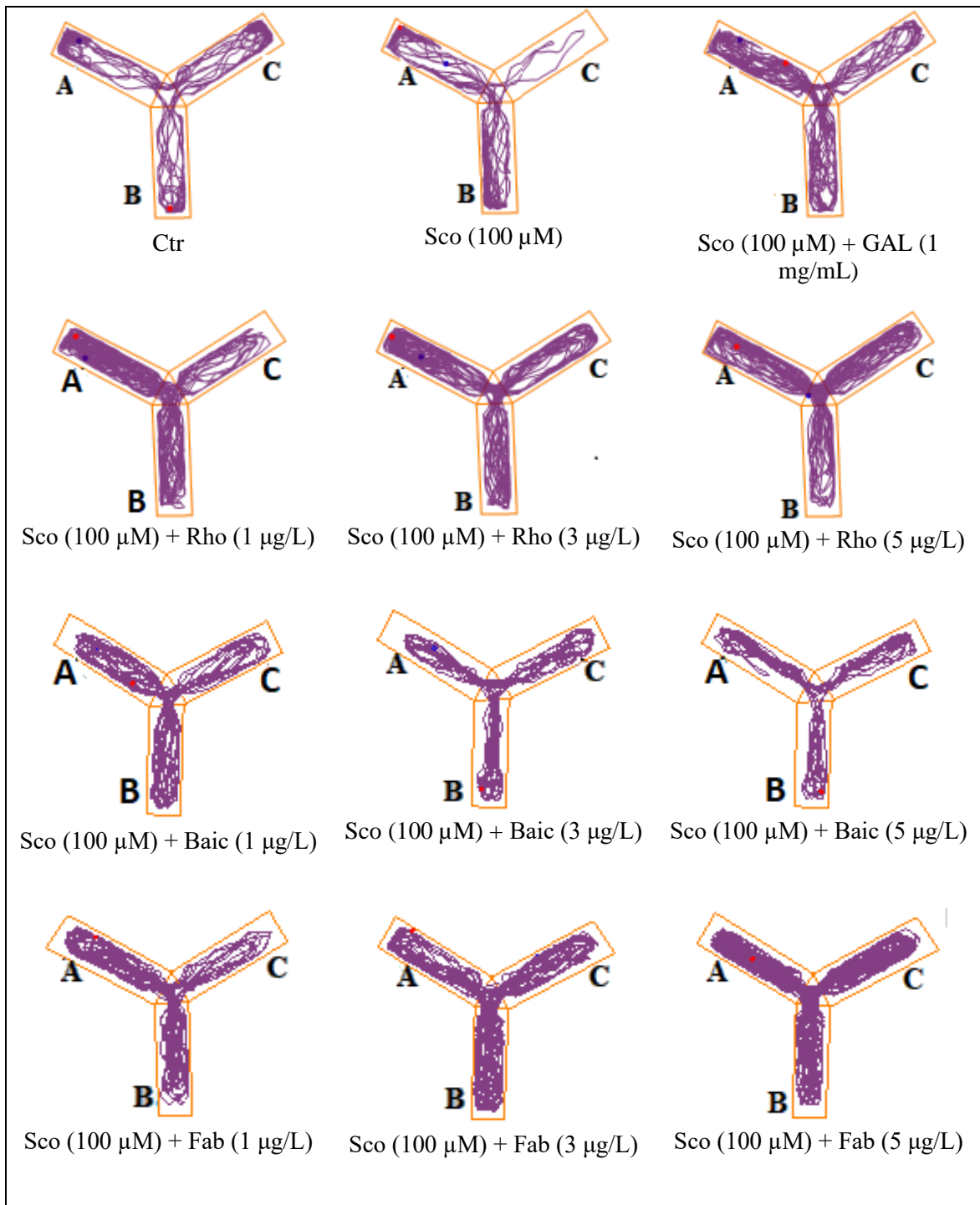


Figura 5.11 Reprezentarea grafică a traseului urmat de peștii zebră în cadrul celei de a doua sesiuni a labirintului Y. Începutul traseului peștilor zebră este reprezentat de punctul de culoare albastră ●, iar sfârșitul traseului peștilor este reprezentat de punctul de culoare roșie ●.

Pe baza ipotezei că dizabilitatea motorie interacționează cu funcția cognitivă, studiul a investigat asocierea dintre activitatea locomotorie a peștilor zebră și efectul celor trei flavonoide naturale asupra proceselor cognitive la modelul animal de demență indus prin administrarea de Sco (100 μ M).

După cum se poate observa în Figura 5.12, în testul labirintului Y, administrarea tratamentului cu Sco în concentrație de 100 μM , a avut un efect hipolocomotor, evaluat prin reducerea semnificativă a numărului de linii traversate ($p < 0.001$; Figura 5.12 A), ($p < 0.01$; Figura 5.12 D), ($p < 0.05$; Figura 5.12 G), prin scăderea evidentă a distanței totale parcurse ($p < 0.05$; Figura 5.12 B), ($p < 0.01$; Figura 5.12 E), ($p < 0.05$; Figura 5.12 H) și prin reducerea unghiului de rotire ($^{\circ}$) efectuat de pești în timpul sesiunii de testare comparativ cu lotul de Control ($p < 0.0001$; Figura 5.12C), ($p < 0.0001$; Figura 5.12F) și ($p < 0.0001$; Figura 5.12 I). Administrarea ulterioară a tratamentului cu Rho a avut ca efect prevenirea deficitului locomotor indus de Sco, manifestând un efect semnificativ doză-dependent în toate cele trei concentrații testate, astfel, pentru concentrația de 1 $\mu\text{g/L}$, ANOVA a relevat un efect semnificativ a tratamentului asupra numărului de intrări în brațe ($p < 0.01$; Figura 5.12 A), a distanței totale parcurse prin înot ($p < 0,01$; Figura 5.12 B) și a unghiului de rotire ($^{\circ}$) ($p < 0,0001$; Figura 5.12 C), pentru concentrațiile de 3 și $\mu\text{g/L}$, ANOVA a relevat un efect semnificativ al tratamentului asupra numărului de intrări în brațe ($p < 0,001$; Figura 5.12 A), a distanței totale parcurse prin înot ($p < 0,0001$; Figura 5.12 B) și a unghiului de rotire ($^{\circ}$) ($p < 0,0001$; Figura 5.12 C), comparativ cu grupul de pești la care s-a administrat doar tratamentul cu Sco (100 μM) (196,197). În ceea ce privește efectul Baic asupra activității locomotorii a peștilor zebra în cadrul testului labirintului Y, s-a observat că administrarea Baic în concentrațiile de 1, 3 și 5 $\mu\text{g/L}$, a reușit să crească într-un mod semnificativ atât numărul total de linii traversate (Figura 5.12 D) cât și distanța totală parcursă de pești în timpul sesiunii de testare (Figura 5.12 E), manifestând cel mai pronunțat efect în concentrația de 5 $\mu\text{g/L}$ ($p < 0,0001$) (196,197). Însă în ceea ce privește efectele tratamentului cu Baic, asupra unghiului de rotire ($^{\circ}$) se observă un patern diferențiat de acțiune, în manieră doză-dependentă, manifestând cel mai pronunțat efect în concentrația de 5 $\mu\text{g/L}$ ($p < 0,0001$; Figura 5.12 F). Cu toate acestea, ANOVA a relevat un efect semnificativ al tratamentului cu Baic asupra unghiului de rotire ($^{\circ}$) și în concentrația de 3 $\mu\text{g/L}$ ($p < 0,001$) și în cea de 1 $\mu\text{g/L}$ ($p < 0.01$; Figura 5.12 F).

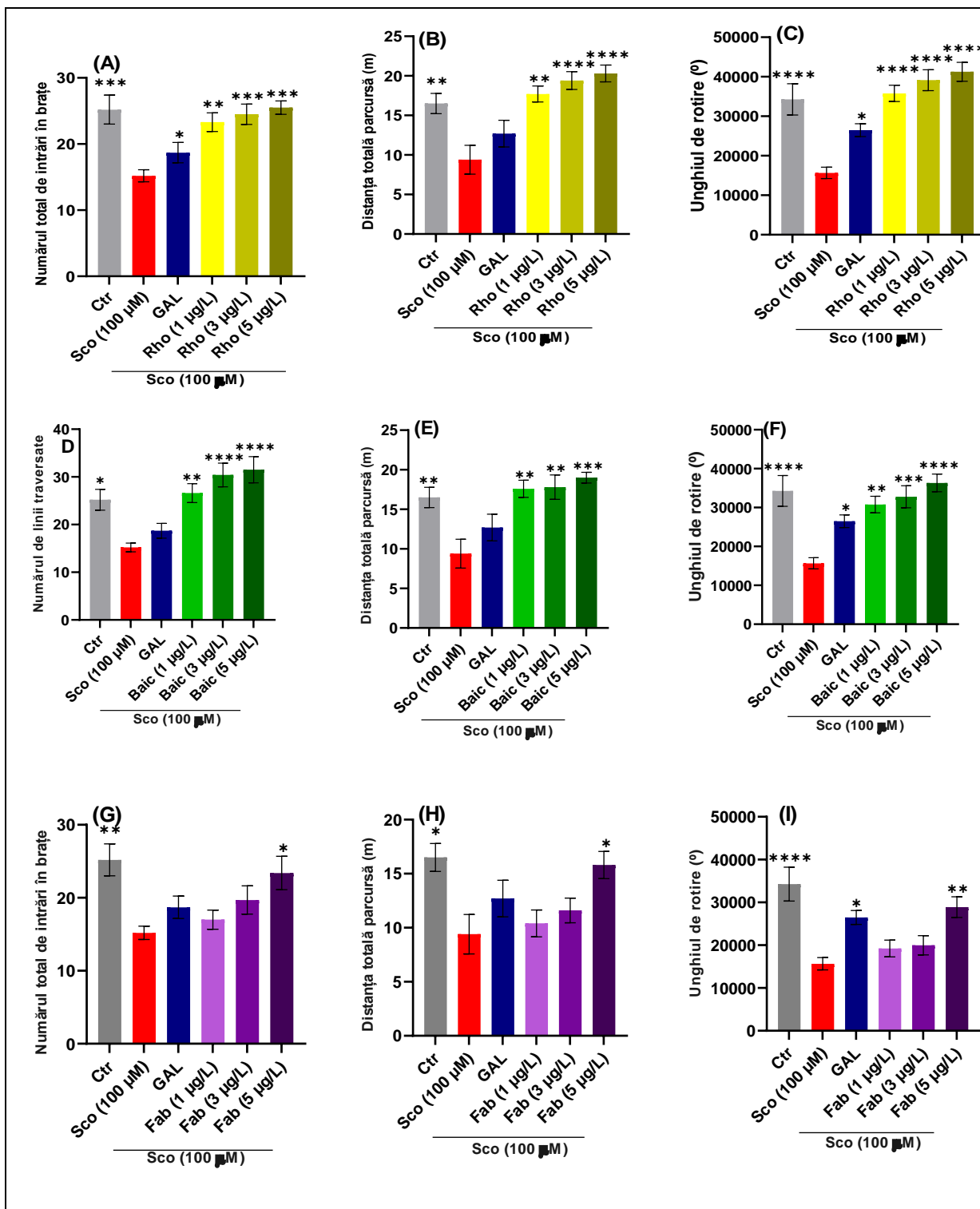


Figura 5.12 Efectele administrării tratamentului cu Rho (1, 3 și 5 µg/L) (A, B, C), Baic (1, 3 și 5 µg/L) (D, E, F) și Fab (1, 3 și 5 µg/L) (G, H, I) asupra numărului de intrări în brațe (A, D, G), a distanței totale parcursă (B, E, H) și asupra unghiului de rotire (C, F, I). Valorile sunt exprimate ca medii ± S.E.M., (n = 10 animale pe grup). ANOVA a relevat un efect semnificativ al tratamentului asupra numărului de intrări în brațe (A) ($F(5, 54) = 7.862, p < 0,0001$); (D) ($F(5, 54) = 9.786, p < 0,0001$); (G) ($F(5, 54) = 4.644, p = 0,0013$); asupra distanței totale parcursă (B) ($F(5, 54) = 9,357, p < 0,0001$); (E) ($F(5, 54) = 6,895, p < 0,0001$); (H) ($F(5, 54) = 4,048, p = 0,0034$); și asupra unghiului de rotire (C) ($F(5, 54) = 14.56, p < 0,0001$); (F) ($F(5, 54) = 8.909, p < 0,0001$); (I) ($F(5, 54) = 8,355, p < 0,0001$); Pentru analizele post-hoc ale lui Tukey: * $p < 0,01$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$ și **** $p < 0,00001$.

Tratamentul cu Fab, s-a dovedit a fi mai puțin eficient în restabilirea activității locomotorii a peștilor zebură amnezici, comparativ cu efectele celor două flavonoide menționate anterior. Astfel, s-a observat un efect semnificativ din punct de vedere statistic al tratamentului cu Fab asupra numărului total de linii traversate, asupra distanței totale parcurse și asupra unghiului de rotire ($^{\circ}$) doar în concentrația de 5 $\mu\text{g/L}$, ($p < 0,05$; Figura 5.12G; Figura 5.12H și $p < 0,01$; Figura 5.12 I), într-o manieră asemănătoare cu cea a tratamentului cu GAL ($p < 0,1$; (Figura 5.12 I).

În acest studiu, administrarea tratamentului cu Sco (100 μM) peștilor zebură a avut drept efect alterarea capacităților de învățare și memorare a animalelor de laborator în testul labirintului Y, evaluate prin intermediul procentului de alternare spontană (%) ($p < 0,05$; Figura 5.13A), ($p < 0,01$; Figura 5.13B) și ($p < 0,01$; Figura 5.13C). Tratamentului cu Rho (1, 3 și 5 $\mu\text{g/L}$) a restabilit în toate cele trei concentrații testate procentul de alternare spontană (%), prezentând cel mai semnificativ efect în concentrația de 5 $\mu\text{g/L}$ ($p < 0,001$), urmată în continuare de concentrația de 3 și 1 $\mu\text{g/L}$ ($p < 0,01$; Figura 5.13A). Prin urmare, Rho ar putea ameliora disfuncția cognitivă indusă de Sco, prin îmbunătățirea proceselor de învățare și memorare.

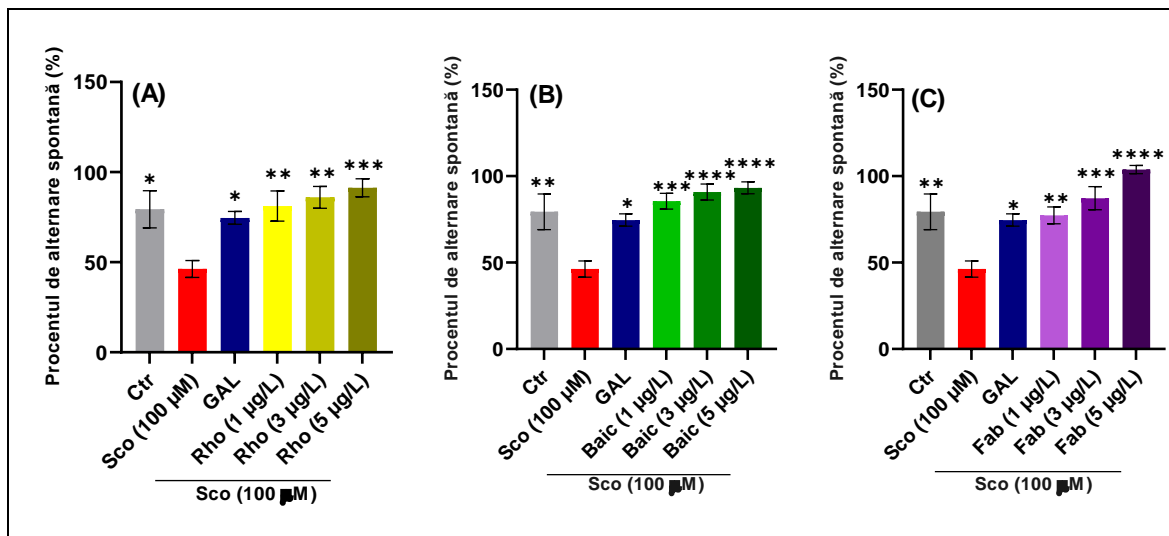
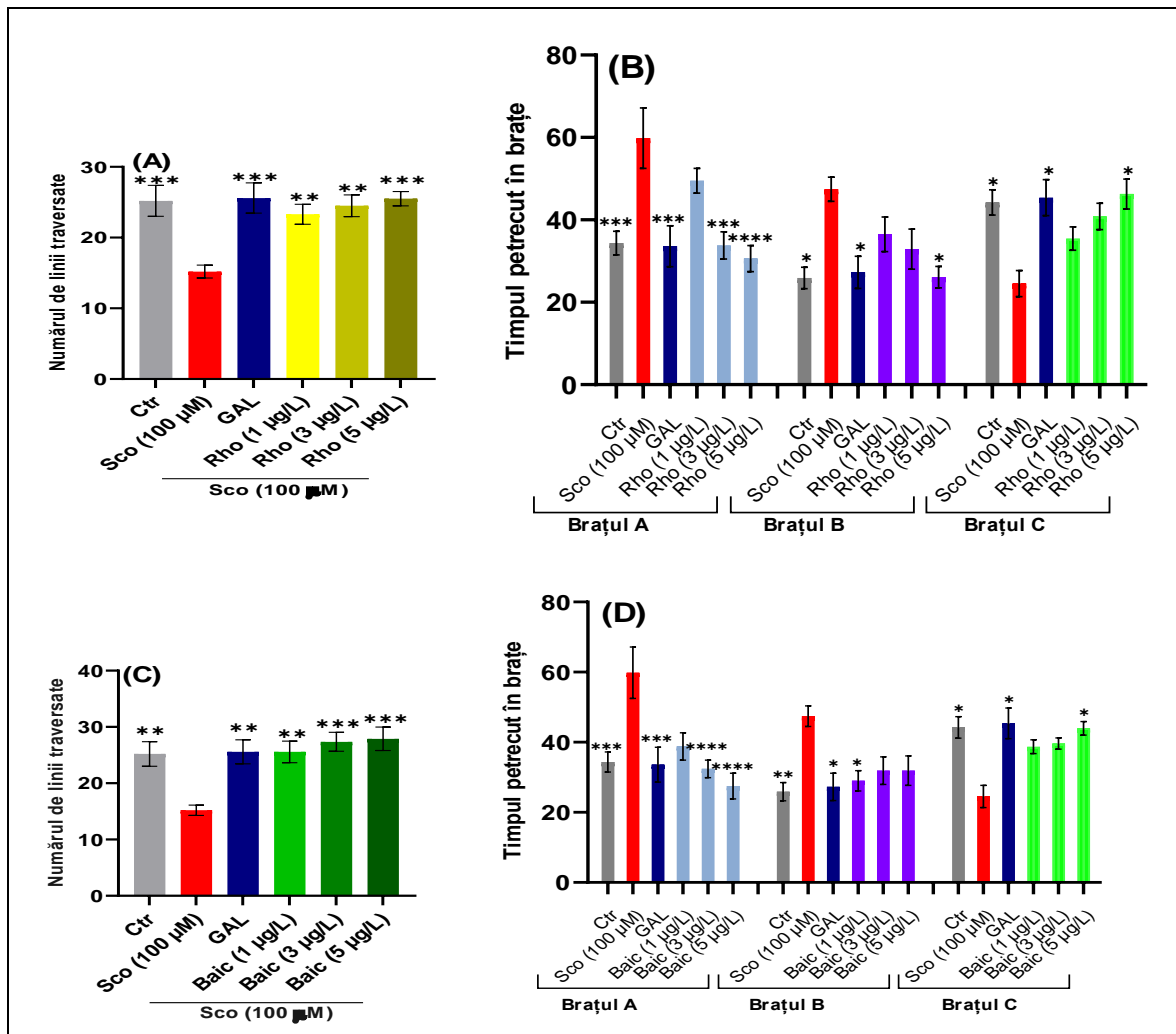


Figura 5.13 Efectele administrării tratamentului cu Rho (1, 3 și 5 $\mu\text{g/L}$) (A), Baic (1, 3 și 5 $\mu\text{g/L}$) (B) și Fab (1, 3 și 5 $\mu\text{g/L}$) (C) asupra procentului de alternare spontană (%) (A, B, C). Valorile sunt exprimate ca medii \pm S.E.M., ($n=10$ animale pe grup). ANOVA a relevat un efect semnificativ al tratamentului asupra procentului de alternare spontană (%) (A) ($F(5, 54) = 5.507, p=0,0004$); (B) ($F(5, 54) = 9,054, p < 0,0001$); (C) ($F(5, 54) = 9,857, p < 0,0001$); Pentru analizele post-hoc ale lui Tukey: * $p < 0,01$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$ și **** $p < 0,00001$.

Simultan, tratamentul cu Baic, s-a dovedit a marca un potențial de acțiune mai remarcabil în concentrațiile de 3 și 5 $\mu\text{g/L}$, în care a determinat o creștere semnificativă a

procentului de alternare spontană (%), comparativ cu grupul de animale la care s-a administrat doar Sco ($p < 0,0001$; Figura 5.13 B), pe când tratamentul cu Baic în concentrația de $1 \mu\text{g/L}$ a determinat o creștere semnificativ mai moderată a procentului de alternare spontană (%) ($p < 0,001$; Figura 5.13 B) (196,197). De asemenea, tratamentul cu Fab, în concentrația de $1 \mu\text{g/L}$, s-a dovedit a fi cel mai puțin eficient în restabilirea capacității de învățare și memorare a peștilor zebură, reușind să crească doar într-o măsură mică procentul de alternare spontană (%) ($p < 0,01$; Figura 5.13 C). O creștere mai însemnată a procentului de alternare spontană (%), s-a observat în concentrația de $3 \mu\text{g/L}$ ($p < 0,001$) și în concentrația de $5 \mu\text{g/L}$ ($p < 0,0001$; Figura 5.13 C). Astfel, tratamentul cu Fab, este capabil să îmbunătățească capacitatea de învățare și memorare a peștilor zebură amnezici.

În plus, peștii zebură tratați cu Sco ($100 \mu\text{M}$), au prezentat un număr mai redus de linii traversate ($p < 0,001$; Figura 5.14A), ($p < 0,01$; Figura 5.14C și E.) și o diminuare a timpului petrecut în brațul nou a labirintului ($p < 0,001$; Figura 5.14B. D și F), comparativ cu lotul de control, ceea ce indică afectarea memoriei la animalele cu Sco.



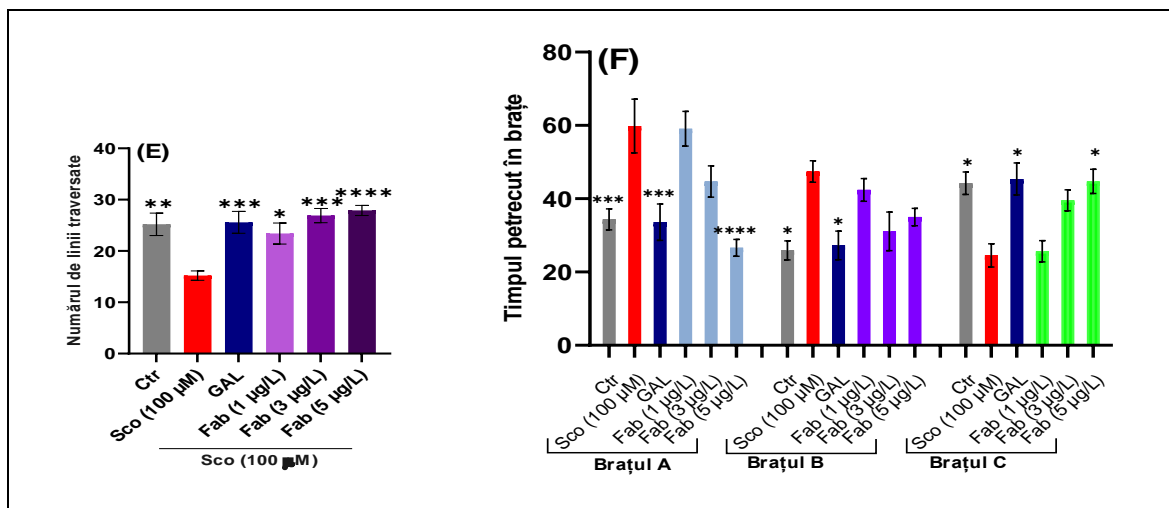


Figura 5.14 Efectele administrării tratamentului cu Rho (1, 3 și 5 $\mu\text{g/L}$) (A, B), Baic (1, 3 și 5 $\mu\text{g/L}$) (C, D) și Fab (1, 3 și 5 $\mu\text{g/L}$) (E, F) asupra numărului de linii traversate (A, C, E) și asupra timpului petrecut în cele trei brațe ale labirintului Y (A, D, F). Valorile sunt exprimate ca medii \pm S.E.M., ($n = 10$ animale pe grup). ANOVA a relevat un efect semnificativ al tratamentului asupra procentului de alternare spontană (%) (A) ($F(5, 54) = 6,235, p = 0,0001$); (B) ($F(5, 54) = 6,353, p < 0,0001$); (C) ($F(5, 54) = 6,238, p = 0,0001$); (D) ($F(5, 54) = 6,244, p < 0,0001$); (E) ($F(5, 54) = 7,347, p < 0,0001$); (F) ($F(5, 54) = 7,894, p < 0,0001$); Pentru analizele post-hoc ale lui Tukey: * $p < 0,01$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$ și **** $p < 0,00001$.

Deficitele cognitive induse de tratamentul cu Sco, peștilor zebă au fost atenuate prin administrarea celor trei flavonoide naturale. Astfel, tratamentul cu Rho, a manifestat un efect benefic asupra memoriei spațiale a peștilor zebă, reușind să restabilească în toate cele trei concentrații testate (1, 3 și 5 $\mu\text{g/L}$) numărul de linii traversate. Analiza post-hoc a arătat că administrarea tratamentului cu Rho în concentrația 1 și 3 $\mu\text{g/L}$ a inversat deficitul de memorie cauzat de administrarea acută de Sco ($p < 0,01$). Mai mult, administrarea Rho în concentrația de 5 $\mu\text{g/L}$ a reușit să restabilească numărul de linii traversate de către peștii zebă în timpul sesiunii de testare din cadrul testului labirintului Y ($p < 0,001$; Figura 5.14 A). De asemenea, tratamentul cu Rho în concentrația de 5 $\mu\text{g/L}$ a restabilit timpul petrecut de pești în brațul nou al labirintului ($p < 0,05$; Figura 5.14 B), la un nivel apropiat de cel al tratamentului cu GAL (1 mg/mL, $p < 0,1$). Prin urmare, rezultatele obținute sugerează că Rho prezintă un profil de stimulare a memoriei, prevenind efectele negative asupra proceselor cognitive induse de Sco. Mai mult decât atât, tratamentul cu Rho, în special în doza de 5 $\mu\text{g/L}$ a îmbunătățit activitatea locomotorie, abilitățile de învățare și memorare. Concomitent, tratamentul cu Rho, prezintă potențialul de a îmbunătăți și susține memoria spațială și de diferențiere a peștilor zebă și de consolidare a efectelor anxiogene induse de Sco în testul labirintului Y, prin restabilirea numărului de linii traversate și a timpului de explorare a brațului nou (196,197).

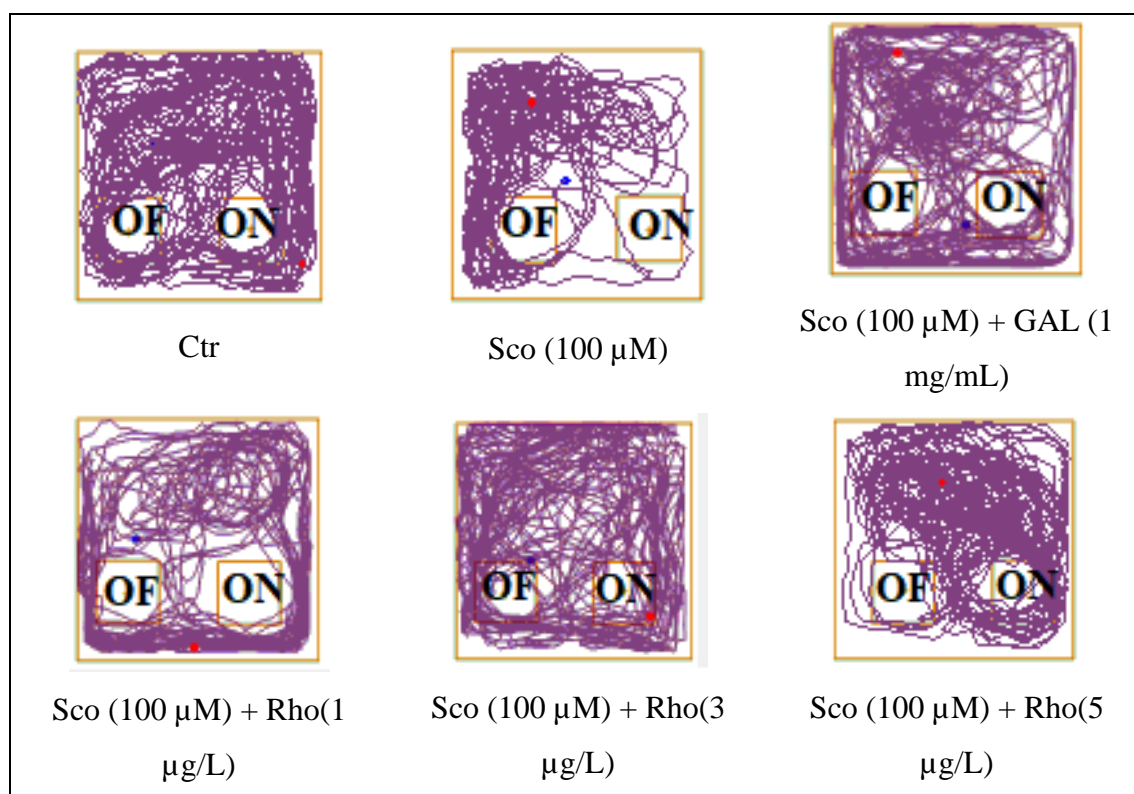
Un efect asemănător asupra cogniției spațiale a peștilor zebură amnezici a exercitat-o și tratamentul cu Baic. Astfel, administrarea tratamentului cu Baic în toate cele trei concentrații (1, 3 și 5 $\mu\text{g/L}$) a crescut într-un mod semnificativ numărul de linii traversate de pești în cadrul labirintului Y, în special în concentrațiile de 3 și 5 $\mu\text{g/L}$ ($p < 0,001$; Figura 5.14 C). În ceea ce privește efectele tratamentului cu Baic, asupra timpului petrecut de pești în cele trei brațe ale labirintului Y se observă că aceasta este capabilă să restabilească într-un mod semnificativ timpul de explorare al brațului nou doar în concentrația de 5 $\mu\text{g/L}$ ($p < 0,05$; Figura 5.14 C) (196,197). În contrast tratamentului cu Fab, s-a dovedit a prezenta un efect semnificativ dependent de doză. Astfel, analiza post-hoc a lui Tukey a arătat că administrarea cronică a tratamentului cu Fab în concentrație de 1 $\mu\text{g/L}$ prezintă un efect modest în ameliorarea efectelor amnezice induse de Sco (100 μM) peștilor zebură ($p < 0,1$). Pe când tratamentul cu Fab în concentrația de 3 $\mu\text{g/L}$, este mult mai eficient în ameliorarea deficitelor cognitive induse de Sco (100 μM) ($p < 0,001$). Pe de altă parte, administrarea tratamentului cu Fab în concentrația de 5 $\mu\text{g/L}$, s-a dovedit a fi cea mai eficientă, reușind să crească într-un mod semnificativ din punct de vedere statistic ($p < 0,0001$), numărul de linii traversate de pești în cadrul labirintului Y (Figura 5.14 E). Mai mult decât atât, tratamentul cu Fab în concentrația de 5 $\mu\text{g/L}$, a reușit să restabilească într-un mod eficient și semnificativ timpul petrecut de pești în brațul nou al labirintului ($p < 0,05$; Figura 5.14 F). Prin urmare descoperirile din acest studiu sugerează că Fab prezintă un profil de îmbunătățire a memoriei spațiale și de diferențiere în cadrul labirintului Y.

Prin urmare, peștii zebură ce au fost supuși tratamentului cu Sco (100 μM) au prezentat o degradare semnificativă a comportamentului evaluat prin cuantificarea parametrilor activității locomotorii ($p < 0,0001$), a abilităților de învățare și memorare, evaluate prin înregistrarea procentului de alternare spontană (%) ($p < 0,01$), precum și printr-o scădere semnificativă a memoriei spațiale ($p < 0,001$). În schimb, peștii tratați cu Sco (100 μM) și supuși tratamentului Rho, Baic și Fab în concentrațiile de 1, 3 $\mu\text{g/L}$ și 5 $\mu\text{g/L}$ au prezentat o creștere semnificativă a activității locomotorii, într-o manieră doză-dependentă, exercitând cel mai pronunțat efect în concentrația de 5 $\mu\text{g/L}$ ($p < 0,0001$ pentru Rho și Baic și $p < 0,01$ pentru Fab). Concomitent, cele trei flavonoide naturale au reușit să îmbunătățească abilitatea de învățare și memorare a informațiilor noi cât și consolidarea și stocarea acestora la modelul de pește zebură a AD ce a fost indus prin administrarea acută de Sco (100 μM), prin creșterea semnificativă a procentului de alternare spontană (%) ($p < 0,001$ pentru Rho și $p < 0,0001$ pentru Baic și Fab) (196,197). De asemenea, rezultatele obținute sugerează că cele trei

flavonoide prezintă un profil de stimulare a memoriei, prevenind efectele negative asupra proceselor cognitive induse de Sco, prin restabilirea numărului de linii traversate și prin creșterea timpului de explorare a brațului nou în timpul sarcinii labirintului Y ($p < 0,001$ pentru Rho și Baic și $p < 0,0001$ pentru Fab).

V.8.3 Efectele roifolinei, baicaleinei 5,6-dimetil eter și agatisflavonei asupra memoriei de referință a peștilor zebură evaluate în testul NOR

În Figura 5.15, sunt ilustrate modelele reprezentative de urmărire a locomoției peștilor zebură în cadrul testului NOR și preferința lor pentru unul dintre cele două obiecte (OF și ON). Pe parcursul sesiunii de 10 min, la peștii din lotul de control a existat o tendință de a petrece o perioadă de timp mai mare explorând zona ON în detrimentul zonei OF, pe când lotul tratat cu Sco (100 μM) a prezentat o preferință pentru OF în detrimentul ON. Grupurile tratate cu Rho, Baic și Fab în concentrații de (1, 3 și 5 $\mu\text{g/L}$) s-au remarcat prin creșterea timpului de explorare a ON în detrimentul OF, la un nivel apropiat de cel al lotului de control și a celui tratat cu GAL (1 mg/mL) (196,197).



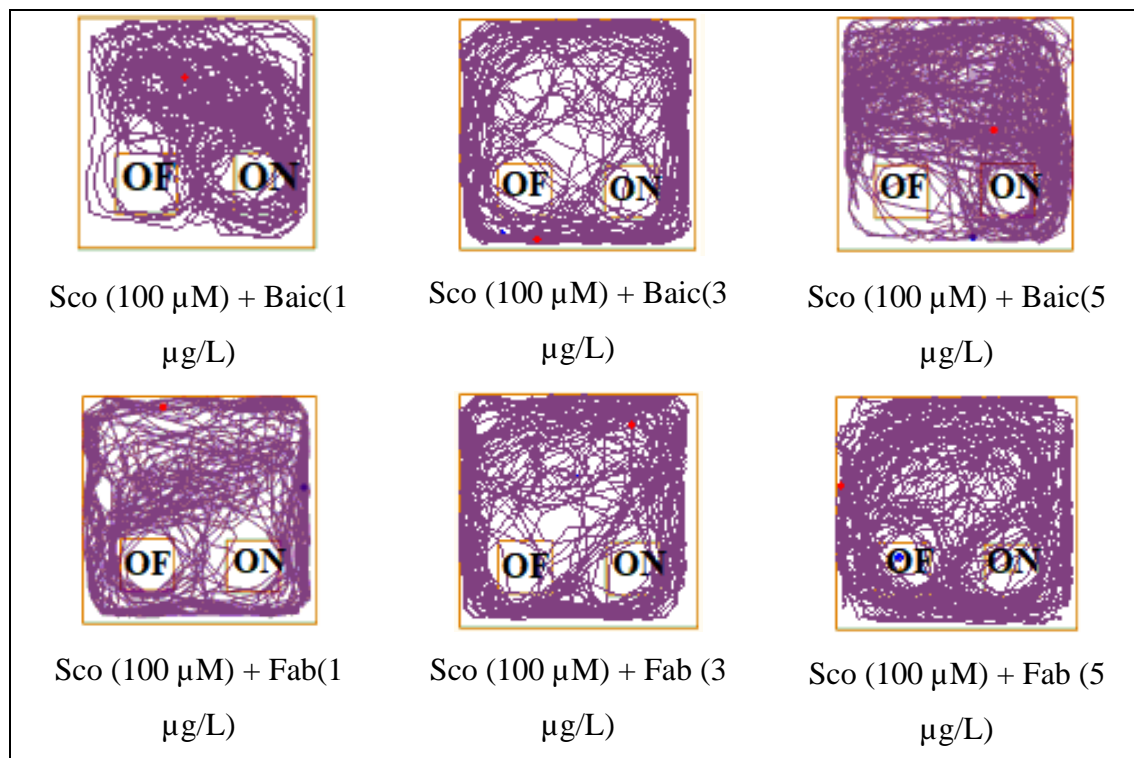


Figura 5.15 Reprezentarea grafică a traseului peștilor zebură în timpul sesiunii de testare din cadrul testului NOR. Începutul traseului peștilor zebură este reprezentat de punctul de culoare albastră ●, iar sfârșitul traseului peștilor este reprezentat de punctul de culoare roșie ●. Zona obiectului familiar a fost notată cu inițialele (OF), iar zona obiectului nou a fost notată cu inițialele (ON).

În testul NOR, ANOVA unidirecțional a relevat un efect semnificativ al tratamentelor cu cele trei flavonoide naturale asupra procentelor de preferință (Rho: F (5, 54) = 10,85, $p < 0,0001$; Figura 5.16 A), (Baic: F (5, 54) = 14,97, $p < 0,0001$; Figura 5.16 C), (Fab: F (5, 54) = 8,087, $p < 0,0001$; Figura 5.16 E) și asupra timpului de explorare a ON (Rho: F (5, 54) = 107,7, $p < 0,0001$; Figura 5.16 B), (Baic: F (5, 54) = 46,43, $p < 0,0001$; Figura 5.16 D), (Fab: F (5, 54) = 79,74, $p < 0,0001$; Figura 5.16 F). În cadrul acestui test s-a observat că peștii din grupul de control au prezentat o preferință ridicată pentru explorarea ON și una redusă pentru explorarea OF ($p < 0,0001$; Figura 5.16 A, C și E). De asemenea peștii din lotul de control au petrecut un timp mai îndelungat explorând zona ON față de cea a OF (Figura 5.16 B, D și F). În contrast, la peștii tratați cu Sco (100 μM) s-a observat o scădere semnificativă a procentelor de preferință ($p < 0,0001$; Figura 5.16 A, C și E) și a timpului de explorare a ON ($p < 0,0001$; Figura 5.16 B, D și F), sugerându-se instaurarea deficitelor de memorie induse de tratamentul cu Sco (196,197).

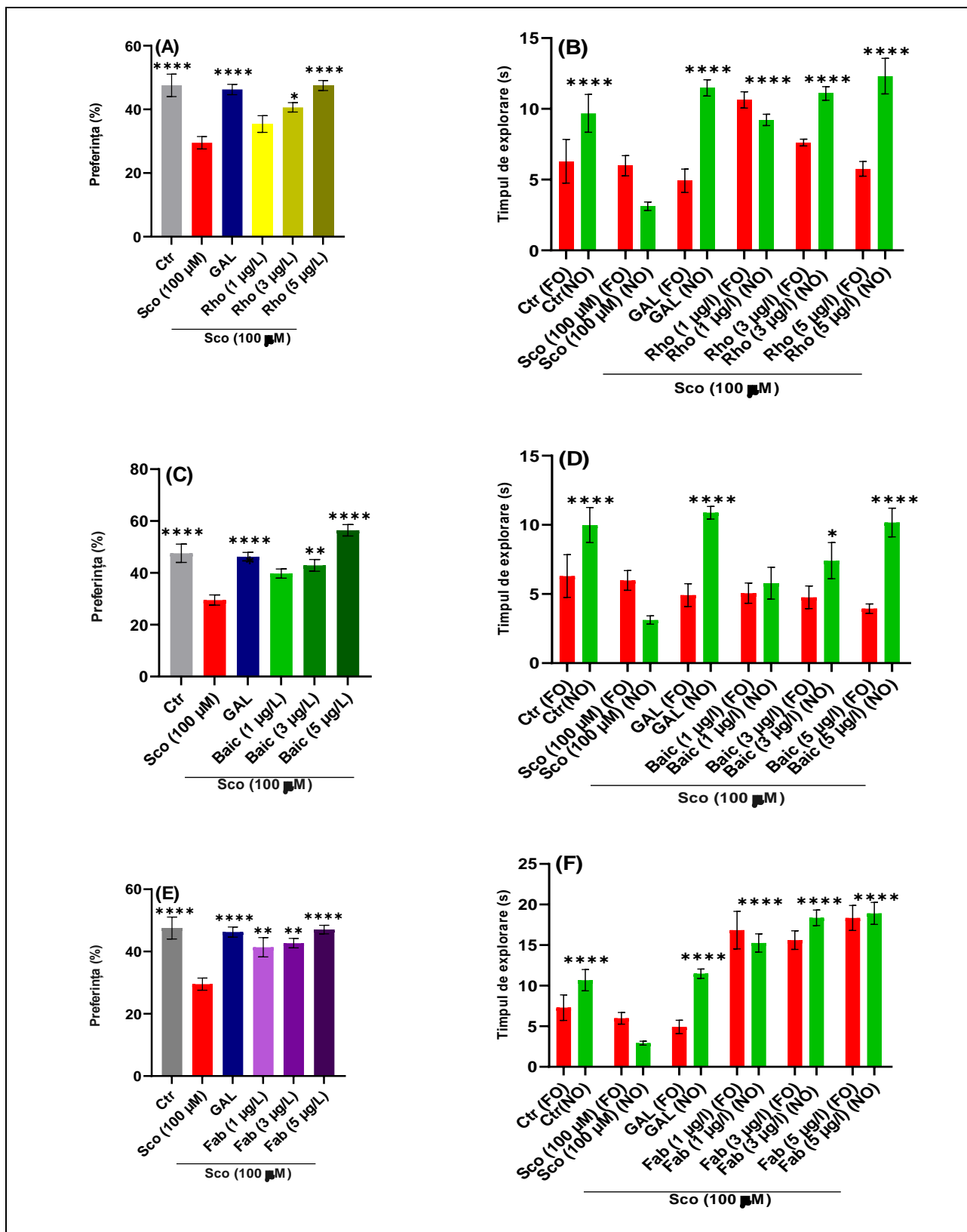


Figura 5.16 Efectul administrării tratamentului cu Rho (1, 3 și 5 μg/L) (A, B), Baic (1, 3 și 5 μg/L) (C, D) și Fab (1, 3 și 5 μg/L) (E, F) asupra investigării performanței memoriei de referință la peștii zebură în timpul sesiunii de 10 minute, evaluată prin preferința (%) peștilor față de obiectul familiar sau față de obiectul nou (A, C, E) și a timpului de explorare a obiectului nou (s) (B, D, F). Valorile sunt exprimate ca medii ± S.E.M., (n = 10 animale pe grup). În testul NOR, ANOVA One-Waya relevat un efect semnificativ al tratamentului asupra preferinței față de unul dintre cele două obiecte în testul NOR: (A) (F (5, 54) = 10,85, p < 0,0001); (C) (F (5, 54) = 14,97, p < 0,0001); (E) (F (5, 54) = 8,087, p < 0,0001); și (B) (F (5, 54) = 107,7, p < 0,0001); (D) (F (5,

54) = 46,43, $p < 0,0001$); (**F**) ($F(5, 54) = 79,74$, $p < 0,0001$). Pentru analizele post-hoc ale lui Tukey: * $p < 0,01$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$ și **** $p < 0,00001$.

Administrarea ulterioară a tratamentului cu Rho în concentrația de 1 $\mu\text{g/L}$, s-a dovedit a fi neeficientă asupra creșterii preferinței (%) peștilor față de ON (Figura 5.16A). Cu toate acestea, s-a înregistrat o îmbunătățire semnificativă a memoriei de referință la peștii zebură ce au fost supuși tratamentului cronic cu Rho în concentrațiile de 3 și 5 $\mu\text{g/L}$, prin restabilirea preferinței peștilor atât în concentrația de 3 $\mu\text{g/L}$ ($p < 0,05$), cât și în cea de 5 $\mu\text{g/L}$ ($p < 0,0001$; Figura 5.16A). Mai mult decât atât, tratamentul cronic cu Rho a reușit în toate cele trei concentrații testate să restabilească timpul de explorare a ON ($p < 0,0001$; Figura 5.16B), la un nivel apropiat de cel al tratamentului cu GAL (1 mg/mL), sugerându-se efectele benefice ale tratamentului cu Rho asupra proceselor de învățare și memorare a peștilor zebură, în special asupra memoriei de referință.

Un efect asemănător cu cel al tratamentului cu Rho asupra procentelor de preferință în testul NOR, a fost observat și în cazul tratamentului cu Baic. Astfel, peștii tratați cu Baic, în concentrația de 1 $\mu\text{g/L}$, nu au prezentat o preferință semnificativă nici pentru unul dintre cele două obiecte. Cu toate acestea, o creștere semnificativă a preferinței peștilor (%), s-a evidențiat începând cu concentrația de 3 $\mu\text{g/L}$ ($p < 0,01$; Figura 5.16 C). Mai mult, tratamentul cu Baic în concentrația de 5 $\mu\text{g/L}$, a reușit să restabilească într-un mod semnificativ preferința peștilor (%) față de ON ($p < 0,0001$), în timpul sesiunii de testare din cadrul testului NOR, într-un mod similar cu cel al tratamentului cu GAL (1 mg/mL) (Figura 5.16C). De asemenea, în ceea ce privește efectele tratamentului cu Baic asupra timpului de explorare a ON, un efect semnificativ s-a observat doar în cadrul concentrațiilor de 3 ($p < 0,1$) și 5 $\mu\text{g/L}$ ($p < 0,0001$; Figura 5.16 D) la un nivel apropiat de cel al GAL (1 mg/mL) ($p < 0,0001$), sugerându-se efectele benefice ale tratamentului cu Baic în special în concentrația 5 $\mu\text{g/L}$ asupra memoriei de referință a peștilor zebură (196,197).

Într-un mod alternativ, tratamentul cu Fab s-a dovedit a fi eficient în restabilirea memoriei de referință a peștilor amnezici în toate cele trei concentrații testate. Astfel, administrarea tratamentului cu Fab în concentrațiile de 1 și 3 $\mu\text{g/L}$ s-a dovedit a prezenta un efect semnificativ similar asupra procentelor de preferință ($p < 0,01$; Figura 5.16 E), pe când, tratamentul cu Fab în concentrația de 5 $\mu\text{g/L}$ a prezentat un efect mai pronunțat ($p < 0,0001$; Figura 5.16 E). Mai mult decât atât, tratamentul cu Fab a manifestat și un efect semnificativ asupra timpului de explorarea a ON (s) în toate cele trei concentrații studiate ($p < 0,0001$; Figura 5.16 F), într-un mod similar cu grupul de pești tratați cu GAL ($p < 0,0001$),

sugerându-se efectele benefice ale tratamentului cu Fab asupra memoriei de referință în testul NOR. Rezultatele din acest studiu, sunt susținute și de către datele unei meta-analize realizate de către (198), unde autorii au descris, Fab, drept un biflavonoid natural ce prezintă caracteristici promițătoare pentru a acționa ca un agent neuroprotector adjuvant pentru tratamentul bolilor neurodegenerative.

Peștii zebură supuși tratamentului cu Sco (100 μ M) au prezentat o scădere a procentelor de preferință ($p < 0,0001$) și a timpului de explorare a ON ($p < 0,0001$), sugerându-se degradarea proceselor cognitive și instaurarea unui profil amnezic. Administrarea ulterioară a tratamentelor cu cele trei flavonoide naturale a determinat o îmbunătățire semnificativă a memoriei de referință a peștilor zebură. Un efect mai pronunțat asupra proceselor cognitive și în special asupra memoriei de referință a fost observat ca urmare a administrării tratamentului cu Rho și Baic în concentrațiile de 3 și 5 μ g/L și al tratamentului cu Fab în toate cele trei concentrații testate 1, 3 și 5 μ g/L, prin restabilirea preferinței peștilor pentru ON și a timpului de explorare a ON, în special pentru concentrația de 5 μ g/L ($p < 0,0001$), la un nivel apropiat de cel al tratamentului cu GAL (1 mg/mL).

V.9 Efectele roifolinei, baicaleinei 5,6-dimetil eter și ale agatisflavonei asupra stresului oxidativ la modelul de pește zebură al bolii Alzheimer

V.9.1 Efectele roifolinei, baicaleinei 5,6-dimetil eter și a agatisflavonei asupra activității superoxid-dismutazei

În acest studiu, administrarea tratamentului cu Sco (100 μ M), timp de 30 de minute peștilor zebură, a prezentat o scădere semnificativă a activității SOD ($p < 0.0001$; Figura 5.17 A, B și C), în comparație cu grupul de control. În contrast, administrarea tratamentului cu Rho (1, 3, 5 μ g/L) a determinat creșterea activității SOD, în special în concentrația de 5 μ g/L ($p < 0,0001$; Figura 5.17 A), însă a prezentat un efect semnificativ din punct de vedere statistic și în concentrațiile mai mici ($p < 0,01$ pentru concentrația de 3 μ g/L și $p < 0,05$ pentru concentrația de 1 μ g/L; Figura 5.17 A).

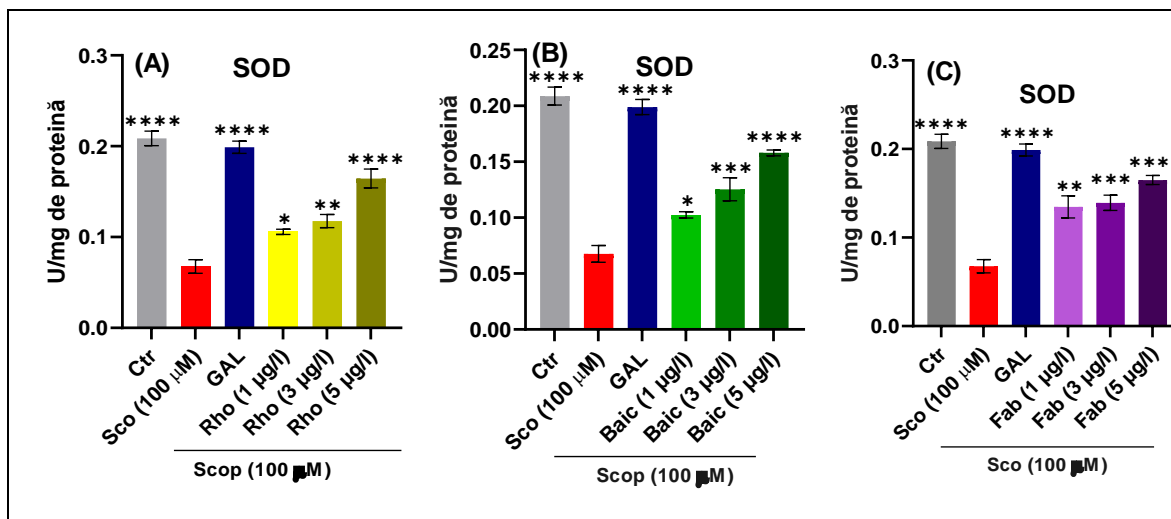


Figura 5.17 Efectele administrării tratamentului cu Rho (1, 3 și 5 µg/L) (A), Baic (1, 3 și 5 µg/L) (B) și Fab (1, 3 și 5 µg/L) (C) asupra activității SOD la modelul de pește zebură al AD indus prin administrarea a 100 µM de Sco. Valorile sunt exprimate ca medii ± S.E.M. (n = 10 animale pe grup). ANOVA a relevat un efect semnificativ al tratamentului asupra activității specifice a SOD. (A) (F (5, 12) = 55,84, p < 0,0001) și (B) (F (5, 12) = 64,20, p < 0,0001) și (C) (F (5, 12) = 37,26, p < 0,0001). Pentru analizele post-hoc ale lui Tukey: *p < 0,01, ** p < 0,001, *** p < 0,0001 și **** p < 0,00001.

În ceea ce privește tratamentul cu Baic (1, 3, 5 µg/L), s-a observat că această flavonoidă naturală a crescut de asemenea, într-un mod semnificativ activitatea specifică a SOD (p < 0,05 pentru concentrația de 1 µg/L, p < 0,01 pentru concentrația de 3 µg/L și p < 0,0001 pentru concentrația de 5 µg/L; Figura 5.17 B) (196,197). De asemenea, după cum se observă în figura 5.17C tratamentul cu Fab a reglat într-un mod remarcabil activitatea SOD într-o manieră dependentă de concentrație. Astfel, pentru concentrația de 1 µg/L semnificația statistică este de p < 0,01, pentru concentrația de 3 µg/L semnificația statistică este de p < 0,001, iar pentru concentrația de 5 µg/L semnificația statistică este de p < 0,0001.

V.9.2 Efectele roifolinei, baicaleinei 5,6-dimetil eter și a agatisflavonei asupra activității catalazei

În acest studiu, testul Post-hoc al lui Tukey a arătat o diferență semnificativă între grupul de control și peștii zebură tratați cu Sco. Astfel, la peștii tratați cu Sco s-a observat o scădere semnificativă a activității specifice a CAT, comparativ cu grupul de control (p < 0,001; Figura 5.17 A, B și C), sugerându-se instaurarea OS și generarea de modificări oxidative ale ADN-ului, proteinelor și lipidelor în țesutul cerebral al peștilor zebură (196,197).

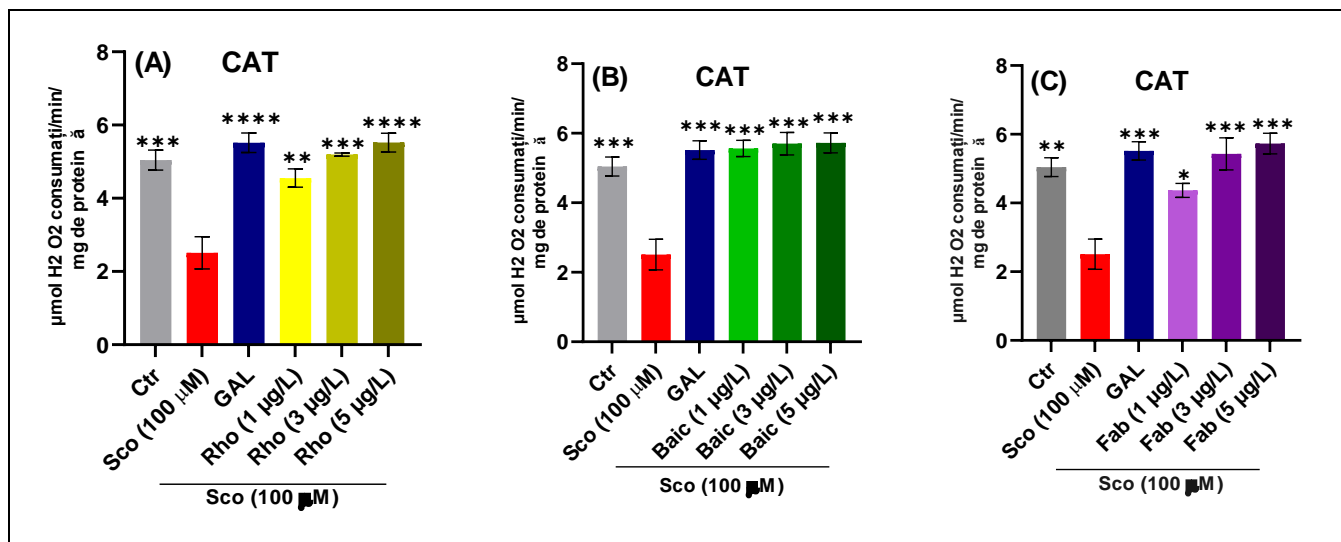


Figura 5.18 Efectele administrării tratamentului cu Rho (1, 3 și 5 µg/L) (A), Baic (1, 3 și 5 µg/L) (B) și Fab (1, 3 și 5 µg/L) (C) asupra activității CAT la modelul de pește zebră al AD indus prin administrarea a 100 µM de Sco. Valorile sunt exprimate ca medii ± S.E.M., (n = 10 animale pe grup). ANOVA a relevat un efect semnificativ al tratamentului asupra activității specifice a CAT. (A) (F (5, 12) = 16,56, p < 0,0001) și (B) (F (5, 12) = 16,09, p < 0,0001) și (C) (F (5, 12) = 12,57, p=0,0002). Pentru analizele post-hoc ale lui Tukey: *p < 0,01, ** p < 0,001, *** p < 0,0001 și **** p < 0,00001.

Tratamentele cu Rho, Baic și Fab (1, 3, 5 µg/L) au prezentat un efect semnificativ asupra activității CAT, crescând într-un mod semnificativ activitatea specifică a CAT. Astfel pentru tratamentul cu Rho testul Post-hoc al lui Tukey a arătat o diferență semnificativă într-o manieră doză-dependentă între lotul de pești tratați cu Sco și lotul de pești tratați cu Rho în concentrația de 1 µg/L (p < 0,01), între lotul de pești tratați cu Sco și lotul de pești tratați cu Rho în concentrația de 3 µg/L (p < 0,001) și între lotul de pești tratați cu Sco și lotul de pești tratați cu Rho în concentrația de 5 µg/L (p < 0,0001), într-un mod similar cu grupul tratat cu GAL (p < 0,0001; Figura 5.18 A) (196,197). În ceea ce privește efectele tratamentului cu Baic, testul Post-hoc al lui Tukey a arătat că tratamentul cronic cu Baic a reușit să restabilească într-o manieră asemănătoare pentru toate cele 3 concentrații testate (1, 3, 5 µg/L) activitatea specifică a CAT din țesutul cerebral al peștilor zebră (p < 0,0001), la un nivel apropiat cu cel al GAL (p < 0,001; Figura 5.18 B) (196,197). Într-un mod alternativ, administrarea tratamentului cu Fab în concentrațiile de 1, 3, 5 µg/L la animalele de laborator ce au fost supuse în prealabil tratamentului acut cu Sco, a reușit să exercite un efect semnificativ asupra activității CAT, în special în concentrațiile de 3 și 5 µg/L (p < 0,001) la un nivel apropiat cu cel al GAL (p < 0,001; Figura 5.18 C). Cu toate acestea, s-a remarcat că tratamentul cu Fab în concentrație de 1 µg/L, a prezentat un efect infim asupra modulării activității CAT (196,197).

V.9.3 Efectele roifolinei, baicaleinei 5,6-dimetil eter și ale agatisflavonei asupra activității glutation peroxidazei

În ceea ce privește efectele tratamentelor cu cele trei flavonoide naturale asupra activității GPX, testul Post-hoc al lui Tukey a arătat că tratamentul cu Rho (1, 3, 5 $\mu\text{g/L}$) a reglat într-un mod semnificativ nivelul de GPx doar în doza de 5 $\mu\text{g/L}$ ($p < 0,05$; Figura 5.19 A) (196,197). Tratamentul cu Baic (1, 3, 5 $\mu\text{g/L}$) s-a dovedit a fi mai eficient în reglarea activității specifice a GPX, față de tratamentul cu Rho. Astfel, tratamentul cu Baic în concentrația de 3 $\mu\text{g/L}$ a reușit să exercite un efect semnificativ asupra activității GPX ($p < 0,01$), la un nivel apropiat cu cel al GAL ($p < 0,001$; Figura 5.19 B). Mai mult, tratamentul cu Baic în concentrația de 5 $\mu\text{g/L}$ a reușit să restabilească activitatea specifică a GPX în creierul peștilor zebra ($p < 0,0001$).

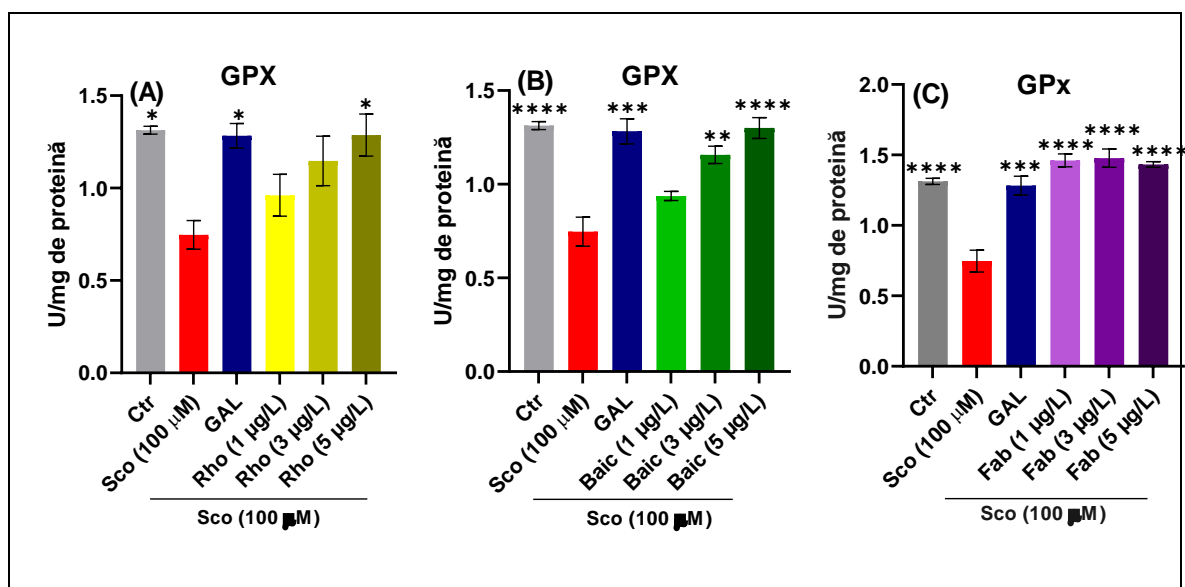


Figura 5.12. Efectele administrării tratamentului cu Rho (1, 3 și 5 $\mu\text{g/L}$) (A), Baic (1, 3 și 5 $\mu\text{g/L}$) (B) și Fab (1, 3 și 5 $\mu\text{g/L}$) (C) asupra activității GPX la modelul de pește zebra al AD indus prin administrarea a 100 μM de Sco. Valorile sunt exprimate ca medii \pm S.E.M. ($n = 10$ animale pe grup). ANOVA a relevat un efect semnificativ al tratamentului asupra activității specifice a GPX. (A) ($F(5, 12) = 5,636, p = 0,0067$) și (B) ($F(5, 12) = 19,33, p < 0,0001$) și (C) ($F(5, 12) = 25,71, p < 0,0001$). Pentru analizele post-hoc ale lui Tukey: * $p < 0,01$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$ și **** $p < 0,00001$.

În ceea ce privește tratamentul cu Fab (1, 3, 5 $\mu\text{g/L}$), se observă o creștere mai pronunțată a activității GPX în toate cele trei concentrații testate ($p < 0,0001$; Figura 5.19 C), într-un mod similar cu cel al tratamentului cu GAL ($p < 0,001$) (196,197).

V.9.4 Efectele roifolinei, baicaleinei 5,6-dimetil eter și a agatisflavonei asupra conținutului total de glutation redus

Tratamentul cu Sco (100 μ M) a determinat reducerea nivelului de GSH din creierul peștilor zebură în comparație cu lotul la care nu s-a administrat Sco ($p < 0,01$; Figura 5.20 A), ($p < 0,001$; Figura 5.20 B), ($p < 0,0001$; Figura 5.20 C).

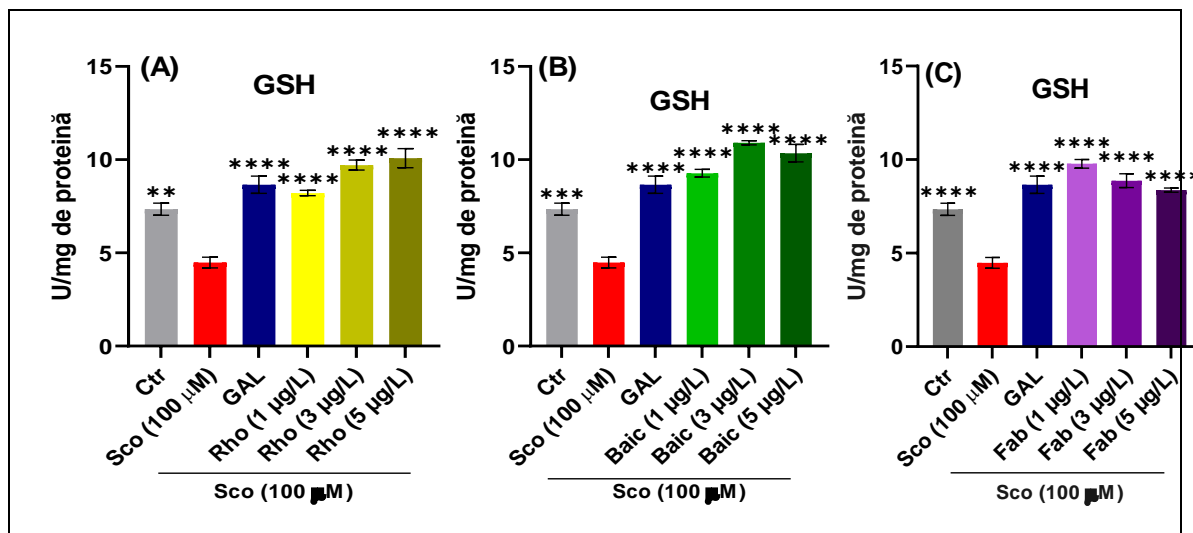


Figura 5.20 Efectele administrării tratamentului cu Rho (1, 3 și 5 μ g/L) (A), Baic (1, 3 și 5 μ g/L) (B) și Fab (1, 3 și 5 μ g/L) (C) asupra activității GSH la modelul de pește zebură al AD indus prin administrarea a 100 μ M de Sco. Valorile sunt exprimate ca medii \pm S.E.M., ($n = 10$ animale pe grup). ANOVA a relevat un efect semnificativ al tratamentului asupra activității specifice a GSH. (A) ($F(5, 12) = 32,53$, $p < 0,0001$) și (B) ($F(5, 12) = 48,57$, $p < 0,0001$) și (C) ($F(5, 12) = 34,44$, $p < 0,0001$). Pentru analizele post-hoc ale lui Tukey: * $p < 0,01$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$ și **** $p < 0,00001$.

Administrarea ulterioară a tratamentelor cu Rho, Baic și Fab, a determinat o creștere semnificativă a nivelului de GSH, într-un mod similar, în toate cele trei concentrații testate (1, 3 și 5 μ g/L) ($p < 0,0001$; Figura 5.20 A, B și C), într-o manieră asemănătoare cu cea a grupului tratat cu GAL ($p < 0,0001$) (196,197).

V.9.5 Efectele roifolinei, baicaleinei 5,6-dimetil eter și a agatisflavonei asupra nivelului de malondialdehidă

Administrarea acută de Sco (100 μ M) a determinat, creșteri semnificative ale nivelului de MDA, comparativ cu grupul de control ($p < 0,0001$; Figura 5.21) (196,197). Administrarea cronică a tratamentului cu Rho (1, 3 și 5 μ g/L) animalelor amnezice a restabilit într-un mod semnificativ starea de antioxidant din creierul peștilor zebură, însă s-a observat un patern diferențiat de eficiență. Astfel, s-a observat că tratamentul cu Rho în concentrațiile de (1, 3 μ g/L) a prezentat un potențial mai modest în ameliorarea efectelor amnezice induse Sco (100 μ M) ($p < 0,001$; Figura 5.21 A), față de concentrația de (5 μ g/L)

ce a prezentat un potențial mai ridicat ($p < 0,0001$), într-un mod similar cu grupul tratat cu GAL ($p < 0,0001$; (Figura 5.21A).

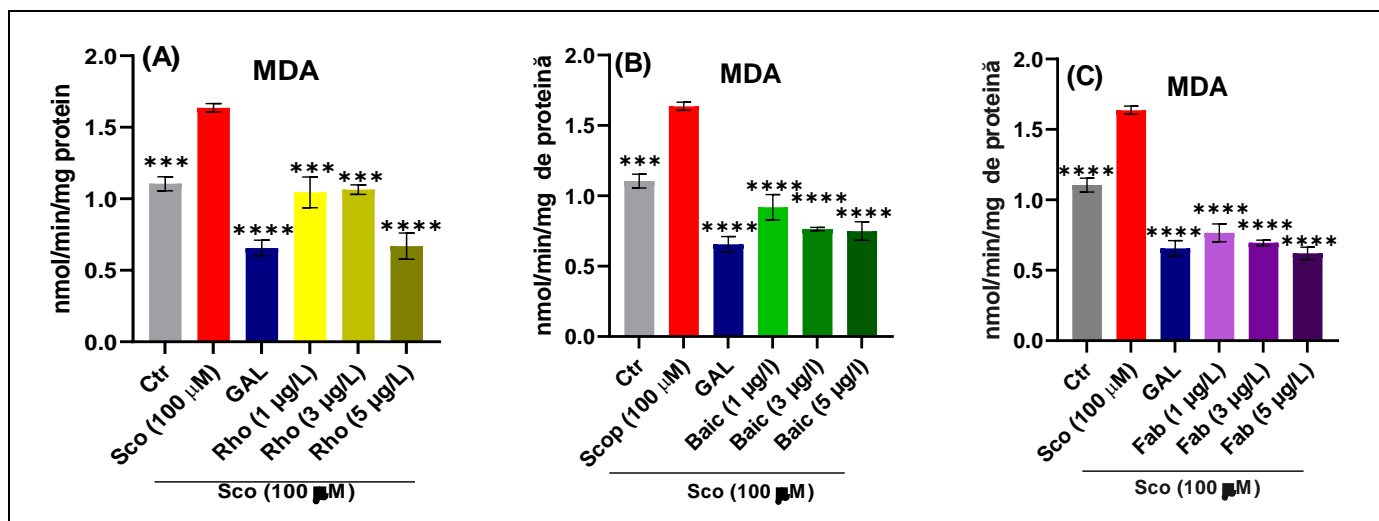


Figura 5.21 Efectele administrării tratamentului cu Rho (1, 3 și 5 µg/L) (A), Baic (1, 3 și 5 µg/L) (B) și Fab (1, 3 și 5 µg/L) (C) asupra activității MDA la modelul de pește zebură al AD indus prin administrarea a 100 µM de Sco. Valorile sunt exprimate ca medii ± S.E.M., (n = 10 animale pe grup). ANOVA a relevat un efect semnificativ al tratamentului asupra activității specifice a MDA. (A) (F (5, 12) = 28,33, $p < 0,0001$) și (B) (F (5, 12) = 41,93, $p < 0,0001$) și (C) (F (5, 12) = 75,07, $p < 0,0001$). Pentru analizele post-hoc ale lui Tukey: * $p < 0,01$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$ și **** $p < 0,00001$.

În ceea ce privește tratamentul cu Baic și FAB, s-a observat că cele două flavonoide naturale au prezentat o eficiență similară în toate cele trei concentrații (1, 3 și 5 µg/L) în reglarea nivelurilor de MDA, din creierul peștilor zebură ($p < 0,0001$), într-un mod similar cu grupul tratat cu GAL ($p < 0,0001$; Figura 5.21 B și C) (196,197).

V.9.6 Efectele roifolinei, baicaleinei 5,6-dimetil eter și a agatisflavonei asupra nivelului de proteine carbonilate

În urma cuantificării nivelurilor de proteine carbonilate din creierele peștilor zebură, s-a observat că administrarea cronică a tratamentului cu Sco (100 µM), a avut drept efect creșterea semnificativă a nivelului de proteine carbonilate, comparativ cu peștii netratați ($p < 0,0001$) (Figura 5.15) (196,197). Administrarea tratamentului Rho în concentrația de 1 µg/L a determinat o scădere a nivelului de proteine carbonilate față de grupul tratat doar cu Sco (100 µM), însă a determinat o scădere nesemnificativă din punct de vedere statistic (Figura 5.22 A). În ceea ce privește tratamentul cu Rho în concentrația de 3 µg/L s-a observat că în această concentrație Rho este capabilă să scadă într-un mod semnificativ, deși modest, nivelului de proteine carbonilate în comparație cu lotul de pești tratați doar Sco (100 µM) ($p < 0,05$; Figura 5.22 A). O semnificație statistică mai evidentă a tratamentului cu Rho față de lotul supus doar tratamentului cu Sco (100 µM), s-a observat în concentrația de 5 µg/L ($p <$

0,001), la un nivel apropiat de cel al tratamentului cu GAL ($p < 0,0001$; Figura 5.22 A) (196,197).

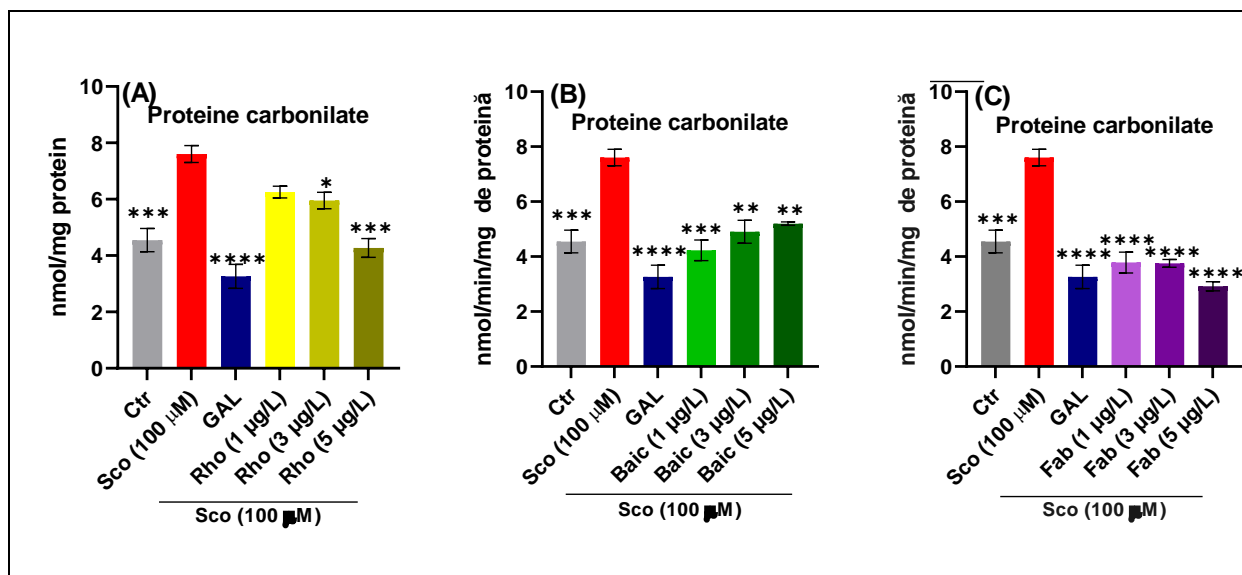


Figura 5.22 Efectele administrării tratamentului cu Rho (1, 3 și 5 µg/L) (A), Baic (1, 3 și 5 µg/L) (B) și Fab (1, 3 și 5 µg/L) (C) asupra activității proteinelor carbonilate la modelul de pește zebură al AD indus prin administrarea a 100 µM de Sco. Valorile sunt exprimate ca medii ± S.E.M., (n=10 animale pe grup). ANOVA a relevat un efect semnificativ al tratamentului asupra activității specifice a proteinelor carbonilate. (A) ($F(5, 12) = 21.75, p < 0.0001$) și (B) ($F(5, 12) = 16.68, p < 0.0001$) și (C) ($F(5, 12) = 27.42, p < 0.0001$). Pentru analizele post-hoc ale lui Tukey: * $p < 0,01$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$ și **** $p < 0,00001$.

Tratamentul cu Baic s-a dovedit a fi mai eficient în concentrația cea mai mică testată și anume în cea de 1 µg/L, unde a reușit să regleze într-un mod semnificativ nivelul de proteine carbonilate ($p < 0.001$; Figura 5.22 B), în timp ce tratamentul cu Baic în concentrațiile de 3 și 5 µg/L a determinat o scădere semnificativă mai modestă a conținutului de proteine carbonilate ($p < 0,001$; Figura 5.22B). În contrast, administrarea cronică a tratamentului cu Fab, animalelor cu model amnezic de demență, a relevat o scădere semnificativă a nivelului de proteine carbonilate în toate cele trei concentrații testate 1, 3 și 5 µg/L ($p < 0,0001$), într-un mod asemănător tratamentului cu GAL ($p < 0,0001$; Figura 5.22 C) (196,197). Prin urmare, datele din acest studiu, sugerează că Sco induce suprimarea remarcabilă a funcțiilor de protecție ale enzimelor endogene antioxidante SOD, CAT, GPX și GSH ce duce la niveluri ridicate de acumulare a radicalilor liberi în celulă, cum ar fi ROS. Alternativ, tratamentul cu Rho, Baic și Fab a restabilit eficient mecanismul de apărare antioxidantă prin âreglarea activității enzimelor antioxidante SOD, CAT, GPX și GSH. De asemenea, tratamentele cu cele trei flavonoide naturale a reușit să stopeze oxidarea proteinelor și a lipidelor și să scadă nivelul de proteine carbonilate și a nivelului de MDA.

V.10 Efectele roifolinei baicaleinei 5,6-dimetil eter și a agatisflavonei asupra activității acetilcolinesterazei

În acest studiu, tratamentul cu Sco (100 μ M) timp de 30 de minute a crescut semnificativ activitatea AChE la peștii zebra comparativ cu grupul de control ($p < 0,01$) (Figura 5.23) (196,197).

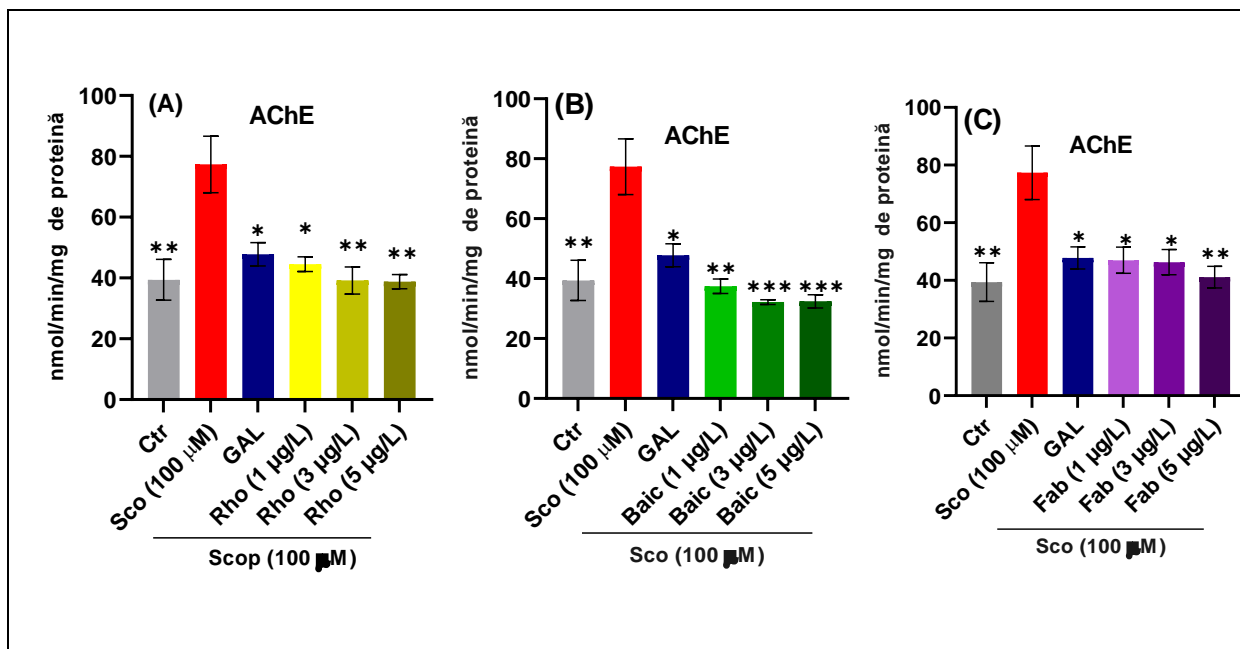


Figura 5.23 Efectele administrării tratamentului cu Rho (1, 3 și 5 μ g/L) (A), Baic (1, 3 și 5 μ g/L) (B) și Fab (1, 3 și 5 μ g/L) (C) asupra activității AChE la modelul de pește zebra al AD indus prin administrarea a 100 μ M de Sco. Valorile sunt exprimate ca medii \pm S.E.M. ($n = 10$ animale pe grup). ANOVA a relevat un efect semnificativ al tratamentului asupra activității specifice a AChE: (A) ($F(5, 12) = 7,524, p = 0,0021$) și (B) ($F(5, 12) = 11,19, p = 0,0003$) și (C) ($F(5, 12) = 5,803, p = 0,0060$). Pentru analizele post-hoc ale lui Tukey: * $p < 0,01$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$ și **** $p < 0,00001$.

Administrarea ulterioară a tratamentului cronic cu Rho (1, 3, 5 μ g/L) a determinat o scădere a activității AChE, în special în concentrațiile de 3 și 5 μ g/L ($p < 0,01$). În contrast, tratamentul cu Rho, în concentrația de 1 μ g/L a reușit să exercite un efect semnificativ asupra activității AChE, acționând într-o manieră asemănătoare cu cea a tratamentului GAL ($p < 0,05$) în comparație cu animalele tratate doar cu Sco (100 μ M) (Figura 5.23 A) (196,197). În ceea ce privește tratamentul cu Baic (1, 3, 5 μ g/L), s-a observat că aceasta a manifestat o scădere semnificativă a activității specifice a AChE în funcție de doză ($p < 0,01$ pentru 1 μ g/L și $p < 0,001$ pentru 3 și 5 μ g/L), în comparație cu peștii tratați numai cu Sco (100 μ M). Grupurile de animale tratate cu Fab (1, 3, 5 μ g/L), au prezentat un efect asemănător cu cel al Rho și Baic, indicând o scădere semnificativă a activității specifice a AChE în funcție de doză ($p < 0,05$ pentru 1 μ g/L și 3 μ g/L și $p < 0,01$ pentru 5 μ g/L) în comparație cu peștii tratați numai cu Sco (100 μ M) (Figura 5.23C) (196,197). Prin urmare, pe baza acestor

rezultate, am putea sugera că Rho, Baic și Fab prezintă potențialul de a îmbunătăți disfuncția cognitivă la modelul de pește-zebră amnezic indus de Sco prin inhibarea activității AChE și prin îmbunătățirea deficitelor colinergice generate de administrarea tratamentului cu Sco. Acest lucru fiind corelat și cu îmbunătățirea parametrilor de memorie, după cum se evidențiază în abordările comportamentale (NTT, labirintul Y și NOR) și prin restabilirea eficientă a mecanismul de apărare antioxidantă).

V.11 Efectele roifolinei, baicaleinei 5,6-dimetil eter și a agatisflavonei asupra expresiei genelor

Am evaluat efectele neurofarmacologice, ale Rho, Baic și Fab, asupra expresiei genelor *bdnf*, *npv*, *egr-1*, *nrf2a* și *crebl*

V.11.1 Efectele roifolinei, baicaleinei 5,6-dimetil eter și a agatisflavonei asupra expresiei factorului neurotrofic derivat din creier (*bdnf*).

Rezultatele studiului, indică că administrarea tratamentului cu Sco (100 μM), timp de 30 de minute peștilor zebra, a prezentat o scădere semnificativă a numărului de copii ARNm al genei *bdnf* în creierul peștilor, comparativ cu lotul de pești ce a fost supus doar tratamentului cu Sco (100 μM) ($p < 0,01$; Figura 5.17).

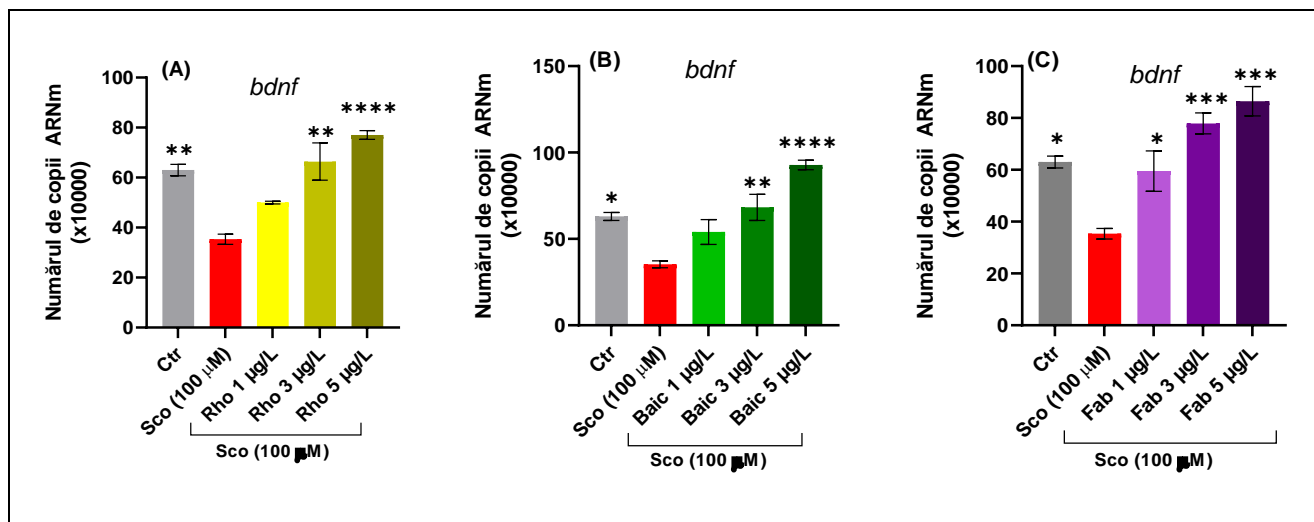


Figura 5.24 Efectele administrării tratamentului cu Rho (1, 3 și 5 μg/L), Baic (1, 3 și 5 μg/L) și Fab (1, 3 și 5 μg/L) asupra numărului de copii ARNm al genei *bdnf* în creierul modelului de pește zebra al AD indus prin administrarea a 100 μM de Sco. Valorile sunt exprimate ca medii ± S.E.M., (n = 3 animale pe grup). ANOVA a relevat un efect semnificativ al tratamentului asupra numărului de copii ARNm al genei *bdnf*. (A) (F (4, 10) = 18,94, p=0,0001); (B) (F (4, 10) = 17,65, p=0,0002); (C) (F (4, 10) = 16,19, p=0,0002). Pentru analizele post-hoc ale lui Tukey: * $p < 0,01$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$ și **** $p < 0,00001$.

În ceea ce privește efectele celor 3 flavonoide asupra expresiei genei *bdnf* în creierul peștilor zebra, s-a observat că Rho și Baic manifestă un efect asemănător asupra expresiei genei *bdnf*. Astfel, atât tratamentul cu Rho, cât și cel cu Baic, au determinat într-un mod

semnificativ creșterea numărului de copii ARNm al genei *bdnf* în creierul peștilor zebură în concentrațiile de 3 și 5 $\mu\text{g/L}$ ($p < 0,01$ pentru 3 $\mu\text{g/L}$ și $p < 0,0001$ pentru 5 $\mu\text{g/L}$), pe când tratamentele cu Rho și Baic în concentrația de 1 $\mu\text{g/L}$, s-au dovedit a fi neeficient în modularea expresiei genei *bdnf* (Figura 5.24 A și B). De asemenea, după cum se observă în Figura 5.24C, tratamentul cu Fab a crescut într-un mod remarcabil numărul de copii ARNm al genei *bdnf* într-o manieră dependentă de doză, manifestând un efect semnificativ în toate cele trei concentrații testate ($p < 0,1$ pentru concentrația de 1 $\mu\text{g/L}$ și $p < 0,001$ pentru concentrațiile de 3 și 5 $\mu\text{g/L}$).

V.11.2 Efectele roifolinei, baicaleinei 5,6-dimetil eter și a agatisflavonei asupra expresiei neuro peptidei Y (NPY)

În acest studiu, administrarea tratamentului cu Sco în concentrație de (100 μM) a indus o diminuare semnificativă a numărului de copii ARNm al genei *npv* în creierul peștilor zebură, comparativ cu grupul de control ($p < 0,0001$; Figura 5.25).

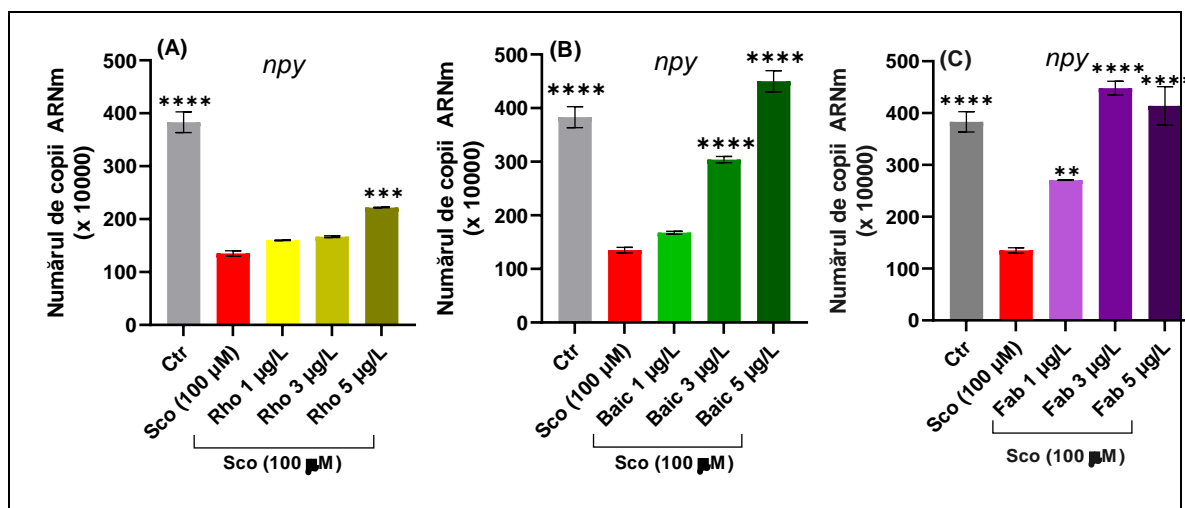


Figura 5.25 Efectele administrării tratamentului cu Rho (1, 3 și 5 $\mu\text{g/L}$), Baic (1, 3 și 5 $\mu\text{g/L}$) și Fab (1, 3 și 5 $\mu\text{g/L}$) asupra numărului de copii ARNm al genei *npv* în creierul modelului de pește zebură al AD indus prin administrarea a 100 μM de Sco. Valorile sunt exprimate ca medii \pm S.E.M., ($n = 3$ animale pe grup). ANOVA a relevat un efect semnificativ al tratamentului asupra numărului de copii ARNm al genei *npv*: (A) ($F(4, 10) = 120,2$, $p < 0,0001$); (B) ($F(4, 10) = 109,6$, $p < 0,0001$); (C) ($F(4, 10) = 41,81$, $p < 0,0001$). Pentru analizele post-hoc ale lui Tukey: * $p < 0,01$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$ și **** $p < 0,00001$.

În cazul tratamentului cu Rho (1, 3, 5 $\mu\text{g/L}$) s-a observat, că acesta a fost capabil să determine o intensificare semnificativă din punct de vedere statistic a expresiei genei *npv* doar în concentrația de 5 $\mu\text{g/L}$ ($p < 0,001$) (Figura 5.25). În contrast, tratamentul cu Baic, s-a dovedit a fi eficient în reglarea expresiei genice a genei *npv*, atât în concentrația de 3, cât și în cea de 5 $\mu\text{g/L}$, intensificând într-un mod semnificativ ($p < 0,0001$) numărul de copii ARNm a genei *npv*. În ceea ce privește tratamentul cu Fab (1, 3, 5 $\mu\text{g/L}$) s-a observat că

acesta a crescut într-un mod remarcabil numărul de copii ARNm al genei *npv*, prezentând un efect semnificativ din punct de vedere statistic în toate cele 3 concentrații testate ($p < 0,01$ pentru concentrația de 1 $\mu\text{g/L}$ și $p < 0,0001$ pentru concentrațiile de 3 și 5 $\mu\text{g/L}$; Figura 5.25C).

V.11.3 Efectele roifolinei, baicaleinei 5,6-dimetil eter și a agatisflavonei asupra expresiei genei proteinei 1 de răspuns a creșterii timpurii (*egr1*)

Pe baza rezultatelor pe care le-am obținut în acest studiu se poate observa că administrarea tratamentului cu Sco în concentrație de (100 μM) a suprimat expresia genei *egr-1* în comparație cu animalele din grupul de control ceea ce, la rândul său, a cauzat afectarea memoriei ($p < 0.0001$; Figura 5.26).

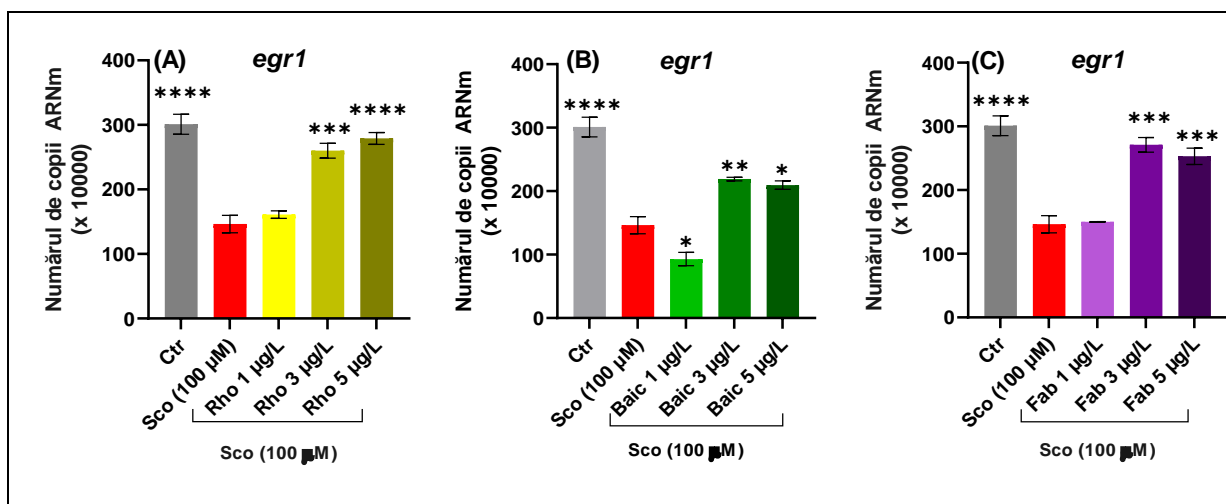


Figura 5.26 Efectele administrării tratamentului cu Rho (1, 3 și 5 $\mu\text{g/L}$), Baic (1, 3 și 5 $\mu\text{g/L}$) și Fab (1, 3 și 5 $\mu\text{g/L}$) asupra numărului de copii ARNm al genei *egr1* în creierul modelului de pește zebură al AD indus prin administrarea a 100 μM de Sco. Valorile sunt exprimate ca medii \pm S.E.M., ($n=3$ animale pe grup). ANOVA a relevat un efect semnificativ al tratamentului asupra numărului de copii ARNm al genei *egr-1*: (A) ($F(4, 10) = 37,33$, $p < 0,0001$); (B) ($F(4, 10) = 53,25$, $p < 0,0001$); (C) ($F(4, 10) = 35,76$, $p < 0,0001$). Pentru analizele post-hoc ale lui Tukey: * $p < 0,01$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$ și **** $p < 0,00001$.

Administrarea ulterioară a tratamentelor cu Rho, Baic și Fab, au reușit să restabilească într-un mod semnificativ numărul de copii ARNm al genei *egr-1* în creierul peștilor zebură (Figura 5.26 A, B și C). Testele de comparație multiple ale lui Tukey au arătat că atât tratamentul cu Rho, cât și cel cu Fab prezintă o eficiență similară în ameliorarea efectelor negative ale Sco asupra expresiei *egr-1* pentru concentrația de 3 $\mu\text{g/L}$ ($p < 0,001$). Însă în ceea ce privește concentrația de 5 $\mu\text{g/L}$, s-a observat un patern diferențiat de acțiune. Astfel, tratamentul cu Rho s-a dovedit a fi mai eficient în restabilirea numărului de copii ARNm al genei *egr-1* în creierul peștilor zebură față de tratamentul cu Fab ($p < 0,0001$, pentru tratamentul cu Rho în concentrația de 5 $\mu\text{g/L}$ și $p < 0,001$, pentru tratamentul cu Fab în

concentrația de 5 $\mu\text{g/L}$; Figura 5.26 A și C). În contrast, tratamentul cu Baic, a prezentat un efect mai modest în ceea ce privește restabilirea numărului de copii ARNm al genei *egr-1* în creierul peștilor zebură ($p < 0.05$ pentru concentrația de 5 $\mu\text{g/L}$ și $p < 0,05$ pentru concentrații de 3 $\mu\text{g/L}$) (Figura 5.26 B). Însă, în ceea ce privește concentrația de 1 $\mu\text{g/L}$, s-a observat că nici una dintre flavonoide nu a fost capabilă să inducă reglarea expresiei genei *egr-1*.

V.11.4 Efectele roifolinei, baicaleinei 5,6-dimetil eter și a agatisflavonei asupra expresiei genei factorului 2 legat de factorul nuclear eritroid 2a (NRF2)

În acest studiu, expunerea acută a peștilor zebură la tratamentul cu Sco în concentrație de (100 μM), a determinat o scădere semnificativă ($p < 0,0001$) a numărului de copii ARNm al genei *NRF2* în creierul peștilor zebură, în comparație cu peștii din grupul de control (Figura 5.27A, B și C). Administrarea cronică a tratamentului cu Rho (1, 3 și 5 $\mu\text{g/L}$) animalelor amnezice a determinat o creștere semnificativă a numărului de copii ARNm a genei *nrf2* ($p < 0,01$, pentru concentrația de 3 $\mu\text{g/L}$ și $p < 0,001$, pentru doza de 5 $\mu\text{g/L}$; Figura 5.27A).

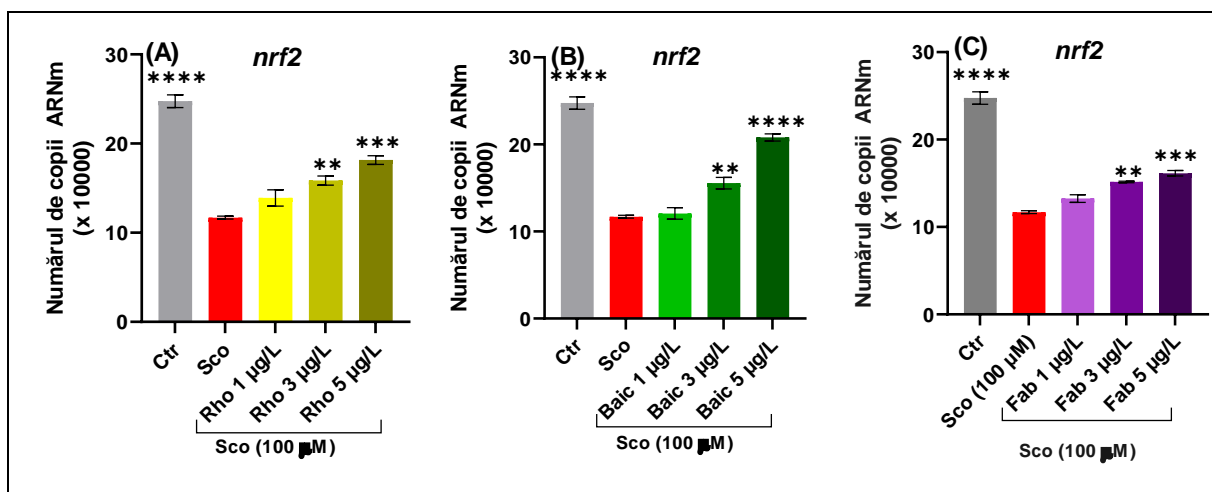


Figura 5.27 Efectele administrării tratamentului cu Rho (1, 3 și 5 $\mu\text{g/L}$), Baic (1, 3 și 5 $\mu\text{g/L}$) și Fab (1, 3 și 5 $\mu\text{g/L}$) asupra numărului de copii ARNm al genei *nrf2* în creierul modelului de pește zebură al AD indus prin administrarea a 100 μM de Sco. Valorile sunt exprimate ca medii \pm S.E.M., ($n = 3$ animale pe grup). ANOVA a relevat un efect semnificativ al tratamentului asupra numărului de copii ARNm al genei *nrf2*: (A) ($F(4, 10) = 67,11$, $p < 0,0001$); (B) ($F(4, 10) = 101,5$, $p < 0,0001$); (C) ($F(4, 10) = 153,5$, $p < 0,0001$). Pentru analizele post-hoc ale lui Tukey: * $p < 0,01$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$ și **** $p < 0,00001$.

În ceea ce privește efectele tratamentului cu Baic, testul Post-hoc al lui Tukey a arătat că tratamentul cronic cu Baic a reușit să restabilească într-un mod semnificativ expresia genei *nrf2*, însă s-a observat un patern diferențiat de eficiență. Astfel, s-a observat că tratamentul cu Baic în concentrațiile de 1 $\mu\text{g/L}$, nu a prezentat nici un efect asupra numărului copii ARNm a genei *nrf2*. În ceea ce privește tratamentul cu Baic în concentrația de 3 $\mu\text{g/L}$, aceasta a prezentat un potențial mai modest în ceea ce privește ameliorarea efectelor induse de Sco (100 μM), reușind totuși să crească într-un mod semnificativ din punct de vedere

statistic numărul de copii ARNm a genei *nrf2* ($p < 0,05$), față de grupul tratat cu Sco (100 μM) (Figura 5.27 B). În contrast, tratamentul cu Baic în concentrația de 5 $\mu\text{g/L}$ a reușit să restabilească într-un mod semnificativ numărul de copii ARNm a genei *nrf2* ($p < 0,0001$), ce a fost diminuat în urma administrării tratamentului cu Sco (100 μM) (Figura 5.27B).

De asemenea, după cum se observă în Figura 5.27 C, tratamentul cu Fab a amplificat într-un mod remarcabil numărul de copii ARNm a genei *nrf2* într-o manieră dependentă de doză. Astfel, testul Post-hoc al lui Tukey a arătat că tratamentul cronic cu Fab în concentrația de 1 $\mu\text{g/L}$ nu a prezentat nici un efect, în ceea ce privește numărul de copii ARNm a genei *nrf2* din creierul peștilor zebură, pe când tratamentele cu Fab, în concentrațiile mai mari de 3 și 5 $\mu\text{g/L}$, au reușit să restabilească într-o manieră semnificativă numărul de copii ARNm a genei *nrf2* ($p < 0,01$ pentru concentrația de 3 $\mu\text{g/L}$ și $p < 0,001$ pentru concentrația de 5 $\mu\text{g/L}$; Figura 5.27C).

V.11.5 Efectele roifolinei, baicalinei și a agatisflavonei asupra expresiei genei de legare a elementului de răspuns a AMPc (*creb1*)

Administrarea tratamentului cu Sco în concentrație de (100 μM) a indus o diminuare semnificativă a numărului de copii ARNm, al genei *creb1*, în creierul peștilor zebură, comparativ cu grupul de control ($p < 0,0001$; Figura 5.28). Administrarea ulterioară a tratamentului cu Rho a reușit să restabilească într-un mod semnificativ numărul de copii ARNm a genei *creb1* din creierul peștilor zebură, ce au fost diminuate, ca și consecință a administrării tratamentului cu Sco, atât în concentrația de 3 $\mu\text{g/L}$ ($p < 0,1$) cât și în concentrația de 5 $\mu\text{g/L}$ ($p < 0,0001$; Figura 5.28 A).

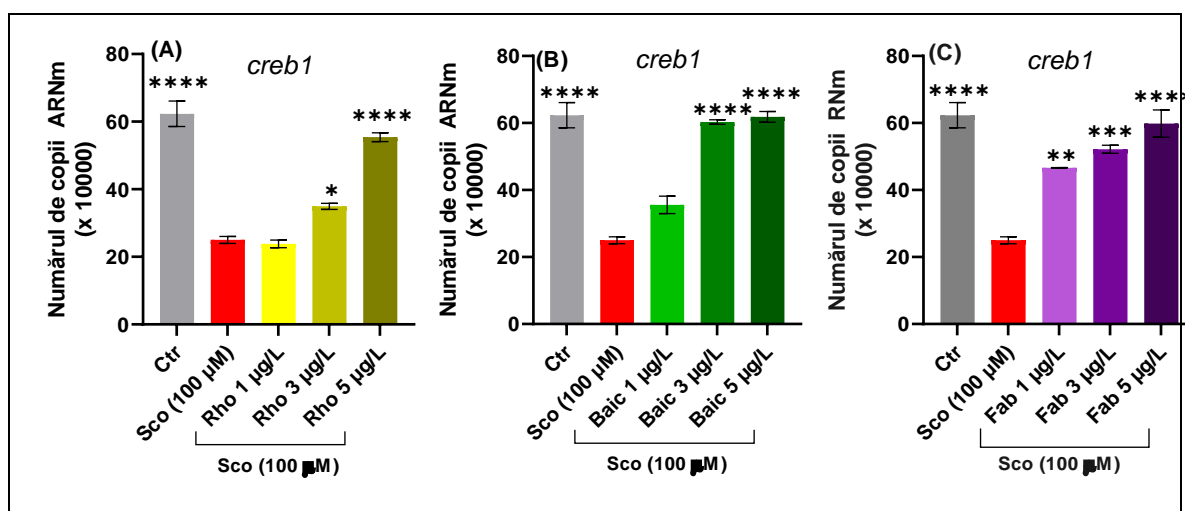


Figura 5.28. Efectele administrării tratamentului cu Rho (1, 3 și 5 $\mu\text{g/L}$), Baic (1, 3 și 5 $\mu\text{g/L}$) și Fab (1, 3 și 5 $\mu\text{g/L}$) asupra numărului de copii ARNm al genei *creb1* în creierul modelului de pește zebură al AD indus prin administrarea a 100 μM de Sco. Valorile sunt exprimate ca medii \pm S.E.M., ($n = 3$ animale pe grup). ANOVA a relevat un efect semnificativ al tratamentului asupra numărului de copii ARNm al genei *creb1*: (A) (F (4, 10)

= 81,45, $p < 0,0001$); (B) ($F(4, 10) = 92,87$, $p < 0,0001$); (C) ($F(4, 10) = 33,31$, $p < 0,0001$). Pentru analizele post-hoc ale lui Tukey: $*p < 0,01$, $**p < 0,001$, $***p < 0,0001$ și $****p < 0,00001$.

În ceea ce privește tratamentul cu Baic, s-a observat că această flavonoidă naturală a reușit să restabilească expresia genei *creb1* în creierul peștilor tratați cu Sco, doar în concentrațiile de 3 și 5 $\mu\text{g/L}$ ($p < 0,0001$; Figura 5.28 B). În ceea ce privește efectele tratamentelor cu Fab, asupra expresiei genei *creb1* la nivelul creierului peștilor zebra, s-a observat că aceasta a prezentat un patern diferențiat de acțiune. Astfel, tratamentul cu Fab, în concentrația de 1 $\mu\text{g/L}$, a reușit să intensifice într-un mod destul de modest expresia genei *creb1* ($p < 0,05$). În contrast, o influență mai mare a tratamentului cu Fab asupra expresiei genei *creb1* a fost observată în concentrațiile de 3 ($p < 0,001$) și 5 $\mu\text{g/L}$ ($p < 0,0001$; Figura 5.28 C).

V.12 Efectele roifolinei, baicaleinei 5,6-dimetil eter și a agatisflavonei asupra nivelului proteinelor de interes

V.12.1 Efectele roifolinei, baicaleinei 5,6-dimetil eter și a agatisflavonei asupra nivelului proteinei Creb1

Rezultatele studiului arată că, administrarea tratamentului cu Sco (100 μM), timp de 30 de minute peștilor zebra, a indus o diminuare semnificativă a nivelului proteinei Creb1 raportată la GAPDH, în comparație cu grupul de control (Figura 5.29).

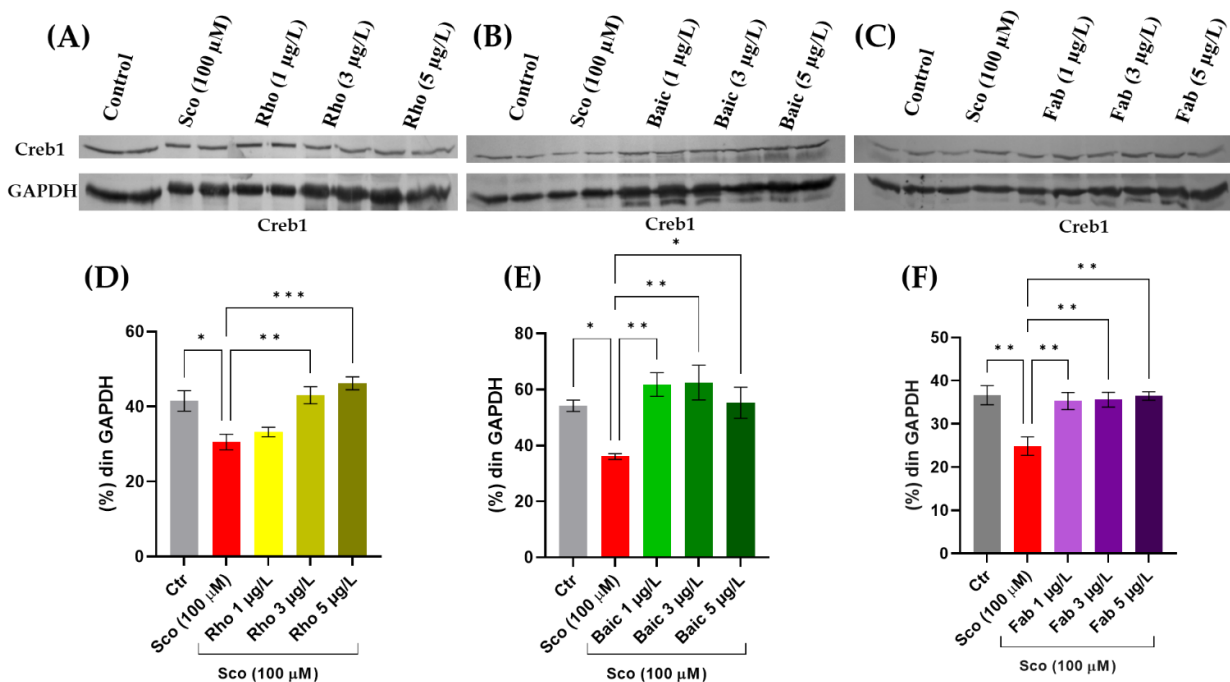


Figura 5.29 Benzile reprezentative ale nivelului de proteine CREB1 și GAPDH din țesutul cerebral al peștilor zebra, obținute prin tehnica de imunoblotting (A, B, C) și efectele administrării tratamentului cu Rho (1, 3 și 5

$\mu\text{g/L}$), Baic (1, 3 și 5 $\mu\text{g/L}$) și Fab (1, 3 și 5 $\mu\text{g/L}$) asupra nivelului proteinei Creb1, în creierul modelului de pește zebură al AD, indus prin administrarea a 100 μM de Sco (**D**, **E**, **F**). Abundența proteinei Creb1, a fost calculată prin raportarea sa la GAPDH. Valorile sunt exprimate ca medii \pm S.E.M., ($n=6$ probe pe grup). ANOVA a relevat un efect semnificativ al tratamentului asupra nivelului proteinei Creb1. **D**) ($F(4, 15) = 10,43, p=0,0003$); **E**) ($F(4, 25) = 5,539$); **F**) ($F(4, 25) = 7,233, p=0,0005$). Pentru analizele post-hoc ale lui Tukey: * $p < 0,01$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$ și **** $p < 0,00001$.

Administrarea tratamentului cu Rho a reglat semnificativ nivelurile de expresie ale proteinei Creb1 în creierul peștilor zebură tratați cu Sco, în special în concentrațiile de 3 $\mu\text{g/L}$ ($p < 0,01$) și 5 $\mu\text{g/L}$ ($p < 0,001$; Figura 5.29 D). În schimb, tratamentul cu Baic, s-a dovedit a fi mai eficient în concentrația de 1 $\mu\text{g/L}$ ($p < 0,01$) și 3 $\mu\text{g/L}$ ($p < 0,01$), în care a reușit să regleze într-un mod semnificativ nivelul proteinei Creb1, pe când în concentrația de Baic 5 $\mu\text{g/L}$, s-a dovedit a avea un efect mai modest ($p < 0,05$; Figura 5.29 E). În ceea ce privește tratamentul cu Fab s-a observat că această flavonoidă a reușit să regleze activitatea proteinei Creb1 în toate cele trei concentrații testate ($p < 0,01$, pentru concentrațiile de 1, 3 și 5 $\mu\text{g/L}$; Figura 5.29 F).

V.13 Corelații Pearson între parametrii comportamentali, biochimici și moleculari

Coeficientul de corelație Pearson (r) a fost calculat pentru a evalua corelația statistică între parametrii comportamentali și biochimici la peștii zebură, inclusiv latența de explorare, timpul petrecut în diferite zone ale acvariului, performanțele în teste de memorie și nivelurile de AChE și MDA (Figura 5.30). Datele sunt exprimate după cum urmează: Perioada de latență (s), timpul petrecut în zona superioară/inferioară a acvariului (s), timpul petrecut în brațul nou (% din timpul total), procentul de alternare spontană (%), timpul de explorare a ON (s), preferința (%), AChE (nmol ATCh/min/mg proteină), MDA (nmol/mg proteină). Perioada de latență (Figura 5.30 A) a arătat o corelație pozitivă semnificativă cu AChE ($r = 0,8752$), în contrast, raportul dintre timpul petrecut în zona superioară și timpul petrecut în zona inferioară a acvariului a arătat o corelație negativă, semnificativă din punct de vedere statistic cu MDA ($r = - 0,6424$; Figura 5.30 B). Totodată s-a identificat o corelație negativă semnificativă între timpul petrecut în brațul nou și AChE ($r = - 0,5263$; Figura 5.30 C), precum și între procentul de alternare spontană și MDA ($r = - 0,5759$; Figura 5.30 D). De asemenea, a fost observată o corelație negativă semnificativă între timpul de explorare a ON cu AChE ($r = - 0,4362$; Figura 5.30 E) și între preferința de explorare și MDA ($r = - 0,6298$; Figura 5.29F).

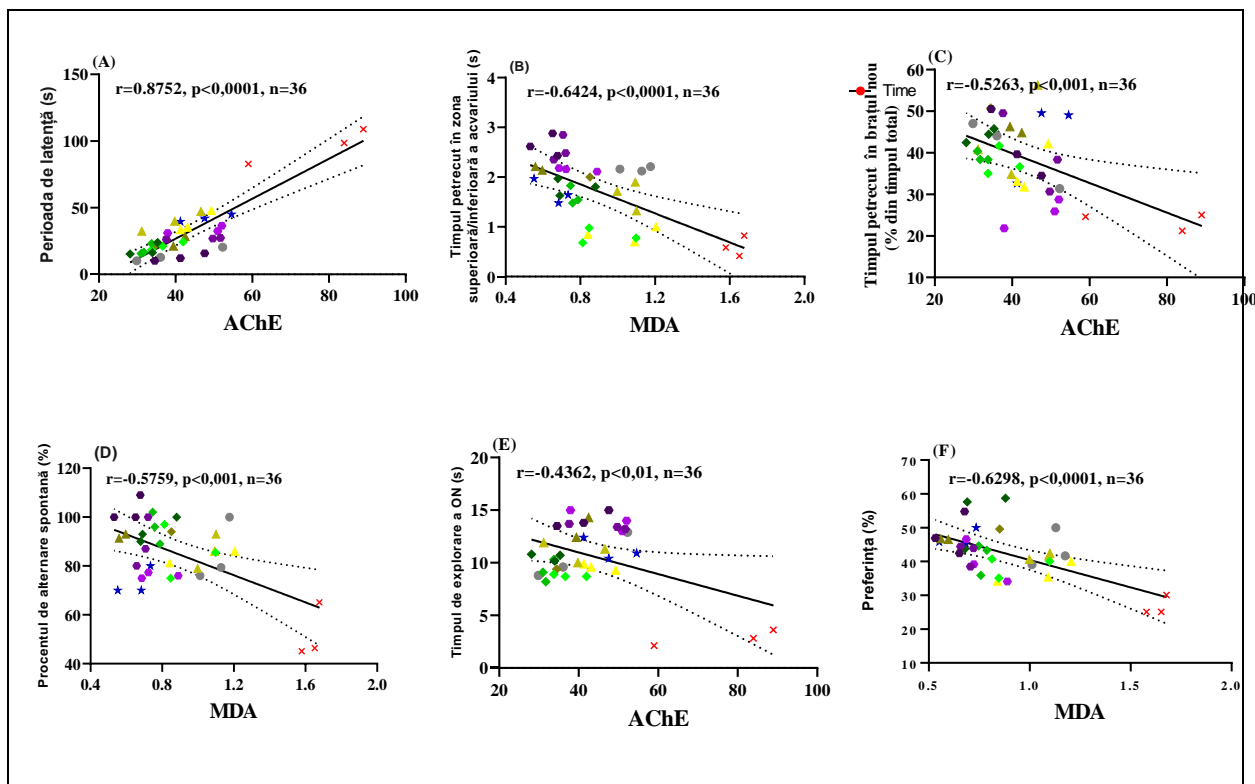
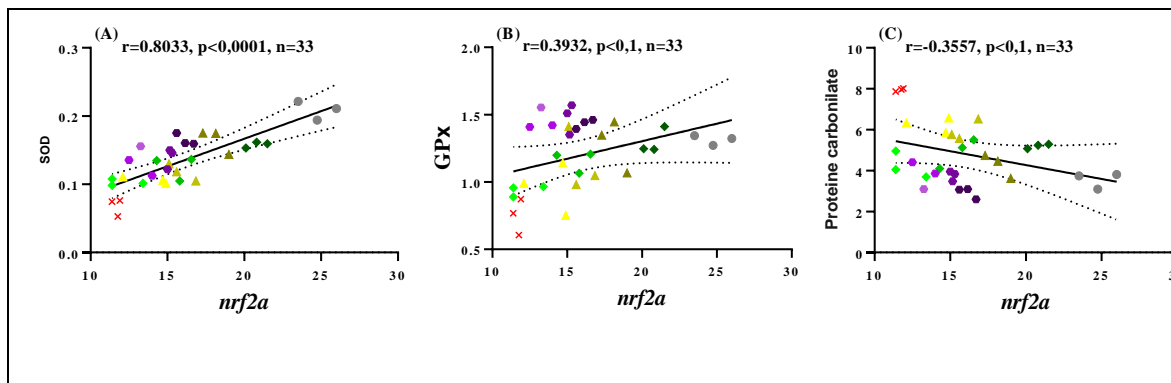


Figura 5.30 Coeficientul de corelație Pearson între parametrii comportamentali și cei biochimici. Valorile sunt exprimate ca medii \pm S.E.M., ($n=3$ animale pe grup). Analiza regresiei liniare a indicat o corelație pozitivă semnificativă între:

(A) perioada de latență și nivelul de AChE ($r = 0,8752$, $p < 0,0001$); (B) raportul dintre timpul petrecut în zona superioară și timpul petrecut în zona inferioară a acvariului și MDA ($r = - 0,6424$, $p < 0,0001$); (C) timpul petrecut în brațul nou și nivelul de AChE ($r = - 0,5263$, $p < 0,001$); (D) procentul de alternare spontană și nivelul de AChE ($r = - 0,5759$, $p < 0,001$); (E) timpul de explorare a ON și MDA ($r = - 0,4362$, $p < 0,01$); (F) preferința de explorare și nivelul de MDA ($r = - 0,6298$, $p < 0,0001$).

- Ctr, ✗ Sco (100 μ M), ★ GAL (1mg/mL), ▲ Rho 1 (μ g/L), ▲ Rho (3 μ g/L),
- Rho (5 μ g/L), ◆ Baic (1 μ g/L), ◆ Baic (3 μ g/L), ◆ Baic (5 μ g/L), ◆ Fab (1 μ g/L), ◆ Fab (3 μ g/L), ◆ Fab (5 μ g/L);

De asemenea, am efectuat analize de corelație între activitățile enzimatice, peroxidarea lipidelor și expresia genică, inclusiv activitatea SOD, CAT, GPX, AChE, nivelul de GSH, proteine carbonilate și expresia genică a genelor *bdnf*, *nrf2* și *creb1* (Figura 5.31).



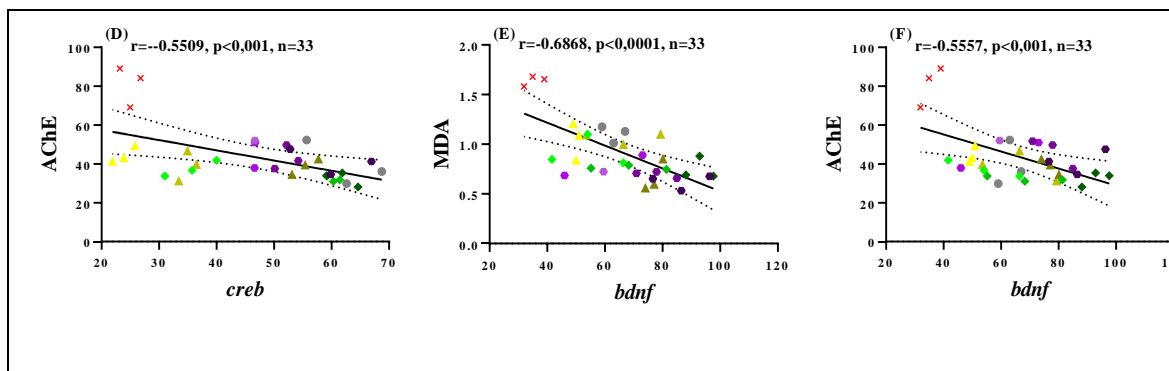


Figura 5.31 Coeficientul de corelație Pearson (r) între activitățile enzimatic, peroxidarea lipidelor și expresia absolută a genelor de interes. Valorile sunt exprimate ca medii \pm S.E.M., ($n = 3$ animale pe grup). Analiza regresiei liniare a indicat o corelație pozitivă semnificativă între:

(A) activitatea SOD și numărul de copii ARNm a genei *nrf2* ($r = 0,8033$, $p < 0,0001$); (B) activitatea GPx și numărul de copii ARNm a genei *nrf2* ($r = 0,3932$, $p < 0,05$); (C) nivelul de proteine carbonilate și numărul de copii ARNm a genei *nrf2* ($r = -0,3557$, $p < 0,05$); (D) activitatea AChE și numărul de copii ARNm a genei *creb1* ($r = -0,5509$, $p < 0,001$); (E) nivelul de MDA și numărul de copii ARNm a genei *bdnf* ($r = -0,686$, $p < 0,0001$); (F) activitatea AChE și numărul de copii ARNm a genei *bdnf* ($r = -0,557$, $p < 0,001$).

● Ctr, × Sco (100 μ M), ▲ Rho 1 (μ g/L), ▲ Rho (3 μ g/L), ▲ Rho (5 μ g/L),
 ◆ Baic (1 μ g/L), ◆ Baic (3 μ g/L), ◆ Baic (5 μ g/L), ◆ Fab (1 μ g/L), ◆ Fab (3 μ g/L), ◆ Fab (5 μ g/L).

Datele sunt exprimate după cum urmează: SOD (U/mg proteină), GPx (U/mg proteină), proteine carbonilate (nmoli/min/mg proteină), AChE (nmol ATCh/min/mg proteină), MDA (nmol/mg proteină), *bdnf* (număr de copii ARNm, $\div 10.000$), *nrf2* (număr de copii ARNm, $\div 10.000$), *creb1* (număr de copii ARNm, $\div 10.000$).

Activitatea SOD (Figura 5.33 A) și activitatea GPx (Figura 5.33 B) au arătat o corelație semnificativă pozitivă cu numărul de copii ARNm a genei *nrf2* cu r de 0,8033 (Figura 5.31 A) și cu r de 0,3932 (Figura 5.31 B), spre deosebire de nivelul de proteine carbonilate care a arătat o corelație semnificativă negativă cu numărul de copii ARNm a genei *nrf2*, cu r de -0,3557 (Figura 5.31 C). De asemenea, s-a observat o corelație negativă semnificativă între nivelul de MDA și activitatea AChE (Figura 5.31 F) cu numărul de copii ARNm a genei *bdnf*, cu r de -0,6868 (Figura 5.31 E) și r de -0,5557 (Figura 5.31 F). În mod similar, s-a identificat și o corelație semnificativ negativă între activitatea AChE cu numărul de copii ARNm a genei *creb1* cu r de -0,5509 (Figura 5.31 D).

Luată împreună, aceste rezultate au descoperit, pentru prima dată, că Rho, Baic și Fab exercită efecte de îmbunătățire cognitivă în amnezia indusă de Sco și au sugerat că ar putea fi niște potențiali compuși candidați pentru reglarea simptomelor neuropsihiatrice, menținerea și / sau îmbunătățirea proceselor cognitive, precum și în tratamentul unor boli neurodegenerative, cum ar fi AD.

CONCLUZII

Am efectuat acest studiu în vederea evaluării efectelor neurofarmacologice ale Rho, Baic și Fab, asupra performanței neurocognitive, a stării similare anxietății, a statusului oxidativ și a celui colinergic, a expresiei ARNm a factorului neurotrofic derivat din creier (*bdnf*), a neuropeptidei Y (*npv*), a proteinei 1 de răspuns a creșterii timpurii (*egr-1*), a factorului nuclear 2 legat de factorul eritroid 2 (*nrf2*) și a proteinei de legare a elementului de răspuns a AMPc (*creb1*), a nivelului proteinei Creb1, precum și a posibilității de îmbunătățire a memoriei la modelul de pește zebra al AD indus prin imersie în Sco. Având în vedere rezultatele acestui studiu, în concluzie afirmăm că:

- 1) Baic respectă toate cele cinci filtre farmacocinetice, sugerând că este un candidat promițător pentru dezvoltarea medicamentelor. În schimb, Rho și Fab încalcă aceste reguli, ceea ce sugerează o biodisponibilitate moderată. Baic prezintă alerte PAINS și Brenk, indicând o structură farmacologică potențial problematică, pe care Rho și Fab nu o au. Toți trei compuși au solubilitate orală scăzută, cu permeabilitate variată prin BBB și profile diferite de distribuție plasmatică.
- 2) Administrarea cronică a tratamentelor cu Rho, Baic și Fab la modelul de pește zebra al AD a determinat îmbunătățiri semnificative în activitatea locomotorie, comportamentul anxiolitic și procesele cognitive, demonstrând potențialul acestor flavonoide în restabilirea memoriei și a funcțiilor cognitive afectate.
- 3) Rho, Baic și Fab au prezentat efecte neuroprotective prin creșterea expresiei genelor implicate în procesele cognitive și de apărare antioxidantă, cum ar fi *bdnf*, *npv*, *egr-1*, *nrf2* și *creb1*, au ameliorat stresul oxidativ și disfuncția mitocondrială. De asemenea, acesta au demonstrat efecte anti-acetilcolinesterazice și au protejat proteinele și lipidele cerebrale de degradarea oxidativă, sugerându-se astfel potențialul lor neuroprotector
- 4) Deși flavonoidele studiate prezintă un profil neuroprotector promițător și pot reface degradarea memoriei în modele animale de AD, există încă limitări și discrepanțe în biodisponibilitatea lor între modelul peștilor zebra și mamifere. Este necesară cercetări suplimentare pentru a înțelege mai bine aplicabilitatea acestor compuși în ameliorarea degradării memoriei asociate cu AD și pentru a optimiza profilul lor farmacologic, în vederea posibilei lor utilizări clinice.

BIBLIOGRAFIE

1. **Findley CA, Bartke A, Hascup KN, Hascup ER.** *Amyloid Beta-Related Alterations to Glutamate Signaling Dynamics During Alzheimer's Disease Progression.* Vol. 11, ASN Neuro. SAGE Publications Inc.; 2019.
2. **Prince M, Comas-Herrera A, Knapp M, Guerchet M, Karagiannidou M.** *improving healthcare for people living with dementia: coverage, quality and costs now and in the future.* World Alzheimer report 2016
3. **Sochocka M, Diniz BS, Leszek J.** *Inflammatory Response in the CNS: Friend or Foe?* Vol. 54, Molecular Neurobiology. Humana Press Inc.; 2017. p. 8071–89.
4. **Allen S, Watson J, Dawbarn D.** *The Neurotrophins and Their Role in Alzheimers Disease.* Curr Neuropharmacol. 2011 Dec 5;9(4):559–73.
5. **Deture MA, Dickson DW.** *The neuropathological diagnosis of Alzheimer's disease.* Vol. 14, Molecular Neurodegeneration. BioMed Central Ltd.; 2019. p. 1–18.
6. **Ting LH, Chiel HJ, Trumbower RD, Allen JL, McKay JL, Hackney ME, et al.** *Neuromechanical principles underlying movement modularity and their implications for rehabilitation.* Vol. 86, Neuron. Cell Press; 2015. p. 38–54.
7. **Bhatti GK, Reddy AP, Reddy PH, Bhatti JS.** *Lifestyle Modifications and Nutritional Interventions in Aging-Associated Cognitive Decline and Alzheimer's Disease* Vol. 11, Frontiers in Aging Neuroscience. Frontiers Media S.A.; 2020. p. 369.
8. **Dan L. L. Harrison** - Manual de medicina, Harispon 2013. P. 163
9. **Pláteník J, Fišar Z, Buchal R, Jiráček R, Kitzlerová E, Zvěřová M, et al.** *GSK3 β , CREB, and BDNF in peripheral blood of patients with Alzheimer's disease and depression.* Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 2014 Apr 3;50:83–93.
10. **Moussa-Pacha NM, Abidin SM, Omar HA, Alniss H, Al-Tel TH.** *BACE1 inhibitors: Current status and future directions in treating Alzheimer's disease.* Med Res Rev. 2020 Jan 26 40(1):339–84.
11. **Bitner RS.** *Cyclic AMP response element-binding protein (CREB) phosphorylation: A mechanistic marker in the development of memory enhancing Alzheimer's disease therapeutics.* Biochem Pharmacol. 2012 Mar 15;83(6):705–14.

12. **Saha S, Buttari B, Profumo E, Tucci P, Saso L.** *A Perspective on Nrf2 Signaling Pathway for Neuroinflammation: A Potential Therapeutic Target in Alzheimer's and Parkinson's Diseases.* *Front Cell Neurosci.* 2022 Jan 21;15:551.
13. **Misra K, Pandey SC.** *Differences in basal levels of CREB and NPY in nucleus accumbens regions between C57BL/6 and DBA/2 mice differing in inborn alcohol drinking behavior.* *J Neurosci Res.* 2003 Dec 15;74(6):967–75.
14. **Huang EJ, Reichardt LF.** *Neurotrophins: Roles in Neuronal Development and Function.* *Annu Rev Neurosci.* 2001 ;24:677.
15. **Katche C, Goldin A, Gonzalez C, Bekinschtein P, Medina JH.** *Maintenance of long-term memory storage is dependent on late posttraining Egr-1 expression.* *Neurobiol Learn Mem.* 2012 Oct 1;98(3):220–7.
16. **Gøtzsche CR, Woldbye DPD.** *The role of NPY in learning and memory.* *Neuropeptides.* 2016 Feb 1;55:79–89.
17. **Brandes MS, Gray NE.** *NRF2 as a Therapeutic Target in Neurodegenerative Diseases.* *ASN Neuro.* 2020 Jan 21;12.
18. **Kolaj I, Imindu Liyanage S, Weaver DF.** *Phenylpropanoids and Alzheimer's disease: A potential therapeutic platform.* Vol. 120, *Neurochemistry International.* Elsevier Ltd; 2018. p. 99–111.
19. **Ayaz M, Sadiq A, Junaid M, Ullah F, Ovais M, Ullah I, et al.** *Flavonoids as Prospective Neuroprotectants and Their Therapeutic Propensity in Aging Associated Neurological Disorders.* *Front Aging Neurosci.* 2019;11(JUN).
20. **Lou SN, Ho CT.** *Phenolic compounds and biological activities of small-size citrus: Kumquat and calamondin.* Vol. 25, *Journal of Food and Drug Analysis.* Elsevier Taiwan LLC; 2017. p. 162–75.
21. **Bakhtiari M, Panahi Y, Ameli J, Darvishi B.** *Protective effects of flavonoids against Alzheimer's disease-related neural dysfunctions.* *Biomedicine & Pharmacotherapy.* 2017 Sep 1;93:218–29.
22. **Andrade AWL, Machado K da C, Machado K da C, Figueiredo DDR, David JM, Islam MT, et al.** *In vitro antioxidant properties of the biflavonoid agathisflavone.* *Chem Cent J.* 2018 Dec 1;12(1):75.
23. **Ding L, Jia C, Zhang Y, Wang W, Zhu W, Chen Y, et al.** *Baicalin relaxes vascular smooth muscle and lowers blood pressure in spontaneously hypertensive rats.* *Biomedicine and Pharmacotherapy.* 2019 Mar 1;111:325–30.

24. **Chen XQ, Mobley WC.** *Alzheimer disease pathogenesis: Insights from molecular and cellular biology studies of oligomeric A β and tau species.* Vol. 13, *Frontiers in Neuroscience.* Frontiers Media S.A.; 2019. p. 659.
25. **Meshalkina DA, Kysil E v., Warnick JE, Demin KA, Kalueff A v.** *Adult zebrafish in CNS disease modeling: A tank that's half-full, not half-empty, and still filling.* Vol. 46, *Lab Animal.* Nature Publishing Group; 2017. p. 378–87.
26. **Spence R, Gerlach G, Lawrence C, Smith C.** *The behaviour and ecology of the zebrafish, Danio rerio.* Vol. 83, *Biological Reviews.* 2008. p. 13–34.
27. **Ferreira-Vieira T, Guimaraes IM, Silva FR, M. Ribeiro F.** *Alzheimer's disease: Targeting the Cholinergic System.* *Curr Neuropharmacol.* 2016 Jan 26;14(1):101–15.
28. **Silverman DHS.** *Brain 18F-FDG PET in the diagnosis of neurodegenerative dementias: Comparison with perfusion SPECT and with clinical evaluations lacking nuclear imaging.* *Journal of Nuclear Medicine.* 2004 Apr 1;45(4):594–607.
29. **Sabogal-guáqueta, Ignacio M manco J, Marisol L rodriguez, Edison O, Gloria C gómez.** *triple transgenic Alzheimer ' s disease model mice.* 2016;134–45.
30. **Kumar A, Singh A, Ekavali.** *A review on Alzheimer's disease pathophysiology and its management: an update.* *Pharmacological Reports.* 2015 Apr 1;67(2):195–203.
31. **Alzheimer's Association.** *Alzheimer's disease facts and figures.* *Alzheimer's and Dementia.* 2018 Mar 1;14(3):367–429.
32. **Alzheimer's Association.** *Alzheimer's disease facts and figures.* *Alzheimer's and Dementia.* 2022 Apr 1;18(4):700–89.
33. **Siddappaji KK, Gopal S, Siddappaji KK, Gopal S.** *Molecular mechanisms in Alzheimer's disease and the impact of physical exercise with advancements in therapeutic approaches.* *AIMS Neuroscience* 2021 3:357. 2021;8(3):357–89.
34. **Sardoiwala MN, Kaundal B, Choudhury SR.** *Development of engineered nanoparticles expediting diagnostic and therapeutic applications across blood-brain barrier.* In: *Handbook of Nanomaterials for Industrial Applications.* Elsevier; 2018. p. 696–709.
35. **Alzheimer's Association.** *Alzheimer's disease facts and figures.* *Alzheimer's & Dementia.* 2019 Mar 1;15(3):321–87.
36. **Blennow K, de Leon MJ, Zetterberg H.** *Alzheimer's disease.* Vol. 368, *Lancet.* 2006. p. 387–403.

37. **Chan KY, Wu JJ, Liu L, Theodoratou E, Car J, Middleton L, et al.** *Epidemiology of Alzheimer's disease and other forms of dementia in China, 1990–2010: a systematic review and analysis.* The Lancet. 2013 Jun 8;381(9882):2016–23.
38. **Niu H, Álvarez-Álvarez I, Guillén-Grima F, Aguinaga-Ontoso I.** *Prevalence and incidence of Alzheimer's disease in Europe: A meta-analysis.* Neurología (English Edition). 2017 Oct 1;32(8):523–32.
39. **Montgomery W, Ueda K, Jorgensen M, Stathis S, Cheng Y, Nakamura T.** *Epidemiology, associated burden, and current clinical practice for the diagnosis and management of Alzheimer's disease in Japan.* Clinicoecon Outcomes Res. 2018 Jan 1;10:13.
40. **Takizawa C, Thompson PL, Van Walsem A, Faure C, Maier WC.** *Epidemiological and Economic Burden of Alzheimer's Disease: A Systematic Literature Review of Data across Europe and the United States of America.* Journal of Alzheimer's Disease. 2015 Jan 1;43(4):1271–84.
41. **Rajan KB, Weuve J, Barnes LL, Wilson RS, Evans DA.** *Prevalence and incidence of clinically diagnosed Alzheimer's disease dementia from 1994 to 2012 in a population study.* Alzheimer's & Dementia. 2019 Jan 1;15(1):1–7.
42. **Tahami Monfared AA, Byrnes MJ, White LA, Zhang Q.** *Alzheimer's Disease: Epidemiology and Clinical Progression.* Neurol Ther. 2022 Mar 14;1–17.
43. **Reitz C, Brayne C, Mayeux R.** *Epidemiology of Alzheimer disease.* Vol. 7, Nature Reviews Neurology. Nature Publishing Group; 2011. p. 137–52.
44. **Chui HC, Victoroff JI, Margolin M, Jagust W, Shankle R, Katzman R.** *Criteria for the diagnosis of IV dementia proposed by the state of California Alzheimer's disease diagnostic and treatment centers.* Neurology. 1992;42(3):473–80.
45. **Yildiz D.** *Alzheimers Disease Current and Future Perspectives.* Alzheimers Disease Current and Future Perspectives. 2016;
46. **Calabrò M, Rinaldi C, Santoro G, Crisafulli C.** *The biological pathways of Alzheimer disease: a review.* AIMS Neurosci. 2021;8(1):86.
47. **Bellenguez C, Grenier-Boley B, Lambert JC.** *Genetics of Alzheimer's disease: where we are, and where we are going.* Vol. 61, Current Opinion in Neurobiology. Elsevier Ltd; 2020. p. 40–8.
48. **Makin S.** *The amyloid hypothesis on trial.* Nature. 2018 Jul 26;559(7715):S4–7.

49. **Castellani RJ, Rolston RK, Smith MA.** *Alzheimer Disease. Disease-a-Month.* 2010 Sep 1;56(9):484–546.
50. **Bellenguez C, Küçükali F, Jansen IE, Klei L, Moreno-Grau S, Amin N, et al.** *New insights into the genetic etiology of Alzheimer's disease and related dementias.* *Nature Genetics* 2022 54:4. 2022 Apr 4;54(4):412–36.
51. **Tait SWG, Green DR.** *Mitochondria and cell signalling.* Vol. 125, *Journal of Cell Science.* The Company of Biologists Ltd; 2012. p. 807–15.
52. **Maruszak A, Zekanowski C.** *Mitochondrial dysfunction and Alzheimer's disease.* *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2011 Mar 30;35(2):320–30.
53. **Murphy KE, Park JJ.** *Can co-activation of Nrf2 and neurotrophic signaling pathway slow Alzheimer's disease?* *Int J Mol Sci.* 2017;18(6).
54. **Butterfield DA.** *Brain lipid peroxidation and Alzheimer disease: Synergy between the Butterfield and Mattson laboratories.* *Ageing Res Rev.* 2020 Dec 1;64.
55. **Wang W, Zhao F, Ma X, Perry G, Zhu X.** *Mitochondria dysfunction in the pathogenesis of Alzheimer's disease: recent advances.* *Molecular Neurodegeneration* 2020 15:1. 2020 May 29;15(1):1–22.
56. **Noori T, Dehpour AR, Sureda A, Sobarzo-Sanchez E, Shirooie S.** *Role of natural products for the treatment of Alzheimer's disease.* *Eur J Pharmacol.* 2021 May 5;898:173974.
57. **Baum L, Chan IHS, Cheung SKK, Goggins WB, Mok V, Lam L, et al.** *Serum zinc is decreased in Alzheimer's disease and serum arsenic correlates positively with cognitive ability.* *BioMetals.* 2010 Feb 13; 23(1):173–9.
58. **H. Ferreira-Vieira T, M. Guimaraes I, R. Silva F, M. Ribeiro F.** *Alzheimer's disease: Targeting the Cholinergic System.* *Curr Neuropharmacol.* 2016 Jan 26;14(1):101–15.
59. **Chen ZR, Huang JB, Yang SL, Hong FF.** *Role of Cholinergic Signaling in Alzheimer's Disease.* *Molecules,* Vol 27, Page 1816. 2022 Mar 10;27(6):1816.
60. **Stanciu GD, Luca A, Rusu RN, Bild V, Chiriac SIB, Solcan C, et al.** *Alzheimer's disease pharmacotherapy in relation to cholinergic system involvement.* Vol. 10, *Biomolecules.* MDPI AG; 2020. p. 40.
61. **Schliebs R, Arendt T.** *The cholinergic system in aging and neuronal degeneration.* *Behavioural Brain Research.* 2011 Aug 10;221(2):555–63.

62. **Hampel H, Marsel M, Claudio C, Martin F, Ezio G, George G, et al.** *The Cholinergic System and Alzheimer's Disease*. Medscape. 2018.
63. **Arosio P.** *Biophysical Aspects of Alzheimer's Disease: Implications for Pharmaceutical Sciences: Theme: Drug Discovery, Development and Delivery in Alzheimer's Disease* Vol. 34, Pharmaceutical Research. Springer New York LLC; 2017. p. 2628–36.
64. **Haass C.** *Take five—BACE and the γ -secretase quartet conduct Alzheimer's amyloid β -peptide generation*. EMBO J. 2004 Feb 11;23(3):483–8.
65. **Jorissen E, Prox J, Bernreuther C, Weber S, Schwanbeck R, Serneels L, et al.** *The Disintegrin/Metalloproteinase ADAM10 Is Essential for the Establishment of the Brain Cortex*. Journal of Neuroscience. 2010 Apr 7;30(14):4833–44.
66. **De Felice FG, Velasco PT, Lambert MP, Viola K, Fernandez SJ, Ferreira ST, et al.** *$A\beta$ oligomers induce neuronal oxidative stress through an N-methyl-D-aspartate receptor-dependent mechanism that is blocked by the Alzheimer drug memantine*. Journal of Biological Chemistry. 2007 Apr 13;282(15):11590–601.
67. **Saraceno C, Musardo S, Marcello E, Pelucchi S, di Luca M.** *Modeling Alzheimer's disease: From past to future*. Front Pharmacol. 2013;4 JUN:77.
68. **Selkoe DJ.** *Toward a Comprehensive Theory for Alzheimer's Disease. Hypothesis: Alzheimer's Disease Is Caused by the Cerebral Accumulation and Cytotoxicity of Amyloid β -Protein*. Ann N Y Acad Sci. 2000 Dec 1;924(1):17–25.
69. **Kumar S, Pandey AK.** *Free Radicals: Health Implications and their Mitigation by Herbs*. Br J Med Med Res. 2015 Feb 27;438–57.
70. **Kocahan S, Doğan Z.** *Mechanisms of Alzheimer's disease pathogenesis and prevention: The brain, neural pathology, N-methyl-D-Aspartate receptors, tau protein and other risk factors*. Vol. 15, Clinical Psychopharmacology and Neuroscience. Korean College of Neuropsychopharmacology; 2017. p. 1–8.
71. **Medeiros R, Baglietto-Vargas D, Laferla FM.** *[The Role of Tau in Alzheimer's Disease and Related Disorders]*. Vol. 17, CNS Neuroscience and Therapeutics. Wiley-Blackwell; 2011. p. 514–24.
72. **Salloway S, Sevigny J, Bain LJ, Hendrix JA, Carrillo MC.** *Combination therapy for Alzheimer's disease: Are we ready?* Alzheimer's & Dementia. 2018 Sep;14(9):1232–3.
73. **Agamonolis D.** *Alzheimer's disease*. Neuropathology. 2018;

74. **Jiao S, Shen L, Zhu C, Bu X, Liu Y, Liu C, et al.** *Brain-derived neurotrophic factor protects against tau-related neurodegeneration of Alzheimer's disease.* *Transl Psychiatry.* 2016 Oct 4; 6(10).
75. **Rocher AB, Crimins JL, Amatrudo JM, Kinson MS, Todd-Brown MA, Lewis J, et al.** *Structural and functional changes in tau mutant mice neurons are not linked to the presence of NFTs.* *Exp Neurol.* 2010 Jun 1;223(2):385–93.
76. **Serrano-Pozo A, Frosch MP, Masliah E, Hyman BT.** *Neuropathological alterations in Alzheimer disease.* *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2011 Sep;1(1).
77. **Ising C, Venegas C, Zhang S, Scheiblich H, Schmidt S v., Vieira-Saecker A, et al.** *NLRP3 inflammasome activation drives tau pathology.* *Nature* 2019 575:7784. 2019 Nov 20;575(7784):669–73.
78. **Tondo G, Iaccarino L, Caminiti SP, Presotto L, Santangelo R, Iannaccone S, et al.** *The combined effects of microglia activation and brain glucose hypometabolism in early-onset Alzheimer's disease.* *Alzheimers Res Ther.* 2020 Apr 30;12(1):1–10.
79. **Guerriero F, Sgarlata C, Francis M, Maurizi N, Faragli A, Perna S, et al.** *Neuroinflammation, immune system and Alzheimer disease: searching for the missing link.* Vol. 29, *Aging Clinical and Experimental Research.* Springer International Publishing; 2017. p. 821–31.
80. **Skaper SD, Facci L, Zusso M, Giusti P.** *An inflammation-centric view of neurological disease: Beyond the neuron.* *Front Cell Neurosci.* 2018 Mar 21;12:72.
81. **Killin LOJ, Starr JM, Shiue IJ, Russ TC.** *Environmental risk factors for dementia: a systematic review.* *BMC Geriatr.* 2016 Oct 12;16(1):1–28.
82. **Rosendorff C, Beeri MS, Silverman JM.** *Cardiovascular Risk Factors for Alzheimer's Disease.* *Am J Geriatr Cardiol.* 2007 Mar 1;16(3):143–9.
83. **Pearson RCA, Esiri MM, Hiorns RW, Wilcock GK, Powell TP.** *Anatomical correlates of the distribution of the pathological changes in the neocortex in Alzheimer disease.* *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1985;82(13):4531–4.
84. **Braak H, Braak E.** *Neuropathological stageing of Alzheimer-related changes.* Vol. 82, *Acta Neuropathologica.* Springer-Verlag; 1991. p. 239–59.
85. **Perl DP.** *Neuropathology of Alzheimer's disease.* *Mt Sinai J Med.* 2010 Jan;77(1):32–42.

86. **Zuccato C, Cattaneo E.** *Brain-derived neurotrophic factor in neurodegenerative diseases.* Nat Rev Neurol. 2009;5(6):311–22.
87. **Colucci-D'amato L, Speranza L, Volpicelli F.** *Neurotrophic Factor BDNF, Physiological Functions and Therapeutic Potential in Depression, Neurodegeneration and Brain Cancer.* IJMS. 2020, Vol 21, Page 7777. 2020 Oct 21;21(20):7777.
88. **Fahnestock M, Garzon D, Holsinger RMD, Michalski B.** *Neurotrophic factors and Alzheimer's disease: are we focusing on the wrong molecule?* Journal of Neural Transmission, Supplement. 2002;(62):241–52.
89. **García-Suárez PC, Rentería I, Plaisance EP, Moncada-Jiménez J, Jiménez-Maldonado A.** *The effects of interval training on peripheral brain derived neurotrophic factor (BDNF) in young adults: a systematic review and meta-analysis.* Scientific Reports 2021 11:1. 2021 Apr 26;11(1):1–14.
90. **Li Q, Li QQ, Jia JN, Sun QY, Zhou HH, Jin WL, et al.** *Baicalein exerts neuroprotective effects in FeCl3-induced posttraumatic epileptic seizures via suppressing ferroptosis.* Front Pharmacol. 2019 Jun 7;10(JUN):638.
91. **Bertocchi I, Mele P, Ferrero G, Oberto A, Carulli D, Eva C.** *NPY-Y1 receptor signaling controls spatial learning and perineuronal net expression.* Neuropharmacology. 2021 Feb 15;184:108425.
92. **Reid HMO, Chen-Mack N, Snowden T, Christie BR.** *Understanding Changes in Hippocampal Interneurons Subtypes in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease: A Systematic Review..* 2021 Apr 13;11(3):159–79.
93. **Hendrickx A, Pierrot N, Tasiaux B, Schakman O, Brion JP, Kienlen-Campard P, et al.** *Epigenetic Induction of EGR-1 Expression by the Amyloid Precursor Protein during Exposure to Novelty.* PLoS One. 2013 Sep 16;8(9):e74305.
94. **Hu YT, Chen XL, Huang SH, Zhu Q Bin, Yu SY, Shen Y, et al.** *Early growth response-1 regulates acetylcholinesterase and its relation with the course of Alzheimer's disease.* Brain Pathol. 2019 Jul 1;29(4):502–12.
95. **Gallo FT, Kathe C, Morici JF, Medina JH, Weisstaub N V.** *Immediate early genes, memory and psychiatric disorders: Focus on c-Fos, Egr1 and Arc.* Front Behav Neurosci. 2018 Apr 25;12:79.
96. **Cuadrado A.** *NRF2 in neurodegenerative diseases.* Curr Opin Toxicol. 2016 Dec 1;1:46–53.

97. **Ramsey CP, Glass CA, Montgomery MB, Lindl KA, Ritson GP, Chia LA, et al.** *Expression of Nrf2 in Neurodegenerative Diseases.* JNEN. 2007 Jan 1;66(1):75–85.
98. **Kerr JS, Adriaanse BA, Greig NH, Mattson MP, Cader MZ, Bohr VA, et al.** *Mitophagy and Alzheimer's Disease: Cellular and Molecular Mechanisms.* Trends Neurosci. 2017 Mar 1;40(3):151–66.
99. **Saha S, Buttari B, Profumo E, Tucci P, Saso L.** *A Perspective on Nrf2 Signaling Pathway for Neuroinflammation: A Potential Therapeutic Target in Alzheimer's and Parkinson's Diseases.* Front Cell Neurosci. 2022 Jan 21;15:551.
100. **Carlezon WA, Duman RS, Nestler EJ.** *The many faces of CREB.* Trends Neurosci. 2005 Aug 1;28(8):436–45.
101. **Teich AF, Nicholls RE, Puzzo D, Fiorito J, Purgatorio R, Fa' M, et al.** *Synaptic Therapy in Alzheimer's Disease: A CREB-centric Approach.* Neurotherapeutics 2015 12:1. 2015 Jan 10; 12(1):29–41.
102. **Amidfar M, de Oliveira J, Kucharska E, Budni J, Kim YK.** *The role of CREB and BDNF in neurobiology and treatment of Alzheimer's disease.* Life Sci. 2020 Sep 15;257:118020.
103. **DaRocha-Souto B, Coma M, Pérez-Nievas BG, Scotton TC, Siao M, Sánchez-Ferrer P, et al.** *Activation of glycogen synthase kinase-3 beta mediates β -amyloid induced neuritic damage in Alzheimer's disease.* Neurobiol Dis. 2012 Jan 1;45(1):425–37.
104. **Tiwari V, Mishra A, Singh S, Mishra SK, Sahu KK, Parul, et al.** *Protriptyline improves spatial memory and reduces oxidative damage by regulating NF κ B-BDNF/CREB signaling axis in streptozotocin-induced rat model of Alzheimer's disease.* Brain Res. 2021 Mar 1;1754:147261.
105. **Bishop NA, Lu T, Yankner BA.** *Neural mechanisms of ageing and cognitive decline.* Vol. 464, Nature. Nature Publishing Group; 2010. p. 529–35.
106. **Apostolova LG.** *Alzheimer disease.* Vol. 22, C. Lifelong Learning in Neurology. Lippincott Williams and Wilkins; 2016. p. 419–34.
107. **Lopez OL, Kuller LH.** *Epidemiology of aging and associated cognitive disorders: Prevalence and incidence of Alzheimer's disease and other dementias.* In: *Handbook of Clinical Neurology.* Elsevier B.V.; 2019. p. 139–48.

108. **Gaspary KV, Reolon GK, Gusso D, Bonan CD.** *Novel object recognition and object location tasks in zebrafish: Influence of habituation and NMDA receptor antagonism.* Neurobiol Learn Mem. 2018 Nov 1;155:249–60.
109. **Hinz FI, Aizenberg M, Tushev G, Schuman EM.** *Protein Synthesis-Dependent Associative Long-Term Memory in Larval Zebrafish.* Journal of Neuroscience. 2013 Sep 25; 33(39):15382–7.
110. **Shao X, Cui W, Xie X, Ma W, Zhan Y, Lin Y.** *Treatment of Alzheimer's disease with framework nucleic acids.* Cell Prolif. 2020 Apr 12;53(4).
111. **Chae SC, Lee JH, Park SU.** *Recent studies on flavonoids and their antioxidant activities.* EXCLI J. 2013; 12:226–30.
112. **Takahashi A, Ohnishi T.** *The significance of the study about the biological effects of solar ultraviolet radiation using the Exposed Facility on the International Space Station.* Biological sciences in space. 2004;18(4):255–60.
113. **Maugeri A, Ferlazzo N, Luca L de, Gitto R, Navarra M.** *The link between the AMPK/SIRT1 axis and a flavonoid-rich extract of Citrus bergamia juice: A cell-free, in silico, and in vitro study.* Phytotherapy Research 2019 Jul 1;33(7):1805–14.
114. **Hamsalakshmi, Alex AM, Arehally Marappa M, Joghee S, Chidambaram SB.** *Therapeutic benefits of flavonoids against neuroinflammation: a systematic review.* Inflammopharmacology 2021 30:1. 2022 Jan 15;30(1):111–36.
115. **Sharma P, Sharma S, Singh D.** *Apigenin reverses behavioural impairments and cognitive decline in kindled mice via CREB-BDNF upregulation in the hippocampus.* Nutr Neurosci. 2020 Feb 1;23(2):118–27.
116. **Thakur A, Chaudhary A, Singh Tuli H, Sharma AK.** *Emerging Trends in Flavonoid Research and Associated Toxicity. In: Current Aspects of Flavonoids: Their Role in Cancer Treatment.* Singapore: Springer Singapore; 2019. p. 139–48.
117. **Karak P.** *Biological activities of flavonoids: an overview.* International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research. 2019;10(4):1567.
118. **Sharma P, Kumar A, Singh D.** *Dietary Flavonoids Interaction with CREB-BDNF Pathway: An Unconventional Approach for Comprehensive Management of Epilepsy.* Curr Neuropharmacol. 2019 Aug 10;17(12):1158.
119. **Cruchaga C, Karch CM, Jin SC, Benitez BA, Cai Y, Guerreiro R, et al.** *Rare coding variants in the phospholipase D3 gene confer risk for Alzheimer's disease.* Nature. 2014 Dec 11;505(7484):550–4.

120. **Youdim KA, Qaiser MZ, Begley DJ, Rice-Evans CA, Abbott NJ.** *Flavonoid permeability across an in situ model of the blood-brain barrier.* *Free Radic Biol Med.* 2004 Mar 1;36(5):592–604.
121. **Rendeiro C, Rhodes JS.** *Dietary flavonoids and brain health in aging: food for thought.* *Factors Affecting Neurological Aging.* 2021 Jan 1;589–601.
122. **Sam SK, Ji YL, Yoo KC, Sun SS, Ju SK, Su JJ, et al.** *Neuroprotective effects of naturally occurring biflavonoids.* *Bioorg Med Chem Lett.* 2005;15(15):3588–91.
123. **Jaeger BN, Parylak SL, Gage FH.** *Mechanisms of dietary flavonoid action in neuronal function and neuroinflammation.* *Mol Aspects Med.* 2018 Jun 1;61:50–62.
124. **Williams RJ, Spencer JPE.** *Flavonoids, cognition, and dementia: Actions, mechanisms, and potential therapeutic utility for Alzheimer disease.* *Free Radic Biol Med.* 2012;52(1):35–45.
125. **Hole KL, Williams RJ.** *Flavonoids as an Intervention for Alzheimer's Disease: Progress and Hurdles Towards Defining a Mechanism of Action.* *Brain Plasticity.* 2020 Jan 1;6(2):167–92.
126. **Gong EJ, Park HR, Kim ME, Piao S, Lee E, Jo DG, et al.** *Morin attenuates tau hyperphosphorylation by inhibiting GSK3 β .* *Neurobiol Dis.* 2011 Nov;44(2):223–30.
127. **Kong ANT, Yu R, Chen C, Mandlekar S, Primiano T.** *Signal transduction events elicited by natural products: Role of MAPK and caspase pathways in homeostatic response and induction of apoptosis.* *Archives of Pharmacal Research* 1999 23:1. 2000; 23(1):1–16.
128. **Guo LT, Wang SQ, Su J, Xu LX, Ji ZY, Zhang RY, et al.** *Baicalin ameliorates neuroinflammation-induced depressive-like behavior through inhibition of toll-like receptor 4 expression via the PI3K/AKT/FoxO1 pathway.* *J Neuroinflammation.* 2019 May 8; 16(1):1–21.
129. **Refaat J, Yehia SY, Ramadan MA, Kamel MS.** *Rhoifolin: a review of sources and biological activities Natural products from sponge derived actinomycetes View project No project View project.* *International Journal of Pharmacognosy.* 2015
130. **Hattori S, Matsuda H.** *Rhoifolin, a new flavone glycoside, isolated from the leaves of *Rhus succedanea*.* *Arch Biochem Biophys.* 1952 May;37(1):85–9.
131. **Eldahshan OA.** *Rhoifolin; A Potent Antiproliferative Effect on Cancer Cell Lines.* *Journal of Pharmaceutical Research.* 2013;3(1):46–53.

132. **Peng S, Hu C, Liu X, Lei L, He G, Xiong C, et al.** *Rhoifolin regulates oxidative stress and proinflammatory cytokine levels in Freund's adjuvant-induced rheumatoid arthritis via inhibition of NF- κ B.* Brazilian Journal of Medical and Biological Research. 2020; 53(6).
133. **Aoki C, Takeuchi Y, Higashi K, Okamoto Y, Nakanishi A, Tandia M, et al.** *Structural elucidation of a novel transglycosylated compound α -glucosyl rhoifolin and of α -glucosyl rutin by NMR spectroscopy.* Carbohydr Res. 2017 Apr; 443–444:37–41.
134. **Liao S, Song F, Feng W, Ding X, Yao J, Song H, et al.** *Rhoifolin ameliorates titanium particle-stimulated osteolysis and attenuates osteoclastogenesis via RANKL-induced NF- κ B and MAPK pathways.* J Cell Physiol. 2019 Oct 1;234(10):17600–11.
135. **Toshimitsu H, Ken T.** *MassBank High Quality Mass Spectral Database.* 2016. MassBank of North America.
136. **Sowndhararajan K, Deepa P, Kim M, Park SJ, Kim S.** *Baicalein as a potent neuroprotective agent: A review.* Biomed. & Pharm.. 2017 Nov 1;95:1021–32.
137. **De Oliveira MR, Nabavi SF, Habtemariam S, Erdogan Orhan I, Daglia M, Nabavi SM.** *The effects of baicalein and baicalin on mitochondrial function and dynamics: A review.* Pharmacol Res. 2015 Oct 1;100:296–308.
138. **Ren M, Zhao Y, He Z, Lin J, Xu C, Liu F, et al.** *Baicalein inhibits inflammatory response and promotes osteogenic activity in periodontal ligament cells challenged with lipopolysaccharides.* BMC Complement Med Ther. 2021 Dec 1;21(1):1–11.
139. **Shrestha S, Lee DY, Park JH, Cho JG, Lee DS, Li B, et al.** *Flavonoids from the fruits of Nepalese sumac (*Rhus parviflora*) attenuate glutamate-induced neurotoxicity in HT22 cells.* Food Sci Biotechnol. 2013;22(4):895–902.
140. **Dumitru G, El-Nashar HAS, Mostafa NM, Eldahshan OA, Boianjiu RS, Todirascu-Ciornea E, et al.** *Agathisflavone isolated from *Schinus polygamus* (Cav.) Cabrera leaves prevents scopolamine-induced memory impairment and brain oxidative stress in zebrafish (*Danio rerio*).* Phytomedicine. 2019;58 (December 2018): 152889.
141. **Van Dam D, De Deyn PP.** *Animal models in the drug discovery pipeline for Alzheimer's disease.* Br J Pharmacol. 2011 Oct 1;164(4):1285–300.

142. **Adams MM, Kafaligonul H.** *Zebrafish—A Model Organism for Studying the Neurobiological Mechanisms Underlying Cognitive Brain Aging and Use of Potential Interventions.* *Front Cell Dev Biol.* 2018 Nov 1;6(NOV):135.
143. **Stewart A, Gaikwad S, Kyzar E, Green J, Roth A, Kalueff A V.** *Modeling anxiety using adult zebrafish: A conceptual review.* *In: Neuropharmacology.* Pergamon; 2012. p. 135–43.
144. **Tan JK, Nazar FH, Makpol S, Teoh SL.** *Zebrafish: A Pharmacological Model for Learning and Memory Research.* *Molecules.* 2022 Nov 1;27(21):7374.
145. **Choi TY, Choi TI, Lee YR, Choe SK, Kim CH.** *Zebrafish as an animal model for biomedical research.* *Experimental & Molecular Medicine* 2021 53:3. 2021 Mar 1;53(3):310–7.
146. **Saleem S, Kannan RR.** *Zebrafish: an emerging real-time model system to study Alzheimer's disease and neurospecific drug discovery.* *Cell Death Discovery* 2018 4:1. 2018 Oct 3;4(1):1–13.
147. **Tufi S, Leonards P, Lamoree M, de Boer J, Legler J, Legradi J.** *Changes in Neurotransmitter Profiles during Early Zebrafish (Danio rerio) Development and after Pesticide Exposure.* *Environ Sci Technol.* 2016 Mar 15;50(6):3222–30.
148. **Santana S, Rico EP, Burgos JS.** *Can zebrafish be used as animal model to study Alzheimer's disease?.* Vol. 1, *American Journal of Neurodegenerative Diseases.* E-Century Publishing Corporation; 2012. p. 32–48.
149. **d'Amora M, Giordani S.** *The Utility of Zebrafish as a Model for Screening Developmental Neurotoxicity.* *Front Neurosci.* 2018 Dec 18;12:976.
150. **Kalueff A V., Stewart AM, Gerlai R.** *Zebrafish as an emerging model for studying complex brain disorders.* *Trends Pharmacol Sci.* 2014 Feb;35(2):63.
151. **Gerlai R.** *Evolutionary conservation, translational relevance and cognitive function: The future of zebrafish in behavioral neuroscience.* *Neurosci Biobehav Rev.* 2020 Sep 1;116:426–35.
152. **Teame T, Zhang Z, Ran C, Zhang H, Yang Y, Ding Q, et al.** *The use of zebrafish (Danio rerio) as biomedical models.* *Animal Frontiers.* 2019 Jun 25;9(3):68–77.
153. **Smith DA, Jones BC, Walker DK.** *Design of drugs involving the concepts and theories of drug metabolism and pharmacokinetics.* *Med Res Rev.* 1996 May 1;16(3):243–66.

154. **Daina A, Michielin O, Zoete V.** *SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules.* Scientific Reports 2017 7:1. 2017 Mar 3;7(1):1–13.
155. **Gad EM, Nafie MS, Eltamany EH, Hammad MSAG, Barakat A, Barakat A, et al.** *Discovery of New Apoptosis-Inducing Agents for Breast Cancer Based on Ethyl 2-Amino-4,5,6,7-Tetra Hydrobenzo[b]Thiophene-3-Carboxylate: Synthesis, In Vitro, and In Vivo Activity Evaluation.* Molecules 2020, Vol 25, Page 2523. 2020 May 28; 25(11):2523.
156. **Wang X, Shen Y, Wang S, Li S, Zhang W, Liu X, et al.** *PharmMapper 2017 update: a web server for potential drug target identification with a comprehensive target pharmacophore database.* Nucleic Acids Res. 2017 Jul 3;45(W1):W356–60.
157. **Filimonov DA, Lagunin AA, Glorizova TA, Rudik A V., Druzhilovskii DS, Pogodin P V., et al.** *Prediction of the biological activity spectra of organic compounds using the pass online web resource.* Chem Heterocycl Compd (N Y). 2014 May 28;50(3):444–57.
158. **Tripathy A, Raichur AM, Chandrasekaran N, Prathna TC, Mukherjee A.** *Process variables in biomimetic synthesis of silver nanoparticles by aqueous extract of Azadirachta indica (Neem) leaves.* Journal of Nanoparticle Research. 2010 Jan;12(1):237–46.
159. **Daina A, Michielin O, Zoete V.** *SwissTargetPrediction: updated data and new features for efficient prediction of protein targets of small molecules.* Nucleic Acids Res. 2019 Jul 2;47(W1):W357–64.
160. **Cai C, Lin H, Wang H, Xu Y, Ouyang Q, Lai L, et al.** *miDruglikeness: Subdivisional Drug-Likeness Prediction Models Using Active Ensemble Learning Strategies.* Biomolecules. 2023 Jan 1;13(1):29.
161. **Kuo PC, Liao YR, Hung HY, Chuang CW, Hwang TL, Huang SC, et al.** *Anti-Inflammatory and Neuroprotective Constituents from the Peels of Citrus grandis.* Molecules. 2017 Jun 9;m22(6):967.
162. **Lin L, Wu XD, Davey AK, Wang J.** *The anti-inflammatory effect of baicalin on hypoxia/reoxygenation and TNF- α induced injury in cultural rat cardiomyocytes.* Phytotherapy Research. 2010 Mar;24(3):429–37.

163. **De Sousa LRF, Wu H, Nebo L, Fernandes JB, Da Silva MFDGF, Kiefer W, et al.** *Flavonoids as noncompetitive inhibitors of Dengue virus NS2B-NS3 protease: Inhibition kinetics and docking studies.* Bioorg Med Chem. 2015;23(3).
164. **Ohl F.** *Testing for anxiety.* Clin Neurosci Res. 2003 Dec 1;3(4–5):233–8.
165. **Lachowicz J, Niedzialek K, Rostkowska E, Szopa A, Świąder K, Szponar J, et al.** *Zebrafish as an Animal Model for Testing Agents with Antidepressant Potential.* Life 2021, Vol 11, Page 792. 2021 Aug 5;11(8):792.
166. **Cachat JM, Canavello PR, Elkhayat SI, Bartels BK, Hart PC, Elegante MF, et al.** *Video-Aided Analysis of Zebrafish Locomotion and Anxiety-Related Behavioral Responses.* In: Neuromethods. 2011. p. 1–14.
167. **Cognato G de P, Bortolotto JW, Blazina AR, Christoff RR, Lara DR, Vianna MR, et al.** *Y-Maze memory task in zebrafish (Danio rerio): The role of glutamatergic and cholinergic systems on the acquisition and consolidation periods.* Neurobiol Learn Mem. 2012 Nov 1;98(4):321–8.
168. **Fontana BD, Gibbon AJ, Cleal M, Sudwarts A, Pritchett D, Petrazzini MEM, et al.** *Moderate early-life stress improves adult zebrafish (Danio rerio) spatial short-term memory but does not affect social and anxiety-like responses.* bioRxiv. 2020 Mar 11;2020.03.10.985945.
169. **Bak J, Pyeon HI, Seok JI, Choi YS.** *Effect of rotation preference on spontaneous alternation behavior on Y maze and introduction of a new analytical method, entropy of spontaneous alternation.* Behavioural Brain Research. 2017 Mar 1;320:219–24.
170. **Bruzzone M, Gatto E, Xiccato TL, Valle LD, Fontana CM, Meneghetti G, et al.** *Measuring recognition memory in zebrafish larvae: Issues and limitations.* PeerJ. 2020 Apr 27; 2020(4)
171. **Stefanello F V., Fontana BD, Ziani PR, Müller TE, Mezzomo NJ, Rosemberg DB.** *Exploring Object Discrimination in Zebrafish: Behavioral Performance and Scopolamine-Induced Cognitive Deficits at Different Retention Intervals.* 2019 Aug 1; 16(4):370–8.
172. **Valentim AM, Eeden FJ van, Strähle U, Olsson IAS.** *Euthanizing zebrafish legally in Europe.* EMBO Rep. 2016 Dec 1;17(12):1688–9.
173. **Gupta T, Mullins MC.** *Dissection of Organs from the Adult Zebrafish.* JoVE (Journal of Visualized Experiments). 2010 Mar 4;(37):e1717.

174. **Bradford MM.** *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.* Anal Biochem. 1976 May; 72(1–2):248–54.
175. **Winterbourn CC, Hawkins RE, Brian M, Carrell RW.** *The estimation of red cell superoxide dismutase activity.* J Lab Clin Med. 1975 Feb 1;85(2):337–41.
176. **Sinha AK.** *Calorimetric Assay of Catalase.* Analytical biochemistry. 1972;47:389–94.
177. **Fukuzawa K, Tokumura A.** *Glutathione peroxidase activity in tissues of vitamin E-deficient mice.* J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo). 1976;22(5):405–7.
178. **Salbitani G, Vona V, Bottone C, Petriccione M, Carfagna S.** *Sulfur Deprivation Results in Oxidative Perturbation in Chlorella sorokiniana (211/8k).* Plant Cell Physiol. 2015 May;56(5):897–905.
179. **Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K.** *Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction.* Anal Biochem. 1979 Jun;95(2):351–8.
180. **Oliver CN, Ahn BW, Moerman EJ, Goldstein S, Stadtman ER.** *Age-related changes in oxidized proteins.* J Biol Chem. 1987 Apr;262(12):5488–91.
181. **Ellman GL, Courtney KD, Andres V, Feather-Stone RM.** *A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity.* Biochem Pharmacol. 1961 Jul;7:88–95.
182. **Kundap UP, Kumari Y, Othman I, Shaikh MF.** *Zebrafish as a Model for Epilepsy-Induced Cognitive Dysfunction: A Pharmacological, Biochemical and Behavioral Approach.* Front Pharmacol. 2017;8:515.
183. **Koehler D, Williams FE.** *Utilizing zebrafish and okadaic acid to study Alzheimer's disease.* Neural Regen Res. 2018 Sep 1;13(9):1538.
184. **Blagg J.** *Structure–Activity Relationships for In vitro and In vivo Toxicity.* Annu Rep Med Chem. 2006 Jan 1;41:353–68.
185. **Edwards MP, Price DA.** *Role of Physicochemical Properties and Ligand Lipophilicity Efficiency in Addressing Drug Safety Risks.* Annu Rep Med Chem. 2010 Jan 1;45(C):380–91.
186. **Kramer JA, Sagartz JE, Morris DL.** *The application of discovery toxicology and pathology towards the design of safer pharmaceutical lead candidates.* Nat Rev Drug Discov. 2007 Aug; 6(8):636–49.

187. **Kerns EH.** *High throughput physicochemical profiling for drug discovery.* J Pharm Sci. 2001 Nov 1;90(11):1838–58.
188. **Alsensz J, Kansy M.** *High throughput solubility measurement in drug discovery and development.* Adv Drug Deliv Rev. 2007 Jul 30;59(7):546–67.
189. **Henchoz Y, Bard B, Guillarme D, Carrupt PA, Veuthey JL, Martel S.** *Analytical tools for the physicochemical profiling of drug candidates to predict absorption/distribution.* Analytical and Bioanalytical Chemistry 2009 394:3. 2009 Feb 2;394(3):707–29.
190. **Testa Bernard.** *Pharmacokinetic profiling in drug research: biological, physicochemical, and computational strategies.* 2006;493.
191. **Xiong G, Wu Z, Yi J, Fu L, Yang Z, Hsieh C, et al.** *ADMETlab 2.0: An integrated online platform for accurate and comprehensive predictions of ADMET properties.* Nucleic Acids Res. 2021 Jul 2;49(W1):W5–14.
192. **Ertl P, Schuffenhauer A.** *Estimation of synthetic accessibility score of drug-like molecules based on molecular complexity and fragment contributions.* J Cheminform. 2009 Jun 10; 1(1):1–11.
193. **Borul SB, More SP.** *Study of drug likeness properties substituted indazoles.* International Journal of Creative Research Thoughts. 2022;10(2):2320–882.
194. **Schneider G.** *Prediction of Drug-Like Properties.* 2013.
195. **Bashirzade AAO, Cheresiz S v., Belova AS, Drobkov A v., Korotaeva AD, Azizi-Arani S, et al.** *MPTP-Treated Zebrafish Recapitulate ‘Late-Stage’ Parkinson’s-like Cognitive Decline.* Toxics 2022 Feb 1; 10(2):69.
196. **Brinza I, Ayoub IM, Eldahshan OA, Hritcu L.** *Baicalein 5,6-dimethyl ether prevents memory deficits in the scopolamine zebrafish model by regulating cholinergic and antioxidant systems.* Plants. 2021;10(6).
197. **Brinza I, Abd-Alkhalek AM, El-Raey MA, Boiangiu RS, Eldahshan OA, Hritcu L.** *Ameliorative Effects of Rhoifolin in Scopolamine-Induced Amnesic Zebrafish (Danio rerio) Model.* Antioxidants. 2020 Jul 3; 9(7):580.
198. **Júnior GPB de O, Pimenta RMC, Oliveira WNF.** *Oxidative stress and neuroinflammation in neurodegenerative diseases: possible neuroprotective effect of agathisflavone.* Research, Society and Development. 2020 Dec 24;9(12):e28291211061–e28291211061

ACTIVITATE ȘTIINȚIFICĂ

Articole ISI publicate in extenso din teza de doctorat

1. **Brinza I.**, Abd-Alkhelek A. M., El-Raey M. A., Boiangiu R.S., Eldahshan, O. A. and Hritcu L., 2020, Ameliorative effects of rhoifolin in scopolamine-induced amnesic zebrafish (*Danio rerio*) model. *Antioxidants*, 9(7): 580. <https://doi.org/10.3390/antiox9070580> (IF 6,313, AIS 0,910, Q1)
2. **Brinza I.**, Ayoub I.M., Eldahshan O.A., Hritcu, L., 2021, Baicalein 5,6-dimethyl ether prevents memory deficits in the scopolamine zebrafish model by regulating cholinergic and antioxidant systems. *Plants*, 10(6), 1245. <https://doi.org/10.3390/PLANTS10061245> (IF 4,658, AIS 0,654, Q1)

Alte articole ISI publicate

1. Boiangiu R.S.; **Brinza I.**; Hancianu M.; Erdogan Orhan I.; Eren G.; Gündüz E.; Ertas H.; Hritcu L.; Cioanca, O., 2020, Cognitive facilitation and antioxidant effects of an essential oil mix on scopolamine-induced amnesia in rats: molecular modeling of in vitro and in vivo approaches. *Molecules* 25 (7), 1519. <https://doi.org/10.3390/molecules25071519> (IF 4,412, AIS 0,694, Q2)
2. Brinza I.; Boiangiu R.S.; Hancianu M.; Cioanca O.; Erdogan Orhan I.; Hritcu L., 2021, Bay leaf (*Laurus Nobilis* L.) incense improved scopolamine-induced amnesic rats by restoring cholinergic dysfunction and brain antioxidant status. *Antioxidants*, 10(2), 259. <https://doi.org/10.3390/antiox10020259> (IF 7,675, AIS 0,921, Q1)
3. **Brinza I.**; Raey M.A.E.; El-Kashak W.; Eldahshan O.A.; Hritcu L., 2022, Sweroside ameliorated memory deficits in scopolamine-induced zebrafish (*Danio rerio*) model: involvement of cholinergic system and brain oxidative stress. *Molecules*, 27 (19), 5901. <https://doi.org/10.3390/molecules27185901>. (IF 4,6 AIS 0,660, Q2)
4. Damo J.L.K.; Boiangiu R.S.; **Brinza I.**; Kenko Djoumessi L.B.; Rebe, R.N.; Kamleu, B.N.; Guedang, S.D.N.; Camdi, G.W.; Bouvourné, P.; Keugong, E.W.; *et al.*, 2022, Neuroprotective potential of *Guiera senegalensis* (Combretaceae) leaf hydroethanolic extract against cholinergic system dysfunctions and oxidative stress in scopolamine-induced cognitive impairment in zebrafish (*Danio rerio*). *Plants* 2022, 11, 1149. <https://doi.org/10.3390/plants11091149>. (IF 4,5, AIS 0,623, Q1)
5. Pecio L.; Kozachok S.; **Brinza I.**; Boiangiu R.S.; Hritcu L.; Mircea C.; Burlec A.F.; Cioanca O.; Hancianu M.; Wronikowska-Denysiuk O.; *et al.*, 2022, Neuroprotective effect of *Yucca schidigera* Roetzl ex Ortgies bark phenolic fractions, yuccaol B and gloriosaol A on scopolamine-induced memory deficits in zebrafish. *Molecules*, 27(12), 3692. <https://doi.org/10.3390/molecules27123692>. (IF 4,6 AIS 0,660, Q2)
6. **Brinza I.**; Boiangiu R.S.; Cioanca O.; Hancianu M.; Dumitru G.; Hritcu L.; Birsan G.-C.; Todirascu-Ciornea E., 2023, Direct evidence for using *Coriandrum sativum* var. *microcarpum* essential oil to ameliorate scopolamine-induced memory impairment and brain oxidative stress in the zebrafish model. *Antioxidants*, 12(8), 1534. <https://doi.org/10.3390/antiox12081534>. (IF 7 AIS 0,946, Q1)
7. **Brinza I.**; Boiangiu R.S.; Honceriu I.; Abd-Alkhalek A.M.; Eldahshan O.A.; Dumitru, G.; Hritcu, L.; Todirascu-Ciornea, E., 2024, Investigating the potential of essential oils from *Citrus reticulata* leaves in mitigating memory decline and oxidative stress in the scopolamine-treated zebrafish model. *Plants*, 13(12), 1648. <https://doi.org/10.3390/plants13121648>. (IF 4,5, AIS 0,623, Q1)

Participări la manifestări științifice

a) naționale

1. **Brînza Ion**, Hritcu Lucian - Evaluarea efectelor roifolinei, baicalinei și a agatisflavonei asupra performanțelor cognitive și a statusului oxidativ, la modelul de pește zebură al bolii Alzheimer, SSBF, Mai, Iași, **România** 2021;
2. **Brînza Ion**, Hrițcu Lucian, Omayama Eldahshan - Sweroside can prevents scopolamine- induced memory impairment and brain oxidative stress in zebrafish (*Danio rerio*) SSFB, 28-29 Octombrie, Iași, **România** 2021;
3. **Brînza Ion**, Hrițcu Lucian, Omayama Eldahshan, Impact of rhoifolin, baicalin and agathisflavone on scopolamine-induced memory decline and brain oxidative stress in a zebrafish model (*Danio rerio*) „Sesiunea de comunicări științifice studențești, Ediția a XIX-a, 25-26 Noiembrie, Arad, **România**, on-line”, 2021;
4. **Brînza Ion**, Stache A. Bogdan, Omayma Eldahshan, Gorgan D. Lucian, Mihășan Marius, Hrițcu Lucian - Sweroside supports memory function in the scopolamine-induced zebrafish model (*Danio rerio*) of Alzheimer disease, RSBMB, 21st-23rd, October Cluj-Napoca, Romania, 2022;
5. Bîrsan Gheorghe-Ciprian, Dumitru Gabriela , Boiangiu Răzvan Ștefan , **Brînza Ion**, Hrițcu Lucian - Coriandrum sativum linn. Attenuated scopolamine – induced anxiety and oxidative stress in the amnestic zebrafish model „Sesiunea de comunicări științifice studențești, Ediția a XXI, 29-31 Mai, Arad, România, 2023.

b) internaționale

1. **Brînza Ion**, Razvan Stefan Boiangiu, Omayma Eldahshan, Lucian Hritcu, Abdel Nasser Singab - Impact of baicalin and rhoifolin on scopolamine-induced memory decline and brain oxidative stress in a zebrafish model (*Danio rerio*). The 12th FENS, Forum of Neuroscience, abstract submission system, Galsgow, UK, 11-15 Iulie, 2020;
2. **Brînza Ion**, Răzvan Stefan Boiangiu, Omayma Eldahshan, Lucian Hritcu, Abdel Nasser Singab - Baicalin and Rhoifolin prevents scopolamine-induced memory impairment and brain oxidative stress in zebrafish (*Danio rerio*), FEBS OPEN BIO , 4-9 Iulie 2021;
3. **Brînza Ion**, Hrițcu Lucian, Omayama Eldahshan - Evaluation of the effects of sweroside on cognitive performance and oxidative status in the zebrafish (*Danio rerio*) model of Alzheimer’s disease, FENS Regional Meeting, Kraków, Poland, 25-27 August 2021;
4. **Brînza Ion**, Stache A. Bogdan, Omayma Eldahshan, Gorgan D. Lucian, Mihășan Marius, Hrițcu Lucian - Sweroside supports memory function by increasing mRNA expression of bdnf, creb, npy and decreasing AChE activity and brain oxidative stress in the scopolamine –induced zebrafish model (*Danio rerio*), YSF congresis, Vimeiro, Portugal, 6-9 Iulie 2022;

5. **Brînza Ion**, Stache A. Bogdan, Omayma Eldahshan, Gorgan D. Lucian, Mihășan Marius, Hrițcu Lucian - Sweroside supports memory function by increasing mRNA expression of bdnf, creb, npy and decreasing AChE activity and brain oxidative stress in the scopolamine -induced zebrafish model (*Danio rerio*), IUBMB-FEBS-PABMB congressis, Lisbon, Portugal, 9-14 Iulie 2022;
6. **Brînza Ion**, Hritcu Lucian – The impact of agatisflavone on memory processes. Studies on an animal model of dementia;- Life sciences in the dialogue of generations: Connections between Universities, Academia and Business community and International Scientific Symposium Advanced Biotechnologies – Achievements and Prospects (Vth Edition), Chișinău, Republica Moldova, 21-22 Octombrie 2019;
7. **Brînza Ion**, Hritcu Lucian - Quantification of neurotrophin expression in the hippocampus of an oil-treated dementia model volatile, Ith International Congress of Geneticists and Breeders from the Republic of Moldova, Iunie 2021.