

UNIVERSITATEA “ALEXANDRU IOAN CUZA” DIN IAȘI

FACULTATEA DE BIOLOGIE

ȘCOALA DOCTORALĂ DE BIOLOGIE

**Caracterizarea biochimică și comportamentală a
unor modele animale de schizofrenie la peștele zebură, în baza
diferențierii trăsăturilor individuale de personalitate**

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

**Coordonator științific,
CS1 Dr. Habil. Alin Stelian Ciobică**

**Student doctorand,
Alexandrina-Ștefania Curpău**

**IAȘI
2024**

MULȚUMIRI

Per audacia ad astra

De-a lungul anilor, un aspect care mereu m-a impresionat la oamenii din jur a fost curajul, curajul să își asume riscuri, curajul să își depășească condiția, curajul să vrea mai mult de la viață și curajul să își urmeze pasiunea. Dacă aș fi fost întrebată acum 10 ani dacă credeam că voi ajunge aici, răspunsul meu ar fi fost un categoric Nu, dar ceea ce a condus la schimbarea răspunsului meu au fost oamenii din jurul meu care au ales să fie o parte integrantă a vieții mele.

Așadar, cu această ocazie, aș vrea să mulțumesc mamei, unchiului, bunicii și mătușii care m-au susținut atât emoțional cât și financiar și care m-au încurajat să vreau mai mult, să merg mai departe și să nu las pe nimeni să îmi spună că nu pot. Familia e cel mai prețios lucru din viața mea și nu aș fi ajuns aici fără ajutorul fiecăruia dintre ei. O mențiune specială către verișoara mea care m-a inspirat de nenumărate ori să îmi urmez pasiunea și mi-a fost alături mereu.

Mulțumesc prietenilor care deseori au avut mai multă încredere în mine și forțele mele decât mine. Ei sunt cei care au ascultat fiecare plângere (uneori fără motive reale), au celebrat fiecare victorie oricât de mică și m-au împins să merg mai departe cu fruntea sus. O mențiune specială către colega mea de laborator

care mi-a fost alături atât profesional cât și personal și m-a împins să fac mai mult.

Mulțumesc coordonatorului meu de doctorat (prof. Alin Ciobică) fără de care probabil nu aș fi făcut doctoratul. Sper din toată inima că veți continua să inspirați tinere generații să își urmeze pasiunea și să caute mereu lucruri ”care să îi stimuleze cognitiv” (așa cum vă place dumneavoastră să spuneți).

And lastly, but not least, I would like to thank my boyfriend for the patience, love and understanding you have shown me over the last four years. You have shown me what true love is and how partners should support each other to achieve their goals. You have made my life feel fuller and happier.

Tot ceea ce am realizat și unde am ajuns până în acest moment se datorează doar acestor oameni, iar unde voi ajunge în viitor se datorează tot lor.

Cuprins

Lista abrevierilor și cuvinte cheie.....	13
Introducere	Error! Bookmark not defined.
Motivația studiului	Error! Bookmark not defined.
Stadiul actual al cunoașterii.....	Error! Bookmark not defined.
1. Schizofrenia.....	Error! Bookmark not defined.
1.1. Factori de risc.....	Error! Bookmark not defined.
1.2. Implicațiile neurobiologice	Error! Bookmark not defined.
1.2.1. Glutamatul.....	Error! Bookmark not defined.
1.2.2. S-adenozilmetionina (SAME)....	Error! Bookmark not defined.
1.3. Implicațiile imunohistochimice.....	Error! Bookmark not defined.
1.4. Impactul microplasticelor asupra schizofreniei	Error! Bookmark not defined.
2. Stresul oxidativ	Error! Bookmark not defined.
2.1. Stresul oxidativ și schizofrenia ...	Error! Bookmark not defined.
3. Alfa-amilaza	Error! Bookmark not defined.

- 3.1. Generalități, structură și mecanism de acțiune
.....**Error! Bookmark not defined.**
- 3.2. Alfa-amilaza și neurotransmițătorii**Error! Bookmark not defined.**
- 3.3. Alfa-amilaza și schizofrenia. **Error! Bookmark not defined.**
4. Peștii zebra ca modele animale pentru tulburările psihiatrice
Error! Bookmark not defined.
- 4.1. De ce peștii zebra? ... **Error! Bookmark not defined.**
- 4.2. Modele animale de inducere a
simptomatologie schizofreniei.....**Error! Bookmark not defined.**
- 4.3. Au peștii zebra personalitate?**Error! Bookmark not defined.**
- 4.4. Posibile corelații între parametrii biochimici
și comportamentali și personalitate **Error! Bookmark not defined.**
- Scopul și obiectivele principale ...**Error! Bookmark not defined.**
- Rezultate așteptate și limitele studiului **Error! Bookmark not defined.**
- Partea experimentală**Error! Bookmark not defined.**
5. Materiale și metode de lucru ...**Error! Bookmark not defined.**

5.1. Animale și condiții de găzduire...**Error! Bookmark not defined.**

5.2. Administrarea de ketamină... **Error! Bookmark not defined.**

5.3. Administrarea de metionină . **Error! Bookmark not defined.**

5.4. Administrarea de metionină în combinație cu ketamina**Error! Bookmark not defined.**

5.5. Expunerea la microplastice .. **Error! Bookmark not defined.**

5.6. Expunerea la microplastice în combinație cu celelalte substanțe.....**Error! Bookmark not defined.**

5.7. Teste comportamentale..... **Error! Bookmark not defined.**

5.7.1. Testul acvariului nou **Error! Bookmark not defined.**

5.7.2. Testul de preferință socială. **Error! Bookmark not defined.**

5.7.3. Testul de agresivitate **Error! Bookmark not defined.**

5.7.4. Testul de lumină-întuneric.. **Error! Bookmark not defined.**

5.8. Testul cognitiv**Error! Bookmark not defined.**

5.8.1. Testul de preferință a culorilor ..**Error! Bookmark not defined.**

5.8.2. Perioada de învățare **Error! Bookmark not defined.**

5.8.3. Testul de memorie **Error! Bookmark not defined.**

5.9. Analize imunohistochimice .. **Error! Bookmark not defined.**

5.10. Măsurarea biomarkerilor stresului oxidativ..**Error! Bookmark not defined.**

5.10.1. Prelucrarea materialului biologic pentru măsurarea extractelor.....**Error! Bookmark not defined.**

5.10.2. Superoxid-dismutaza (SOD) ...**Error! Bookmark not defined.**

5.10.3. Glutathion peroxidaza (GPx)**Error! Bookmark not defined.**

5.10.4. Malondialdehida (MDA)..**Error! Bookmark not defined.**

5.11. Măsurarea nivelului de alfa-amilază**Error! Bookmark not defined.**

5.11.1. Prelucrarea materialului biologic pentru măsurarea extractelor.....**Error! Bookmark not defined.**

5.11.2. Protocol măsurare alfa-amilază**Error! Bookmark not defined.**

5.12. Separarea peștilor pe tip de personalitate**Error! Bookmark not defined.**

5.13. Ministudiu asupra efectului disociativ al ketaminei
.....**Error! Bookmark not defined.**

5.14. Analize statistice...**Error! Bookmark not defined.**

6. Rezultate.....**Error! Bookmark not defined.**

6.1. Separarea peștilor pe bază de personalitate**Error! Bookmark not defined.**

6.2. Testul acvariului nou **Error! Bookmark not defined.**

6.2.1. General.....**Error! Bookmark not defined.**

6.2.2. Personalitate.....**Error! Bookmark not defined.**

6.3. Testul de preferință socială... **Error! Bookmark not defined.**

6.3.1. General.....**Error! Bookmark not defined.**

6.3.2. Personalitate.....**Error! Bookmark not defined.**

6.4. Testul de agresivitate **Error! Bookmark not defined.**

6.4.1. General.....**Error! Bookmark not defined.**

6.4.2. Personalitate.....**Error! Bookmark not defined.**

6.5. Testul de lumină-întuneric.... **Error! Bookmark not defined.**

6.5.1. General.....	Error! Bookmark not defined.
6.5.2. Personalitate.....	Error! Bookmark not defined.
6.6. Testul de memorie pe bază de culori	Error!
Bookmark not defined.	
6.6.1. General.....	Error! Bookmark not defined.
6.6.2. Personalitate.....	Error! Bookmark not defined.
6.7. Ministudiu asupra efectului disociativ al ketaminei	Error! Bookmark not defined.
6.7.1. Aprecierea tipului de personalitate pre- și post-administrare ketamină	Error! Bookmark not defined.
6.7.2. Analiza statistică a comportamentului.....	Error!
Bookmark not defined.	
6.8. Imunohistochimie...	Error! Bookmark not defined.
6.9. Stresul oxidativ.....	Error! Bookmark not defined.
6.10. Activitatea alfa-amilazei.....	Error! Bookmark not defined.
defined.	
6.10.1. Corelații între nivelul activității alfa-amilazei și parametrii comportamentali.....	Error! Bookmark not defined.
7. Discuții	Error! Bookmark not defined.
Concluzii	Error! Bookmark not defined.
Lista lucrărilor publicate.....	Error! Bookmark not defined.
Participări la conferințe	Error! Bookmark not defined.

Bibliografie.....**Error! Bookmark not defined.**

Anexe**Error! Bookmark not defined.**

Lista abrevierilor și cuvinte cheie

5-HNE – 5-hidroxinonenal

ADN – acid dezoxiribonucleic

APA – Asociația americană de psihiatrie

ATP – adenzin-trifosfat

BDNF – factorul neurotrofic derivat din creier

CAT – catalază

CNV – variabilitate genică pe baza numărului de copii

COMT – catecol-O-metiltransferaza

DISC1 – disrupted-in-schizophrenia

DRD2 – receptorul de dopamină D2

DSM – Diagnostic and Statistical Manual of mental disorders

(eng.)

GABA – acid gama-aminobutiric

GCL – ligaza glutamat-cisteină

GPx – glutation-peroxidază

GSH – glutation

HPA – axa hipotalamo-hipofizo-suprarenală

LSD – dietilamida acidului lisergic

LTD – depresie pe termen lung

LTP – potențarea pe termen lung

MDA – malondialdehidă

mGluR – receptori metabotropi de glutamat

MP – microplastice

NMDA/R – N-metil-D-aspartat/receptor

NRG1 – neuregulin 1

PCNA – antigen nuclear de proliferare celulară

PSD-95 – proteina de densitate postsinaptică 95

RCS – specii reactive de clor

RNS – specii reactive de azot

ROS – specii reactive de oxigen

RSS – specii reactive de sulf

sAA – alfa-amilaza salivară

SAMe – S-adenozilmetionina

SNC – sistemul nervos central

SOD – superoxid dismutază

TBARS – thiobarbituric acid reactive substances (eng.)

TNF – factor de necroză tumoral

TNFIL-8 – interleukina 8 a factorului de necroză tumoral

Cuvinte cheie: pește zebra, personalitate, schizofrenie, stres fiziologic, stres oxidativ, comportament, diferențe individuale, alfa-amilază

Introducere

Schizofrenia, ca tulburare, este un concept relativ nou comparativ cu alte patologii și manifestări de natură psihiatrică, precum melancolia, ”isteria” sau nebunia (1).

În ciuda diferitelor observații făcute asupra etiologiei acestei tulburări, cauzele exacte sunt în continuare necunoscute fiind rezultatul împletirii a multipli factori de risc de la genetici, la factori de mediu, economici, sociali, culturali și istoricul familial (2). Acești factori pot influența ponderea unei tulburări în populația generală, debutul tulburării precum și gravitatea simptomatologiei alături de răspunsul terapeutic (3). Deseori,

tulburările psihiatrice pot fi extrem de asemănătoare în privința prezentării bolii, motiv pentru care este o continuă nevoie de noi studii și noi căi de cercetare care să clarifice cât mai eficient principalele distincții și asemănări între tulburări (4,5) astfel încât diagnosticarea să nu poate fi subiectivă și dependentă de experiență medicului psihiatru.

Creierul este un organ ce necesită un volum mare de energie obținut prin fosforilarea oxidativă a mitocondriei, proces ce poate conduce la formarea de specii reactive de oxigen. Atunci când aceste specii reactive de oxigen sunt produse în exces, organismul intră într-o stare de stres oxidativ în care mecanismele de protecție sunt compromise și neuronii devin susceptibili la leziuni (6).

Stresul oxidativ este definit drept un dezechilibru între oxidanți (speciile reactive de oxigen, azot și sulf) și apărarea antioxidantă (antioxidanții) care conduc la diferite leziuni la nivelul ADN-ului, proteinelor, lipidelor și integrității celulare. Acest concept a fost introdus pentru prima dată în anul 1985 și de atunci a atras o atenție deosebită din partea comunității științifice care continuă să dezvolte felul în care stresul oxidativ este definit și posibilul său rol în diferite patologii (7).

Peștii zebra, *Danio rerio*, sunt o specie indigenă în regiunile sudice și estice ale Asiei și sunt o specie de acvariu preferată și este de asemenea larg crescută și înmulțită în laboratoare pentru mutagenză și screening în scopul de a menține un mediu strict controlat pentru a asigura o proveniență genetică

stabilă (8). În ciuda convingerii generale că animalele mai puțin complexe au caracteristici mai puțin complexe, studiile anterioare au arătat că, comportamentul peștilor zebură acoperă majoritatea trăsăturilor cognitive și socio-afective fie la fel, fie foarte asemănătoare cu comportamentul uman. Evaluarea comportamentului peștilor zebură include evaluarea răspunsului la mulți stimuli vizuali, acustici, tactili și olfactivi (9).

Peștii zebură, la fel ca alte viețuitoare, își pot schimba comportamentul în funcție de cât de bine se simt în mediul lor. Conform American Psychiatric Association APA, personalitatea se referă la diferențele individuale între tiparele caracteristice de gândire și comportament, iar atunci când se vorbește de studierea personalității, individul trebuie să înțeleagă diferențele individuale ale caracteristicilor particulare de personalitate, cum ar fi sociabilitatea sau iritabilitatea (10). În cazul animalelor, trăsăturile de personalitate se referă la tipare consistente ale comportamentului, cogniției și răspunsurilor emoționale care pot fi observate în diferite situații de-a lungul timpului (11).

Deși bolile neuropsihiatrice precum schizofrenia afectează un procent relativ mic din populația mondială, ele sunt unele dintre cele mai debilitare afecțiuni și nu sunt complet elucidate, iar de cele mai multe ori este un procedeu de durată de tipul ”încercare și eroare” pentru a identifica și stabili cea mai bună opțiune terapeutică. Prin urmare, prin continuarea studiului început la lucrarea de disertație asupra schizofreniei și stresului oxidativ, doresc să consolidez caracteristicile sociale ale peștilor

zebră din prisma personalității, capacității cognitive de învățare, a exprimării evidente ale preferințelor sociale și a tendinței de a sta în grupuri în mod normal comparativ cu disrupțiile comportamentale observate în schizofrenie.

Personalitatea este o caracteristică complexă a oamenilor ce poate prezice direcția în care un potențial deficit cognitiv și comportamental ar putea să meargă, dar studierea acestuia în corelație cu parametrii biochimici este o cale puțin explorată în oameni și cu atât mai puțin în modele animale. Motiv pentru care, un alt punct de interes al prezentei teze este evaluarea diferențelor individuale și colective ale peștilor zebra ce alcătuiesc personalitatea unică și individuală a fiecărui animal. Peștii zebra arată diferențe comportamentale în cadrul aceluiași grup în ciuda condițiilor fiziologice și stadiilor de dezvoltare identice ceea ce i-ar putea face un candidat excelent pentru studierea dereglărilor comportamentale asociate unor tulburări psihiatrice specifice.

Mai mult decât atât, studiile au arătat că izolarea socială poate duce la eliberare de glucocorticoizi și oxitocină și alterarea nivelurilor de dopamină, serotonină, GABA și modificarea sensibilității NMDAR (12), motiv pentru care am ales să realizez grupuri experimentale atât izolate social în acvarii individuale, acoperite pe lateral cât și în grupuri. Pe baza datelor din literatură, izolarea socială provoacă anxietate, depresie, crește nivelul de agresivitate și scade preferința de a sta în grupuri. Motivația pentru izolare este potențialul ca izolarea socială să fie suficientă pentru modelarea de tulburări psihiatrice dacă nu sunt identificate

diferențe semnificative între grupul de control izolat și modele farmaceutice.

Scopul și obiectivele principale

Personalitatea este o caracteristică complexă a oamenilor ce poate prezice direcția în care un potențial deficit cognitiv și comportamental ar putea să meargă, dar studierea acestora în corelație cu parametrii biochimici și comportamentali este o cale puțin explorată în oameni și cu atât mai puțin în modele animale. Motiv pentru care, un punct de interes al prezentei teze este evaluarea diferențelor individuale și colective ale peștilor zebra ce alcătuiesc personalitatea unică și individuală a fiecărui animal. Peștii zebra arată diferențe comportamentale în cadrul aceluiași grup în ciuda condițiilor fiziologice și stadiilor de dezvoltare identice ceea ce i-ar putea face un candidat excelent pentru studierea dereglărilor comportamentale asociate unor tulburări psihiatrice specifice.

În ciuda avansării tehnologiei și informațiilor disponibile asupra bolilor de natură psihiatrică, nu există modele animale care să reproducă foarte fidel simptomatologia asociată schizofreniei. Modele acceptate de comunitatea științifică la momentul actual sunt cel al administrării de ketamină și cel al administrării de metionină, motiv pentru care în acest studiu se propune un model animal constituit din administrarea concomitentă a celor două substanțe în pești găzduiți tradițional (împreună) și în pești găzduiți separat (izolare socială).

De asemenea, un alt scop al studiului este de a aprecia efectele neurotoxice ale administrării de microplastice, în special în contextul modelării schizofreniei.

Obiectivele prezentului studiu au fost:

1. Dezvoltarea unui potențial model animal robust pentru evidențierea simptomatologiei asociate schizofreniei
2. Urmărirea tendințelor sociale și cognitive ale peștilor zebra cu dezvoltarea unei noi metodologii de testare a capacității de învățare a peștilor zebra prin intermediul preferinței naturale pentru o anumită culoare și prin condiționare pozitivă (mâncare)
3. Separarea peștilor în funcție de personalitate pe baza trăsăturilor alese și evaluarea diferențelor comportamentale și cognitive în fiecare test între peștii timizi și peștii îndrăzneți
4. Evaluarea efectului disociativ al ketaminei
5. Evaluarea efectelor substanțelor utilizate asupra țesuturilor
6. Evaluarea nivelului de stres oxidativ
7. Evaluarea nivelului de alfa-amilază în scopul determinării nivelului de stres

Stadiul actual al cunoașterii

1. Schizofrenia

Schizofrenia este considerată a fi cea mai severă tulburare de natură psihiatrică (13). Tulburările de natură psihiatrică au o constituție și etiologie multifactorială, fiind rezultatul împletirii a multipli factori de risc de la genetici, la factori de mediu, economici, sociali, culturali și istoricul familial (2). Acești factori pot influența ponderea unei tulburări în populația generală, debutul tulburării precum și gravitatea simptomatologiei alături de răspunsul terapeutic (3).

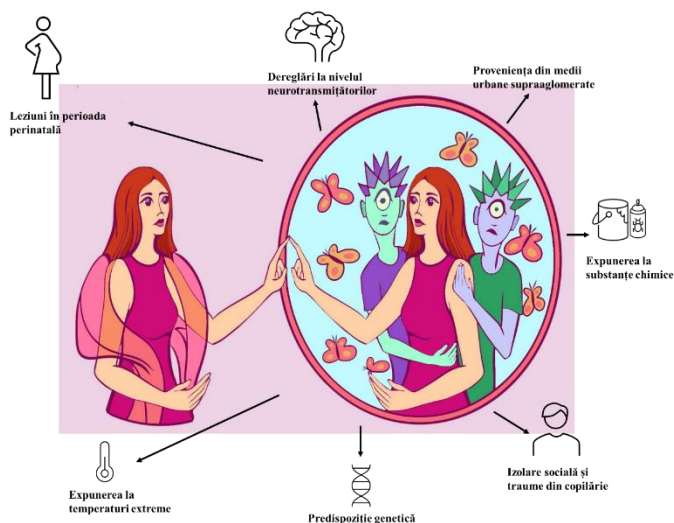


Figura 1.1 Factori de risc pentru dezvoltarea de episoade și simptomatologie psihotică (imagine originală creată de Maria Hreniuc (artist vizual))

Per ansamblu, se consideră atât hiperproducerea de dopamină, cât și hipoproducerea acesteia contribuie la simptomele

schizofreniei (14,15). Această conexiune a fost realizată prin administrarea de medicamente antipsihotice în doze anxiolitice (cum ar fi diazepamul) care ajută la prevenirea apariției stărilor hiperdopaminergice la adulți (16). În plus, la teoria anterior menționată, patofiziologia schizofreniei încorporează și alte câteva teorii ale altor neurotransmițători (cum ar fi serotonina și glutamatul), dar și a acidului gama-aminobutiric (GABA) (17). Au fost explorate și alte teorii deoarece administrarea de medicamente blocante de receptori D2 pacienților cu psihoză secundară nu a făcut decât să le exacerbeze starea. Conform teoriei glutamatului, hipofuncția receptorului N-metil-D-aspartat (NMDA) poate contribui la apariția episoadelor psihotice (18,19).

Receptorul N-metil-D-aspartat este reglat în mod special de statusul redox. Mai precis, perechile de reziduuri de cisteină sensibile la reacții redox formează punți disulfidice care pot scădea curenții NMDAR. În plus, există un grup de reziduuri de cisteină care se suprapun și sunt susceptibile la efecte inhibitorii și facilitează S-nitrozilarea (20). Acest echilibru delicat dintre formarea punților disulfidice și S-nitrozilarea reglează activitatea NMDAR. Este de reținut faptul că echilibrul redox este influențat și de glutatone, iar hipofuncția acestui receptor poate conduce la scăderea cantității de GSH (21).

Metionina este unul dintre aminoacizii esențiali care conține sulf, este alifatic și joacă rol de precursor în metabolismul mai multor aminoacizi (cisteina, creatina, homocisteina ș.a.). Metionina este considerată a fi neutră și cel mai dinamic

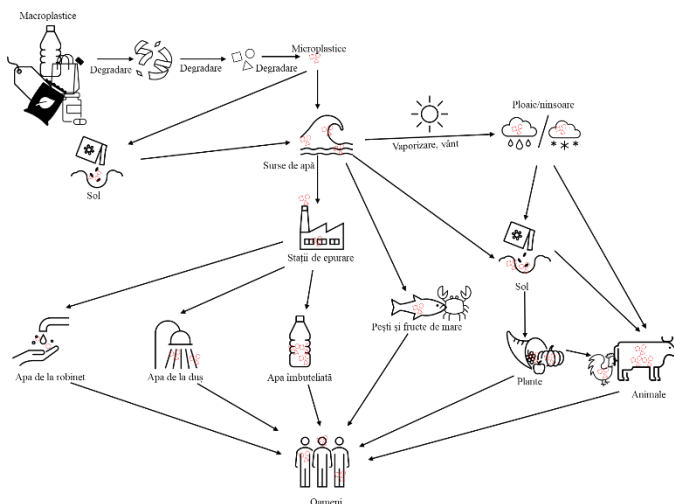
aminoacid, care prin intermediul metabolizării poate deveni acid (22). S-adenozilmethionina este un metabolit din calea de transmetilare a metioninei cu ATP-ul care este implicat în reacțiile de metilare a lipidelor, proteinelor și nucleotidelor, neurotransmițătorilor, sinteza fosfatidilcolinei și metilarea intracelulară a ARN-ului unde joacă rol de donator de grupări -metil. În condiții fiziologice de stres, în încercarea de a reduce stresul oxidativ celular se utilizează glutatationul (23,24).

Mai mult decât atât, se cunoaște faptul că SAME crește activitatea enzimatică a catecol-O-metiltransferazei (COMT) a cărui nivel scăzut a fost asociat cu agresivitatea din schizofrenie (25), în timp ce alte studii au propus administrarea de SAME drept posibil tratament pentru pacienții cărora le lipsește o copie a genei *COMT* (deleția *22q11.2*), condiție asociată cu o prevalență crescută a dezvoltării de psihoze, depresie și ADHD (26,27).

Microplasticele (MPs) sunt particule de dimensiuni relativ mici (< 5 mm) obținute din procesul de degradare a diferitor tipuri de plastic. În societatea modernă, microplasticele provin dintr-o varietate de surse din prisma faptului că plasticul este un material intens utilizat în industrii, de la cea alimentară până la agricultură, construcții și industria cosmetică (28), iar metodele de gestionare a deșeurilor, ambalajelor și materialelor utilizate nu sunt întotdeauna propice și plasticele ajung în natură în mod deliberat sau nu. Microplasticele pot ajunge în corpul uman pe mai multe căi, precum inhalare, ingestie sau translocare după cum se poate observa în Figura 1.5. Studiile pe modele animale asupra efectelor

microplasticelor au arătat că acestea pot genera tulburări metabolice în direcția metabolismului lipidic și reducerea producerii de ATP, dar ar putea afecta și progeniturile, prin inducerea stresului oxidativ și scăderea ratei reproductive (29). În timp ce, un studiu realizat pe poluarea cu microplastice în Coreea de Sud a arătat că rate ridicate de MPs în aer ar putea conduce la boli cardiovasculare și pulmonare prin inhalare cronică (30).

Figura 1.2 Căi prin care microplasticele ajung înapoi la oameni (imagine originală).



În ciuda amenințării reale a microplasticelor asupra sănătății, studiile care să analizeze efectele dăunătoare a acestora în indivizii cu probleme de natură psihiatrică sunt limitate. Un studiu realizat de către Poldermann et al. a ilustrat că 55% din riscul de tulburare depresivă majoră, 32% din riscul pentru tulburare bipolară și 23% din riscul pentru schizofrenie sunt constituite de factori de mediu (31). Mai mult decât atât, există

numeroase studii care corelează expunerea la metale grele cu riscul de a dezvolta schizofrenie, aspect ce are o importanță deosebită din moment ce microplasticele au capacitatea de a absorbi metale grele din mediul înconjurător (32). Într-un studiu realizat de grupul nostru de cercetare, am observat că microplasticele, mai specific fibrele de polipropilenă, au acționat drept tampon împotriva toxicității asociate administrării de ketamină și drept stimulant pentru expunerea la metionină, aspect ce ar putea fi corelat cu agravarea deficitelor cognitive (33).

2. Stresul oxidativ

Acumularea acestor oxidanți a fost asociată cu stresul oxidativ de mult timp (34). Pe lângă speciile reactive de oxigen (ROS), mai există speciile reactive de azot (RNS), speciile reactive de sulf (RSS) și speciile reactive de clor (RCS) (35). Speciile reactive sunt radicali liberi sau nu. Cei mai întâlniți radicali liberi sunt hidroxilul, superoxidul și oxidul nitric, iar aceștia sunt produși în timpul radiațiilor ionizante sau reacțiilor față de elementele toxice din mediu.

Superoxid-dismutazele (SOD) sunt metaloenzime cu rol antioxidant și antiinflamator care neutralizează radicalii superoxid prin clivarea acestora în molecule normale nedăunătoare (oxigen și peroxid de hidrogen) (36). Un nivel crescut de SOD nu sugerează stres oxidativ ci sugerează activarea unui mecanism compensatoriu de combatere a oxidanților (37).

Glutation-peroxidazele sunt o familie de enzime cu rol în procesele reglatoare, funcțiile de sinteză și prevenirea formării de radicali liberi (38). Glutation-peroxidaza (GPx) are rol în reducerea peroxidării lipidice prin transformarea peroxizilor în alcoolii corespunzători și a peroxidului de hidrogen în apă (39).

Malondialdehida (MDA) este un biomarker pentru stresul oxidativ pentru tulburări de natură tumorală, psihiatrică, pulmonară sau cardiovasculară deoarece este o componentă derivată din peroxidarea acizilor grași polinesaturați (40). Pe măsură ce cantitatea de radicali liberi crește, se produce mai mult MDA (41).

Într-un scenariu ideal, nivelurile de SOD și GPX ar trebui să fie ridicate pentru a elimina radicalii superoxid și pentru a reduce peroxidul de hidrogen și hidroperoxizii lipidici, în timp ce nivelul de MDA ar trebui să fie scăzut ca să indice peroxidare lipidică minimă.

Studiile arată că în pacienții cu schizofrenie aflați la primul episod psihotic, nivelurile de GSH, CAT, SOD sunt scăzute și aduc organismul într-o stare de dezechilibru oxidativ (42–47).

3. Alfa-amilaza

Începând cu anii 1990, studiile au început să sugereze că alfa-amilaza poate fi un indicator pentru stresul fiziologic, deoarece concentrația acesteia scade pe parcursul expunerii la stres acut, deși studiile ulterioare au raportat opusul. Expunerea la stres

acut duce la activarea sistemului nervos simpatic care stimulează secreția de alfa-amilaza, dar aceasta este secretată și prin stimulare parasimpatică lucru ce ar putea explica rezultatele contradictorii obținute prin măsurarea nivelului de alfa-amilază salivară (48). Alfa-amilaza salivară este produsă de către celulele acinare prin stimularea sistemului simpatic și parasimpatic (49). Sistemul nervos simpatic duce la creșterea concentrației de alfa-amilază în salivă, în timp ce sistemului parasimpatic crește rata de producere a salivei fără a afecta conținutul acesteia (50).

Corelația dintre alfa-amilaza salivară și schizofrenia este un subiect de interes pentru comunitatea științifică, dar observațiile actuale nu sunt încă definitive sau complet înțelese. Studiile au explorat asocierea dintre acestea pe baza faptului că sAA este un biomarker al activității sistemului nervos simpatic. Acesta fiind implicat în răspunsul corpului la stres și joacă un rol important în reglarea excitării fiziologice. Câteva studii au evidențiat o alterare a nivelului de sAA în indivizii cu schizofrenie comparativ cu controlul sănătos, sugerând o potențială dereglare a sistemului nervos simpatic. Multiple studii au arătat că nivelul de alfa-amilază sangvină este mai ridicat în pacienții cu schizofrenie (51,52), și că cu cât nivelul este mai ridicat cu atât simptomele psihiatrice sunt mai severe (53,54).

4. Peștii zebură ca modele animale pentru tulburările psihiatrice

Studiile clinice precum şi cercetările bazate pe utilizarea de modele animale pot ilustra trăsături importante ale etiologiei şi patologiei tulburărilor psihiatrice. În ziua de astăzi, modelele animale reprezintă o unealtă importantă în cercetarea biomedicală. Dintre toate modelele animale, peştii zebură (*Danio rerio*) sunt preferaţi pentru majoritatea studiilor prin prisma avantajelor pe care le aduce, cum ar fi condiţiile de creştere şi înmulţire, morfologia sistemului nervos central, geneticii şi fertilizării specifice cu dezvoltare *ex-utero* (8,55–57).

Aceştia manifestă un spectru larg de răspunsuri la stimuli vizuali, tactili şi olfactivi şi sunt capabili să înveţe şi să exprime diferite tipuri de memorie şi comportamente complexe cum ar fi anxietate/frică, cogniţie, comportament social, pe bază de recompense, pe bază de durere, somn şi neurologice aşa cum vor fi discutate ulterior (58,59).

În plus la repertoriul larg de avantaje, se adaugă abilitatea peştilor zebură de a absorbi substanţele prin imersie prin intermediul branhiilor şi pielii în cazul substanţelor solubile în apă – metodă care poate fi folosită încă de la stadiul embrionar (60), prin injecţie intraperitoneală (61) sau prin administrare orală începând de la vârsta de 72 de ore (62). Pe de o parte, imersia este o metodă foarte folosită deoarece nu produce nici un fel de stres asupra animalului comparativ cu injecţia sau administrarea orală, dar pe de altă parte injecţia intraperitoneală şi administrarea orală permit un control mai bun asupra dozajului, o cantitate mai mică

de medicament utilizată și o corelare mai ușoară și directă cu rezultatele obținute în șoareci, de exemplu (63).

Peștii zebură, la fel ca alte viețuitoare, își pot schimba comportamentul în funcție de cât de bine se simt în mediul lor. Conform APA, personalitatea se referă la diferențele individuale între tiparele caracteristice de gândire și comportament, iar atunci când se vorbește de studierea personalității, individul trebuie să înțeleagă diferențele individuale ale caracteristicilor particulare de personalitate, cum ar fi sociabilitatea sau iritabilitatea (10,64).

Astfel, dacă peștele înoată activ prin întregul acvariu sau nu, dacă caută și îngerează hrană sau nu, dacă la stau la fundul acvariului sau pe lângă alți pești, dacă înoată rapid sau încet, în cazul peștilor zebură toate acestea pot fi considerate trăsături de personalitate întrucât sunt unice și constante fiecărui pește în mod individual. De asemenea, indivizii proactivi părăsesc mai repede ”zona de confort” și se recuperează mai rapid și mai ușor după expunerea la un factor stresor (65). În plus, aceștia mănâncă mai mult și mai des decât cei reactivi (66).

Studiile au observat că peștii zebură pot arăta comportament agresiv, în special în timpul disputelor teritoriale sau competiției pentru mâncare cu unii indivizi arătând tendințe agresive mai pronunțate și alții fiind mai submisivi. Mai mult decât atât, se cunoaște faptul că peștii zebură sunt animale sociale și tind să formeze grupuri în mediul lor natural, dar chiar și în această situația s-au observat diferențe comportamentele în cadrul aceluiași grup, cu unii pești căutând în mod activ compania altor

membri ai grupului și alții preferând un comportament mai puțin activ social. Peștii zebra arată diferite nivele de activitate cu unii mai activi, cu viteză de înot mai mare și tendință de explorare mai ridicată și alții mai sedentari. În plus, peștii zebra prezintă variații individuale a răspunsului la factori stresori, unii pești având o reziliență și adaptabilitate mai mare, în timp ce alții sunt mai predispuși la stres și arată răspunsuri comportamentale și fiziologice mai pronunțate (11,66,67).

Partea experimentală

5. Materiale și metode de lucru

Pentru acest experiment, au fost utilizați 160 de adulți de pește zebra de tip sălbatic, obținuți de la un comerciant local care au fost găzduiți în condiții optime cu măsurări repetate ale parametrilor apelor, menținerea unei temperaturi constante, ciclu de lumină:întuneric și nivel de oxigen.

Grupuri experimentale au fost:

Izolare socială:

Grup 1 – Control (C izo)(10 pești)

Grup 2 – Ketamină (K izo)(10 pești)

Grup 3 – Metionină (M izo)(10 pești)

Grup 4 – Ketamină + metionină (K+M izo)(10 pești)

Grup 5 – Control Microplastice (C MP izo)(10 pești)

Grup 6 – Microplastice + Ketamină (MP+M izo)(10 peşti)

Grup 7 – Microplastice + Metionină (MP+M izo)(10 peşti)

Grup 8 – Microplastice + Ketamină + Metionină (MP+K+M izo)(10 peşti)

Grupuri împreună:

Grup 1' – Control (C imp)(10 peşti)

Grup 2' – Ketamină (K imp)(10 peşti)

Grup 3' – Metionină (M imp)(10 peşti)

Grup 4' – Ketamină + Metionină (K+M imp)(10 peşti)

Grup 5' – Control Microplastice (C MP)(10 peşti)

Grup 6' – Microplastice + Ketamină (MP+K imp)(10 peşti)

Grup 7' – Microplastice + Metionină (MP+M imp)(10 peşti)

Grup 8' – Microplastice + Ketamină + Metionină (MP+K+M imp)(10 peşti)

Studiile au fost realizate în cadrul Facultăţii de Biologie a Universităţii "Alexandru Ioan Cuza" din Iaşi şi în cadrul Facultăţii de Medicină Veterinară a Universităţii de Ştiinţele Vieţii "Ion Ionescu de la Brad" din Iaşi conform aprobărilor comisiilor de etică corespunzătoare, nr. 2533/08.09.2022 (UAIC Iaşi), respectiv nr. 165/26.01.2022 (USV Iaşi). Mai mult decât atât, studiile au fost realizate în conformitate cu prevederile directivelor Europene

(2010/62/EU) şi legislaţiei României (43/2014) referitoare la protecţia animalelor utilizate în scopuri ştiinţifice sau experimentale.

Expunerea la ketamină s-a făcut pe o perioadă de 5 zile. În zilele de administrare, peştii au fost scoşi din acvariile corespunzătoare şi plasaţi în tuburi de 50 mL soluţie de ketamină 0,1% timp de 5 minute. Administrarea de metionină s-a realizat pentru o perioadă de 7 zile. Soluţia a avut concentraţia de 6.0 mM, a fost preparată *de novo* zilnic şi a constituit apa de acvariu. Pentru pregătirea co-administrării celor două substanţe, grupurile alocate au fost expuse la 48 de ore de soluţie de metionină, iar în a treia zi s-a început şi administrarea ketaminei conform instrucţiunilor prezentate anterior. Pentru expunerea la microplastice, s-au utilizat fibre de polipropilenă (dimensiune <2 mm) deoarece acesta este unul dintre cele mai identificaţi polimeri în natură şi în ţesuturile umane (68), iar concentraţia de plastic a fost calculată ca 2 mg/L adăugată la cantitatea de hrană necesară în funcţie de greutatea peştilor (4% din greutatea acestora conform studiilor (69)).

Pentru co-administrarea polipropilenă-ketamină, expunerea peştilor la microplastice în mâncare a început cu 48 de ore înainte începerii tratamentului cu ketamină. În privinţa grupului combinat de polipropilenă-metionină, expunerea la cele două substanţe a început simultan,

Pentru pregătirea co-administrării celor trei substanţe, grupurile alocate au fost expuse la 48 de ore de soluţie de metionină şi polipropilenă pe cale dietetică, iar în a treia zi s-a

început și administrarea ketaminei conform instrucțiunilor prezentate anterior.

Testele comportamentale utilizate au fost:

- Testul acvariului nou
- Testul de preferință socială
- Testul de agresivitate
- Testul de lumină-întuneric
- Testul cognitiv (testul de memorie)

Testul cognitiv a fost constituit din trei etape: testul de preferință a culorilor, perioada de învățare și testul de memorie.

Testul de preferință al culorilor s-a realizat conform Figurii 5.5.

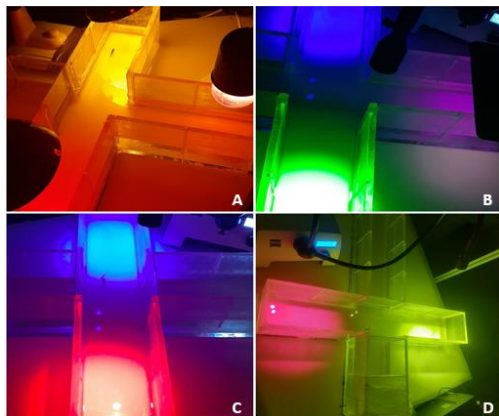


Figura 5.1 Aparatul experimental pentru testul de preferință socială. A – runda 1 (roșu vs. orange vs. galben), B – runda 2 (albastru vs. violet vs. verde), runda 3 (roșu vs. albastru) și runda 4 (violet vs. galben).

Testarea s-a realizat în runde într-un labirint cu 3 brațe egale și un punct de decizie: 1. Galben vs. orange vs. roșu, 2.

Albastru vs. violet vs. verde, 3. Albastru vs. roșu (cele mai puțin preferate culori) și 4. Galben vs. violet (cele două culori preferate).

În urma rezultatelor obținute la testul de preferință al culorii (galben – culoare preferată, roșu – culoare cel mai puțin preferată) am decis realizarea unui test de memorie asociat cu culori cu perioadă de învățare corespunzătoare. Peștii au petrecut câte jumătate de oră zilnic în lumina ambientală cea mai evitată (roșu), timp în care au fost hrăniți, pe o perioadă de 10 zile (începând cu perioada de pre-tratament și până în ultima zi de administrare) (Figura 5.6.).



Figura 5.2 Aparatul experimental utilizat pentru expunerea la lumina roșie pentru 30 de minute în timpul perioadei de învățare și asociere a mâncării cu culoarea roșie.

În ziua imediat următoare finalizării perioadei de învățare, peștii au fost supuși testului de memorie (1 minut) în care un braț a fost luminat în culoarea cea mai puțin preferată (roșu) și un braț în culoarea cea mai preferată (galben) conform Figurii 5.7.

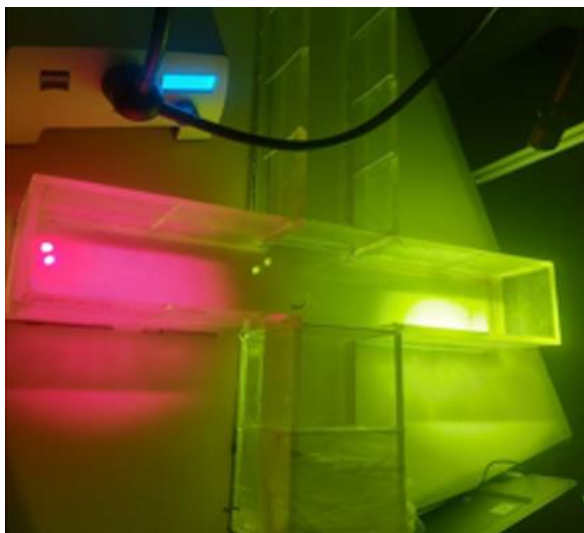


Figura 5.3 Aparatul experimental al testului de memorie

Pentru studiul imunohistologic al probelor, au fost aleși în mod aleatoriu, la finalul perioadei de expunere, câte trei pești din fiecare grup reprezentativ pentru studiu. Metodologia urmată este conformă cu cea descrisă și în literatura de specialitate, astfel încât capul a fost recortat imediat după moartea peștilor și fixat în Bouin timp de 48 de ore. Blocurile de parafina au fost secționate la grosimea de 4 μm cu ajutorul unui microtomului SLEE, iar apoi secțiunile colorate HE și IHC cu anticorpii: PCNA, TNFAI8, Cox41, BDNF, Map2, H2A, S100, GFAP, Tub2. Sectionarea s-a realizat longitudinal.

Pentru măsurarea biomarkerilor de stres oxidativ, peștii zebură au fost sacrificați prin imersie în apă rece conform recomandărilor etice timp de 20 minute și depozitați la -80°C până

în momentul analizării biochimice. Peștii au fost dezghețați lent până la -4°C și apoi cântăriți și mojarăți până la omogenizare completă. Se solubilizează cu 0.1M soluție tampon trifosfat de potasiu (pH 7,4) și 1,15% KCl. Omogenatele astfel obținute au fost centrifugate timp de 15 minute la 960 x g rpm, iar din supernatantele obținute s-au determinat activitățile specifice ale SOD, GPX, MDA și proteine totale solubile conform instrucțiunilor producătorului.

Pentru măsurarea nivelului de alfa-amilază, peștii zebra au fost sacrificați prin imersie în apă rece conform recomandărilor etice timp de 20 minute și depozitați la -80°C până în momentul analizării biochimice. Peștii au fost dezghețați lent până la -4°C și apoi cântăriți și mojarăți până la omogenizare completă. S-au cântărit exact 0,1 g țesut la care s-au adăugat 0,9 ml apă dublu distilată și s-a omogenat mecanic în baie de apă cu gheață. S-a colectat omogenatul, s-a lăsat la temperatura camerei pentru 15 minute, urmat de oscilare pentru 5 minute și centrifugare la 3000 g timp de 10 minute la temperatura camerei. S-a colectat supernatantul și s-a adăugat apă distilată până la un volum final de 10 ml. Măsurarea nivelului de alfa-amilază s-a realizat cu ajutorul unui kit specific (α -amylase activity assay kit, Elabscience, SUA) conform instrucțiunilor producătorului.

În scopul dovedirii existenței personalității în peștii zebra și de a evidenția trăsăturile și diferențele comportamentele specifice, am realizat separarea peștilor în cele două tipuri

principale de personalitate (Timid şi Încrezător) pe baza parametrilor care descriu comportamentul acestora.

Parametrii aleşi pentru această separare sunt:

- Din testul de acvariu nou: tracks, heatmaps, distanţa parcursă, durată totală de îngheţ şi timpul până la prima intrare în jumătatea superioară.
- Din testul de preferinţă socială: timpul petrecut în braţul stâng
- Din testul de agresivitate: puşeurile de înot accelerat (*swim bursts*)

Pentru departajarea în funcţie de parametrii măsurabili s-a calculat mediana şi în funcţie de această valoare s-a separat pe cele două personalităţi după cum urmează:

- Mediana pentru distanţa parcursă = 1732,03. S-a considerat că orice valoare sub mediană = personalitate timidă, orice valoare peste = personalitate îndrăzneţă.
- Mediana pentru timpul total de îngheţ = 100,36; peste această valoare = personalitate timidă, sub această valoare = personalitate îndrăzneţă.
- Mediana pentru timpul până la prima intrare în jumătatea superioară = 0,01; valori egale sau mici decât mediana = personalitate îndrăzneţă, valori peste mediană = personalitate timidă.
- Mediana pentru timpul petrecut în braţul stâng (braţul cu conspecifici) = 51.2007; peste această valoare =

personalitate timid, sub această valoare = personalitate îndrăzneţă.

- Mediana pentru puşeurile de înot accelerat = 12; peste această valoare = personalitate îndrăzneţă, sub această valoare = personalitate timidă.

Personalitatea finală a fost decisă atunci când 4 din cei 7 parametri indică fie Timid fie Încrăzător.

Ideea din spatele acestui subcapitol este bazată pe noţiunea că ketamina are efecte disociativă ceea ce înseamnă că afectează personalitatea într-un fel sau altul. Dar este acest lucru adevărat şi în cazul peştilor zebură? În continuare este prezentat un mini studiu secundar concentrat pe posibilitatea ca peştii zebură să îşi schimbe personalitatea în urma expunerii la ketamină. Împărţirea peştilor zebură într-o personalitate sau alta s-a făcut pe baza trackurilor şi heatmapurilor şi s-a urmărit evoluţia şi schimbarea trăsăturilor de personalitate în urma tratamentului cu ketamină.

Deoarece observaţiile făcute pe bază vizuale nu sunt suficiente pentru a susţine că personalitatea peştilor este într-adevăr afectată de tratamentul cu ketamină, s-a urmărit şi analizat şi parametrii corespunzători testului de acvariu nou, şi anume: durată până la prima intrare în jumătatea superioară a acvariului, timp petrecut şi numărul de intrări în aceasta, timp petrecut în jumătatea inferioară şi număr de intrări în jumătatea inferioară.

Analiza statistică a tuturor rezultatelor obţinute a fost realizată utilizând programul GraphPad Prism 10 (SUA) şi au fost

reprezentate grafic ca medie $\pm$ SD. Rezultatele au fost analizate statistic prin intermediul testului student "t" test, ANOVA uni și bi-direcțional, urmate de analize post-hoc (testul Tukey). Pentru corelații s-a utilizat testul Pearson în care un $p < 0,05$ înseamnă respingerea ipotezei conform căreia corelație identificată este datorată selectării aleatorii de rezultate. Pentru testele ANOVA, s-a aplicat și testul Brown-Forsythe pentru verificarea variabilității în care un $p < 0,05$ sugerează eșuarea respingerii ipotezei că variabilitatea este egală și testul ANOVA poate fi efectuat. Rezultatele testelor au fost considerate semnificative dacă $p < 0,05$.

6. Rezultate

6.1. Separarea peștilor pe bază de personalitate

În scopul de dovedi existența personalității în peștii zebra și de a evidenția trăsăturile și diferențele comportamentele specifice, acest capitol începe cu separarea peștilor în cele două tipuri principale de personalitate (Timid și Încrăzător) pe baza parametrilor care descriu comportamentul acestora.

Track-urile și heatmap-urile utilizate pentru identificarea tipului de personalitate pe baza rezultatelor testului de acvariu nou pot fi vizualizate în Tabelul 6.1 în teza integrală.

6.2. Testul acvariului nou

6.2.1. General

În cazul duratei până la prima intrare în jumătatea superioară, analiza statistică a arătat diferențe semnificative

(F(DFn, DFd)=5,463(15, 104), $p<0,001$) cu diferențele semnificative individuale de interes ilustrate în Figura 6.1.A.

Mai mult decât atât, analiza efectuată asupra valorilor obținute pentru timpul petrecut în jumătatea superioară a arătat, de asemenea, diferențe semnificative ($F(DFn, DFd)=1,442(15, 123)$, $p<0,001$) cu comparațiile individuale între grupuri ilustrate în Figura 6.1.B.

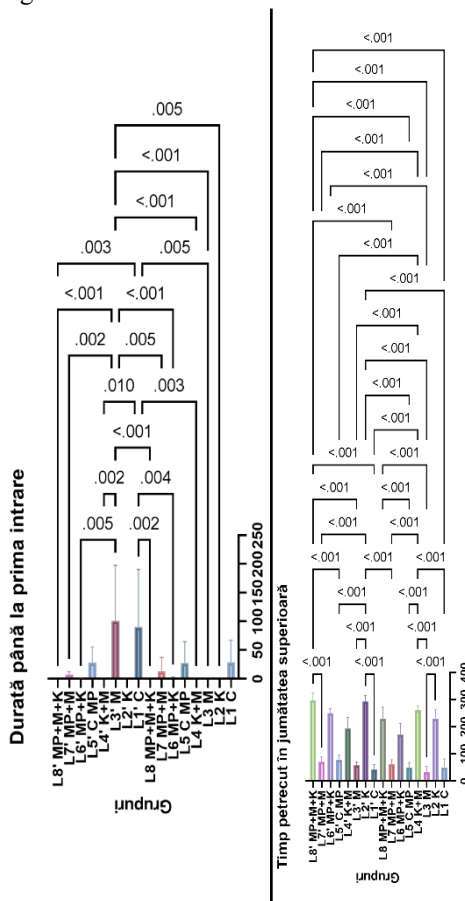


Figura 6.1
Rezultatele
parametrilor
durată până la
prima intrare în
jumătatea
superioară (s)(A)
și timp petrecut în
jumătatea
superioară (s)(B)
ale testului de
acvariu nou.

În cazul nr. de rotații în sensul acelor de ceasornic, analiza statistică a arătat diferențe semnificative ($F(DFn, DFd)=1,044(15, 123)$, $p<0,001$) cu diferențele semnificative individuale de interes ilustrate în Figura 6.3.A. Analiza efectuată asupra valorilor obținute pentru nr. de rotații în sensul opus acelor de ceasornic a arătat, de asemenea, diferențe semnificative ($F(DFn, DFd)=2,127(15, 123)$, $p=0,035$) cu comparațiile individuale între grupuri ilustrate în Figura 6.3.B. Analiza efectuată asupra valorilor obținute pentru durata totală de *freezing* (îngheț) a arătat, de asemenea, diferențe semnificative ($F(DFn, DFd)=1,078(15, 123)$, $p=0,007$) cu comparațiile individuale între grupuri ilustrate în Figura 6.3.C.

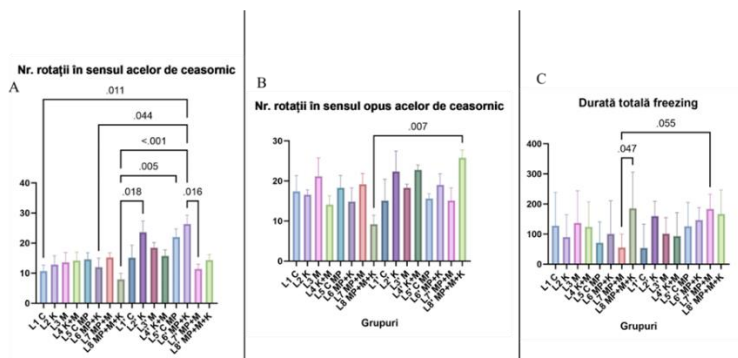


Figura 6.2 Rezultatele parametrilor nr. rotații în sensul acelor de ceasornic (A), nr. rotații în sensul opus acelor de ceasornic (B) și durata totală freezing (îngheț) (C) ale testului de acvariu nou. Rezultatele sunt ilustrate ca medie $\pm$ SD cu un $p<0.05$ considerat a fi semnificativ.

6.2.2. Personalitate

Analiza statistică a timpului petrecut în jumătatea superioară a arătat diferențe semnificative între grupuri ($p<0,001$),

dar nu și între tipuri de personalitate ($p=0,438$). Mai mult decât atât, s-au observat multiple diferențe semnificative între grupuri pe baza personalității, cum ar fi între controlul izolat timid și grupul de ketamină izolat timid ($p=0,004$) sau între grupul de ketamină împreună îndrăzneț și cel de metionină ($p<0,001$). Aceste diferențe pot fi observate în Figura 6.6.A. Au fost considerate semnificative diferențele $p<0,05$. În privința analizei pe bază de personalitate și condiții de găzduire nu au fost identificate diferențe semnificative ($p=0,069$)(Figura 6.6 B) și nici în cazul analizei între tipuri de personalitate independent de grupul de tratament ($p=0,104$)(Figura 6.6 C).

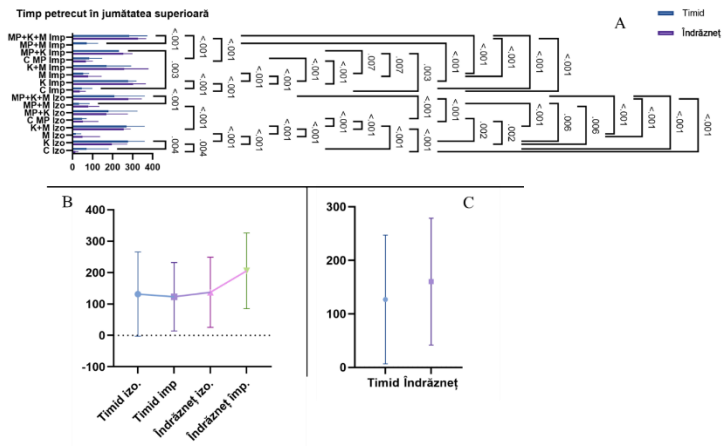


Figura 6.3 Analiză statistică a timpului petrecut în jumătatea superioară (s). A – analiza pe baza de grupuri și personalitate, B – analiza pe baza personalității și condițiile de găzduire, C – analiza pe baza personalității. Rezultatele sunt ilustrate ca medie $\pm$ SEM/SD și au fost considerate semnificative cele cu $p < 0,001$).

Analiza statistică a numărului de intrări în jumătatea superioară arătat diferențe semnificative între grupuri ($p < 0,001$),

dar și între tipuri de personalitate ($p=0,023$). S-au observat diferențe semnificative între grupuri pe baza personalității. Aceste diferențe pot fi observate în Figura 6.7.A. Au fost considerate semnificative diferențele $p<0,05$. În privința analizei pe bază de personalitate și condiții de găzduire au fost identificate diferențe semnificative ($p=0,011$) între peștii timizi împreună și cei îndrăzneți izolați ($p=0,009$) (Figura 6.7 B), dar și în cazul analizei între tipuri de personalitate independent de grupul de tratament ($p=0,002$)(Figura 6.7 C).

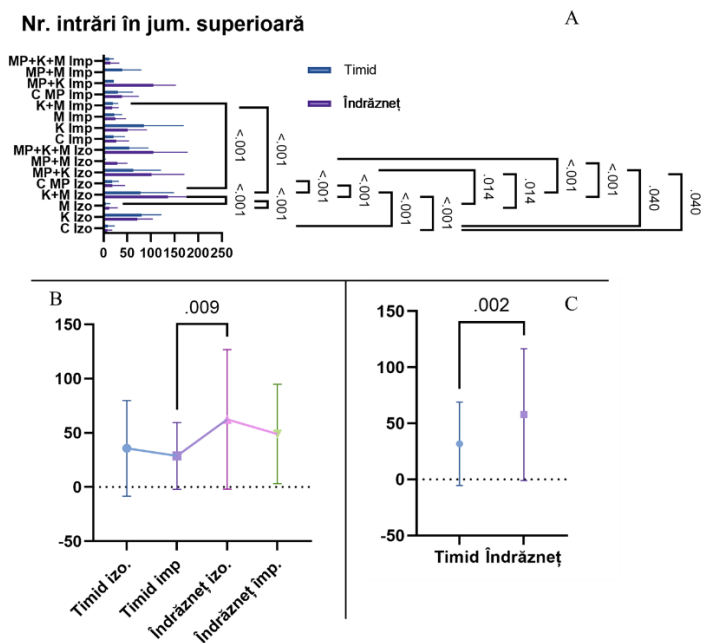


Figura 6.4 Analiză statistică a nr. intrări în jumătatea superioară. A – analiza pe baza de grupuri și personalitate, B – analiza pe baza personalității și condițiile de găzduire, C – analiza pe baza personalității. Rezultatele sunt ilustrate ca medie $\pm$ SD/SEM și au fost considerat semnificative cele cu $p<0,001$.

Analiza statistică a distanţei parcurse a arătat diferenţe semnificative între grupuri ($p=0,002$), dar şi între tipuri de personalitate ($p<0,001$). S-au observat multiple diferenţe semnificative între grupuri pe baza personalităţii. Aceste diferenţe pot fi observate în Figura 6.8.A. În privinţa analizei pe bază de personalitate şi condiţii de găzduire au fost identificate diferenţe semnificative ($p<0,001$) între peştii timizi izolaţi şi cei îndrăzneţi izolaţi ($p=0,001$) (Figura 6.8 B), dar şi în cazul analizei între tipuri de personalitate independent de grupul de tratament ($p<0,001$)(Figura 6.8 C).

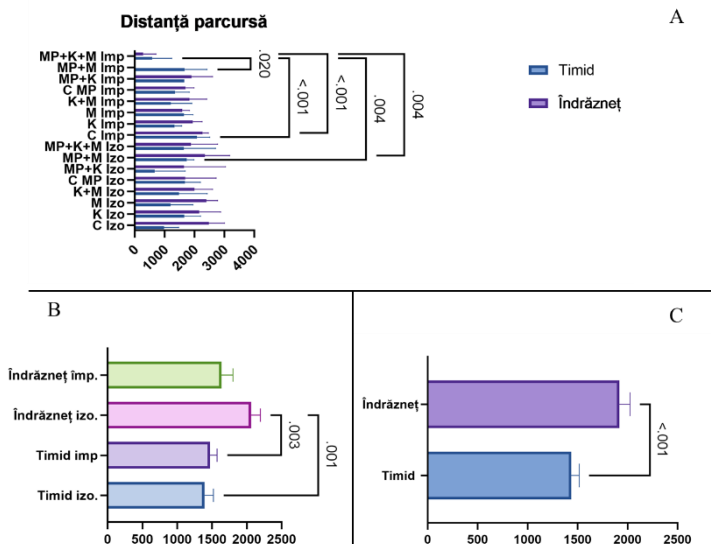


Figura 6.5 Analiză statistică a distanţei totale parcurse (mm). A – analiza pe baza de grupuri şi personalitate, B – analiza pe baza personalităţii şi condiţiile de găzduire, C – analiza pe baza personalităţii. Rezultatele sunt ilustrate ca medie $\pm$ SEM şi au fost considerat semnificative cele cu $p<0,001$.

Analiza statistică a duratei totale de îngheţ a arătat diferenţe semnificative între grupuri, dar şi între tipuri de personalitate (Figura 6.9.A). Au fost identificate diferenţe semnificative între peştii timizi izolaţi şi cei împreună ($p=0,033$), între cei îndrăzneţi izolaţi şi cei împreună ($p=0,004$), dar şi între timid izo şi îndrăzneţi izo ($p<0,001$) (Figura 6.9 B), dar şi în cazul analizei între tipuri de personalitate independent de grupul de tratament ($p<0,001$) (Figura 6.9 C).

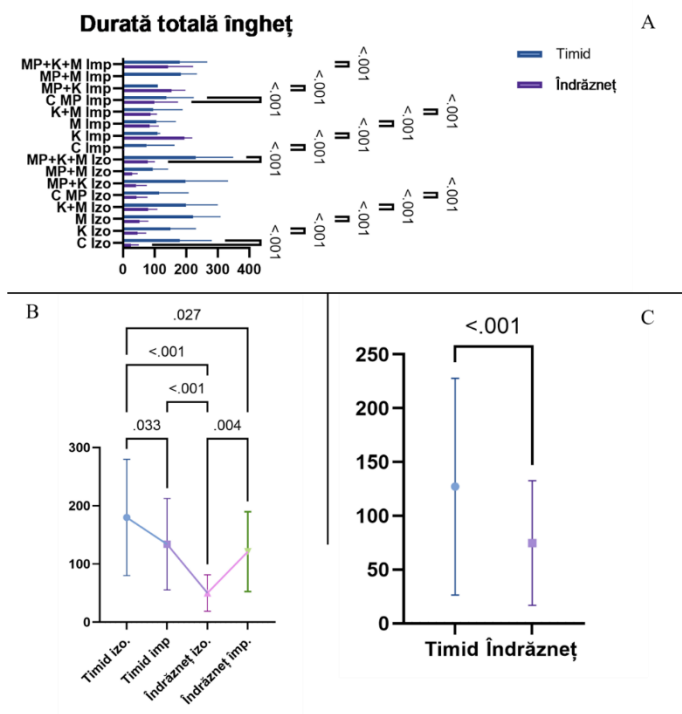


Figura 6.6 Analiză statistică a duratei totale de îngheţ (s). A – analiza pe baza de grupuri şi personalitate, B – analiza pe baza personalităţii şi condiţiile de găzduire, C – analiza pe baza personalităţii. Rezultatele sunt ilustrate ca medie $\pm$ SD şi au fost considerat semnificative cele cu $p<0,001$.

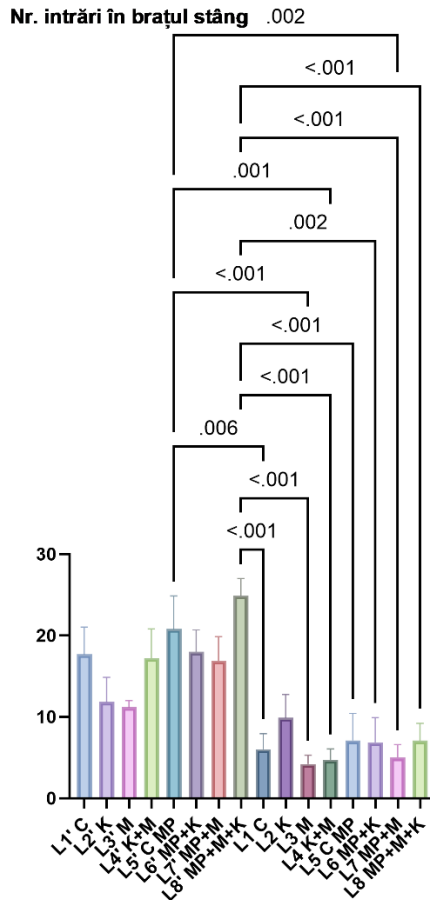


Figura 6.8 Rezultate statistice ale parametrului de număr de intrări în brațul stâng. Rezultatele sunt ilustrate ca medie $\pm$ SEM și au fost considerat semnificative cele cu $p < 0,05$).

6.3.2. Personalitate

Analiza statistică a duratei până la prima intrare în brațul stâng arătat diferențe semnificative între grupuri ($p=0.041$), dar nu

şi între tipuri de personalitate ($p=0,319$.) (Figura 6.15.A.). În privinţa analizei dependente de tipul de personalitate şi de condiţiile de găzduire au fost identificate diferenţe semnificative ($p=0,002$) între peştii timizi izolaţi şi cei împreună ($p=0,001$), dar şi între peştii timizi izolaţi şi cei îndrăzneţi împreună ($p=0,035$) (Figura 6.15 B), dar fără diferenţe între tipurile de personalitate independent de grupul de tratament ($p=0,989$)(Figura 6.15 C).

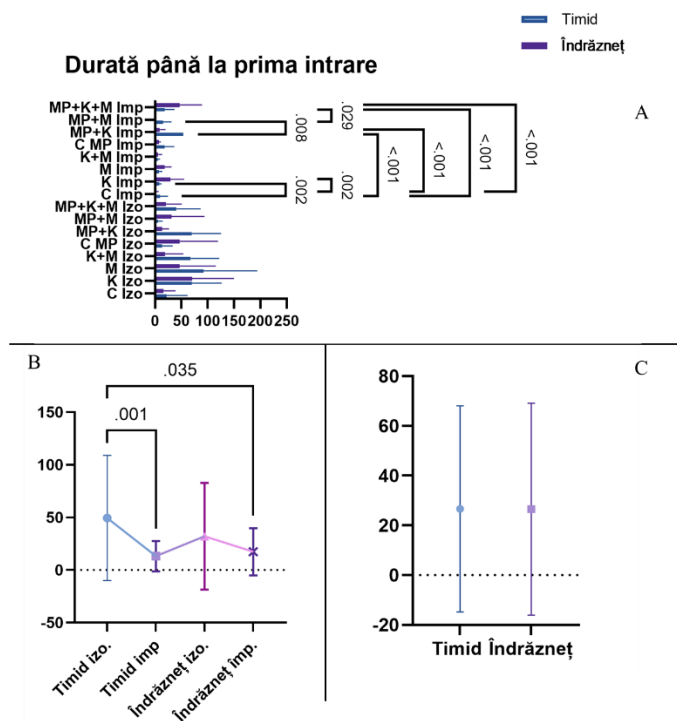


Figura 6.9 Analiză statistică a duratei până la prima intrare în braţul stâng (s). A – analiza pe baza de grupuri şi personalitate, B – analiza pe baza personalităţii şi condiţiile de găzduire, C – analiza pe baza personalităţii. Rezultatele sunt ilustrate ca medie $\pm$ SD şi au fost considerat semnificative cele cu $p < 0,05$).

În privința timpului total petrecut în brațul stâng, s-au observat diferențe semnificative doar în cazul grupurilor împreună ($p<0,001$) (Figura 6.16 A). În privința analizei dependente de tipul de personalitate și de condițiile de găzduire au fost identificate diferențe semnificative ($p<0,001$) (Figura 6.16 B), și cu diferențe semnificative între tipurile de personalitate independent de grupul de tratament ($p=0,004$) (Figura 6.16 C).

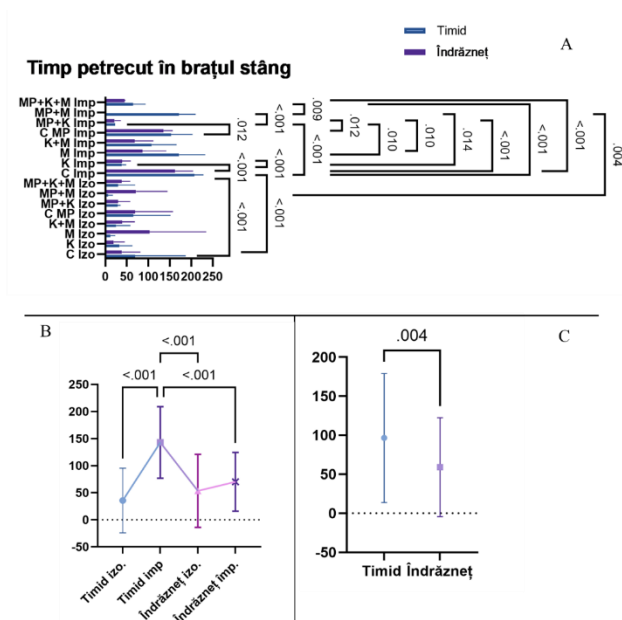


Figura 6.10 Analiză statistică a timpului total petrecut în brațul stâng (s). A – analiza pe baza de grupuri și personalitate, B – analiza pe baza personalității și condițiilor de găzduire, C – analiza pe baza personalității. Rezultatele sunt ilustrate ca medie $\pm$ SD și au fost considerat semnificative cele cu $p<0,05$).

Analiza statistică a numărului de intrări în brațul stâng a arătat diferențe semnificative între grupuri ($p<0,001$), dar nu și

între tipuri de personalitate ($p=0,176$.) (Figura 6.17.A.). În privința analizei dependente de tipul de personalitate și de condițiile de găzduire au fost identificate diferențe semnificative ($p<0,001$) între peștii timizi izolați și cei împreună ($p<0,001$), dar și între peștii îndrăzneți izo și cei îndrăzneți împ ($p<0,001$) (Figura 6.17 B), dar fără diferențe între tipurile de personalitate independent de grupul de tratament ($p=0,635$) (Figura 6.17 C).

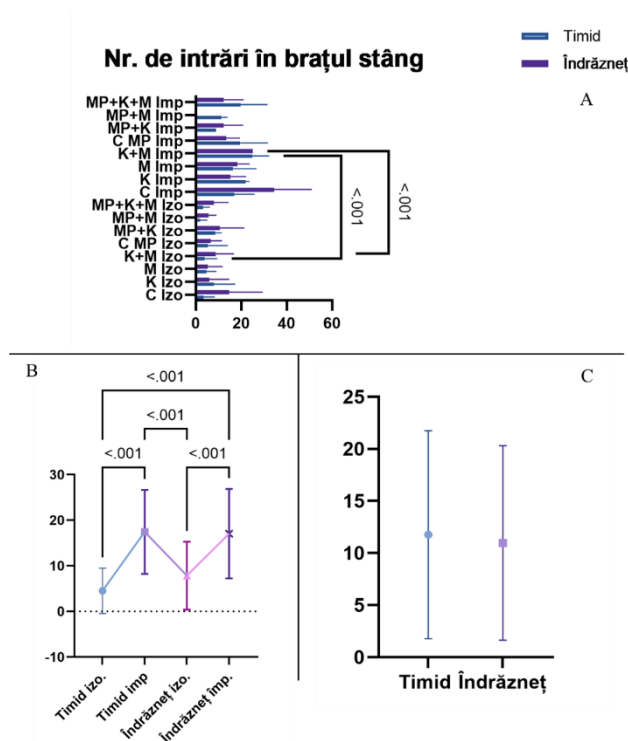


Figura 6.11 Analiză statistică a numărului de intrări în brațul stâng. A – analiza pe baza de grupuri și personalitate, B – analiza pe baza personalității și condițiile de găzduire, C – analiza pe baza personalității. Rezultatele sunt ilustrate ca medie $\pm$ SD și au fost considerat semnificative cele cu $p<0,05$).

6.4. Testul de agresivitate

6.4.1. General

Analiza asupra perioadei de timp petrecut în brațul stâng a arătat rezultate semnificativ diferite ($p < 0,001$) cu multiple diferențe individuale. Rezultate similare au fost obținute și pentru numărul de intrări în brațul stâng ($p < 0,001$). În ciuda faptului că nu sunt diferențe semnificative în privința primei intrări în brațul stâng (chiar dacă vizual există grupuri care au avut nevoie de o perioadă mai mare pentru a face prima intrare în brațul stâng), există deosebiri individuale majore în privința timpului petrecut și numărului de intrări, de exemplu, grupurile izolate (L1-L8) au intrat mai greu în brațul stâng, au petrecut mai puțin timp acolo și au intrat de mai puține ori. Aceste rezultate pot fi observate în Figura 6.22.A și B.

În privința pușeurilor de înot accelerat, nu au fost identificate diferențe semnificative în funcție de durată, dar au fost identificate pe baza numărului (F (DF_n , DF_d)=1,395 (15, 125), $p < 0,001$) (Figura 6.23).

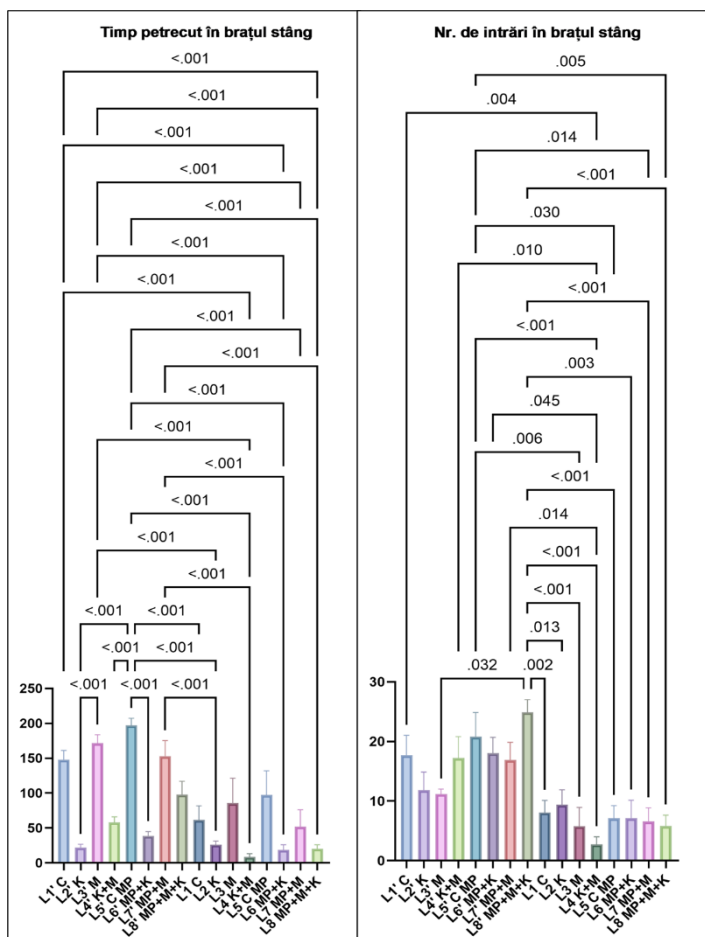


Figura 6.12 Rezultate statistice ale parametrului de timp total petrecut în brațul stâng (s) (A) și număr de intrări în brațul stâng (B). Rezultatele sunt ilustrate ca medie $\pm$ SD și au fost considerat semnificative cele cu $p < 0,05$.

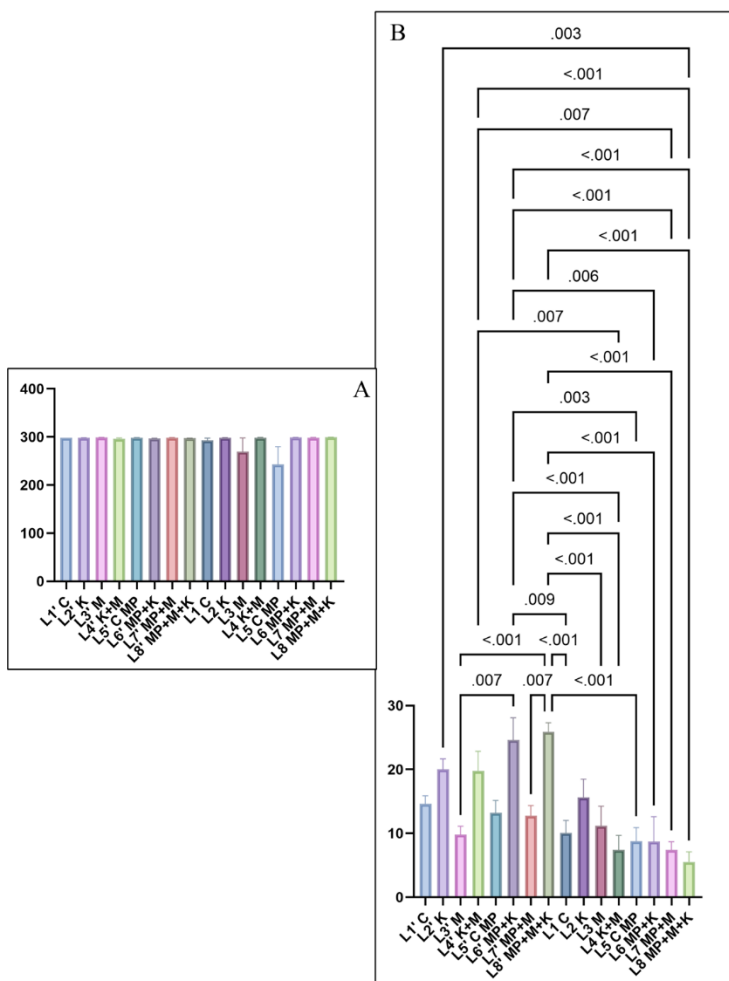


Figura 6.13 Rezultate statistice ale parametrului de durată pușeuri de înot accelerat (s) (A) și număr pușeuri de înot accelerat (B). Rezultatele sunt ilustrate ca medie $\pm$ SD și au fost considerat semnificative cele cu $p < 0,05$.

6.4.2. Personalitate

În cazul timpului total petrecut în brațul stâng s-au observat diferențe semnificative doar între tratamente ($p < 0,001$), dar fără diferențe individuale semnificative (Figura 6.26 A). În analiza dependentă de tipul de personalitate și condițiile de găzduire s-au identificat diferențe semnificative statistic ($p < 0,001$) (Figura 6.26 B). Mai mult decât atât, s-au observat diferențe semnificative în cazul analizei independente de grup de tratament și condiții de găzduire ($p < 0,001$) (Figura 6.26 C).

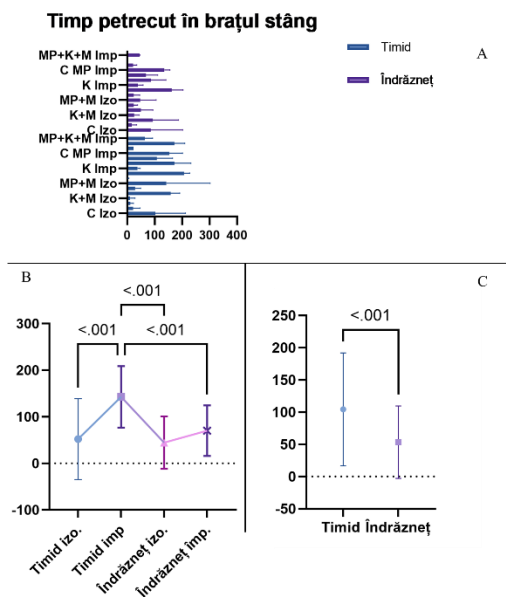


Figura 6.14 Analiză statistică a timpului total petrecut în brațul stâng (s). A – analiza pe baza de grupuri și personalitate, B – analiza pe baza personalității și condițiile de găzduire, C – analiza pe baza personalității. Rezultatele sunt ilustrate ca medie $\pm$ SD și au fost considerat semnificative cele cu $p < 0,05$).

Analiza statistică a numărului și duratei pușeurilor de înot arătat diferențe semnificative între grupurile de tratament ($p<0,001$), dar nu și între tipurile de personalitate ($p=0,065$). Aceste diferențe pot fi observate în Figura 6.29.A. În privința analizei dependente de tipul de personalitate și de condițiile de găzduire au fost identificate diferențe semnificative ($p<0,001$) (Figura 6.29 B), cu toate că, nu au fost identificate diferențe între tipurile de personalitate independent de grupul de tratament ($p=0,204$)(Figura 6.29 C).

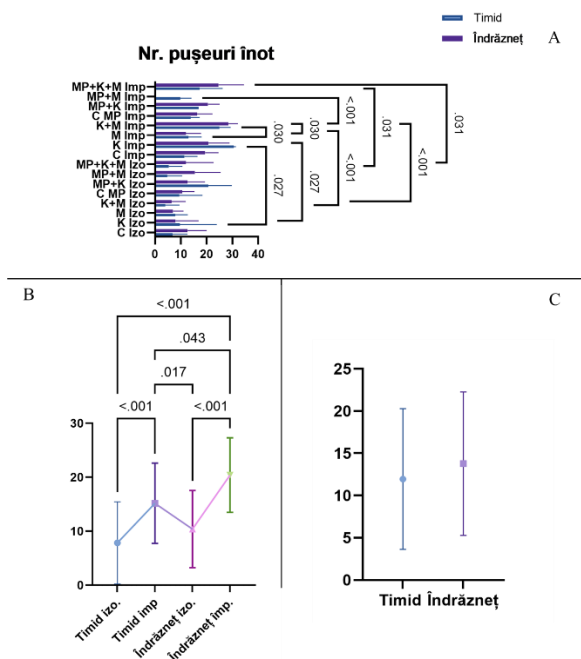


Figura 6.15 Analiză statistică a numărului de pușeuri de înot. A – analiza pe baza de grupuri și personalitate, B – analiza pe baza personalității și condițiile de găzduire, C – analiza pe baza personalității. Rezultatele sunt ilustrate ca medie $\pm$ SD și au fost considerat semnificative cele cu $p<0,05$).

6.5. Testul de lumină-întuneric

6.5.1. General

În cazul raportului timpului petrecut în fiecare dintre cele două braţe s-au obţinut rezultate individuale semnificative statistic pentru fiecare grup de studiu conform Figurii 6.35.

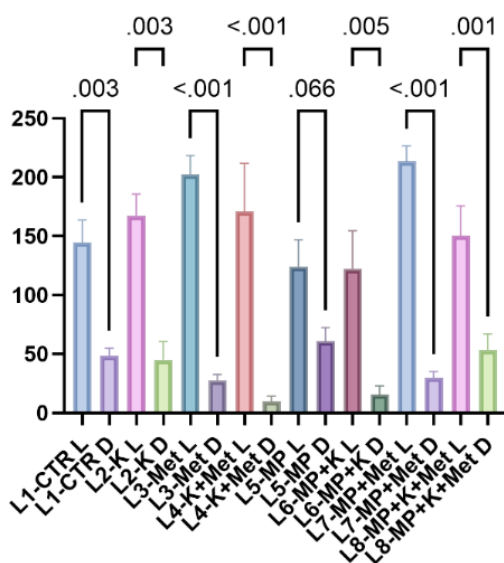


Figura 6.16 Rezultatele analizării raportului dintre timpul petrecut în fiecare dintre cele două braţe ale grupurilor împreună. Rezultatele sunt ilustrate ca medie $\pm$ SD şi au fost considerate semnificative cele cu $p < 0,05$. L – în braţul luminos, D – în braţul întunecat.

Mai mult decât atât, s-au obţinut rezultate semnificative între grupuri şi în privinţa distanţei totale parcurse (Figura 6.36).

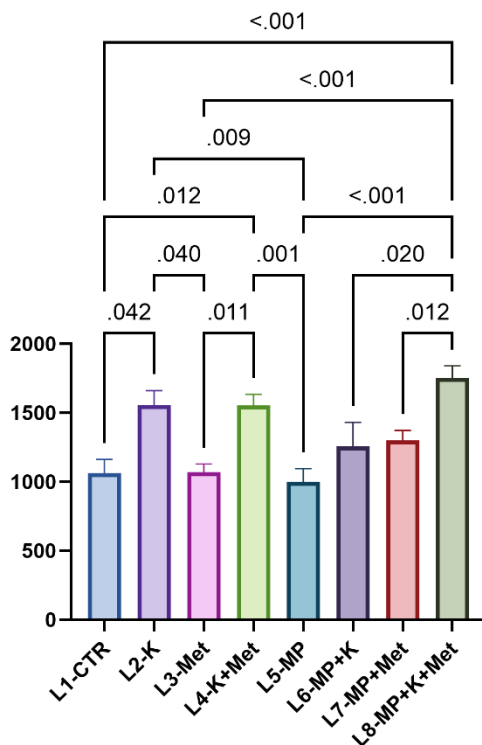


Figura 6.17 Rezultatele analizării distanţei parcurse ale grupurilor împreună (mm). Rezultatele sunt ilustrate ca medie $\pm$ SD şi au fost considerate semnificative cele cu $p < 0,05$

6.5.2. Personalitate

Analiza timpului petrecut în braţul întunecat a arătat diferenţe semnificative între grupurile de tratament ($p=0,001$) (Figura 6.41 A). Cu toate acestea, nu au fost identificate diferenţe semnificative între tipurile de personalităţi în privinţa timpului total petrecut în braţul întunecat ($p=0,748$) (Figura 6.42 B).

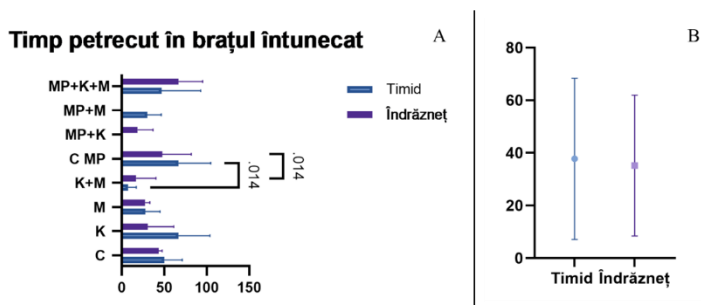


Figura 6.18 Analiză statistică a timpului petrecut în brațul întunecat (s). A – analiza pe baza de grupuri și personalitate, B – analiza pe baza personalității independent de tratament. Rezultatele sunt ilustrate ca medie $\pm$ SD și au fost considerat semnificative cele cu $p < 0,05$).

Pentru numărul de intrări în brațul întunecat au fost obținute diferențe semnificative între grupurile de tratament ($p=0,007$) (Figura 6.42 A), dar fără diferențe semnificative între tipurile de personalitate ($p=0,677$) (Figura 6.42 B).

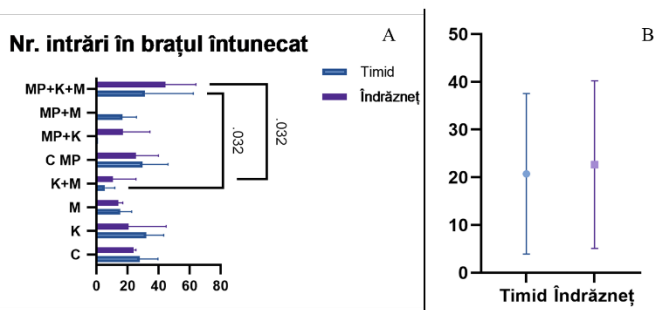


Figura 6.19 Analiză statistică a numărului de intrări în brațul întunecat. A – analiza pe baza de grupuri și personalitate, B – analiza pe baza personalității independent de tratament. Rezultatele sunt ilustrate ca medie $\pm$ SD și au fost considerat semnificative cele cu $p < 0,05$).

Analiza statistică a distanței totale parcurse a arătat diferențe semnificative între grupurile de tratament ($p < 0,001$) în care peștii timizi din grupurile C, M, C MP au explorat

semnificativ mai puțin decât peștii timizi din grupul MP+K+M ($p < 0,001$), dar și peștii îndrăzneți din grupurile C, M, C MP au explorat labirintul de testare semnificativ mai puțin decât cei îndrăzneți din grupul MP+K+M ($p < 0,001$, respectiv $p = 0,007$) (Figura 6.43 A). Cu toate acestea, nu au fost identificate diferențe semnificative între tipurile de personalitate independent de tratament ($p = 0,680$) (Figura 6.43 B).

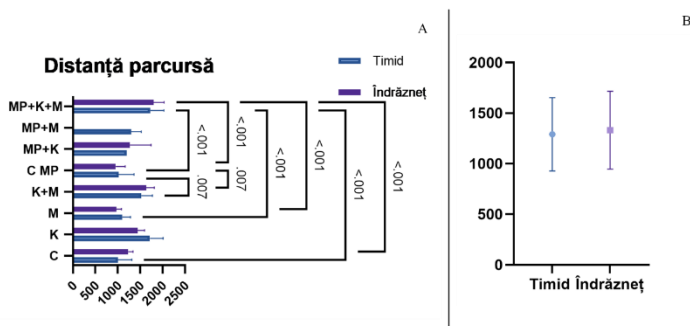


Figura 6.20 Analiză statistică a distanței totale parcurse (mm). A – analiza pe baza de grupuri și personalitate, B – analiza pe baza personalității independent de tratament. Rezultatele sunt ilustrate ca medie $\pm$ SD și au fost considerat semnificative cele cu $p < 0,05$).

6.6. Testul de memorie pe bază de culori

6.6.1. General

Pe baza diferențelor observate vizual, lotul L3 M a prezentat cea mai bună capacitate cognitivă, deoarece a avut o proporție de peste 50% dintre pești care au ales brațul roșu prima dată, urmați de L5 MP, L4 M+L și L6 MP+K. Aceste rezultate pot fi vizualizate în Figura 6.45.

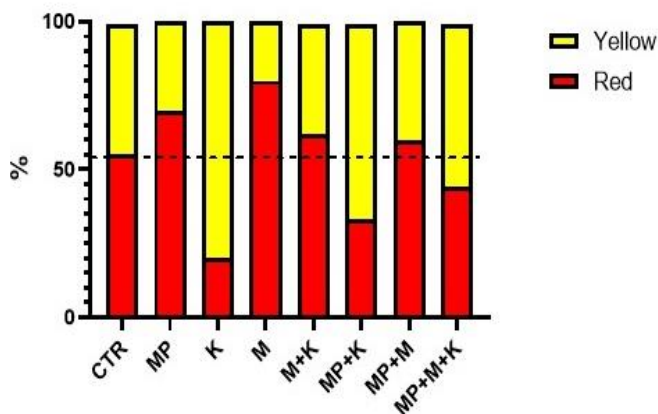


Figura 6.21 Rezultatele ale primei alegeri făcute de fiecare grup.
Yellow – galben, Red - roşu

În privința duratei până la prima intrare în brațul roșu, au fost diferențe semnificative între L1 C și L2 K, L5 MP și L2 K, L2 K și L3 M, precum și L2 K și L4 K+M. În același timp, au fost observate diferențe semnificative între L2 K și L1 C, respective L3 M în privința timpului petrecut în brațul roșu, cu cele din urmă petrecând semnificativ mai mult timp în culoarea antrenată. Mai mult decât atât, s-au observat diferențe semnificative și în privința numărului de intrări în brațul roșu, respectiv a distanței parcurse unde grupurile L2 K și L6 MP+K au intrat de semnificativ mai puține ori în brațul roșu comparativ cu celelalte grupuri și au parcurs și cea mai scurtă distanță. Toate aceste rezultate pot fi vizualizate în Figura 6.46.

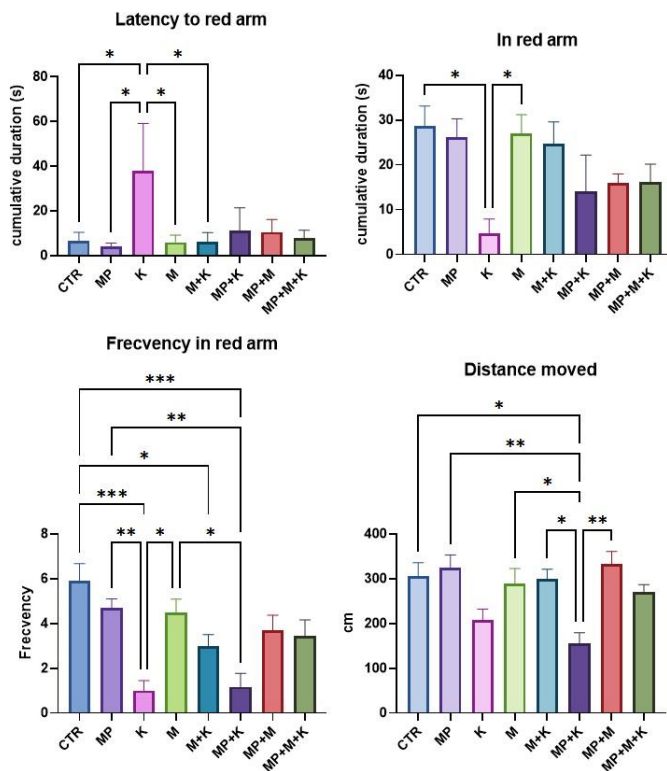


Figura 6.22 Analizarea rezultatelor obținute în cadrul testului de memorie pe bază de culori a următorilor parametri de studiu: durata până la prima intrare în brațul roșu (s), timpul petrecut în brațul roșu (s), numărul de intrări în brațul roșu și distanța parcursă (cm). Rezultatele sunt ilustrate ca medie $\pm$ SD și au fost considerate semnificative cele cu $p < 0,05$, * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$, *** - $p < 0,001$.

6.6.2. Personalitate

Prima alegere a peștilor din fiecare grup de tratament diferențiați pe baza personalității poate fi vizualizată în Figura 6.47.

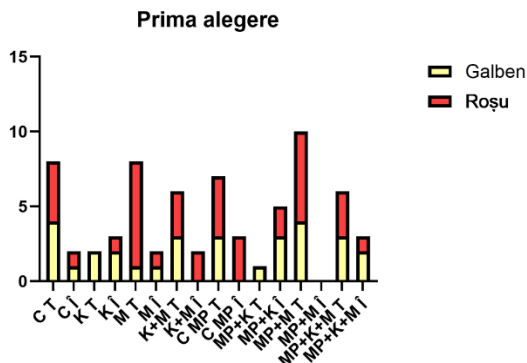


Figura 6.23 prima alegere a peștilor zebură în funcție de grupul de tratament și personalitate

Diferențe apar în privința timpului total petrecut în brațul roșu unde au fost identificate diferențe semnificative între grupurile de tratament ($p < 0,001$), dar fără diferențe individuale (Figura 6.50 A) și fără diferențe semnificative între tipurile de personalitate ($p = 0,432$) (Figura 6.50 B).

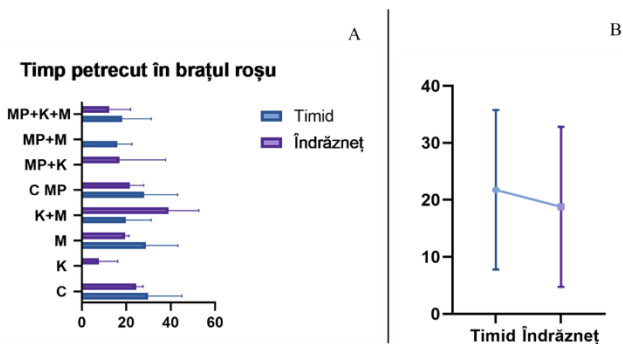


Figura 6.24 Analiză statistică a timpului petrecut în brațul roșu (s). A – analiza pe baza de grupuri și personalitate, B – analiza pe baza personalității independent de tratament. Rezultatele sunt ilustrate ca medie $\pm$ SD și au fost considerat semnificative cele cu $p < 0,05$).

În privința numărului de intrări în brațul roșu, analiza statistică între grupurile de tratament a fost semnificativă din punct de vedere statistic ($F(7, 58)=5,210, p<0,001$) cu diferențe notabile între peștii îndrăzneți din grupul C și cei din grupul MP+M ($p=0,003$) și cei îndrăzneți din grupul K cu cei din grupul C MP ($p=0,048$) (Figura 6.52 A). Cu toate acestea, nu au fost identificate diferențe semnificative între tipurile de personalitate independent de grupurile de tratament ($t=1,853, df=65, p=0,068$) (Figura 6.52 B).

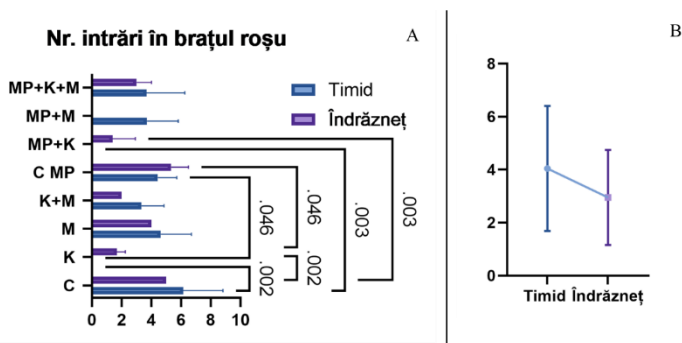


Figura 6.25 Analiză statistică a numărului de intrări în brațul roșu. A – analiza pe baza de grupuri și personalitate, B – analiza pe baza personalității independent de tratament. Rezultatele sunt ilustrate ca medie $\pm$ SD și au fost considerat semnificative cele cu $p<0,05$).

6.7. Ministudiu asupra efectului disociativ al ketaminei

Împărțirea peștilor zebra într-o personalitate sau alta s-a făcut pe baza track-urilor și s-a urmărit evoluția și schimbarea trăsăturilor de personalitate în urma tratamentului cu ketamină.

În Figura 6.54 sunt prezentate track-urile și heatmap-urile unui grup de 4 pești categorisiți ca fiind timizi pre-tratament și îndrăzneți post-tratament.

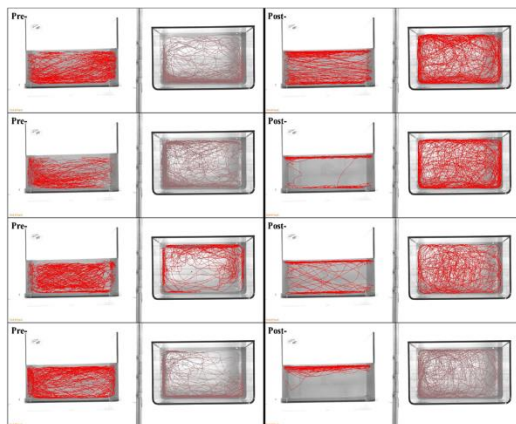


Figura 6.26 Track-urile a patru pești pre- și post- tratament cu ketamină care ilustrează schimbări comportamentale clare ale tiparului de înot și a tendinței de explorare.

În Figura 6.55 sunt ilustrate heatmap-urile pentru o mai bună apreciere a preferinței de a sta pe lângă pereți/de a explora acvariul a fiecăruia dintre peștii studiați.

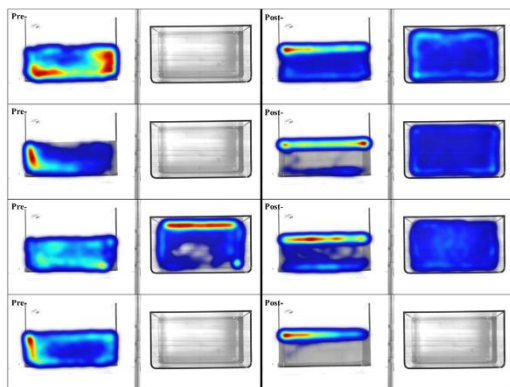


Figura 6.27 Heatmap-urile a patru pești pre- și post- tratament cu ketamină care ilustrează schimbări comportamentale clare ale tiparului de înot și a tendinței de explorare.

În Figura 6.56 sunt prezenți următorii parametri: durată până la prima intrare în jumătatea superioară a acvariului (A), timpul petrecut în jumătatea superioară (B), numărul de intrări în jumătatea superioară (C), timpul petrecut în jumătatea inferioară (D) și numărul de intrări în jumătatea inferioară (E). Astfel, au fost obținute diferențe semnificative din punct de vedere statistic între înainte și după tratament în cazul timpului petrecut în jumătatea superioară ($p=0,002$) și numărului de intrări în jumătatea inferioară ($p<0,001$).

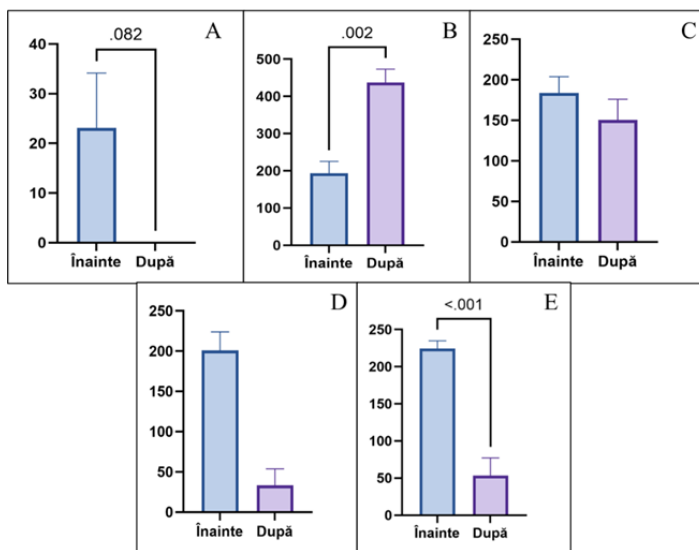


Figura 6.28 Durată până la prima intrare în jumătatea superioară (s) (A), timpul petrecut în jumătatea superioară (s) (B), numărul de intrări în jumătatea superioară (C), timpul petrecut în jumătatea inferioară (s) (D) și numărul de intrări în jumătatea inferioară (E). Rezultatele sunt ilustrate ca medie $\pm$ SD și au fost considerate semnificative cele cu $p<0,05$.

6.8. Imunohistochimie

Au fost observate o serie de schimbări histopatologice în diferite straturi ale tectumului optic al peștilor zebra în urma expunerii la microplastice, ketamină, metionină și cele combinate. Severitatea și frecvența leziunilor a fost mai pronunțată în grupurile L6 MP+K, L7 MP+M și mai atenuată în grupurile L8 MP+K+M și L4 M+K.

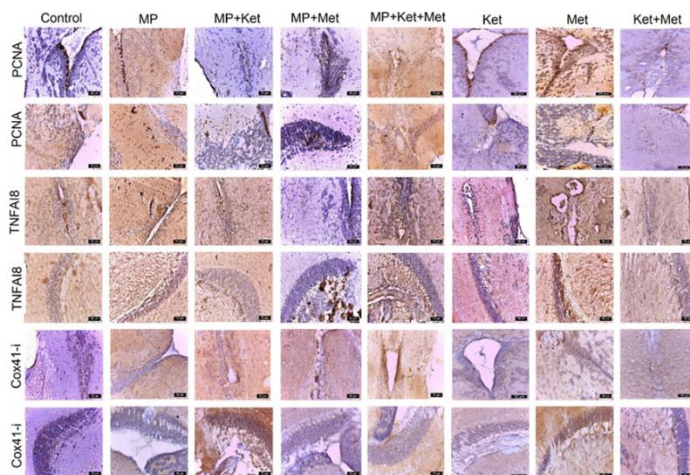


Figura 6.29 Expresiile diferite a PCNA, TNF α 18, COX41-I în diferite grupuri experimentale și grupurile de control. Pe rândurile 1,3 și 5 se observă expresia periventriculară, în timp ce pe rândurile 2,4 și 6 expresia este observată la nivelul tectumului optic.

Prezența expresiei TNF α 18 în sistemul nervos al peștilor zebra din grupurile experimentale sugerează prezența unui proces inflamator generat de MP, K, M și combinația acestora. Mai mult decât atât, au fost observate niveluri diferite ale expresiei COX41-I în zona periventriculară și tectumul optic, acestea sugerând

existența a diferite grade de generare de ATP dependent de expresia factorului de inducție a hipoxiei.

6.9. Stresul oxidativ

Mai mult, în privința nivelului de SOD (Figura 6.62), s-au observat diferențe semnificative între: L2 K și L6 MP+K ($p<0,05$), L3 M și L6 MP+K ($p<0,05$), L6 MP+K și L7 MP+M ($p<0,01$). În privința nivelului de GPx (Figura 6.62), s-au identificat diferențe semnificative între L1 C și L8 MP+K+M ($p<0.0001$), L5 MP și L8 MP+M+K ($p<0.01$), L2 K și L8 MP+M+K ($p<0.01$), L6 MP+K și L8 MP+M+K ($p<0.01$), L7 MP+M vs. L8 MP+M+K ($p<0,05$). Iar în privința MDA (Figura 6.62), diferențe semnificative au fost observate între L5 MP și L7 MP+M ($p<0,01$), L2 K și L7 MP+M ($p<0,05$).

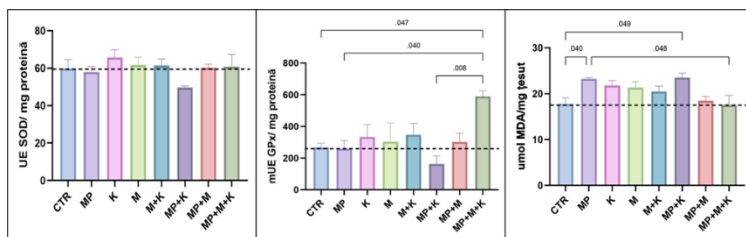


Figura 6.30 Rezultatele biomarkerilor de stres oxidativ

6.10. Activitatea alfa-amilazei

Activitatea alfa-amilazei a fost măsurată atât pentru grupurile izolate, cât și pentru cele împreună, iar rezultatele au fost exprimate ca U/mg țesut.

În cazul acestei măsurători, analiza statistică a fost semnificativă ($F(15, 30)=2.613$, $p=0,012$), dar nu au fost identificate diferențe semnificative statistic individuale (Figura 6.63).

Nivel activitate amilază (U/mg țesut)

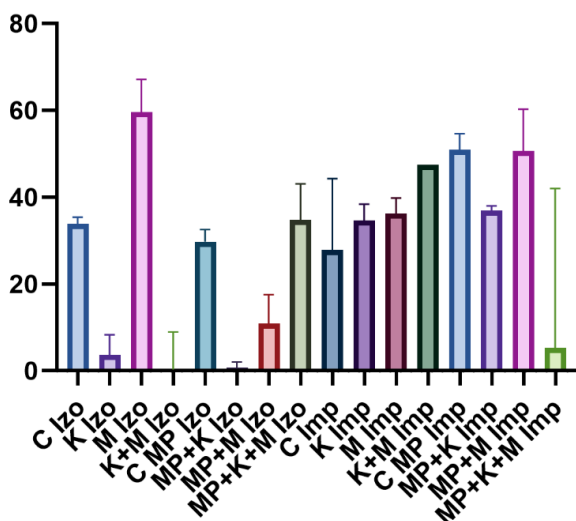


Figura 6.31 Analiză statistică a activității alfa-amilazei exprimate ca U/mg țesut. Rezultatele sunt ilustrate ca medie $\pm$ SD și au fost considerat semnificative cele cu $p < 0,05$.

6.10.1. Corelații între nivelul activității alfa-amilazei și parametrii comportamentali

Markerii pentru anxietate utilizați în această analiză au fost timpul până la prima intrare în jumătatea superioară a acvariului și durata episoadelor de îngheț. În cazul peștilor cu un nivel crescut de alfa-amilază s-a identificat o slabă corelație

pozitivă (Figura 6.64 A), dar mai puternică decât în cazul corelației dintre peștii cu un nivel scăzut de alfa amilază (Figura 6.64 B).

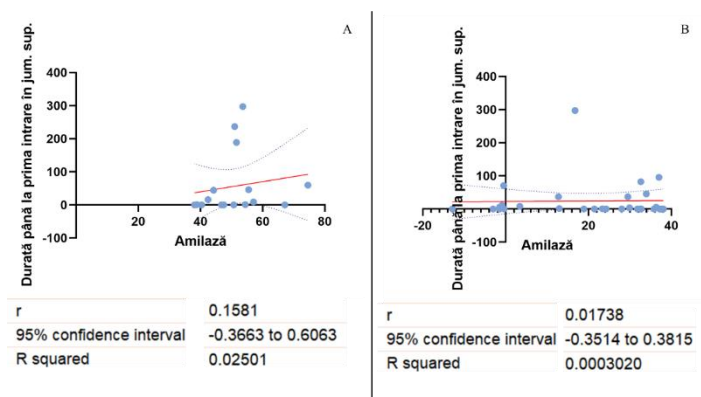


Figura 6.32 Corelație între nivelul de alfa amilază și durata până la prima intrare în jumătatea superioară. A – corelație între un nivel crescut de alfa amilază și durata până la prima intrare în jumătatea superioară (corelație slab pozitivă, $r=0,1581$), B – corelație între un nivel scăzut de alfa-amilază și durata până la prima intrare în jumătatea superioară (corelație inexistentă, $r=0,01738$).

În cazul duratei episoadelor de îngheț, s-a obținut o corelație slab negativă între un nivel scăzut de alfa amilază și durata totală a episoadele de îngheț (Figura 6.65 A)/

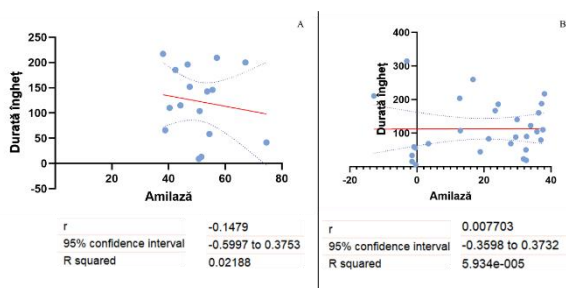


Figura 6.33 Corelație între nivelul de alfa amilază și durata episoadelor de îngheț. A – corelație între un nivel crescut de alfa amilază și durata episoadelor de îngheț (corelație slab negativă, $r=-0,1479$), B – corelație între un nivel scăzut de alfa-amilază și durata episoadelor de îngheț (corelație inexistentă, $r=0,007703$).

S-a obținut o corelație moderată pozitivă doar între un nivel crescut de alfa-amilază și distanța totală parcursă (Figura 6.66 A).

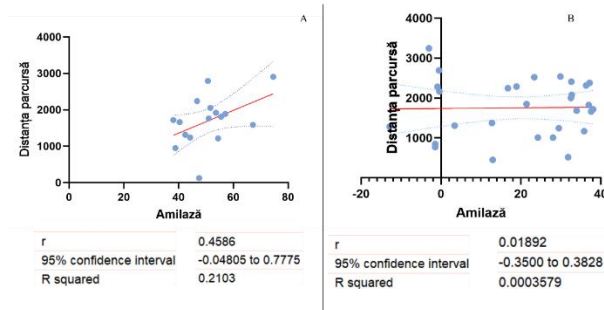


Figura 6.34 Corelație între nivelul de alfa amilază și distanța totală parcursă. A – corelație între un nivel crescut de alfa amilază și distanța totală parcursă (corelație moderată pozitivă, $r=0,4586$), B – corelație între un nivel scăzut de alfa-amilază și distanța totală parcursă (corelație inexistentă, $r=0,01892$).

S-a obținut doar o corelație slab pozitivă între un nivel scăzut de amilază și timpul petrecut în brațul cu conspecifici (Figura 6.67 B).

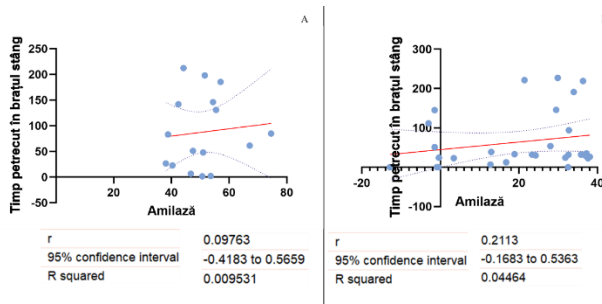


Figura 6.35 Corelație între nivelul de alfa amilază și timpul petrecut în brațul stâng. A – corelație între un nivel crescut de alfa amilază și timpul petrecut în brațul stâng (corelație inexistentă, $r=0,09763$), B – corelație între un nivel scăzut de alfa-amilază și timpul petrecut în brațul stâng (corelație slab pozitivă, $r=0,2113$).

Agresivitatea în acest caz a fost măsurată prin intermediul numărului de puşuri de înot din cadrul testului de agresivitate. Prin intermediul analizei, am obţinut o corelaţie moderată pozitivă între un nivel crescut de amilază şi numărul de puşuri de înot ($r=0,3145$, $R^2=0,09888$) (Figura 6.68 A), dar şi o corelaţie puternic moderată pozitivă între un nivel scăzut de alfa-amilază şi numărul de puşuri de înot ($r=0,5433$, $R^2=0,2951$) (Figura 6.68 B).

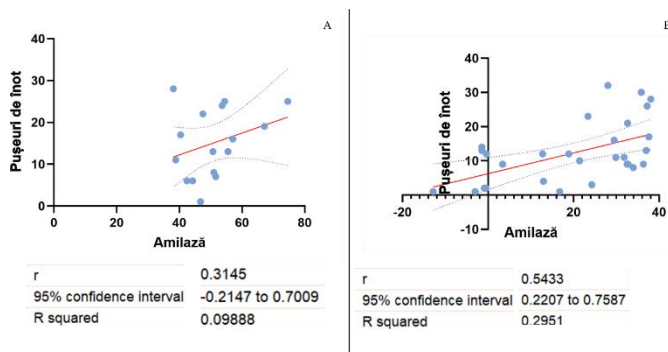


Figura 6.36 Corelaţie între nivelul de alfa amilază şi numărul de puşuri de înot. A – corelaţie între un nivel crescut de alfa amilază şi numărul de puşuri de înot (corelaţie moderată pozitivă, $r=0,3145$), B – corelaţie între un nivel scăzut de alfa-amilază şi numărul de puşuri de înot (corelaţie puternic moderată pozitivă, $r=0.5433$)

7. *Discuții*

La animale, trăsăturile de personalitate se referă la tipare constante de comportament, cogniție și răspunsuri emoționale care pot fi observate în diferite situații de-a lungul timpului (70). Câteva dintre aceste trăsături sunt: îndrăzneala (71) (tendința de a-și asuma riscuri sau de arăta curaj într-o situație nouă), agresivitatea (72) (evidențiată prin gradul de luptă, teritorialitate și dominanță), sociabilitatea (73) (preferința de a sta în vecinătatea conspecificilor sau chiar indivizi ai altor specii), nivelul de activitate (74) (animale pot fi diferențiate pe baza nivelului de activitate), nivelul de explorare (74) (tendința de a explora medii noi, de a fi mai curioși), neofobie/neofilie (75) (frica/curiozitatea pentru lucruri noi), anxietatea (76) (felul în care răspund la stimuli sau situații).

Acestea fiind spuse, studiile sugerează următoarea distincție între personalități (și caracteristici specifice): personalitatea proactivă sau îndrăzneată (tendință exploratorie crescută, nivel de agresivitate crescut, nivel de sociabilitate crescut, înot în întregimea acvariului, mai puțin predispuși la anxietate, abilități cognitive mai bune, părăsirea spațiului de confort mai rapidă) și personalitatea reactivă sau timidă (tendință exploratorie scăzută, agresivitate scăzută, sociabilitate scăzută, preferință de a sta la fundul acvariului, predispus la anxietate, mai mult timp petrecut în zona de confort (77–80)).

În contextul testului de acvariu nou, durata până la prima intrare în jumătatea superioară serveşte drept indicator al nivelului de anxietate. Astfel, cu cât acest timp este mai lung cu atât anxietatea peştelui este mai mare. În cazul studiului curent, grupului de control împreună (L1' C) i-a luat semnificativ mai mult timp să intre în jumătatea superioară comparativ cu aproape toate celelalte grupuri (mai puţin grupul de metionină împreună) şi a petrecut semnificativ mai puţin timp în jumătatea superioară, aspecte ce reflectă comportamentul considerat normal pentru această specie şi care sunt conforme cu datele din literatură. Un aspect interesant este faptul că peştii izolaţi au avut un nivel de anxietate semnificativ mai mare decât grupurile împreună în toţi parametri urmăriţi, mai puţin grupurile cu ketamină care au avut un nivel de anxietate mai scăzut. Acest lucru este ilustrat şi în alte studii care investighează posibile efecte anxiolitice ale ketaminei şi poate fi explicat prin faptul că ketamina creşte neuroplasticitatea şi reglează receptorii glutamat care în schimb cresc fluxul de gânduri pozitive şi scad anxietatea şi depresia. Diferenţele între grupurile izolate social şi cele împreună sunt susţinute de rezultatele din literatură asupra nivelului de anxietate investigat în cazul testului de acvariu nou (81).

Literatura sugerează că un grup sănătos ar trebui să arate un comportament anxios în cazul expunerii la un nou mediu, manifestat prin tendinţa de a sta la fundul acvariului, durată mai lungă de îngheţ, explorare redusă şi durată mai lungă până la prima intrare în jumătatea superioară. Pe baza faptului că expunerea la

ketamină imită simptomele pozitive ale schizofreniei, cercetările în domeniu spun că toxicitatea ketaminei conduce la anxietate scăzută manifestată printr-o durată mai mică până la prima intrare în jumătatea superioară a acvariului, mai mult timp petrecut în aceasta, explorare crescută și număr de rotații în sensul acelor de ceasornic crescut. Pe de cealaltă parte, studiile arată că o concentrație de 6.0 mM de metionină ar trebui să scadă anxietatea și să crească explorarea, dar fără să afecteze activitatea locomotorie (82). Deși studiile asupra efectelor microplasticelor sunt reduse, în special asupra polimerilor de polipropilenă se sugerează că ar putea induce comportamente asociate anxietății (83) ceea ce sugerează că în cazul testului de acvariu nou, ar putea conduce la tipare de înot și parametri mai apropiați cu valorile grupurilor de control. Ideea de izolare socială este o continuare a unui studiu publicat anterior obținut printr-o colaborare a grupului nostru de studiu cu un grup de cercetare din Egipt care a analizat potențialul utilizării izolării sociale pentru a prezenta schizofrenia la șobolani masculi albinoși (84).

În cazul metioninei, alte studii au arătat că expunerea la aceasta conduce la reducerea locomoției, reducerea comportamentului agresiv, afectarea memoriei și creșterea anxietății (85). Acest aspect este observat și în studiul prezent unde grupurile de metionină au petrecut semnificativ mai puțin timp în jumătatea superioară, deși au intrat mai repede, au avut mai puține intrări și mai multe rotiri în sensul acelor de ceasornic.

Pentru grupurile împreună de control și ketamină, rezultatele studiului sunt conforme celor din literatură. În cazul metioninei, s-a observat o mică îmbunătățire a duratei până la prima intrare în jumătatea superioară și a timpului petrecut acolo comparativ cu grupul de control, dar activitatea locomotorie a fost, de asemenea, afectată, aspect observat prin scăderea distanței parcurse și creșterea duratei de îngheț (86). Multiple studii au observat că anxietatea crescută conduce la reducerea locomoției printr-o pauză în mișcare menținută, cunoscută sub numele de episoade de îngheț (87,88). Prin urmare, anxietatea poate fi evaluată pe baza numărului și duratei cumulate a episoadelor de îngheț și a distanței parcurse. Faptul că microplasticele au crescut durata de îngheț și au redus distanța parcursă ar putea sugera că acestea au un efect anxiogen în cazul administrării pe o perioadă de 7 zile. Cu toate acestea, ar trebui să se țină seama de faptul că episoadele de îngheț și mișcarea redusă se poate datora și toxicității substanțelor utilizate.

Astfel, am constatat că latența pentru a ajunge la jumătatea superioară a acvariului a fost mai scurtă, în timp ce timpul petrecut în jumătatea superioară a fost mai lung în grupul MP comparativ cu grupul control netratat, în conformitate cu punctul de vedere conform căruia MP au un efect anxiolitic. Această constatare este în contrast cu rapoartele anterioare arătând că MP induce anxietate la peștele zebra fără a afecta activitatea locomotorie.

Studiile au arătat că administrarea subanestezică de ketamina modifică semnificativ timpul petrecut în jumătatea superioară, numărul de intrări și durata până la prima intrare în jumătatea superioară (89), în timp ce în cazul metioninei, o concentrație de 6.0 mM determină o creștere substanțială a mișcării și a explorării în jumătatea superioară comparativ cu un control netratat (82) care sunt în conformitate cu rezultatele prezentului studiu și le validează.

Diferențele între grupurile împreună și grupurile izolate independent de substanța la care au fost expuse sunt minore în majoritatea parametrilor, lucru care sugerează că ar putea exista și alte metode de a induce simptome asemănătoare tulburărilor mentale cu simptomatologie anxioasă/depresivă care să producă mai puțină suferință animalul de studiu. Cu toate acestea, diferențele majore se observă în cazul grupurilor care au fost supuse simultan la tratament cu ketamină și metionină și ar putea reprezenta o mai bună abordare pentru modelarea schizofreniei, din moment ce aceasta este o tulburare neliniară simptomatologic în sensul că este descrisă atât prin simptome pozitive (mimate prin efectul ketaminei), cât și prin simptome negative (efectul metioninei) și cognitive (efectul microplasticelor). Aceste rezultate și descoperiri din literatură (90) sugerează că, efectele combinate ale acestor substanțe conferă un model robust al unei simptomatologii complexe care nu poate fi replicată în totalitate în oameni, dar pot fi create modele cât mai apropiate.

Conform studiilor, peștii îndrăzneți ar trebui să aibă un nivel de anxietate mai mic comparativ cu cei timizi, lucru valabil pentru loturile cu microplastice izolate, dar și pentru cele împreună. Nu au fost diferențe semnificative între cele două personalități în analiza independentă, dar peștii timizi împreună au petrecut cel mai puțin timp în jumătatea superioară, urmați de Timizi izolați, Îndrăzneți izolați și Îndrăzneți împreună ceea ce sugerează că și izolarea socială pe cont propriu afectează comportamentul și anxietatea peștilor indiferent de tratamentele aplicate.

În cazul distanței totale parcurse, în toate grupurile de studiu se observă diferențe între peștii timizi și cei îndrăzneți cu diferență semnificativă între cele două personalități în comparația independentă de grup și protocol experimental. Acest lucru susține trăsătura de personalitate că peștii timizi tind să exploreze mai puțin decât cei îndrăzneți.

Acest aspect ar putea fi explicat prin faptul că peștii care au fost izolați social au avut o curiozitate și o dorință mai mare de explorare o dată ce au fost puși în acvariul de test ce era semnificativ mai mare și de formă diferită comparativ cu acvariile de izolare. Astfel, izolarea socială poate avea efecte puternice asupra sănătății mentale chiar și în oameni, inclusiv nivelul de anxietate.

Aceste rezultate sunt totuși contrare cu rezultatele din literatură care susțin că izolarea socială poate conduce la creșterea

comportamentului de tip anxios prin a sta mai mult la fundul acvariului, explorarea redusă și alterarea activității locomotorii.

În mod surprinzător, datele din literatură sugerează că indiferent dacă administrarea de ketamină este cronică sau acută în peștele zebură, aceasta crește preferința socială, manifestată în special prin creșterea timpului în brațul cu conspecifici (91), în timp ce metionina induce deficiențe sociale la șobolani (90) și la peștele zebură (82). Un studiu amplu a observat că izolarea socială este asociată cu creșterea anxietății, dar că aceasta ar putea fi inversată prin administrarea de substanțe cu efect anxiolitic (92). În studiul curent, rezultate stau puțin diferit în sensul că ketamina nu a avut efecte de facilitare și îmbunătățire a preferințelor sociale, iar metionina nu a cauzat deficiențe sociale ci din contră a crescut timpul petrecut în brațul cu conspecifici comparativ cu celelalte grupuri, în timp ce ketamina l-a scăzut. Mai mult decât atât, grupurile care au ingerat microplastice au prezentat o preferință socială crescută cu grupul L5 MP având timpul petrecut în brațul cu conspecifici cel mai lung.

Pe de cealaltă parte, în analiza pe baza personalității lucrurile au fost asemănătoare. Ketamina nu a crescut preferința socială și metionina nu a provocat deficiențe sociale. La peștii izolați, cei îndrăzneți au preferat să stea mai mult pe lângă conspecifici, dar la peștii împreună, cei timizi au preferat să stea mai mult pe lângă conspecifici, au intrat mai repede și de mai multe ori în brațul cu conspecifici comparativ cei izolați ceea ce susține faptul că izolarea socială a indus deficiențe sociale.

Un studiu care a analizat preferinţele sociale ale peştilor zebra, a relatat că a identificat o proporţie mai mică de peşti în cadrul aceleiaşi grup care preferă singurătatea şi evită interacţiunilor sociale (93) ceea ce se potriveşte cu trăsăturile prezentate pentru peştii izolaţi, dar şi pentru cei îndrăzneţi împreună şi susţine existenţa trăsăturile distincte între indivizi ai aceleiaşi specii şi grup.

În cazul analizei pe baza personalităţii unde peştii timizi izolaţi au înotat semnificativ mai repede în braţul cu oglinda comparativ cu cei împreună, iar peştii îndrăzneţi izolaţi au înotat mai repede în braţul cu oglinda comparativ cu peştii îndrăzneţi şi timizi împreună. În privinţa timpului petrecut în braţul de interes, peştii împreună de ambele personalităţi au petrecut semnificativ mai mult timp în braţul corespunzător comparativ cu grupurile izolate corespunzătoare. Din punct de vedere al puşeurilor de înot accelerat, peştii îndrăzneţi împreună au avut cele mai multe puşouri de înot accelerat, în timp ce, cei timizi izolaţi au avut cel mai mic număr cu diferenţe semnificative statistic între toate cele patru categorisiri (Timid izo., Îndrăzneţ Izo., Timid imp., Îndrăzneţ imp.) cu menţiunea că cei îndrăzneţi izo. au avut un număr mai mic chiar decât peştii Timid imp. Aceste aspecte sugerează că izolarea socială afectează comportamentul agresiv independent de tipul de personalitate, dar nu îi determină să devină opusul personalităţii lor, iar în combinaţia cu personalitatea se poate spune că chiar şi cel mai îndrăzneţ dintre peştii izolaţi este mai puţin curajos peştii timizi împreună.

În ciuda datelor din literatură conform cărora peștii zebra ar prefera mediul întunecat, în studiul prezent tuturor grupurilor le-a luat semnificativ mai mult timp să intre în partea întunecată comparativ cu cea luminată. Mai mult decât atât, în acord cu observațiile făcute în celelalte teste conform cărora ketamina ar avea efecte anxiolitice, toate grupurile de studiu cărora le-a fost administrată ketamină (fie expunere individuală, fie combinată cu alte substanțe) au intrat mai repede în brațul luminat și mai greu în brațul întunecat comparativ cu celelalte grupuri. Din punct de vedere al timpului petrecut în fiecare dintre cele două brațe, grupurile cu metionină au petrecut mai puțin timp în zona întunecată și mai mult timp în zona luminată comparativ cu celelalte grupuri. În plus, toate grupurile au petrecut semnificativ mai mult timp în zona luminată comparativ cu zona întunecată.

În privința personalității, peștii timizi din majoritatea grupurilor de studiu au intrat mai târziu în compartimentul întunecat și mai repede în cel luminat comparativ cu grupurile tratate cu microplastice și/sau produse farmaceutice. Rezultate similare au fost obținute și în cazul timpului petrecut în fiecare dintre brațe, unde în majoritatea grupurilor peștii timizi au petrecut semnificativ mai mult timp în compartimentul luminat și mai puțin în cel întunecat. În privința distanței parcurse, au fost identificate diferențe semnificative dependente de personalitate și tratament unde substanțele administrate au crescut semnificativ tendința exploratorie a peștilor timizi.

Comparativ cu studiile din literatură care au ilustrat că peștii zebură preferă culoarea roșie în defavoarea celei galbene (94,95), în studiul prezent, grupurile noastre au ales culoare galbenă ca fiind preferată (86) și roșie ca fiind cea mai puțin preferată.

Pe baza faptului că peștii zebură au flexibilitate cognitivă și au abilitatea de a face alegeri (ex: să aleagă o culoare, în special când sunt motivați prin recompense) (96), am dorit să aducem un aport considerabil informațiilor disponibile și deja existente în literatura de specialitate cu privire la abilitatea acestora de învățare prin a-i condiționa pozitiv (recompensă sub formă de mâncare) să aleagă culoarea mai puțin preferată în defavoarea celei preferate. Această idee de experiment s-a bazat pe ipoteza dereglării dopaminei în schizofrenie din moment ce analizează comportamentul bazat pe recompense (87) ce influențează funcțiile cognitive, în special memoria și luarea deciziilor (51). În mod surprinzător, grupul în care majoritatea peștilor au ales prima dată culoarea roșie a fost grupul de metionină, în timp ce grupul cu cei mai puțini pești care să aleagă roșu a fost grupul de ketamină.

Există o posibilă corelație între nivelul de anxietate observat în Testul acvariului nou și performanța cognitivă din testul de memorie descrisă în studiul publicat de grupul nostru (86).

Ketamina este un medicament disociativ anestezic care a devenit de interes în lumea științifică din cauza efectele sale unice

asupra conștientului. Atunci când este administrată în doze subanestezice, ketamina poate induce o stare disociativă caracterizată prin alterări profunde ale percepției, cogniției și sinelui (97). Ketamina poate distorsiona percepția senzorială conducând astfel la schimbări asupra felului în care indivizii percep mediul, sunetele și alți stimuli senzoriali. Indivizii ar putea experimenta distorsionări vizuale, precum schimbări ale percepției de adâncire, percepției culorilor sau halucinații vizuale (98).

În cazul track-urilor și heatmap-urilor, schimbările comportamentului de explorare sunt evidente între pre- și post-tratament cu creșterea nivelului de explorare și diminuarea tendinței de a sta în vecinătatea pereților, respectiv la fundul acvariului. Mai mult decât atât, peștii au intrat mai repede în jumătatea superioară, au petrecut mai mult timp în jumătatea superioară a acvariului și mai puțin în cea inferioară, au intrat de mai puține ori în jumătatea superioară și în cea inferioară. În privința timpului petrecut atingând pereții și numărului de atingeri, post-tratament valorile au fost mai mici. Pe baza numărului de rotații în sensul acelor de ceasornic și în sensul opus acelor de ceasornic, post-tratament nivelul de anxietate a fost mai mic (mai multe rotații în sensul acelor de ceasornic și mai puține rotații în sensul opus acelor de ceasornic). Așadar s-ar putea concluziona că ketamina poate schimba trăsăturile de personalitate ale peștilor zebra post-tratament cronic (5 zile) și ar putea fi utilizați în modelarea simptomatologiei comportamentale și în contextul tulburărilor de personalitate, pe lângă cele psihotice.

La loturile care au primit ketamină, celulele *PCNA* pozitive s-au observat în cele două zone, periventriculară (ZPV) și valvula cerebeloasă, dar s-a remarcat și un număr mai mic de celule migratoare. Este posibil ca ketamina să nu modifice doar modelul de expresie a *PCNA*, ci și timpul de migrare/diferențiere a tipurilor de celule cerebeloase la adulți, contribuind la o stare de alterare generală a proliferării celulare a SNC.

Prezența expresiei *TNFAI8* în sistemul nervos al peștilor de la loturile experimentale denotă prezența unui proces inflamator generat de MP, K, M și combinația acestora.

Expresia *COX4-1* este legată de factorul de inducție a hipoxiei (*HIF-1α*) și la celulele cu deficit de *COX4-1* s-au reliefat niveluri crescute de *HIF-1α* localizate în nucleii acestora (99). Prezența supraexpresiei *Cox41-i* la unele loturi, denotă creșterea necesarului de energie pentru refacerea metabolismului celular al celulelor nervoase, ca urmare a stresului oxidativ și a neurotoxicității produse prin diverse expuneri.

BDNF ar putea acționa ca un factor antioxidant, deoarece se știe că acesta crește nivelul de activitate al unor enzime antioxidante (100). Prezența unei expresii intense la loturile experimentale, demonstrează capacitatea de a activa sistemul de enzime antioxidante pentru refacerea leziunilor produse de MP, M, K și combinația lor deopotrivă.

Caracterul influențator asupra stresului oxidativ a fost evidențiat atât în cazul modelelor de schizofrenie cât și pentru microplastice singure și co-administrate. De altfel, creșteri MDA

au fost identificate tot în aceleași situații (101). Într-un studiu menit a evalua efectele transgeneraționale în cazul expunerii la metionină, a fost evidențiat faptul că nivelul de MDA prezintă creșteri față de grupul control, similar și în cazul SOD-ului (102). De altfel, o scădere semnificativă a SOD-ului a fost evidențiată după retragerea expunerii la metionină (103). În ceea ce privește administrarea de ketamină, literatura de specialitate ne indică faptul că la diferite concentrații nivelele de SOD, dar și MDA cresc, chiar și după încetarea administrărilor (104).

Studiile asupra nivelului alfa-amilazei în peștii zebra sunt inexistente la momentul actual, dar cu toate acestea există o serie de studii care evidențiază posibilitatea utilizării acestuia drept biomarker pentru stresul fiziologic. Concluziile principale evidențiate în literatură sunt că alfa-amilaza este mai sensibilă la stresul fiziologic decât cortizolul, în sensul că acesta poate fi afectat fără afectarea nivelului de cortizol, iar nivelul de alfa-amilază fie să nu se modifice după tiparul normalul (diurn) fie să fie hipo- sau hiper-secreție (105–107). Chiar dacă în studiul prezent nu s-au identificat diferențe semnificative între grupurile de studiu, faptul că a obținut niveluri diferite ale activității alfa-amilazei sugerează utilitatea acestuia pentru aprecierea nivelului de stres fiziologic. Mai mult decât atât, faptul că am identificat corelații slabe și moderate între acest parametru și cei

comportamentali sugerează că și în peștii zebra există o relație în stresul fiziologic și comportament.

Concluzii

Studiul curent a adus la lumină și a evidențiat diferite aspecte asociate neurotoxicității determinate de diferite substanțe farmacologice și/sau material plastic în scopul de a evidenția posibile alternative pentru modelarea unor tulburări de natură neuro-psihiatrică cu reducerea semnificativă a suferinței indivizilor utilizați. Concluziile principale și de interes care pot fi trase în urma prezentului studiu sunt:

1. Izolarea socială pe cont propriu ar putea imita cu fidelitate simptomele negative ale schizofreniei prin prisma valorilor obținute în fiecare parametru al testelor comportamentale desfășurate.
2. Administrarea combinată de ketamina și metionină ar putea produce un model mai robust al schizofreniei care să exploreze atât simptomele negative, cât și cele pozitive, noutate la nivel cel puțin național.
3. Am evidențiat o corelație între nivelul de anxietate și performanța cognitivă, aspect care este observabil și la oameni și este relevant pentru studii viitoare.
4. Preferința peștilor pentru o anumită culoare este relativă, lucru ce subliniază faptul că pentru orice studiu pe bază de culori și nu numai, este important să se testeze loturile

de studiu înaintea începerii experimentului deoarece există posibilitatea ca loturile de animale disponibile să nu reacționeze/să nu se comporte la fel cu datele identificate în literatură. Animalele sunt sensibile și puternic influențate de factori de mediu, genetici și sociali.

5. Metodologia utilizată pentru testul de memorie pe bază de culori și condiționare pozitivă este nouă la nivel național și internațional.
6. Ipotezele de diferențiere a personalității peștilor zebra pe baza parametrilor comportamentali au fost confirmate majoritar și evidențiază existența personalității în acești pești.
7. Am evidențiat și demonstrat pentru prima dată la nivel național, cât și internațional, că peștii zebra au personalitate și chiar trăsături complexe care nu pot avea limite clare și nu pot fi strict delimitate în contextul testelor comportamentale considerate standard pentru aceștia.
8. Fiecare dintre rezultatele obținute pe baza personalității ilustrează ca nu toți peștii timizi sunt la fel și nici toți peștii îndrăzneți. În cadrul fiecărei categorii există subcategoriile și este important să se țină cont că chiar dacă un pește timid ar putea să aibă o valoare puțin mai mare într-un parametru comparativ cu conspecificii timizi, nu înseamnă că este catalog greșit.

9. În cazul studiului prezent, s-a arătat efectul disociativ al ketaminei prin schimbarea a multipli parametri și tipare de înot de la categorisirea de pește timid la categorisirea de pește îndrăzneț.
10. Rezultate imunohistologice ilustrează că toate substanțele utilizate afectează peștii până la nivel de țesut și până la stadiul de necroză.
11. Microplasticele cresc semnificativ nivelul de stres oxidativ.
12. Obținerea de valori diferite ale activității alfa-amilazei evidențiază posibila utilitate a acestuia pentru aprecierea stresului fiziologic, în timp ce corelațiile obținute pot servi drept factori predictivi comportamentali.

Rezultatele și observațiile obținute în urma acestui studiu deschid multiple oportunități pentru viitoare studii în care peștii să fie izolați sociali o perioadă mai lungă de timp pentru o modelare și mai fidelă a simptomelor negative ale schizofreniei, perioada de învățare să fie extinsă și să se testeze și memoria de scurtă durată (nu doar cea de lungă durată ca în studiul prezent), să se repete testul de lumină-întuneric fără alte influențe sau alte tipuri de antrenamente făcute simultan, să se repete testul de agresivitate conform noilor metode de apreciere a acestuia, să se studieze mai în profunzime și pe un lot mai mare de pești efectele disociative ale ketaminei.

Bibliografie selectivă

1. Jablensky A. The diagnostic concept of schizophrenia: its history, evolution, and future prospects. *Dialogues Clin Neurosci*. 2010 Sep 30;12(3):271–87.
2. Arango C, Dragioti E, Solmi M, Cortese S, Domschke K, Murray RM, et al. Risk and protective factors for mental disorders beyond genetics: an evidence-based atlas. *World Psychiatry*. 2021 Oct 1;20(3):417–36.
3. Petrova NN, Khvostikova DA. Prevalence, Structure, and Risk Factors for Mental Disorders in Older People. *Advances in Gerontology*. 2021 Oct 1;11(4):409.
4. McKee J, Brahm N. Medical mimics: Differential diagnostic considerations for psychiatric symptoms. *Ment Health Clin*. 2016 Nov 1;6(6):289.
5. Seng J, Miller J, Sperlich M, van de Ven CJM, Brown S, Carter CS, et al. Exploring dissociation and oxytocin as pathways between trauma exposure and trauma-related hyperemesis gravidarum: a test-of-concept pilot. *J Trauma Dissociation*. 2013 Jan;14(1):40.
6. Zorov DB, Juhaszova M, Sollott SJ. Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. Vol. 94, *Physiological Reviews*. American Physiological Society; 2014. p. 909–50.
7. Ortiz GG, Pacheco Moisés FP, Mireles-Ramírez M, Flores-Alvarado LJ, González-Usigli H, Sánchez-González VJ, et al. Oxidative Stress: Love and Hate History in Central Nervous System. In: *Advances in protein chemistry and structural biology* [Internet]. 2017 [cited 2019 Apr 1]. p. 1–31. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1876162317300032>
8. Spence R, Gerlach G, Lawrence C, Smith C. The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biological Reviews*. 2008 Feb;83(1):13–34.
9. Ashwin C, Chapm E, Howells J, Rhydderch D, Walker I, Baron-Cohen S. Enhanced olfactory sensitivity in autism spectrum conditions. *Mol autism*. 2014;5(53).

10. Pervin LA. Personality. In: APA: Encyclopedia of Psychology. 2000.
11. Forkosh O. Animal behavior and animal personality from a non-human perspective: Getting help from the machine. *Patterns*. 2021 Mar 12;2(3):100194.
12. Mumtaz F, Khan MI, Zubair M, Dehpour AR. Neurobiology and consequences of social isolation stress in animal model-A comprehensive review. *Biomed Pharmacother*. 2018 Sep 1;105:1205–22.
13. Stefan M, Travis M, Murray RM. An atlas of schizophrenia. The Parthenon Publishing Group; 2002.
14. Howes OD, McCutcheon R, Owen MJ, Murray RM. The role of genes, stress, and dopamine in the development of schizophrenia. *Biol Psychiatry*. 2017;81(1):9–20.
15. Kesby JP, Eyles DW, McGrath JJ, Scott JG. Dopamine, psychosis and schizophrenia: the widening gap between basic and clinical neuroscience. *Transl Psychiatry*. 2018;8(1):30.
16. Grace AA, Gomes F V. The circuitry of dopamine system regulation and its disruption in schizophrenia: insights into treatment and prevention. *Schizophr Bull*. 2019;45(1):148–57.
17. Patel KR, Cherian J, Gohil K. Schizophrenia: Overview and Treatment Options. *P T*. 2014;39(9):638–45.
18. Egerton A, Grace AA, Stone J, Bossong MG, Sand M, McGuire P. Glutamate in schizophrenia: Neurodevelopmental perspectives and drug development. *Schizophr Res*. 2020;223:59–70.
19. Uno Y, Coyle JT. Glutamate hypothesis in schizophrenia. *Psychiatry Clin Neurosci*. 2019;73(5):204–15.
20. Baxter PS, Bell KFS, Hasel P, Kaindl AM, Fricker M, Thomson D, et al. Synaptic NMDA receptor activity is coupled to the transcriptional control of the glutathione system. *Nat Commun*. 2015 Apr 10;6.
21. Hardingham GE, Do KQ. Linking early-life NMDAR hypofunction and oxidative stress in

- schizophrenia pathogenesis. Nature Publishing Group. 2016 Feb 14;17(2):1–9.
22. Becquet P, Vazquez-Anon M, Mercier Y, Wedekind K, Mahmood T, Batonon-Alavo DI, et al. A systematic review of metabolism of methionine sources in animals: One parameter does not convey a comprehensive story. *Animal Nutrition*. 2023 Jun;13:31–49.
23. Dash PK, Hergenroeder GW, Jeter CB, Choi HA, Kobori N, Moore AN. Traumatic Brain Injury Alters Methionine Metabolism: Implications for Pathophysiology. *Front Syst Neurosci*. 2016 Apr 29;10.
24. Jin X, Liu L, Liu D, Wu J, Wang C, Wang S, et al. Unveiling the methionine cycle: a key metabolic signature and NR4A2 as a methionine-responsive oncogene in esophageal squamous cell carcinoma. *Cell Death Differ*. 2024 May 3;31(5):558–73.
25. Tsao D, Diatchenko L, Dokholyan N V. Structural Mechanism of S-Adenosyl Methionine Binding to Catechol O-Methyltransferase. *PLoS One*. 2011 Aug 31;6(8):e24287.
26. Tang KL, Antshel KM, Fremont WP, Kates WR. Behavioral and Psychiatric Phenotypes in 22q11.2 Deletion Syndrome. *Journal of Developmental & Behavioral Pediatrics*. 2015 Oct;36(8):639–50.
27. Green T, Steingart L, Frisch A, Zarchi O, Weizman A, Gothelf D. The feasibility and safety of S-adenosyl-l-methionine (S-AMe) for the treatment of neuropsychiatric symptoms in 22q11.2 deletion syndrome: a double-blind placebo-controlled trial. *J Neural Transm*. 2012 Nov 8;119(11):1417–23.
28. Hasan Anik A, Hossain S, Alam M, Binte Sultan M, Hasnine MDT, Rahman MdM. Microplastics pollution: A comprehensive review on the sources, fates, effects, and potential remediation. *Environ Nanotechnol Monit Manag*. 2021 Dec;16:100530.
29. Sun A, Wang WX. Human Exposure to Microplastics and Its Associated Health Risks. *Environment & Health*. 2023 Sep 15;1(3):139–49.

30. Lee Y, Cho J, Sohn J, Kim C. Health Effects of Microplastic Exposures: Current Issues and Perspectives in South Korea. *Yonsei Med J.* 2023;64(5):301.
31. Polderman TJC, Benyamin B, de Leeuw CA, Sullivan PF, van Bochoven A, Visscher PM, et al. Meta-analysis of the heritability of human traits based on fifty years of twin studies. *Nat Genet.* 2015 Jul 18;47(7):702–9.
32. Savuca A, Curpan A, Nicoara M, Ciobica AS. POSSIBLE RELATIONSHIP BETWEEN ENVIRONMENTAL POLLUTANTS/MICROPLASTICS AND SCHIZOPHRENIA ETIOLOGY AND PROGRESSION. In: *Proceedings of the Romanian Academy - Series A: Mathematics, Physics, Technical sciences, information Science.* Romanian Academy; 2023.
33. Curpan AS, Savuca A, Hritcu LD, Solcan C, Nicoara MN, Luca AC, et al. A new approach to explore the correlation between declarative memory and anxiety in animal models of schizophrenia and microplastic pollution. *Behavioural Brain Research.* 2024 Feb;458:114742.
34. Pizzino G, Irrera N, Cucinotta M, Pallio G, Mannino F, Arcoraci V, et al. Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. Vol. 2017, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* Hindawi Limited; 2017.
35. Liu C, Gao X, Yuan J, Zhang R. Advances in the development of fluorescence probes for cell plasma membrane imaging. Vol. 133, *TrAC - Trends in Analytical Chemistry.* Elsevier B.V.; 2020. p. 116092.
36. Younus H. Therapeutic potentials of superoxide dismutase. *Int J Health Sci (Qassim)* [Internet]. 2018 [cited 2024 May 18];12(3):88. Available from: [/pmc/articles/PMC5969776/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35969776/)
37. Ighodaro OM, Akinloye OA. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria Journal of Medicine.* 2018 Dec 1;54(4):287–93.

38. Flohé L, Toppo S, Orian L. The glutathione peroxidase family: Discoveries and mechanism. *Free Radic Biol Med.* 2022 Jul;187:113–22.
39. Rhee SG, Cho CS. Blot-Based Detection of Dehydroalanine-Containing Glutathione Peroxidase with the Use of Biotin-Conjugated Cysteamine. In 2010. p. 23–34.
40. Ansarin K, Khoubnasabjafari M, Jouyban A. Reliability of malondialdehyde as a biomarker of oxidative stress in psychological disorders. *BioImpacts.* 2017 Aug 23;5(3):123–7.
41. Dharmajaya R, Sari DK. Malondialdehyde value as radical oxidative marker and endogenous antioxidant value analysis in brain tumor. *Annals of Medicine & Surgery.* 2022 May;77.
42. Ermakov EA, Dmitrieva EM, Parshukova DA, Kazantseva D V., Vasilieva AR, Smirnova LP. Oxidative Stress-Related Mechanisms in Schizophrenia Pathogenesis and New Treatment Perspectives. Vol. 2021, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* Hindawi Limited; 2021.
43. Fraguas D, Díaz-Caneja CM, Ayora M, Hernández-Álvarez F, Rodríguez-Quiroga A, Recio S, et al. Oxidative Stress and Inflammation in First-Episode Psychosis: A Systematic Review and Meta-analysis. *Schizophr Bull.* 2019 Jun 18;45(4):742–51.
44. Gonzalez-Liencre C, Tas C, Brown EC, Erdin S, Onur E, Cubukcoglu Z, et al. Oxidative stress in schizophrenia: A case-control study on the effects on social cognition and neurocognition. *BMC Psychiatry.* 2014 Sep 24;14(1):1–9.
45. Guidara W, Messedi M, Naifar M, Maalej M, Grayaa S, Omri S, et al. Predictive value of oxidative stress biomarkers in drug-free patients with schizophrenia and schizo-affective disorder. *Psychiatry Res.* 2020 Nov 1;293:113467.
46. Khan F, Sultana S, Mullick M, Akhter N. Oxidative Stress and Antioxidant Status in Schizophrenia Patients. *JAFMC Bangladesh.* 2016;12(2):40–3.

47. Nucifora LG, Tanaka T, Hayes LN, Kim M, Lee BJ, Matsuda T, et al. Reduction of plasma glutathione in psychosis associated with schizophrenia and bipolar disorder in translational psychiatry. *Transl Psychiatry*. 2017 Aug 22;7(8):e1215.
48. Bosch JA, Carroll D. Mucosal Secretory Immunity, Stress and. In: *Encyclopedia of Stress*. Academic Press; 2007. p. 768–74.
49. Damodaran T V. Peripheral nervous system toxicity biomarkers. In: *Biomarkers in Toxicology*. Academic Press; 2014. p. 169–98.
50. Brierley-Bowers P, Sexton S, Brown D. Measures of autonomic nervous system regulation. Arlington, VA: Defense centers of excellence for psychological health and traumatic brain injury; 2011. 1–24 p.
51. Ieda M, Miyaoka T, Wake R, Liaury K, Tsuchie K, Fukushima M, et al. Evaluation of autonomic nervous system by salivary alpha-amylase level and heart rate variability in patients with schizophrenia. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience* 2013 264:1. 2013 May 5;264(1):83–7.
52. Stogios N, Gdanski A, Gerrentsen P, Chintoh AF, Graff-Guerrero A, Rajji TK, et al. Autonomic nervous system dysfunction in schizophrenia: impact on cognitive and metabolic health. *NPJ Schizophr*. 2021;22.
53. Inagaki T, Miyaoka T, Okazaki S, Yasuda H, Kawamukai T, Utani E, et al. High salivary alpha-amylase levels in patients with schizophrenia: A pilot study. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2010 May;34(4):688–91.
54. Kanayama M, Miyaoka T, Araki T, Hayashida M, Hashioka S, Horiguchi J. Salivary Alpha-Amylase Activity Levels in Catatonic Schizophrenia Decrease after Electroconvulsive Therapy. *Case Rep Psychiatry*. 2018;2018.
55. Meshalkina DA, Kizlyk MN, Kysil E V, Collier AD, Echevarria DJ, Abreu MS, et al. Zebra fish models of autism spectrum disorder. *Exp Neurol*. 2018;207–16.

56. Kalueff A V., Echevarria DJ, Stewart AM. Gaining translational momentum: more zebrafish models for neuroscience research. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2014 Dec 3;55:1–6.
57. Vaz R, Hofmeister W, Lindstrand A. Zebrafish models of neurodevelopmental disorders: Limitations and benefits of current tools and techniques. *Int J Mol Sci*. 2019 Mar 2;20(6).
58. Kalueff A V., Gebhardt M, Stewart AM, Cachat JM, Brimmer M, Chawla JS, et al. Towards a Comprehensive Catalog of Zebrafish Behavior 1.0 and Beyond. *Zebrafish*. 2013 Mar 1;10(1):70.
59. López-Schier H. Neuroplasticity in the acoustic startle reflex in larval zebrafish. *Curr Opin Neurobiol*. 2019 Feb;54:134–9.
60. Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, Ullmann B, Schilling TF. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental Dynamics*. 1995 Jul;203(3):253–310.
61. Sökmen TÖ, Sulukan E, Türkoğlu M, Baran A, Özkaraca M, Ceyhun SB. Polystyrene nanoplastics (20 nm) are able to bioaccumulate and cause oxidative DNA damages in the brain tissue of zebrafish embryo (*Danio rerio*). *Neurotoxicology*. 2020 Mar 1;77:51–9.
62. Goldsmith P. Zebrafish as a pharmacological tool: the how, why and when. *Curr Opin Pharmacol*. 2004 Oct;4(5):504–12.
63. 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. *Lab Anim (NY)*. 2017 Oct 1;46(10):378–87.
64. Curpăn A Ștefania, Alin C. Do zebrafish have personality? Possible associations between behavioural patterns and personality traits in *Danio rerio* in the context of schizophrenia. *Bulletin of Integrative Psychiatry*. 2023 Dec 15;99(4):23–33.
65. Yuan M, Chen Y, Huang Y, Lu W. Behavioral and metabolic phenotype indicate personality in zebrafish (*Danio rerio*). *Front Physiol*. 2018 May 30;9(MAY):653.

66. Chen Y, Li W, Xiang L, Mi X, Duan M, Wu C. Fish personality affects their exposure to microplastics. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2022 Mar 15;233:113301.
67. Daniel DK, Bhat A. Bolder and Brighter? Exploring Correlations Between Personality and Cognitive Abilities Among Individuals Within a Population of Wild Zebrafish, *Danio rerio*. *Front Behav Neurosci*. 2020 Aug 12;14:138.
68. Amato-Lourenço LF, Carvalho-Oliveira R, Júnior GR, dos Santos Galvão L, Ando RA, Mauad T. Presence of airborne microplastics in human lung tissue. *J Hazard Mater*. 2021 Aug;416:126124.
69. Avdesh A, Chen M, Martin-Iverson MT, Mondal A, Ong D, Rainey-Smith S, et al. Regular care and maintenance of a zebrafish (*Danio rerio*) laboratory: an introduction. *J Vis Exp [Internet]*. 2012 [cited 2023 Jun 23];(69). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23183629/>
70. Forkosh O. Animal behavior and animal personality from a non-human perspective: Getting help from the machine. *Patterns*. 2021 Mar 12;2(3):100194.
71. White JR, Meekan MG, McCormick MI, Ferrari MCO. A Comparison of Measures of Boldness and Their Relationships to Survival in Young Fish. *PLoS One [Internet]*. 2013 Jul 16 [cited 2023 Jul 19];8(7):68900. Available from: [/pmc/articles/PMC3712919/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23183629/)
72. Goold C, Newberry RC. Aggressiveness as a latent personality trait of domestic dogs: Testing local independence and measurement invariance. *PLoS One [Internet]*. 2017 Aug 1 [cited 2023 Jul 19];12(8). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28854267/>
73. Gartland LA, Firth JA, Laskowski KL, Jeanson R, Ioannou CC. Sociability as a personality trait in animals: methods, causes and consequences. *Biol Rev Camb Philos Soc [Internet]*. 2022 Apr 1 [cited 2023 Jul 19];97(2):802–16. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34894041/>
74. MacKinlay RD, Shaw RC. A systematic review of animal personality in conservation science.

- Conservation Biology [Internet]. 2023 Feb 1 [cited 2023 Jul 19];37(1):37. Available from: [/pmc/articles/PMC10084254/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC10084254/)
75. Costa JHC, Neave HW, Weary DM, von Keyserlingk MAG. Use of a food neophobia test to characterize personality traits of dairy calves. *Sci Rep* [Internet]. 2020 Dec 1 [cited 2023 Jul 19];10(1). Available from: [/pmc/articles/PMC7188825/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC7188825/)
76. Steimer T. Animal models of anxiety disorders in rats and mice: some conceptual issues. *Dialogues Clin Neurosci* [Internet]. 2011 [cited 2023 Jul 19];13(4):495. Available from: [/pmc/articles/PMC3263396/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC3263396/)
77. Daniel DK, Bhat A. Bolder and Brighter? Exploring Correlations Between Personality and Cognitive Abilities Among Individuals Within a Population of Wild Zebrafish, *Danio rerio*. *Front Behav Neurosci*. 2020 Aug 12;14:138.
78. Amin B, Slabbekoorn H, Schaaf M, Tudorache C. “Early birds” take it easy: diurnal timing is correlated with overall level in activity of zebrafish larvae. *Behaviour* [Internet]. 2016 Jan 1 [cited 2022 Sep 11];153(13–14):1745–62. Available from: https://brill.com/view/journals/beh/153/13-14/article-p1745_10.xml
79. Martins EP, Bhat A. Population-level personalities in zebrafish: aggression-boldness across but not within populations. *Behavioral Ecology*. 2014;25(2):368–73.
80. Curpăn A Ştefania, Ciobică A. Do zebrafish have personality? Possible associations between behavioural patterns and personality traits in *Danio rerio* in the context of schizophrenia. *Bulletin of Integrative Psychiatry*. 2023;4(99).
81. Shams S, Seguin D, Facciolo A, Chatterjee D, Gerlai R. Effect of Social Isolation on Anxiety-Related Behaviors, Cortisol, and Monoamines in Adult Zebrafish. *Behavioral Neuroscience*. 2017;131(6):492–504.
82. Wang L, Jiang W, Lin Q, Zhang Y, Zhao C. DNA methylation regulates *gabrb2* mRNA expression:

developmental variations and disruptions in l-methionine-induced zebrafish with schizophrenia-like symptoms. *Genes Brain Behav.* 2016;15(8):702–10.

83. Bruzzone M, Gatto E, Xiccato TL, Valle LD, Fontana CM, Meneghetti G, et al. Measuring recognition memory in zebrafish larvae: Issues and limitations. *PeerJ* [Internet]. 2020 [cited 2023 Sep 13];2020(4). Available from: [/pmc/articles/PMC7192156/](https://pmc/articles/PMC7192156/)

84. Estaphan S, Curpan A, Khalifa D, Rashed L, Ciobica A, Cantemir A, et al. Combined Low Dose of Ketamine and Social Isolation: A Possible Model of Induced Chronic Schizophrenia-Like Symptoms in Male Albino Rats. *Brain Sciences* 2021, Vol 11, Page 917 [Internet]. 2021 Jul 11 [cited 2023 Jun 2];11(7):917. Available from: <https://www.mdpi.com/2076-3425/11/7/917/htm>

85. Zanană R, Wiprich MT, Altenhofen S, Rubensam G, dos Santos TM, Wyse ATS, et al. Withdrawal Effects Following Methionine Exposure in Adult Zebrafish. *Mol Neurobiol* [Internet]. 2020 Aug 1 [cited 2024 Mar 5];57(8):3485–97. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12035-020-01970-x>

86. Curpan AS, Savuca A, Hritcu LD, Solcan C, Nicoara MN, Luca AC, et al. A new approach to explore the correlation between declarative memory and anxiety in animal models of schizophrenia and microplastic pollution. *Behavioural Brain Research.* 2024 Feb 26;458:114742.

87. Egan RJ, Bergner CL, Hart PC, Cachat JM, Canavella PR, Elegante MF, et al. Understanding behavioral and physiological phenotypes of stress and anxiety in zebrafish. *Behavioural Brain Research.* 2009 Dec 14;205(1):38–44.

88. Campanari ML, Bourefis AR, Buee-Scherrer V, Kabashi E. Freezing activity brief data from a new FUS mutant zebrafish line. *Data Brief* [Internet]. 2020 Aug 1 [cited 2023 Sep 14];31. Available from: [/pmc/articles/PMC7352050/](https://pmc/articles/PMC7352050/)

89. Riehl R, Kyzar E, Allain A, Green J, Hook M, Monnig L, et al. Behavioral and physiological effects of acute ketamine exposure in adult zebrafish. *Neurotoxicol Teratol*. 2011 Nov 1;33(6):658–67.
90. Wang L, Alachkar A, Sanathara N, Belluzzi JD, Wang Z, Civelli O. A Methionine-Induced Animal Model of Schizophrenia: Face and Predictive Validity. *International Journal of Neuropsychopharmacology* [Internet]. 2015 Nov 1 [cited 2023 Jun 23];18(12):1–11. Available from: [/pmc/articles/PMC4675974/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26347614/)
91. Benvenuti R, Gallas-Lopes M, Marcon M, Reschke CR, Hermann AP, Piato A. Glutamate NMDA Receptor Antagonists with Relevance to Schizophrenia: A Review of Zebrafish Behavioral Studies. *Curr Neuropharmacol*. 2022;20(3):494–509.
92. Tunbak H, Vazquez-Prada M, Ryan TM, Kampff AR, Dreosti E. Whole-brain mapping of socially isolated zebrafish reveals that lonely fish are not loners. *Elife*. 2020 May 5;9.
93. Dreosti E, Lopes G, Kampff AR, Wilson SW. Development of social behavior in young zebrafish. *Front Neural Circuits* [Internet]. 2015 [cited 2019 Nov 4];9:39. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26347614>
94. Park JS, Ryu JH, Choi TI, Bae YK, Lee S, Kang HJ, et al. Innate Color Preference of Zebrafish and Its Use in Behavioral Analyses. *Mol Cells* [Internet]. 2016 Oct 10 [cited 2023 Jun 20];39(10):750. Available from: [/pmc/articles/PMC5104883/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26347614/)
95. Roy T, Suriyampola PS, Flores J, López M, Hickey C, Bhat A, et al. Color preferences affect learning in zebrafish, *Danio rerio*. *Sci Rep* [Internet]. 2019 Dec 1 [cited 2023 Sep 13];9(1). Available from: [/pmc/articles/PMC6787237/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26347614/)
96. Zabegalov KN, Khatsko SL, Lakstygal AM, Demin KA, Cleal M, Fontana BD, et al. Abnormal repetitive behaviors in zebrafish and their relevance to human brain disorders. *Behavioural brain research* [Internet]. 2019 Jul 23 [cited 2023 Jun 23];367:101–10.

- Available from:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30926483/>
97. Gitlin J, Chamadia S, Locascio JJ, Ethridge BR, Pedemonte JC, Hahm EY, et al. Dissociative and Analgesic Properties of Ketamine Are Independent. *Perioperative medicine*. 2020;133:1021–8.
98. Ballard ED, Zarate CA. The role of dissociation in ketamine's antidepressant effects. *Nature Communications* 2020 11:1 [Internet]. 2020 Dec 22 [cited 2024 Mar 5];11(1):1–7. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41467-020-20190-4>
99. Fukuda R, Zhang H, Kim J whan, Shimoda L, Dang C V., Semenza GL. HIF-1 Regulates Cytochrome Oxidase Subunits to Optimize Efficiency of Respiration in Hypoxic Cells. *Cell*. 2007 Apr;129(1):111–22.
100. Tapia-Arancibia L, Aliaga E, Silhol M, Arancibia S. New insights into brain BDNF function in normal aging and Alzheimer disease. *Brain Res Rev*. 2008 Nov;59(1):201–20.
101. Sheng C, Zhang S, Zhang Y. The influence of different polymer types of microplastics on adsorption, accumulation, and toxicity of triclosan in zebrafish. *J Hazard Mater* [Internet]. 2021 Jan;402:123733. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304389420317192>
102. Zandrea R, Wiprich MT, Altenhofen S, Rubensam G, dos Santos TM, Wyse ATS, et al. Paternal exposure to excessive methionine altered behavior and neurochemical activities in zebrafish offspring. *Amino Acids* [Internet]. 2021 Jul 22;53(7):1153–67. Available from: <https://link.springer.com/10.1007/s00726-021-03019-2>
103. Zandrea R, Wiprich MT, Altenhofen S, Rubensam G, dos Santos TM, Wyse ATS, et al. Withdrawal Effects Following Methionine Exposure in Adult Zebrafish. *Mol Neurobiol* [Internet]. 2020 Aug 12;57(8):3485–97. Available from: <https://link.springer.com/10.1007/s12035-020-01970-x>

104. Liao PH, Yang WK, Yang CH, Lin CH, Hwang CC, Chen PJ. Illicit drug ketamine induces adverse effects from behavioral alterations and oxidative stress to p53-regulated apoptosis in medaka fish under environmentally relevant exposures. *Environmental Pollution* [Internet]. 2018 Jun;237:1062–71. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S026974911732345X>
105. Nater UM, Rohleder N, Gaab J, Berger S, Jud A, Kirschbaum C, et al. Human salivary alpha-amylase reactivity in a psychosocial stress paradigm. *International Journal of Psychophysiology*. 2005 Mar;55(3):333–42.
106. Fischer S, Nater UM, Strahler J, Skoluda N, Dieterich L, Oezcan O, et al. Psychobiological impact of ethnic discrimination in Turkish immigrants living in Germany. *Stress*. 2017 Mar 4;20(2):167–74.
107. Ali N, Nater UM. Salivary Alpha-Amylase as a Biomarker of Stress in Behavioral Medicine. *Int J Behav Med* [Internet]. 2020 Jun 1 [cited 2023 Jul 11];27(3):337–42. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12529-019-09843-x>

Lista lucrărilor publicate

Lucrări ISI:

1. **Curpă** A.S., Luca A.-C., Ciobica A. Potential novel therapies for neurodevelopmental diseases targeting oxidative stress, *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2022; <https://doi.org/10.1155/2021/6640206> (IF = 6,761 la momentul publicării)

2. **Curpă** AS., Balmus I-M, Dobrin RP, Ciobica A, Chele GE, Gorgan DL, Boloş A. 2022. A Mini-Review Regarding the Modalities to Study Neurodevelopmental Disorders-Like Impairments in Zebrafish—Focussing on Neurobehavioural and Psychological Responses, *Brain Sciences* 2022; 12(9):1147. <https://doi.org/10.3390/brainsci12091147> (IF= 3.3 la momentul publicării)

3. **Curpan** AS, Savuca A, Hritcu LD, Solcan C, Nicoara MN, Luca AC, et al. A new approach to explore the correlation between declarative memory and anxiety in animal models of schizophrenia and microplastic pollution. *Behavioural Brain Research*. 2024 Feb 26;458:114742. (IF=3.352 la momentul publicării)

Lucrări BDI:

1. **Curpăn** AS, Alin C. Do zebrafish have personality? Possible associations between behavioural patterns and personality traits in *Danio rerio* in the context of schizophrenia. Bulletin of Integrative Psychiatry. 2023 Dec 15;99(4):23–33. (indexată BDI)

Lucrări conferințe publicate *in extenso*:

1. Savuca A, **Curpan** A, Hritcu L, Ciobîcă A, Plavan G, Nicoar M. Preliminary study on the behavioral response of zebrafish to the presence of methionine and polypropylene residues in water, 2022;45:89-96. 10.35219/ann-ugal-math-phys-mec.2022.2.08. – publicarea *in extenso* a lucrării prezentate la conferință

2. Savuca A, **Curpan** A, Nicoara M, Ciobica AS. POSSIBLE RELATIONSHIP BETWEEN ENVIRONMENTAL POLLUTANTS/MICROPLASTICS AND SCHIZOPHRENIA ETIOLOGY AND PROGRESSION. In: Proceedings of the Romanian Academy - Series A: Mathematics, Physics, Technical sciences, information Science. Romanian Academy; 2023. – publicarea *in extenso* a lucrării prezentate la conferință

3. **Curpan** A, Savuca A, Ciobîcă A. Behavioural analysis of potential new approach in modelling schizophrenia using zebrafish. Current trends in natural sciences, 2023; 12. 06-16.

10.47068/ctns.2023.v12i24.001. – publicarea în extenso a lucrării prezentate la conferință

Participări la conferințe

Conferințe naționale:

1. Workshop “Abordări moderne ale feedbackului între procese de mediu și schimbările climatice” - Universitatea Dunarea de Jos din Galați – A. Săvucă, **A.Ş. Curpă**, L.D. Hrițcu, A.S. Ciobîcă, G. Plăvan, M. N. Nicoară- „*Preliminary study on the behavioural response of zebrafish to the presence of methionine and polypropylene residues in water*” - 6-9 iulie 2022, <https://www.rexdan.ugal.ro/index.php/ro/anunturi-si-evenimente/conferinte/workshop-abordari-moderne-ale-feedbackului-intre-procese-de-mediu-si-schimbarile-climatice/acasa-5> - conferință națională cu publicare
2. CONFERINȚA ȘTIINȚIFICĂ DE PRIMĂVARĂ a AOSR, 2023, BUCUREȘTI, Romania — **A.-S. Curpă**, A. Săvucă, A.S. Ciobîcă – ” *Au peștii zebră personalitate ? Posibile asocieri între tiparele comportamentale și trăsăturile de personalitate la Danio rerio*” 19-20 Mai 2023, <https://www.aosr.ro/conferinta-nationala-stiintifica-editia-de-primavara-transformarea-digitala-in-stiinte/> - conferință națională cu publicare

Conferințe internaționale:

International Scientific Symposium "CURRENT TRENDS IN NATURAL SCIENCES", Pitesti, Romania – **A.-S. Curpan**, A. Savuca, A.S. Ciobica - "*Behavioral analysis of potential new approach in modelling schizophrenia using zebrafish*" - 18 - 20 Mai 2023, <https://www.natsci.upit.ro/international-symposium/> - conferință internațională cu publicare