

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

Studiu complex privind implicarea vitaminei D în mecanismele fiziologice și
biochimice ale unor manifestări psihiatrice asociate epilepsiei

REZUMAT TEZĂ DE DOCTORAT

Conducător de doctorat:

CS. I DR. HABIL. CIOBÎCĂ ALIN-STELIAN

Student-doctorand:

Duță Raluca-Elena

IAȘI
2025

Cuprins	
Listă abrevieri	4
Cuvinte cheie	4
Introducere	5
Capitolul 1 Stadiul actual al cunoașterii	6
1.1 Istoric	6
1.2 Prevalență și epidemiologie	7
1.3 Criterii de diagnosticare	8
1.4 Intervenții terapeutice	9
1.5 Asocierea comorbidităților psihiatrice	11
1.6 Rolul vitaminei D în epilepsie	12
Capitolul 2 Epilepsia la animale	14
2.1 Epilepsia nativă la animale	14
2.1.1 Epilepsia la răs	14
2.1.2 Epilepsia canină	14
2.1.3 Epilepsia la feline domestice	16
2.1.4 Epilepsia la cai	16
2.2 Modele de animale cu epilepsie	17
2.2.1 Modelarea epilepsiei la rozătoare	17
2.2.2 Modelarea epilepsiei la peștii zebra	17
Capitolul 3 Ipoteza de cercetare și obiectivele lucrării	18
Capitolul 4 Metodologia cercetării	19
4.1 Studiu experimental I	19
4.1.1 Scop	19
4.1.2 Designul experimental	19
4.1.3 Analiza statistică a datelor	19
4.2 Studiu experimental II	19
4.2.1 Scop	19
4.2.2 Designul experimental	20
4.2.3 Testele comportamentale	21
4.2.4 Evaluarea stresului oxidativ	23
4.2.5 Analiza statistică a datelor	23
4.2.6 Aviz etic	23
4.3 Studiu experimental III	23
4.3.1 Scop	23

4.3.2 Substanțele chimice utilizate în studiu	24
4.3.3 Designul experimental	24
4.3.4 Testele comportamentale	26
4.3.5 Evaluarea stresului oxidativ	27
4.3.6 Analiza statistică a datelor	28
4.3.7 Aviz etic	28
Capitolul 5 Rezultate și discuții	28
5.1 Studiu experimental I	28
5.1.1 Rezultate meta analiza	28
5.2 Studiu experimental II	30
5.2.1 Performanța de înot	30
5.2.2 Efectul substanțelor asupra comportamentului agresiv	36
5.2.3 substanțelor asupra stresului oxidativ	38
5.2.4 Discuții	39
5.3 Studiu experimental III	40
5.3.1 Performanța de înot	40
5.3.2 Efectul medicamentelor asupra comportamentului agresiv	51
5.3.3 Efectul medicamentelor asupra stresului oxidativ	52
5.3.4. Discuții	53
Concluzii generale	54
Bibliografie selectivă	56

Listă abrevieri

AAM- Administrația pentru Alimente și Medicamente
BHE- barieră hematoencefalică
BP- fenobarbital
CBZ- Carbamazepină
CT- Computer Tomograf
EEG- electroencefalograma
EJM- epilepsie mioclonică juvenilă
FAE- levetiracetam
INM- Institutul Neurologic din Montreal
IRM- Imagistică prin rezonanță magnetică
LCR- lichid cefalorahidian
LCT- leziunea cerebrală traumatică
LIÎE- Liga Internațională Împotriva Epilepsiei
MAE- medicamente antiepileptice
OMS- Organizația Mondială a Sănătății
PIF- peritonită infecțioasă felină
PTZ- pentilentetrazol
ROS- specii reactive de oxigen
SE- Status epileptic
SNC- sistem nervos central
SRC- studii randomizate controlate
VDR- receptorul de vitamina D
Vit D- Vitamina D
VPA- Acid valproic
SOD- superoxid dismutază
GPx- glutation peroxidază
MDA- malondialdehidă
EIAED- medicamente antiepileptice inductoare de enzime hepatice
NEIAED- medicamente antiepileptice ne inductoare de enzime hepatice

Cuvinte cheie

Epilepsie, convulsii, comorbidități psihiatrice, vitamina D, acid valproic, carbamazepină

Introducere

Epilepsia este o tulburare neurologică cronică caracterizată prin predispoziția de durată a creierului de a genera convulsii (crize) epileptice prin activitatea sa electrică excesivă (Thijs et al., 2019; Beghi, 2020). Această afecțiune este rezultatul a cel puțin două convulsii neprovocate în 24 de ore (Kaculini et al., 2021). Aceste crize se bazează pe considerente neurologice, psihiatrice, cognitive, respectiv sociale (Fisher et al., 2017; Beghi, 2020; Falco-Walter et al., 2019). Convulsiile epileptice se împart în funcție de afectarea conștiinței pacientului, dacă implică sau nu mai multe simptome (mișcarea involuntară, urinatea incontrolată), respectiv în funcție de localizarea fiziologică a debutului acestora în creier. Cele din urmă, la rândul său, pot fi împărțite în trei categorii: focal (începând dintr-o anumită parte a creierului), generalizat (începând din cele două emisfere cerebrale) sau debutul lor este necunoscut. (Fisher et al., 2017; Falco-Walter et al., 2018; Parck., 2019; Thijs et al., 2019). La pacienții epileptici se observă frecvent performanțe cognitive scăzute precum tulburări de memorie și de învățare (Kundap et al., 2017).

În funcție de tipul de epilepsie și de convulsii sunt administrate diferite concentrații de medicamente antiepileptice. Există persoane care prezintă rezistență la un anumit tip de medicamente antiepileptice sau care li se recomandă administrarea de două tipuri de medicamente pentru a fi eficiente împotriva convulsiilor epileptice. Medicamentele antiepileptice se clasează în două categorii în funcție de metabolizarea lor în organism, astfel anumite medicamente sunt considerate inductoare de enzime hepatice (EIAED – feniton, fenobarbital, primidon, carbamazepină, oxcarbazepină, topiramat) ele inducând catabolismul anumitor substanțe și medicamente antiepileptice care nu induc enzime hepatice (NEIAED – gabapentin, acid valproic, lamotrigină, levetiracetam, pregabalin, tiagabin) fiind considerate cu un efect mic asupra substanțelor nutritive (Ensrud et al., 2008; Soltani et al., 2016).

Creșterea funcției enzimelor citocromului p-450 prin intermediul medicamentelor antiepileptice inductoare de enzime hepatice conduce la o inactivare a formei active a vitaminei D astfel va reduce și absorbția calciului în organism (Teagarden et al., 2014; Shen et al., 2014; Soltani et al., 2016).

Capitolul 1 Stadiul actual al cunoașterii

1.1 Istoric

Conceptul dintre religie și medicină din timpurile străvechi au făcut ca baza definiției unei convulsii epileptice să fie de la explicație magică la una științifică. Prima descriere de acest fel datează din anul 2500 înainte de Hristos în documentele sumeriene din Mesopotamia, astfel persoana cu afecțiune epileptică cu convulsii tonice focale din zilele noastre era considerată atunci “boala căderii” fiind persoana ce era legată atât de păcat, cât și de luna lui Dumnezeu.

Însă definițiile care conduc spre descrierea de astăzi a epilepsiei sunt din timpul erei hipocratice și post-hipocratice. Hipocrate (460-370 înainte de Hristos) a pus baza medicinei pe ipoteza că natura era alcătuită din patru elemente de bază, astfel aceste elemente sunt în organism eficiente în patru fluide corporale sau umori, sănătatea fiind legătura armonică dintre cele patru umori rezultând starea de eucrazie (Bujalkova et al., 2001; Kalachanis and Michailidis, 2015; Patel and Moshé, 2020). Astfel Hipocrate a fost primul care a atribuit epilepsia creierului și care a sugerat că este mai mult ereditară decât contagioasă (Iftimovici 1995; Kalachanis and Michailidis, 2015; Kaculini et al., 2021).

În Evul Mediu, a existat un regres în ceea ce privește cunoștințele științifice despre epilepsie, dominând gândirea despre posesie demonică, dar și nebulie reflectată de lumina lunii și al spiritelor legate de aceasta. În acea perioadă a existat o confuzie între epilepsie și tulburările mintale (Tamkin, 1994, Patel and Moshé, 2020). Însă au existat persoane care au continuat cercetarea științifică a epilepsiei, astfel un medic persan Avicenna a considerat că manifestarea clinică a unei convulsii poate fi asociată cu originea acesteia creier, stomac, splină, dar și cu schimbări de comportament, temperament și disfuncționalități psihoneurologice (anxietate, entuziasm puternic) înainte de convulsii (Dadmehr, 2018; Patel and Moshé, 2020).

La sfârșitul secolului al XIX-lea, apare electroencefalograma (EEG) care a ajutat la evoluția de înțelegere a epilepsiei, prin descrieri clinice mai clare. Astfel Frederic Andrews Gibbs împreună cu colegii săi Erna Leonhardt Gibbs și William Lennox, au distins ca există diferite modele EEG pentru fiecare tip major de crize clinice precum convulsii absență generalizată, convulsii psihoclonice, convulsii focale-lobul temporal. Aceștia au descoperit prin intermediul EEG-ului că de cele mai multe ori există anomalii în perioada interictală, ceea ce va ajuta clinicianul să-și dea seama de tipul convulsiei fără a fi nevoit să observe efectuarea unei crize la pacient (Wolf, 2014; Gibbs et al., 2002; Patel and Moshé, 2020).

În 1964 apare Liga Internațională Împotriva Epilepsiei (LIÎE) ca un răspuns la nevoia de a avea un sistem standardizat de a clasifica convulsiile.

Acesta a fost posibil sub conducerea lui Gastaut. Convulsiile au fost împărțite în parțial, generalizat, unilateral sau predominant unilateral la copii, neregulat la non-născuți și neclasificat. Termenii parțial, focal și local au fost utilizați interschimbabil, însă Gastaut a fost de părere că parțial este cel mai vechi termen și utilizat cel mai des, fiind o formă de a defini populația neuronală care este amplasată prin descărcări pe scară largă într-o anumită regiune a creierului (Gastaut et al., 1972; Patel and Moshé, 2020). Acestea fiind la rândul său divizate în funcție de frecvență în izolate, repetate, prelungite sau repetitive (Caveness and Radermecker 1964; Patel and Moshé, 2020).

În 1981 a fost propusă o revizuire a clasificării convulsiilor epileptice care ajută prin intermediul înregistrărilor video-EEG să se studieze semiologia crizelor care va ajuta la dezvoltarea limbajului comun al termenilor (Angeles, 1981; Patel and Moshé, 2020). În 2001 s-a propus în ILAE un grup operativ care a introdus un glosar standard de terminologie pentru semiologia ictală, au propus o schema de diagnostic pe cinci axe (Angeles, 1981; Patel and Moshé, 2020). Însă în 2010 a fost revizuită major clasificarea de către Berg și colaboratorii săi. Astfel s-a renunțat la termenii care au fost considerați utilizați greșit focal (înainte era sinonim cu parțial), au fost eliminați termenii simplu și complex fiind recomandate înlocuirea acestora cu crize focale cu/ sau afectarea conștiinței/conștientizării), înlocuirea crizei generalizată secundară cu evoluție către o convulsie bilaterală, convulsivă, crizele neonatale nu mai erau considerate o entitate separate, subclasificarea convulsiilor de absență fiind simplificată, iar spasmele au fost declarate ca fiind ca tip de convulsie. Însă această ultimă revizuire a fost criticată ca fiind inutilă sau mai complicată decât cea anterioară fiind greu de utilizat în practica clinică e zi cu zi (Chang et al., 2017; Ferrie, 2010; Blume et al., 2001; Patel and Moshé, 2020).

Clasificarea internațională actuală a fost aprobată în 2017 de către LIÎE unde au fost utilizate și comentariile, criticele publice, dar și consultați experți separat pentru a revizui observațiile anterioare. Astfel s-a ajuns la ce se cunoaște în mod actual despre diagnosticare. În 2019 Organizația Mondială a Sănătății (OMS) împreună cu partenerii săi (Liga Internațională Împotriva Epilepsiei și Biroul Internațional pentru Epilepsie) au produs primul raport global despre epilepsie, urmat de adoptarea planului de acțiune global intersectorial pentru epilepsie și tulburări neurologice 2022-2031 prin care se recunoaște abordările preventive, farmacologice și psihosociale dintre epilepsie și celelalte tulburări neurologice. Aceste lucruri au ca scop o conștientizare la epilepsie, consolidarea eforturilor publice și private pentru o îmbunătățire a îngrijirii și a reduce impactul pe care îl poate avea această afecțiune în rândul oamenilor (World Health Organization, 2019).

1.2 Prevalență și epidemiologie

Potrivit Organizației Mondiale a Sănătății epilepsia activă afectează

aproximativ 50 de milioane de oameni din populația generală, în funcție de zone ea este întâlnită între 4-10 la 1000 de persoane. Datorită estimăției că aproximativ 5 milioane de oameni sunt diagnosticați anual, ea devine una dintre cele mai frecvente boli neurologice la nivel global (World Health Organization; 2019; Chen et al., 2023; Fiest et al., 2017).

Datorită faptului că epilepsia se poate dobândi sau diagnostica pe parcursul vieții există diferențe între prevalența epilepsiei pe parcursul vieții și prevalența epilepsiei active (a unei perioade de timp care este condiționată de supraviețuirea individului). În literatura de specialitate au fost identificate două meta analize realizate în ultimi 10 ani, una dintre acestea rezumându-se la cercetările din Africa asupra pacienților cu epilepsie (copii și adolescenți), iar cealaltă fiind un revizuire sistematică a studiilor internaționale (Tabel 1.1). Diferențele care există între cele două meta analize sunt posibili factori de risc mai mari raportați ai epilepsiei în Africa (infecții parentale, neonatale, neuroparaziți ale nivelului sistemului nervos central, leziuni cerebrale traumatiche). În meta analiza în care s-au utilizat rezultate din țările africane nu s-a putut calcula rata de incidență deoarece estimările ratelor de incidență a fost de un an, doi sau chiar trei în anumite studii.

Cercetările anterioare au arătat că epilepsia nu este o boală contagioasă, de aceea numărul mare de persoane cu această afecțiune este îngrijorător, la aproximativ 50% dintre persoanele cu această afecțiune la nivel global nu există o cauză sigură, ea rămânând necunoscută. Cauzele ce au putut fi determinate s-au împărțit în cinci categorii: structurale de la nivelul creierului (tumoră, scleroza hipocampală, scleroza de tip tuberoasă, malformație de dezvoltare corticală, displazia focală corticală, paralizia la nivel cerebral, neurofibromatoza), genetice (anumite sindroame genetice, unele dintre ele fiind ereditare), infecțioase (infecție la nivelul creierului: meningita, encefalita, neurocisticercroza, abces cerebral), metabolice și imune (boli autoimune) (World Health Organization, 2019).

Tabel 1.1 Rezultate asupra prevalenței și incidenței a pacienților cu epilepsie din meta analize							
	Prevalența totală	Prevalența medie pe parcursul vieții	Prevalența medie a epilepsiei active	Prevalența medie a epilepsiei neclasificate	Incidența cumulativă	Rata de incidență	Rata medie de incidență
Fiest și alt. 2017	7,6 la 1000 de persoane	7,06 la 1000 de persoane	2,83 la 1000 de persoane	-	67,77 la 100000 de persoane	61,44 la 100000 de persoane	56,79 la 100000 de persoane
Număr articole eligibile	56 studii	56 studii	11 studii	-	14 studii	13 studii	13 studii
Biset și alt. 2024	17,3 la 1000 de copii	18,6 la 1000 de copii	6,8 la 1000 de copii	45,5 la 1000 de copii	250 la 100000 de copii	-	-
Număr articole eligibile	42 studii	42 studii	42 studii	42 studii	6 studii	-	-

1.3 Criterii de diagnosticare

Epilepsia poate fi diagnosticată destul de simplu, însă pot să apară diferite îndoieli pentru a nu se produce erori clinice. Pentru a se putea ajunge la

acest diagnostic, trebuie să se cunoască relatarea episodului de convulsiei atât din punct de vedere a pacientului, cât și a martorilor astfel clinicianul să-și poată da seama dacă a fost un eveniment non epileptic sau o criza, dar și de tipul acesteia (Van Donselaar et al., 2006). Următorul pas constă în investigațiile suplimentare de screening precum electroencefalograma (EEG), imagistica prin rezonanță magnetică (IRM), computer tomograf (CT), acestea pot să determina etiologia care va ajuta la clarificarea sindromului epileptic, ulterior se poate îndruma pacientul și se poate decide începerea unui tratament cu selectarea medicamentelor antiepileptice (MAE) (Van Donselaar et al., 2006).

Există trei niveluri de diagnostic definite de Liga Internațională Împotriva Epilepsiei în 2017 și acceptate de OMS. Acestea sunt niveluri cu debut la nou-născuți și sugari reprezentând copii până la vârsta de 2 ani; sindroame care debutează în copilărie și sindroame care pot începe la o vârstă înaintată (Scheffer et al., 2017).

Bebelușii care prezintă epilepsie se confruntă cu o suferință de comorbiditate cognitivă și comportamentală mare, ei prezentând un risc crescut la rezistență de medicamente și mortalitate (Zuberi et al., 2022).

Sindroamele epilepsiei cu debut în copilărie sunt clasificate pentru copii între 2 și 12 ani. Acestea se împart în trei mari categorii astfel: epilepsii focale autolimitate, sindroame de epilepsie generalizată (se consideră că au bază genetică) și encefalopatii de dezvoltare și epileptice care pot să aibă convulsii focale cât și generalizate (Specchio et al., 2022).

1.4 Intervenții terapeutice

În ultimi 30 de ani au apărut aproximativ 15 medicamente antiepileptice de a treia generație, fiind selectați în funcție de tipul convulsiei, dar și după istoricul medical al pacientului, însă nu există la momentul actual un medicament care să prevină apariția bolii înainte să se declanșeze prima convulsie epileptică (Kaculini et al., 2021; Ghosh et al., 2021).

Glutamatul este un neurotransmițător excitator responsabil pentru stimularea creșterii conducției de calciu și sodiu în canalele ionice dependente de ligant. La modele de animale s-a observat că doi antagoniști (AMPA, NMDA) au proprietăți anticonvulsivante. În consecință la începerea unor convulsii epileptice, plasticitatea dependentă de activitate a receptorilor glutamatului devine o caracteristică importantă a creierului epileptic. La șoareci s-a observat că cei care au mutația unei subunități de la receptorii AMPA, îi adună pe receptori cu permeabilitatea crescută de calciu, un fenotip neurologic de moarte celulară și diferite crize severe (Kumar et al., 2002; Salpietro et al., 2019; Ghosh et al., 2021). Glutamatul este eliberat la sinapsa care acționează asupra receptorilor metabotropi și ionotropi fiind responsabil de stimularea și escaladarea activității convulsive, dar și expresia redusă a transportatorilor de glutamat poate induce convulsii astfel s-a observat că manipularea genetică legată de funcționarea

proteinelor receptorului de glutamat în modelele de răzătoare pot crește pragul de convulsii (Ghosh et al., 2021).

Receptorul GABA joacă un rol important în mecanismul și managementul epilepsiei. Prin inhibarea sinaptică de către GABA se modifică reglarea excitabilității neuronale care este legată de epilepsie. Funcțiile GABA-energetice au arătat anomalii în modele animale dobândite și genetice a epilepsiei, iar în țesutul epileptic uman s-a identificat modificări în densitățile receptorilor GABA și concentrațiile de GABA, existând și un număr redus de receptori GABA α în țesutul hipocampului epileptic uman. Există studii care arată că antagoniștii GABA sunt proconvulsivante. De aceea unele medicamente eficiente pot provoca convulsii datorită faptului că ele inhibă sinteza GABA. Există medicamente anticonvulsivante care au legătură strânsă cu sinteza GABA prin mijloace precum creșterea inhibiției mediate de GABA (barbituricele, benzodiazepine), extinderea timpului de deschidere a canalelor de clorură (barbituricele), amplificarea vitezei de deschidere a canalului de clorură prin îmbunătățirea legăturii GABA la receptorii săi (benzodiazepine), sporirea GABA sinaptic prin scăderea catabolismului sau a recaptării GABA (vigabatrina, tiagabina) (Ghosh et al., 2021).

Receptorii colinergici prin diversitatea structurală și funcțională îndeplinesc funcții modulatorii în tot creierul mamiferelor (Ghosh et al., 2021). Perturbarea mecanismelor colinergice poate conduce la tulburări precum epilepsia, boala Parkinson, demență, schizofrenie, autism, boala Alzheimer. NACHR funcționale sunt dispersate în sistemul nervos central (SNC) astfel: pe dendrite, terminalele axonilor, corpurile celulare astfel mediind neurotransmisia sinaptică. Prin urmare în mai multe studii s-a observat atât la modelele de animale cât și la pacienții epileptici că nACHR este alterată în diferite tipuri de epilepsie (epilepsia mioclonică juvenilă, epilepsia lobului frontal nocturn autosomal dominant), dar și că perturbarea acesteia poate da naștere epilepsiei (Bertrand et al., 2002; Ghasemi and Hadipour-Niktarash, 2015; Ghosh et al., 2021).

Serotonina prin neurotransmisia sa are un rol potențial în epilepsiei. S-a demonstrat că receptorii serotoninei (5-HT α) sunt ținte promițătoare pentru dezvoltarea de noi medicamente antiepileptice, deoarece ei pot regla o mare varietate de convulsii focale și generalizate. Administrarea durabilă de inhibitori selectivi ai recaptării serotoninei este una dintre cauzele scăderii sintezei serotoninei și crește susceptibilitatea la convulsii (Singh et al., 2017; Ghosh et al., 2021).

Există și alte abordări care stau la baza inhibărilor convulsiilor epileptice precum: stimularea nervului vag, relaxarea musculară progresivă, yoga, terapie cognitiv-comportamentală, dieta cetogenă, vitamina D, tratamente pe bază de plante (Ghosh et al., 2021).

1.5 Asocierea comorbidităților psihiatrice

În literatura de specialitate există situații frecvente în care se indică faptul că pacienții cu epilepsie pot prezenta comorbidități psihiatrice precum anxietate (5-25%) (Wiglusz et al., 2018) și depresie (20-80% Domínguez-Aguilera and Muñiz-Landeros, 2017), tulburări de personalitate de acestea pot fi de dinainte sau să se instaleze progresiv în timp după diagnosticarea epilepsiei (Elger et al., 2017; Domínguez-Aguilera și Muñiz-Landeros, 2017; Wiglusz, 2018). Există anumite ghiduri pentru comorbidități psihiatrice la adulți cu o problemă cronică de sănătate care oferă un algoritm care poate fi aplicat în contextul de epilepsie. Aceste instrumente pot fi utilizate pentru screening (eng.) sau cuantificarea simptomelor psihiatrice prin autoevaluare precum: chestionare pentru evaluarea trăsăturilor de personalitate Neurobehavior Inventory (NBI), Revised Personality Inventory (NEO-PI-R); evaluarea simptomelor- interactive din timpul ultimelor luni Interictal Dysphoric Disorder Inventory (IDDI), chestionare pentru simptomele de depresie – Inventarul Beck Depression (IBD), Inventarul Beck Depression II (IBD II), Inventarul tulburărilor de depresie neurologică pentru epilepsie (ITDN-E); scala de anxietate și depresie HASEM, chestionare de evaluare a anxietății State-Trait Anxiety-Chestionar, Disorder-7Items (PHQ-GAD-7) sau cu ajutorul criteriilor SEMM IV prin intermediul interviurilor clinice structurale pentru tulburări SEMM IV axa I (SCID I) sau SEMM IV axa II (SCID II), MINI International Neuropsychiatric Interview (MINI) (Elger et al., 2017; Gurgu et al., 2021).

Caracterizarea epilepsiei indică faptul că majoritatea comorbidităților psihiatrice sunt o consecință a tulburărilor convulsive (Sadock et al., 2015; Duță et al., 2024). Cu toate acestea, există o relație complexă între comorbiditățile psihiatrice și epilepsie, deoarece persoanele care au afecțiunea epilepsie prezintă un risc crescut de a dezvolta tulburări psihiatrice, în timp ce pacienții cu tulburări primare au, de asemenea, un risc mai mare de a dezvolta epilepsie. Studiile epidemiologice sugerează relații bidirecționale (Duță et al., 2024).

Această situație duce la efectele comorbidităților psihiatrice asupra evoluției și managementului tulburărilor convulsive, manifestate la mai multe niveluri, precum I) antecedente de tulburări de dispoziție apărute înainte de debutul epilepsiei, care se asociază cu un risc crescut de epilepsie rezistentă la tratament (Hitiris et al., 2007; Petrovski et al., 2010; Kanner, 2017; Duță et al., 2024); II) un istoric psihiatric personal sau familial care este asociat cu un risc mai mare de evenimente adverse non-psihiatrice și psihiatrice (Mula et al., 2003; Kanner, 2017; Duță et al., 2024); III) un istoric actual sau trecut de tulburări de dispoziție și anxietate care pot facilita apariția convulsiilor în situații stresante (Haut et al., 2003; Haut et al., 2007; Kanner, 2017; Duță et al., 2024).

Antecedentele psihiatrice de-a lungul vieții premergătoare apariției epilepsiei pot avea un impact semnificativ asupra vieții persoanelor cu epilepsie,

cum ar fi: I) o stare de spirit actuală sau o tulburare de anxietate este un predictor puternic al calității proaste a vieții (Cramer et al., 2003; Johnson et al., 2004; Kanner, 2017; Duță et al., 2024);, II) o tulburare de dispoziție activă este asociată cu utilizarea sporită a serviciilor medicale, rezultând costuri mai mari pentru pacient, familie și societate (Cramer et al., 2003; Kanner, 2017; Duță et al., 2024); III) comorbiditățile psihiatrice, în special abuzul de substanțe și tulburările de dispoziție, sunt asociate cu un risc crescut de deces prematur din cauze externe, cum ar fi accidente și sinuciderile (Kanner, 2017; Christensen et al., 2007; Fazel et al., 2013; Duță et al., 2024).

1.6 Rolul vitaminei D în epilepsie

Există multe studii științifice care indică deficitul de vitamina D este mai frecvent la persoanele cu epilepsie în comparație cu persoanele care nu au această afecțiune. Deși există studii limitate, acestea pot demonstra importanța analizării periodice a cantității de vitamina D din organismul uman, în special la pacienții cu epilepsie, dar și scăderea numărului de crize epileptice după optimizarea cantității de vitamina D din organism (Duță, et al., 2024).

Vitamina D este o vitamina liposolubilă care este considerată un steroid neuroactiv al creierului care acționează atât prin receptorii săi nucleari, cât și prin receptorii membranari (Sizar, O. et al., 2021, Anjum, I., et al., 2018). Rolul acestei vitamine în organism este dat de metabolismul osos, funcțiile antioxidante și antiinflamatorii, fiind asociat cu îmbunătățirea stării de spirit cu ajutorul modulării biosintezei neurotransmițătorilor. În literatura de specialitate au fost identificate studii care dovedesc importanța vitaminei D prin beneficiile pe care le aduce asupra organismului, dar există și studii care susțin contrariul, anume că această vitamină nu poate avea niciun impact semnificativ (Jamilian et al., 2019; Duță et al., 2024).

În mod natural organismul uman sintetizează vitamina D prin ergocalciferol (vitamina D₂) și colecalciferol (vitamina D₃). Modalitățile de sinteză a vitaminei D în organism sunt de natură dermică prin expunerea pielii la razele ultraviolete ale soarelui (vitamina D₂ și D₃) (Sizar, O. et al., 2021), dar și sinteza aportului alimentar (vitamina D₃) sintetizat în ficat în 25-hidroxi-vitamina D₂ (25-OH-D₂) și 25-hidroxi-vitamina D₃ (25-OH-D₃) de către enzima 25-hidroxilaza (CYP25A1) și apoi sunt hidrolizate în rinichi de 1-alfa-hidroxilază (CYP27B1) în starea lor activă, în formă de vitamina D (1, 25 hidroxi-vitamina D) (Sizar et al., 2021, Christakos et al., 2017). Unul dintre cele mai importante roluri fiziologice ale vitaminei D este homeostazia calciului prin acțiuni de reglare în organele care manipulează calciul, dar majoritatea celulelor răspund și exprimă receptorul de vitamina D (VDR) (Voutsadakis 2020; Trivedi et al., 2021) pentru a ajuta genele să mențină echilibrul, calciul și fosfatul în țesuturi specifice (Meyer et al., 2020). Aparține unei familii de receptori ai factorilor de transcripție nucleari (Voutsadakis, 2020; Trivedi et al., 2021)

(Figura 1.1).

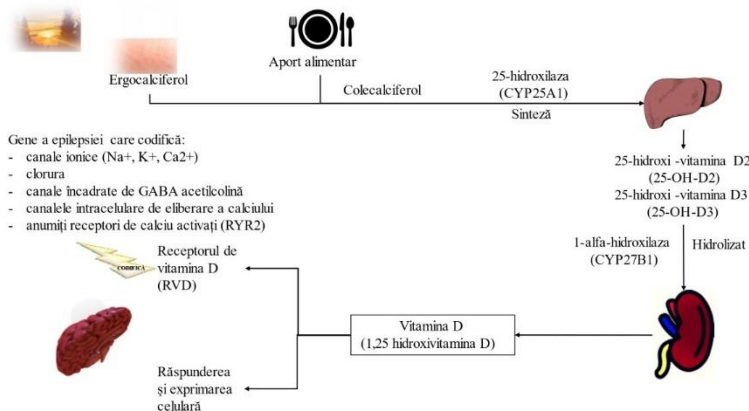


Figura 1.1. Reprezentarea schematică a sintezei vitaminei D în organismul uman

Pentru formele de epilepsie există o serie de gene mutante care codifică canale ionice în funcție de tensiune sau ligand. Aceste mutații au fost identificate în canalele Na⁺, K⁺, Ca²⁺, clorură, în canalele încadrate de GABA acetilcolină și în canalele intracelulare de eliberare a calciului, dar și în anumiți receptori de calciu activați precum rianodina (RYSR2), aceste rețele biologice majore sunt influențate de VDR (Bansal et al., 2020).

Vitamina D poate fi sintetizată și metabolizată local în sistemul nervos central (SNC) prin prezența 1 α -hidroxilazei în neuroni și glia din creier, dar poate fi găsită și în SNC și prin metabolizii săi care pot traversa hematoencefalică. VDR este localizat și în hipocamp, cortex, sisteme libiene, sistemul somatosenzorial (Cui et al., 2017) ajutând astfel la reglarea neurotransmițătorilor, diferențierea neuronală, creșterea axială, sensibilitatea la stres a canalelor de calciu, factorii neurotrofici și speciile reactive de oxigen (ROS) - prin care sunt afectate de funcția neuronală adecvată (Cui et al., 2017). Mai multe studii au arătat că există o varietate de polimorfisme de nucleotide în gene care exprimă elemente ale metabolismului vitaminei D, cum ar fi CYP2R1, CYP27B1, CYP24A1, VDR, GC, și sunt asociate cu predicția nivelurilor serice de 25 (OH) D (Mpandzou et al., 2016).

Principalele semne distinctive ale răspunsului inflamator cerebral (sursă comună în epilepsie) sunt: leziunea cerebrală traumatică (LCT), disfuncții ale barierei hematoencefalice (BHE) precum activarea și migrarea microgliale și astrocite. Neutrofilele mediază patogeniza timpurie prin stimularea edemului și a stresului oxidativ, și eliberarea factorilor inflamatori precum citokinele, chemokinele și ROS (Pendo et al., 2016; Webster et al., 2017). Cele mai cunoscute citokine eliberate după TBI includ factorul de necroză tumorală (TNF- α), factorul de creștere transformant- β (TGF- β) și interleukina-1 β (IL-1 β), -6, -

10 (Pendo et al., 2016; Vezzani et al., 2017). Aceștia, la rândul lor, pot recruta neutrofile și monocite suplimentare din sânge în țesutul deteriorat, răspândind astfel o cascadă inflamatorie (Pendo et al., 2016).

Capitolul 2 Epilepsia la animale

Epilepsia nu este o afecțiune exclusiv umană, animalele fiind afectată de aceasta de asemenea (Mínguez et al., 2019; Mínguez et al., 2021; Löscher, 2022), în special în cazurile de consangvinizare atunci când se încearcă repopularea speciei. Caracterizarea principală a acestei afecțiuni este predispoziția persistentă de a genera convulsii epileptice recurente spontane. Un status de epileptic este o formă frecventă de urgență neurologică atât în cazul oamenilor, fiind asemănătoare izbitoare cu epilepsia la animalele domestice care apare în mod natural (Leppik et al., 2011; Löscher, 2022) epilepsia și tulburările convulsive recurente (TCR) au fost subiect de cercetare veterinară în ultimii 75 de ani la animalele de companie (O'Neill et al., 2020). Aceasta poate fi indusă și la diferite modele de animale în scop științific pentru cercetare (Dudek and Staley, 2012; Pitkänen et al., 2015).

Procesul de epileptoeneză este un proces cronic prin care rețeaua neuronală care a fost normală este modificată funcțional prin factori genetici sau factori dobândiți pentru a conduce la o susceptibilitate crescută a convulsiilor la modelele de animale (Dudek and Staley, 2012; Pitkänen et al., 2015). Dovezile existente sugerează că acest proces este unul continu și prelungit care poate avea frecvență mai crescută după prima convulsie neprovocată sau spontană (Bertram and Cornett, 1993; Hellier et al., 1998; Nissinen et al., 2000; Williams, 2009; Kadam et al., 2010; Pitkänen et al., 2015).

2.1 Epilepsia nativă la animale

2.1.1 *Epilepsia la râs*

Râsul iberic (*Lynx pardinus*) poate prezenta episoade epileptice, atât idiopatice cât și focale, manifestate prin hipersalivație (sialoree), zvâcniri faciale (mișcarea rapidă a urechilor și/ sau a pleoapelor), clipirea unilaterală a ochilor, smucirea repetă a capului, urmate de crize tonico- clonice, așezați în poziție laterală. De altfel, au fost observate și episoade de anxietate, neliniște, precum și reacții de frică sau dezorientare. Profilul biochimic complet de sânge, panoul de boli infecțioase, RMN-ul creierului și analiza lichidului cefalorahidian au confirmat diagnosticul de epilepsie. Demonstrat de altfel că epilepsia este și o afecțiune de natură recesivă din punct de vedere genetic și tratată prin administrarea de fenobarbital cu succes (Mínguez et al., 2019; Mínguez et al., 2021).

2.1.2 *Epilepsia canină*

În epilepsia canină, o diagnosticare corectă se face pe un eșantion larg a

semnelor clinice, vârsta de debut și cauzele subiacente (Löscher, 2022). Imagistica creierului la animale cu epilepsie sugerează că regiunea creierului care acționează ca un sistem de rețea numit sistem limbic în care sunt incluse hipocampusul și girusul cingular sunt adesea afectate la câini, ceea ce poate indica de cele mai multe ori manifestări comportamentale de tip anxietate sau modificări cognitive (Löscher, 2022).

Cele trei categorii de convulsii epileptice prezentate de Liga Internațională împotriva Epilepsiei în funcție de debutul acestora: focal, generalizat (motorii și non-motorii) și necunoscut (ilae) se regăsesc și în cazul câinilor (Löscher, 2022). Acestea fiind un factor important pentru prognosticul terapiei (Bhatti et al., 2015; Löscher, 2022). De cele mai multe ori epilepsia idiopatică cu debut focal are un prognostic mai bun decât cea a epilepsiei structurale cu debut focal fiind asociată cu o perioadă de comportament alterat în care câinele pare nervos, se ascunde sau își caută stăpânul, acestea se manifestă datorită faptului că convulsiile de tip focal pot fi subtile, astfel încât stăpânul patrupedului să nu observe, dar pot fi și complexe ce se manifestă prin comportament bizar față de perioada începerii convulsive prin agresiune neprovocată, alergare necontrolată sau lătrat ritmic (Löscher, W., 2022; De Risio et al., 2015).

Unul sau mai multe episoade de status epiletic canin (CSE) este observat la aproximativ 59% dintre câinii cu epilepsie, ei având o durată medie de viață mai mică față de canini cu epilepsie fără CSE (Leppik et al., 2011). Prognosticul pentru acești câini este unul destul de rău, aproximativ 25% dintre câinii afectați nu supraviețuiesc externării din spital (Löscher, 2022). La fel ca la om, principalele subiecte pentru a atinge obiectivele sunt: identificarea cauzei convulsiilor, gestionarea oricăror complicații ce pot interveni și prevenirea următoarelor convulsii, astfel că medicamentele pentru prevenția apariția convulsiilor epileptice eficiente în SE la câini pot fi o formă de translație pentru studiile terapeutice umane fiind utilizate și la pacienții umani cu SE (Löscher, 2022; Leppik et al., 2011; De Risio et al., 2015). Scopul acestei terapii fiind un ideal pentru a elimina complet convulsiile, însă nu este realizabil, astfel încât se formează un scop secundar de a reduce convulsiile prin numărul și durata acestora. Medicamentele antiepileptice umane nu pot fi toate utilizate de către câini datorită faptului că din punct de vedere a diferențelor legate de farmacocinetică fiind eliminate mai rapid de canini. Astfel există doar primidon utilizat în SUA, iar în Europa există trei medicamente fenobarbital, imepitoină și bromură de potasiu; ultima utilizându-se doar în cazul în care primele două au eșuat.

Astfel s-a putut observa și o capacitate a organismului canin de a avea rezistență la medicamente antiepileptice, prin studii științifice care au demonstrat că două MAE nu au reușit ca un organism a anumitor animale să devină sau să

rămână fără convulsii. La câinii epileptici, procentul de rezistență la medicamente poate fi mai mare decât la om (Leppik et al., 2011).

În evaluarea medicamentelor antiepileptice aceste tratamente nu sunt aprobate de Administrația pentru Alimente și Medicamente (AAM) pentru CSE, dar ar putea exista aprobarea studiului controlat cu placebo avantajele fiind legate de: efectele adverse ale acestora ar putea fi ușor de evidențiat mai ales cele de aritmie cardiaca, hipotensiune și modificări de comportament; deoarece volumul de distribuție la câini este asemănător cu cel de la om și față de modele de animale mai mici (șoareci, șobolani, pești zebură) oferind astfel informații mai eficiente cu privire la doza medicamentelor cu efect util și concentrații plasmatice țintă care se potrivesc și la oameni (Leppik et al., 2011).

2.1.3 *Epilepsia la feline domestice*

În ultimii ani au apărut studii care arată că există o populație de pisici care îndeplinesc criteriile clinice pentru un diagnostic de epilepsie genetică (primară). Acesta este descrisă cu un debut între 1 și 7 ani, având o examinare neurologică între convulsii, screening metabolic, imagistica prin rezonanță magnetică (IRM), examinări a lichidului cefalorahidian (LCR), toate excluzând alte cauze subiacente. Incidența acestora la feline, față de câini fiind mult mai mică (Moore, 2014). Însă există epilepsie structurală (secundară) fiind incluse etiologii infecțioase precum peritonita infecțioasă felină (PIF), toxoplasmoza, boala inflamatorie neinfecțioasă și infarctele ischemice sau hemoragice (Moore, 2014). Sau convulsii reactive care nu declanșează afecțiunea epilepsie, dar pot să apară datorită unor anomalii sistematice, toxice sau metabolice precum bolile: encefalopatie hepatică, uremie severă a bolii renale în stadiul terminal, hipoglicemia severă, hipertiroidism sever, hipertensiunea sistemică severă, policitemia vera, hipocalcemie, hipertrigliceridemie sau expunere la organofosforici (Moore, 2014).

Medicamentele antiepileptice (MAE) care se utilizează pentru feline sunt asemănătoare cu cele pentru câini, însă există o diferență care ține de toxicitate și metabolismul. Cele mai utilizate sunt de prima linie: fenobarbital (PB), levetiracetam (FAE), zonisamide, însă acestea au efecte adverse mai puțin frecvente, dar care sunt mai grave la pisici față de câini precum PB-ul include toxicitatea acută idiosincrazia a ficatului sau a măduvei osoase care poate să apară în primele patru săptămâni de la administrare sau fibroza mielo-hepatică dobândită după o administrare prelungită a medicamentului (Moore, 2014; O'Neill, et al, 2020).

2.1.4 *Epilepsia la cai*

Deși nu sunt multe studii care să clarifice convulsiile epileptice la cai, acest lucru datorându-se faptului că există tulburări asemănătoare acestor convulsii precum atacurile, accidente vasculare cerebrale, convulsii grad mal. În funcție de clasificarea făcută pentru epilepsia la oameni, la cai nu se regăsește

sindromul epileptic, diagnosticarea loc fiind axată pe fenomenologie ictală, clasificarea după tip, clasificarea după etiologie, precum și o indicare opțională a gradului de afectare cauzată de starea epileptică (Lacombe, 2015). Aceste convulsii au o gamă largă de manifestări precum variația între modificări ușoare ale conștiinței, fasciculații musculare acestea pot conduce la diagnosticul convulsiilor în generalizate în întregul cortexul cerebral fiind o activitate motorie bilaterală sau convulsii focale care provin dintr-un loc a cortexului cerebral periferic (Lacombe, 2015).

Diagnosticarea epilepsiei la cai este greu de dat, datorită limitării evaluării tehnicii a imagistricii creierului, etiologia bolilor intra și extra craniene, astfel fiind costisitoare și consumatoare de timp (Lacombe, 2015). Pentru a nu se confunda convulsiile epileptice cu alte tipuri de crize, se face examen fizic și anamneză ajutând astfel la excluderea acestora. Analizele sângelui și a lichidului cefalorahidian sunt testele bioclinice care ajuta clinicianul să excludă anomalii metabolice care pot conduce la convulsii precum hemoleucograma completă, fibrinogenul, infecțiile virale, testele pentru acizii biliari, amoniac și glicemie (Lacombe, 2015).

2.2 Modele de animale cu epilepsie

2.2.1 Modelarea epilepsiei la rozătoare

Șoarecii și șobolanii sunt un model animal des utilizat în cercetarea științifică pentru a induce și a analiza diferite afecțiuni. Aceștia sunt utilizați în studierea comportamentală, fiziologică și genetică. În cercetările legate de epilepsie, aceștia sunt utilizați ca model de tip sălbatic/ Wistar (unde de cele mai multe ori inducerea convulsiilor epileptice se face pe bază de pentilentetrazol, acid kainic) (Abdel-Wahab et al., 2017; Momeni et al., 2019; Sahin et al., 2019), tip WAG/Rij (model genetic epileptic cu comorbidități depresive) (Aygün et al., 2019; Sitnikova., 2024), tip GAERS (epilepsie în absența genetică) (Sitnikova, 2024.).

În cazul acestor modele există studii științifice care demonstrează rolul vitaminei D pe care îl poate avea în controlul convulsiilor epileptice care va ajuta la o prevenție a afectării cognitive și la minimaliza numărul efectelor adverse (Abdel-Wahab et al., 2017; Momeni et al., 2019; Sahin et al., 2019; Aygün et al., 2019).

2.2.2 Modelarea epilepsiei la peștii zăbră

Danio rerio (peștele zăbră) este un model de organism care a câștigat mai mult spațiu în cercetările domeniului bio-medical. În cercetarea neurologică, el este utilizat pentru arhitectura sistemului nervos central similară cu mamiferele și dar și pentru proprietățile sale fiziologice și genetice omoloage cu ale omului, fiind un bun model prin ușurința de a absorbi compuși utilizați în cercetare, dar și pentru tehnicile ușoare de manipulare genetică față de răzătoare (Kalueff et al., 2014; Sassen și Köster, 2015; Chitolina et al., 2023). Mai multe studii au arătat

că peste jumătate din genele care codifică proteinele din genomul uman au corespondent în genomul peștelui zebură, dar și 84% dintre bolile umane au un omolog la bolile care pot fi dobândite de peștele zebură (Howe et al., 2013; Chitolina et al., 2023). Fiind utilizat și în studierea diferitelor mecanisme atât fiziologice cât și biochimice ale epilepsiei, dar și studierea medicamentelor vechi și noi care sunt utilizate în scăderea/ prevenirea convulsiilor epileptice (Zang et al., 2022; Chitolina et al., 2023).

De-a lungul timpului s-a dovedit că peștele zebură este un bun model experimental eficient pentru crizele epileptice induse chimic prin intermediul agenților care induc convulsii: pentilenetetrazol, picroxinina, alilglicina, acid kainic, kainat prin diferite concentrații administrate (Baraban et al., 2005; Williams et al., 2009; Leclercq et al., 2015, Yang, et al., 2017; Chitolina et al., 2023).

Testările comportamentale, biochimice și genetice au avut un aport mare în descoperirea de noi compuși sau găsirea substanțelor ca potențiali candidați a medicamentelor anticonvulsivante capabile să reducă sau să înlăture convulsiile epileptice care imită crizele epileptice umane și minimalizarea efectelor adverse asupra organismului.

Capitolul 3 Ipoteza de cercetare și obiectivele lucrării

În majoritatea articolelor de cercetare epilepsia este considerată o afecțiune ca un întreg, dar ea variază în funcție de cefalopatiile eterogene care au un simptom comun: convulsiile epileptice care au loc și care se pot identifica cea mai ușor prin modalități adecvate de imagistică, dar și prin electroencefalogramă, istoric medical la aceste tipuri se pot adăuga anumite comorbidități psihiatrice care pot să apară în intervale diferite față de convulsii, respectiv în funcție de debutul epileptic.

Am dorit să demonstrez caracterul multifactorial prin intermediul căreia vitaminei D din punct de vedere fiziologic, dar și biochimic prezintă un rol esențial în tulburările psihiatrice asociate cu epilepsia cu ajutorul modelelor animale *Danio rerio*.

Obiectiv 1. Studiarea și îmbinarea în mod sistemic a rezultatelor din studii din literatura de specialitate asupra cazurilor de epilepsie mioclonică juvenilă asupra părții responsabile de procesarea informației de la nivelul creierului uman.

Obiectiv 2. Înțelegerea efectului pe care îl prezintă acidul valproic prin intermediul a mai multe doze la modelele animale ce prezintă convulsii epileptice la care se pot mima manifestările neuropsihiatrice.

Obiectiv 3. Stabilirea efector unei doze de vitamina D și a unor doze de medicamente antiepileptice la modelele animale *Danio rerio*.

Capitolul 4 Metodologia cercetării

Scopul acestei lucrări de doctorat se împarte în două părți: 1) aduce noi informații asupra cazurilor de epilepsie mioclonică juvenilă din literatura de specialitate 2) prin utilizarea peștelui zebra (*Danio rerio*) ca model animal în studierea rolul vitaminei D în epilepsie în funcție de efectul a două medicamente anti epileptice (acid valproic, carbamazepină). Pentru a putea ajunge la atingerea acestui scop 1) am realizat o meta analiză care ajută să fie observat nivelul materiei cenușii la pacienții cu epilepsie și 2) s-a utilizat modelarea epilepsiei prin metode chimice - pentilentetrazol (PTZ), dar și administrarea a patru substanțe: acid valproic în formă de pulbere specific pentru experimente, acid valproic în formă de comprimate, carbamazepină în formă de soluție orală, respectiv vitamina D în formă de pilulă.

4.1 Studiu experimental I

4.1.1 Scop

Meta analiză are scopul de a sintetiza și îmbina în mod sistematic rezultatele unor studii independente asupra cazurilor de epilepsie mioclonică juvenilă prin care se observă modificările apărute la nivelul materiei cenușii.

4.1.2 Designul experimental

S-a realizat o cercetare a tuturor articolelor online bazate pe pacienți cu epilepsie mioclonică juvenilă și martori sănătoși, acestea fiind identificate în bazele de date PubMed, Web of Science, BrainMap, respectiv biblioteca Cochrane. Toate rezultatele au fost generate în baza următoarelor cuvinte cheie: epilepsie mioclonică juvenilă (JME), bazat pe voxel, morfometrie (VBM) și au fost raportate de către Institutul Neurologic din Montreal (MNI) sau spațiul Talairach.

4.1.3 Analiza statistică a datelor

Pentru această analiză s-a utilizat softul Seed-based de Mapping (SDM) (Albajes-Eizagirre et al., 2019), versiunea 6.21. s-au urmărit datele demografice și coordonatele de vârf. Lățimea completă la jumătate de maxim a fost stabilită la 20 mm, iar pragul statistic a fost de $p < 0,005$. Acestea s-au utilizat datorită faptului că studiile anterioare au arătat că valorile au cel mai bun control pentru ratele fals pozitive, fiind capabile să optimizeze echilibrul dintre sensibilitate și specificitate (Seidman et al., 2011). S-a utilizat și o analiză a sensibilității *jack nife*, pentru care s-a mai omis câte un studiu și repetând analiza medie și o analiză de eterogenitate pentru care s-a folosit un model cu efecte aleatoare cu statistici Q (Seidman et al., 2011, Pan et al., 2012).

4.2 Studiu experimental II

4.2.1 Scop

Literatura de specialitate prezintă numeroase studii, publicații sau cazuri

în care se discută despre capacitatea acidului valproic (VPA) de a diminua sau opri convulsiile atât la persoanele, cât și la diferite animale care suferă de epilepsie dar și a diferitelor comorbidități psihiatrice asociate acestei afecțiuni.

Acest studiu a fost de a evidenția diferențele la nivel comportamental dar și la nivel biochimic-enzimatic care există între cantități diferite de administrare a acidului valproic (5.000, 7.5000, 10,000 μM) atât în cazul modelului epileptic, cât și în cazul controlului sănătos.

4.2.2 Designul experimental

În acest studiu experimental s-au utilizat ca modele de animale 60 de indivizi a speciei *Danio rerio* (peștele zebură) de tip sălbatic achiziționate de la un producător local autorizat din județul Iași. După etapa de aclimatizare, peștii zebură au fost împărțiți în 5 grupuri egale în mod aleatoriu ($n=10$) în acvarii noi de 10 L (utilizând 5 L de apă) pentru încă 5 zile de adaptare la noile condiții experimentale. Temperatura din cadrul laboratorului, respectiv din acvarii a fost constantă de $\pm 26^{\circ}\text{C}$ pe parcursul întregului experiment, apa având un pH 7,5. Pe toată perioada experimentului s-a menținut un ciclu de 14 ore lumină/ 10 ore întuneric. Peștii au fost hrăniți de două ori pe zi cu TetraMin Flakes, iar apa a fost schimbată zilnic. Animalele au fost întreținute și tratate cu strictețe în conformitate cu Recomandarea Comisiei UE (2007), Directiva 2010/63/UE a Parlamentului European și a Consiliului din 22 Septembrie 2010, act normativ referitor la orientările privind găzduirea, îngrijirea și protecția animalelor utilizate în scopuri experimentale. După perioada de acomodare, peștii au fost analizați pentru a se putea observa comportamentul lor inițial înainte de administrarea celor 2 substanțe.

Dozele utilizate în acest experiment au fost de 10 mM pentilentetrazol (PTZ), respectiv 5.000, 7.500 și 10,000 μM VPA, toate au fost preparate zilnic de *novo* și administrate pe o perioadă de 26 de zile. Administrarea substanțelor s-a realizat direct în recipiente specifice care conțineau 20 mL soluție timp de 20 minute/pește. Testele de comportament au fost realizate de 5 ori în cele 26 de zile, acestea fiind realizate la un interval de 4 zile între teste (Figura 4.1).

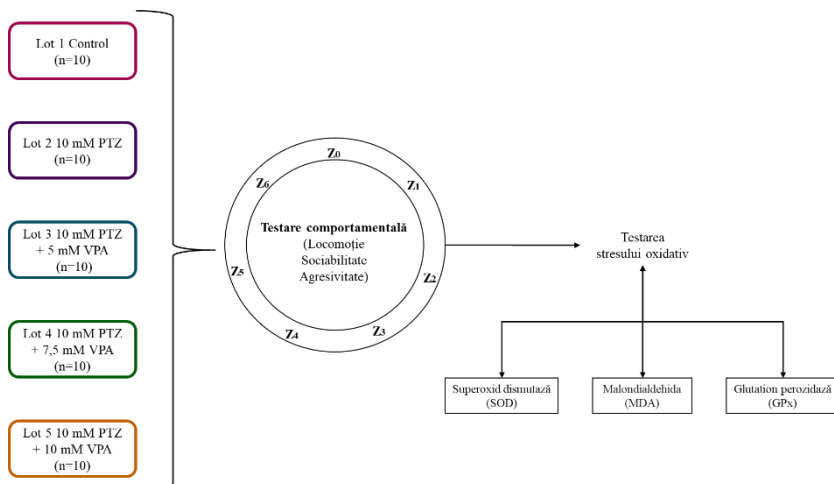


Figura 4.1 Schema protocolului de studiului experimental II

După cele 26 de zile de tratament, la încheierea perioadei experimentale peștii au fost sacrificați prin imersie în apă cu gheață, protocol avizat de comisia Uniunii Europene și stocați în la -80°C până la analizele biochimice ulterioare.

4.2.3 Testele comportamentale

Testul acvariului nou

Testul se realizează într-un acvariu nou față de cel în care sunt de obicei găzduiți peștii, de 10 L (umplut cu 6 L de apă, timp de 4 minute). Sunt urmărite următoarele aspecte în timpul testului: latența de a ajunge în jumătatea superioară a acvariului, timpul petrecut în jumătatea superioară a acvariului, numărul de intrări în jumătatea superioară a acvariului, durata medie a intrărilor și, numărul și durata de îngheț (*freezing* (eng.)). Înghețul a fost definit ca lipsa totală de mișcare, existând mișcările branhiilor și a ochilor, pentru două secunde sau mai mult. Creșterea anxietății este însoțită de obicei de comportamentul exploratoriu redus (Figura 4.2).



Figura 4.2. Reprezentarea calibrării testului acvariului nou în softul Etho Vision XT 14.

Testul social

Testul social se realizează cu un labirint în cruce transformat în labirint

T prin închiderea unui braț cu o fantă de plastic incoloră, astfel labirintul este compus din două brațe, unul stâng, unul drept și un braț principal în care se află căsuța de start. În știința comportamentală, labirintul T se utilizează atât pentru studiile sociale, prin intermediul căreia se oferă subiectului o alegere directă acest lucru va ajuta să se studieze modul de stimulare a navigării spațiale și non-spațială, prin intermediul parametrilor urmăriți. Pentru determinarea comportamentului social doi pești zebra vor fi așezați într-o căsuță din brațul stâng al labirintului (căsuța va fi realizată prin așezarea unei fante incolor). Un alt pește va fi așezat în căsuța de start, explorarea labirintului și timpul petrecut în brațul stâng al labirintului va dovedi comportamentul social accentuat al peștelui (Figura nr 4.3).

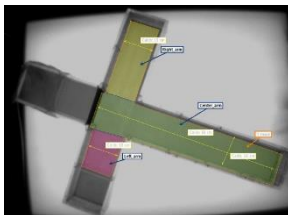


Figura 4.3. Reprezentarea calibrării testului T social în softul Etho Vision XT 11,5

Testul de agresivitate

Agresivitatea este o trăsătură complexă care poate fi dificil de măsurat cu exactitate. Aceste manifestări de luptă cu oponentul din oglindă, stresul cronic imprevizibil, provocarea socială, test de prezență a prădătorilor, întâlnirilor dominante-subdominante se pot observa cu ajutorul acestui test modelul agresivității, fiind în legătură cu tulburările psihiatrice manifestate. Chiar dacă peștii nu se pot recunoaște în oglindă, pot recunoaște că adversarul lor are exact aceeași dimensiune și face exact aceleași mișcări ca și ei (Zabegalov, K.N et al., 2019). Au fost identificate diferite tipuri de agresivități. Testul de agresivitate se realizează cu un labirint în cruce transformat în labirint T prin închiderea unui braț cu o fantă cu suprafața asemănătoare oglinzii, astfel labirintul este compus din două brațe, unul stâng, unul drept și un braț principal în care se află căsuța de start. Fiecare pește va petrece 4 minute în labirint unde se vor analiza mai mulți parametrii cu softul Etho Vision XT 11.5. În știința comportamentală, labirintul T se utilizează atât pentru studiile sociale, cât și pentru a testa agresivitatea (Figura 4.4).

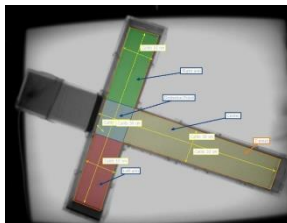


Figura 4.4. Reprezentarea calibrării testului T de agresivitate în softul Etho Vision XT 11,5.

4.2.4 Evaluarea stresului oxidativ

După finalizarea experimentului, fiecare grup a fost supus analizei stresului oxidativ. Pentru aceasta s-au parcurs mai multe etape. Prima dintre acestea a constat în omogenizarea fiecărui pește în soluție salină rece (0,90% NaCl; Hemofarm, România) și centrifugate la 5500 rpm timp de 10 min la 4° C conform metodei lui Jin et al. (Jin et al., 2015). După centrifugare, supernatantul fiecărei probe a fost transferat într-un tub PE curat și împărțit părți egale pentru analiza proteinelor totale, SOD, GPx și a MDA.

Nivelurile SOD (kitul 19160-1KT-F), GPx (kitul CGP1-1KT) și MDA (kitul MAK085- 1KT), precum și concentrațiile de proteine totale din țesuturi (kitul TP0300-1KT) au fost determinate folosind seturile de testare de la Merck, Germania. Fiecare parametru a fost măsurat conform protocoalelor producătorului. Un spectrofotometru (SPECORD 210 Plus producător Analytik Jena, Germania) a fost utilizat pentru a determina cantitatea de proteine totale, nivelurile de SOD, GPx și MDA. Datele au fost exprimate ca media $\pm$ SEM.

4.2.5 Analiza statistică a datelor

Toate datele au fost analizate prin intermediul foilor de calcul din excel (Microsoft Office) și software-ul Originpro v9.3 (2016, Originlab corporation, SUA), ultimul fiind utilizat pentru ANOVA unidirecțională continuată cu testul post-hoc Tukey Honest Significant Difference a perechilor de medii de grup și realizarea graficelor prezentate.

4.2.6 Aviz etic

Acest protocol a fost aprobat de către Comisia de Etică a Facultății de Biologie, Universitatea „Alexandru Ioan Cuza” din Iași, cu numărul de înregistrare 364/04.02.2022.

4.3 Studiu experimental III

4.3.1 Scop

Scopul acestui studiu ne va ajuta să înțelegem și să demonstrăm caracterul multifactorial a vitaminei D, rolul acesteia din punct de vedere fiziologic, dar și biochimic în tulburările psihiatrice asociate cu epilepsia la modelele de animale *Danio rerio*. Importanța acestei vitamine atât în ceea ce include epilepsia la nivel motric și biochimic cât și existența ei ca un ajutor al

celor două medicamente cunoscute ca fiind inductoare a enzimelor CYP450 astfel se accelerează catabolizarea vit D în metaboliții săi polari inactivi (Siniscalchi, A., 2020).

4.3.2 Substanțele chimice utilizate în studiu

Pentilentetrazol cunoscut sub denumiri precum 1,5-Pentamethylenetetrazole, Metrazole, fost achiziționat de Sigma Aldrich, cod produs P6500, având o masă moleculară de 138,17 g/mol. Aceasta este o substanță care induce convulsiile epileptice și este utilizată pe scară largă pe modelele de animale fiind un bun proconvulsivant. S-a realizat o soluție stoc formată din 0,6909 PTZ+ 1000 mL apă pentru a aduce soluția stoc la 5 mM PTZ.

Calciferolul sau popular numit vitamina D a fost achiziționat de la o farmacie locală, fiind un produs destinat adulților sub formă de supliment alimentar. Doza administrată a fost de 400 UI/L de vit. D.

Acidul valproic este un produs destinat persoanelor cu afecțiuni epileptice și cele cu tulburări bipolare, acesta fiind un medicament. Un singur comprimat conținea 333 mg valproat de sodiu și 145 mg acid valproic fiind echivalentul a 500 mg de valproat de sodiu. Doza administrată a fost de 50 mg/L de VPA.

Carbamazepina este un medicament utilizat pentru tratamentul anumitor tipuri de epilepsie, dar și ca adjuvant în controlul tulburărilor de dispoziție, fiind un bun înlocuitor al tratamentului cu litiu. Acesta a fost achiziționat sub formă de suspensie orală. Fiecare 5 mL de suspensie conțin 100 mg carbamazepină. Doza administrată a fost de 40 mg/L de CBZ.

4.3.3 Designul experimental

În cadrul acestui studiu cu caracter experimental, s-au utilizat ca modele animale peștele zebură de tip sălbatic, în număr de 200, achiziționate de la un producător local autorizat din județul Iași. După etapa de acclimatizare peștii zebură au fost împărțiți în 10 grupuri egale ($n=20$) în acvarii noi de 10 L (utilizând 5 L de apă) pentru încă 10 zile de adaptare la noile condiții experimentale. Temperatura din cadrul laboratorului, respectiv din acvarii a fost constantă de $\pm 26^{\circ}\text{C}$ pe parcursul întregului experiment, apa având un pH 7,5. Pe toată perioada experimentului s-a menținut un ciclu de 14 ore lumină/ 10 ore întuneric. Au fost hrăniți de două ori pe zi cu TetraMin Flakes, apa din fiecare tanc experimental a fost schimbată zilnic. Animalele au fost întreținute și tratate cu strictețe în conformitate cu Recomandarea Comisiei UE (2007), Directiva 2010/63/UE a Parlamentului European și a Consiliului din 22 Septembrie 2010, normativ referitor la orientările privind găzduirea, îngrijirea și protecția animalelor utilizate în scopuri experimentale.

Înainte de administrarea substanțelor, au fost realizate teste comportamentale pentru a putea observa modificările exacte pe care peștii le vor prezenta în urma tratamentelor experimentale.

Într-un interval de 11 zile s-a administrat câte 5mM de pentilentetrazol (PTZ) timp de 15 minute pe zi la toți peștii din primele 6 loturi., în ziua 12 fiind testați. După testare, am continuat administrarea cu aceeași doză în același interval de timp, încă 15 zile. În acest interval de timp s- a început administrarea cu supliment de 2000 UI de vitamina D3 și anticonvulsivantele 500 mg Acid Valproic, 200 mg Carbamazepină care au fost dizolvate în 5L de apă (Figura 4.5). Peștii au fost ținuti în acvariile cu tratament timp de două ore, după care aceștia au fost mutați în acvariile cu apă curată.

Astfel loturile studiate au fost următoarele: Lot 1 Pentilentetrazol, Lot 2 Pentilentetrazol + Vitamina D, Lot 3 Pentilentetrazol + Acid Valproic, Lot 4 Pentilentetrazol + Carbamazepină, Lot 5 Pentilentetrazol+ Acid Valproic + Vitamina D, Lot 6 Pentilentetrazol + Carbamazepină + Vitamina D, Lot 7 Control, Lot 8 Vitamina D, Lot 9 Acid Valproic, Lot 10 Carbamazepină. Astfel testele de comportament s-au realizat de 3 ori la primele 6 loturi în care s-a administrat PTZ astfel: înainte, în ziua 12, respectiv în ziua 26, iar la celelalte 4 loturi aceste teste au fost făcute de 2 ori înainte și după administrarea celor 15 zile de tratament.

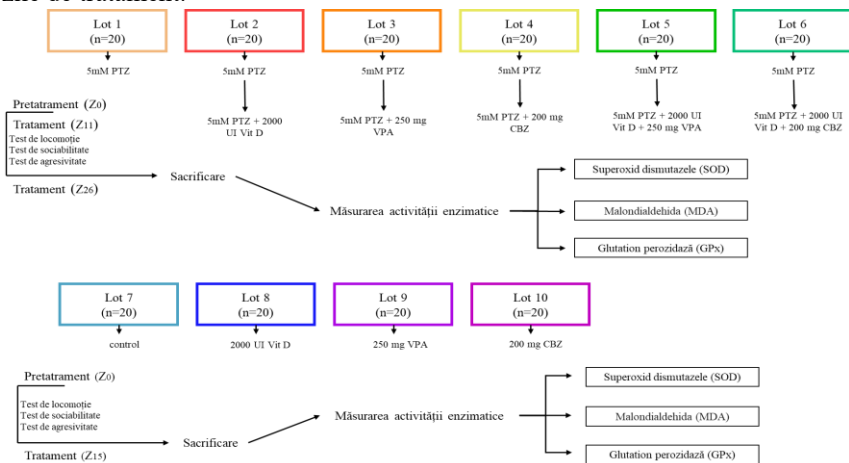


Figura 4.5. Schemă protocolui stadiului experimental III

Loturile au fost grupate în funcție de substanța administrată la fiecare parametru analizat în cele trei teste comportamentale. Astfel s-au analizat cele trei zile (Inițial, ziua 11 de expunere, respectiv ziua 26 de expunere) la cele 6 loturi care au fost expuse la Pentilentetrazol (PTZ), iar la celelalte 4 loturi au fost analizate câte două zile (ziua 11 de expunere/inițial și ziua 26 de expunere/ ziua 15 de tratament) și ziua 15 de tratament) (Tabel 4.1). Grupul 1 fiind alcătuit din totalitatea loturilor pozitive (l-a care s-a administrat doar o singură substanță) (Lot 1 PTZ, Lot 7 Control, Lot 8 Vit D, Lot 9 VPA, Lot 10 Carba), grupul 2 conținând

toate loturile în care s-a administrat vitamina D (Lot 2 PTZ+Vit D, Lot 5 PTZ+VPA+Vit D, Lot 6 PTZ+Carba+Vit D, Lot 8 Vit D), grupul 3 din care fac parte loturile cu Acid Valproic (Lot 3 PTZ+VPA, Lot 5 PTZ+VPA+Vit D, Lot 9 VPA), respectiv grupul 4 care au avut ca tratament Carbamazepină (Lot 3 PTZ+Carba, Lot 6 PTZ+Carba+Vit D, Lot 10 Carba).

Tabel 4.1 Administrarea substanțelor la loturile experimentale			
LOT	Z1-Z11	Z1-Z15	Z11-Z26
Lot 1 Pentilentetrazol	5mM Pentilentetrazol	-	5mM Pentilentetrazol
Lot 2 Pentilentetrazol + Vitamina D	5mM Pentilentetrazol	-	5mM Pentilentetrazol + 2000 UI/5L Vit D
Lot 3 Pentilentetrazol + Acid Valproic	5mM Pentilentetrazol	-	5mM Pentilentetrazol + 250 mg/5L VPA
Lot 4 Pentilentetrazol + Carbamazepină	5mM Pentilentetrazol	-	5mM Pentilentetrazol + 200 mg/5L CBZ
Lot 5 Pentilentetrazol+ Acid Valproic + Vitamina D	5mM Pentilentetrazol	-	5mM Pentilentetrazol + 250 mg/5L VPA + 2000 UI/5L Vit D
Lot 6 Pentilentetrazol + Carbamazepină + Vitamina D	5mM Pentilentetrazol	-	5mM Pentilentetrazol + 200 mg/5L CBZ + 2000 UI/5L Vit D
Lot 7 Control	-	-	-
Lot 8 Vitamina D	-	2000 UI/5L Vit D	-
Lot 9 Acid Valproic	-	250 mg/5L VPA	-
Lot 10 Carbamazepină	-	200 mg/5L CBZ	-

4.3.4 Testele comportamentale

Testul acvariului nou

Testul se realizează într-un acvariu nou față de cel în care sunt de obicei găzduiți peștii, de 10L (umplut cu 6L de apă, timp de 4 minute. Sunt urmărite următoarele aspecte în timpul testului: latența de a ajunge în jumătatea superioară, timpul petrecut în jumătatea superioară, numărul de intrări în jumătatea superioară, durata medie a intrărilor și , numărul și durata de ”îngheț”. Înghețul a fost definit ca lipsa totală de mișcare. Cu excepția branhiilor și ochilor, pentru 2 s sau mai mult. Creșterea anxietății este însoțită de obicei de comportamentul exploratoriu redus (Figura 4.6.).



Figura 4.6. Reprezentarea calibrării testului acvariului nou în softul Etho Vision XT 14.

Testul social

Testul social se realizează cu un labirint în cruce transformat în labirint T prin închiderea unui braț cu o fantă de plastic incoloră, astfel labirintul este compus din două brațe, unul stâng, unul drept și un braț principal în care se află căsuța de start. În știința comportamentală, labirintul T se utilizează atât pentru studiile sociale, prin intermediul căreia se oferă subiectului o alegere directă acest lucru va ajuta să se studieze modul de stimulare a navigării spațiale și non-

spațială, prin intermediul parametrilor urmăriți. Pentru determinarea comportamentului social doi pești zebra vor fi așezați într-o căsuță din brațul stâng al labirintului (căsuța va fi realizată prin așezarea unei fante incolore). Un alt pește va fi așezat în căsuța de start, explorarea labirintului și timpul petrecut în brațul stâng al labirintului va dovedi comportamentul social accentuat al peștelui (Figura 4.7).

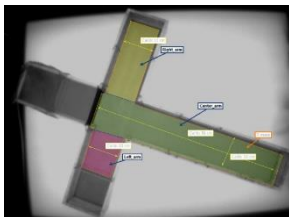


Figura 4.7. Reprezentarea calibrării testului T social în softul Etho Vision XT 11,5

Testul de agresivitate

Agresivitatea este o trăsătură complexă care poate fi dificil de măsurat cu exactitate. Aceste manifestări de luptă cu oponentul din oglindă, stresul cronic imprevizibil, provocarea socială, test de prezență a prădătorilor, întâlnirilor dominante-subdominante se pot observa cu ajutorul acestui test modelul agresivității, fiind în legătură cu tulburările psihiatrice manifestate. Chiar dacă peștii nu se pot recunoaște în oglindă, pot recunoaște că adversarul lor are exact aceeași dimensiune și face exact aceleași mișcări ca și ei (Zabegalov et al., 2019). Au fost identificate diferite tipuri de agresivități. Testul de agresivitate se realizează cu un labirint în cruce transformat în labirint T prin închiderea unui braț cu o fantă cu suprafața asemănătoare oglinzii, astfel labirintul este compus din două brațe, unul stâng, unul drept și un braț principal în care se află căsuța de start. Fiecare pește va petrece 4 minute în labirint unde se vor analiza mai mulți parametrii cu softul Etho Vision XT 11,5. În știința comportamentală, labirintul T se utilizează atât pentru studiile sociale, cât și pentru a testa agresivitatea (Figura 4.8).

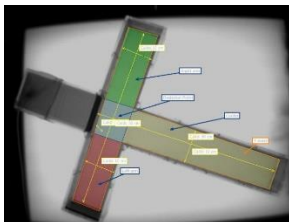


Figura 4.8. Reprezentarea calibrării testului T de agresivitate în softul Etho Vision XT11,5.

4.3.5 Evaluarea stresului oxidativ

După finalizarea experimentului, fiecare grup a fost supus analizei

stresului oxidativ. Pentru aceasta s-au parcurs mai multe etape. Prima dintre acestea a constat în omogenizarea fiecărui pește în soluție salină rece (0,90% NaCl; Hemofarm, România) și centrifugate la 5500 rpm timp de 10 min la 4°C conform metodei lui Jin et al. (Jin et al., 2015). După centrifugare, supernatantul fiecărei probe a fost transferat într-un tub eppendorf curat și împărțit părți egale pentru analiza proteinelor totale, SOD, GPx și a MDA.

Nivelurile SOD (kitul 19160-1KT-F), GPx (kitul CGP1-1KT) și MDA (kitul MAK085- 1KT), precum și concentrațiile de proteine din țesuturi (kitul TP0300-1KT) au fost determinate folosind seturile de testare de la Merck, Germania. Fiecare parametru a fost măsurat conform protocolurilor producătorului. Un spectrofotometru (SPECORD 210 plus producător Analytik Jena, Germania) a fost utilizată pentru a determina cantitatea de proteine totale, nivelurile de SOD, GPx și MDA. Datele au fost exprimate ca media $\pm$ SEM.

4.3.6 Analiza statistică a datelor

Normalitatea și distribuția datelor comportamentale au fost determinate prin testul Shapiro- Wilk folosind softwareul Graph Pad Prism (v 9.1.0.221, San Diego, CA, SUA). Ulterior, comparațiile între grupuri au fost efectuate cu ANOVA unidirecțională urmată de teste parametrice post-hoc, cum ar fi Tukey HSD. Analiza grafică prin intermediul OriginPro 9.0 cu ajutorul căreia se poate compara evoluția distanței parcurse de fiecare lot în parte în fiecare braț a testului de tip social, respectiv agresiv.

4.3.7 Aviz etic

Acest protocol a fost aprobat de către Comisia de Etică a Facultății de Biologie, Universitatea „Alexandru Ioan Cuza” din Iași, cu numărul de înregistrare 3480/24/10/2022.

Capitolul 5 Rezultate și discuții

5.1 Studii experimentale I

5.1.1 Rezultate meta analiza

Din primele căutări au rezultat 31 de studii, acestea fiind trecute prin filtre precum recenziile, fără grupul de control, fără coordonate de vârf bine detaliate. Pentru această meta analiză au rezultat 12 studii cu un număr total de pacienți cu epilepsie mioclonică juvenilă (JME) de 325, iar grupul control fiind de 357 de martori sănătoși.

Această meta analiză a arătat o creștere a substanței cenușii la pacienții cu JME în comparație cu controalele din girul cingular sau paracingular median stâng (zona Brodmann 23, SMD-Z: 1,404, unde diferența statistică a fost $p=0,0002$, Voxeli: 820 coordonate MNI; -4, -6, 42) girusul frontal superior drept (zona Brodmann 10, SMD-Z: 1,446, unde $p=0,0002$, Voxeli 186, coordonate MNI: -20, -20, 66) zona motorie suplimentară dreaptă (zona Brodmann 6, SDM-

Z: 1,135, unde $p=1,139$, Voxeli: 152, coordonate MNI: 8 10, 60) și zona motorie suplimentară stângă (Zona Brodmann 6, SDM-Z: 1,139, unde diferența semnificativă a fost $p=0,0013$, Voxeli: 72, coordonate MNI: -8, 12, 68).

Astfel pacienții cu JME au prezentat un volum mai scăzut de materie cenușie în talamusul stâng (SDM-Z: -1,1875, unde $p=0,00001$, Voxeli: 970, coordonate MNI: -12, -6, 8) și în insula stângă (zona Brodmann 48), SDM-Z: -1,372, unde $p=0,0008$, Voxeli: 553, coordonate MNI: 42, 2, 6) (Figura 5.1).

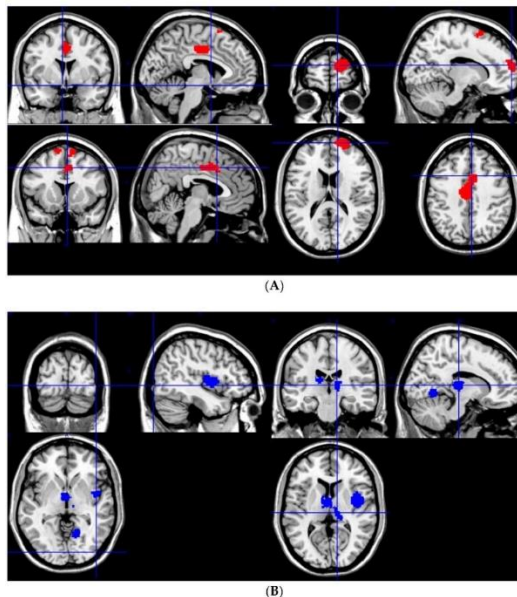


Figura 5.1. Modificări ale materiei cenușii la pacienți cu epilepsie mioclonică juvenilă
 (A) Zone cu volum crescut de substanța cenușie la pacienții cu JME
 (B) Zone cu volum scăzut de materie cenușie la pacienții cu JME în comparație cu martorii.
 Sursa: Kazis et al., 2021

Dovezi semnificative de părtinire a publicării nu au existat prin inspecția vizuală a diagramelor pâlnie și testelor lui Egger. Deoarece au existat atât vârfuri pozitive, cât și negative robuste, reaplicabile, a fost efectuată o omitere a unui studiu de fiecare dată cu ajutorul analizei jack nife, respectiv repetarea analizei medii (Figura 5.2).

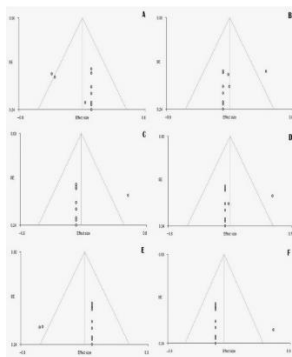


Figura 5.2. Diagrame fundel plot pe toate zonele care au arătat diferențe semnificative statistic între pacienții cu JME și controale.

- | | |
|-------------------------------|---|
| (A) Talamus, | (B) Cortexul cingulat median stâng, |
| (C) Girus precentral stâng, | (D) Zona motorie suplimentară stângă, |
| (E) Insula dreaptă, | (F) Girus frontal superior dreapta. |

Sursa: Kazis et al., 2021

Această meta analiză a arătat că există un volum crescut de materie cenușie în regiunile frontale ale creierului, fiind în concordanță cu studiile care folosesc alte modalități pentru a evidenția diferențe în aceste regiuni ale creierului în epilepsia mioclinică juvenilă în comparație cu martorii sănătoși.

Acest lob jucând un rol important în memoria de lucru și perspectivă în funcții executive. Sqartz și colaboratorii săi au arătat prin intermediul a două studii că există o diferență asupra memoriei vizuale de lucru între pacienții care prezintă epilepsie mioclonică juvenilă (JME) și pacienții cu epilepsie a lobului frontal (FLE), respectiv pacienții martori. Sqartz și echipa lui de lucru au efectuat studiul pentru evaluarea memoriei vizuale de lucru și au observat că pacienții cu JME au avut o memorie cu un nivel mai scăzut, dar și o absorbție scăzută a 18FDG în cortexul premotor ventral, caudal, cortexul prefrontal dorso-lateral bilateral și zona premotorie stângă (Lee et al., 2020; Swartz et al., 1994). Acest lucru a fost demonstrat de mai multe grupuri de cercetători precum Devinsky și colaboratorii săi, Pascualicchio și colaboratorii săi, respectiv Kim și colaboratorii săi (Swartz et al., 1996; Devinsky et al., 1997; Pascualicchio et al., 2007). Însă există studii care arată contrariul, prin performanța comparabilă în sarcinile de memorie de lucru la pacienții cu JME și controale (Kim et al., 2019; Vollmar et al., 2012; Savic et al., 2004; Iqbal et al., 2015; Kazis et al., 2021).

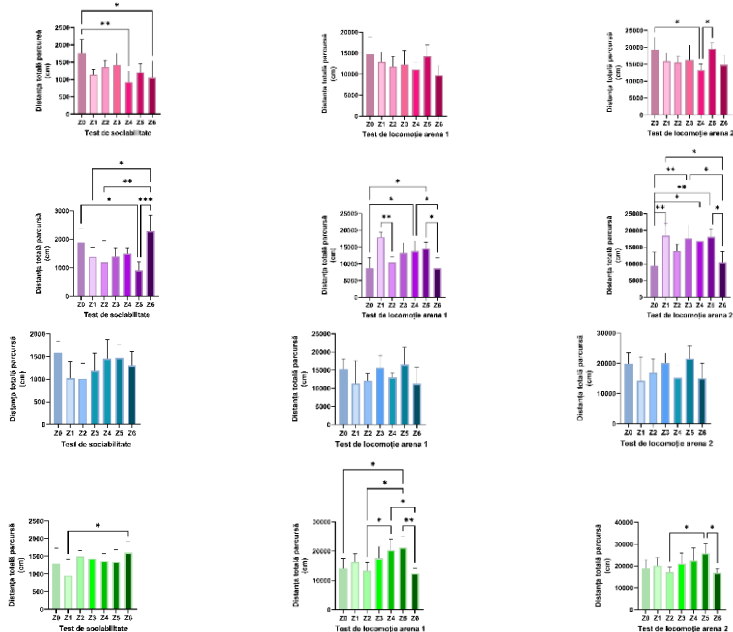
5.2 Studiu experimental II

5.2.1 Performanța de înot

În graficele de mai jos sunt prezentate performanțele peștilor zebură în testul de locomoție, dar și în testul de sociabilitate. Se pot observa diferențe între grupul control și grupurile în care s-a administrat PTZ singur sau împreună cu

concentrații diferite de VPA, rezultatele acestora fiind prezentate ca medie $\pm$ SEM. Astfel pe perioada celor 4 minute a fiecărui test se poate observa diferențele statistice a distanței totale parcurse. Acești parametri au fost calculați în funcție de arene astfel arena 1 reprezintă filmarea laterală în care se poate observa preferința de înot în părțile superioare și inferioare a acvariului, respectiv arena 2 reprezintă filmarea verticală în care se poate observa perimetrul de înot văzut de sus față de partea anterioară, unde era fixată camera laterală și posterioară a acvariului.

În grupurile în care s-au administrat PTZ și VPA de diferite concentrații au existat diferențieri statistice a mediei distanței totale parcurse. În lotul 3, unde s-a administrat 5.000 μ M VPA nu au existat diferențieri semnificative statistic, însă la lotul 4 cu administrare de 7.500 μ M VPA s-au observat o creștere a mediei la distanța totală parcursă la testul de sociabilitate între Z₁ și Z₆ ($p=0,0457$). La ultimul grup în care s-au administrat cele două substanțe și VPA a fost de o concentrație 10 mM s-au observat diferențieri semnificative a distanței totale parcurse doar în testul de locomoție astfel în arena 1 s-au observat două creșteri a mediei Z₂ și Z₄ ($p=0,0037$), Z₂ și Z₅ ($p=0,0037$), respective în arena 2 s-au observat două creșteri a mediei Z₀ și Z₁ ($p=0,0022$), Z₀ și Z₆ ($p=0,0005$) (Figura 5.3).



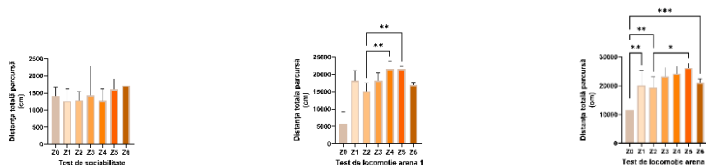
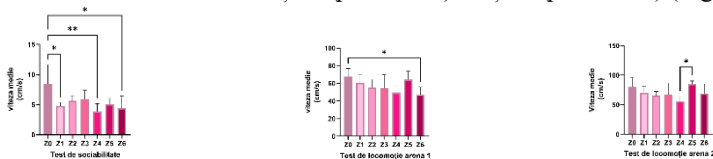


Figura. 5.3. Distanța totală parcursă de către grupurile experimentale (cm) în funcție de ziua de testare a testului de sociabilitate și locomoție. Rezultatele sunt prezentate sub forma mediei $\pm$ SEM: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ și *** $p < 0,001$.

Viteza medie a peștilor este în mod sigur și direct legată de distanța totală parcursă, dar poate oferi informații legate despre starea lor în momentul testării în funcție de diferențele semnificativ statistice care se pot observa în perioada de administrare a proconvulsivantului (PTZ) și a anticonvulsivantului (VPA) în cele trei concentrații diferite. Astfel s-au observat diferențe semnificative a mediei vitezei parcurse la lotul control toate diferențele la testul de sociabilitate au fost legate de ziua pretratament și au scăzut pe parcurs astfel Z_0 și Z_1 ($p=0,0301$), la testul de locomoție în arena 1 (lateral) s-a observat doar o singură diferență semnificativă prin scăderea mediei vitezei între Z_0 și Z_6 ($p=0,0370$). La lotul 2 unde s-a administrat PTZ în timpul testului de sociabilitate s-au observat o scădere a vitezei medii Z_1 și Z_6 ($p=0,0496$). În timpul testului de locomoție s-au observat următoarele: în arena 1 au existat o creștere între Z_0 și Z_1 ($p=0,0001$) și o scădere a vitezei medii Z_1 și Z_6 ($p=0,0001$), respectiv în arena 2 (vertical) a existat aceeași creștere între Z_0 și Z_1 ($p=0,0025$), dar a existat o scădere a vitezei medii Z_1 și Z_6 ($p=0,0006$) (Figura 5.4).

În grupul 3 unde s-a administrat PTZ și $5.000 \mu\text{M}$ VPA s-a observat că nu există diferențieri semnificativ statistice a vitezei medii asemenea parametrului distanței totale parcurse. Astfel încât la lotul 4 unde s-a administrat $7.500 \mu\text{M}$ VPA s-a putut observa în testul de sociabilitate o singur creștere semnificativă a vitezei medii între Z_1 și Z_6 ($p=0,0459$), la testul de locomoție nu s-au identificat semnificații statistice între cele 3 zile pe care le-am considerat cele mai relevante. În ultimul grup s-au observat diferențieri semnificativ statistice doar în testul de locomoție în arena 1 s-a observat o creștere a mediei vitezei Z_0 și Z_1 ($p=0,0134$), iar în arena 2 (vertical) s-au observat două creșteri semnificative a mediei astfel Z_0 și Z_1 ($p=0,0010$), Z_0 și Z_6 ($p=0,0360$) (Figura 5.4).



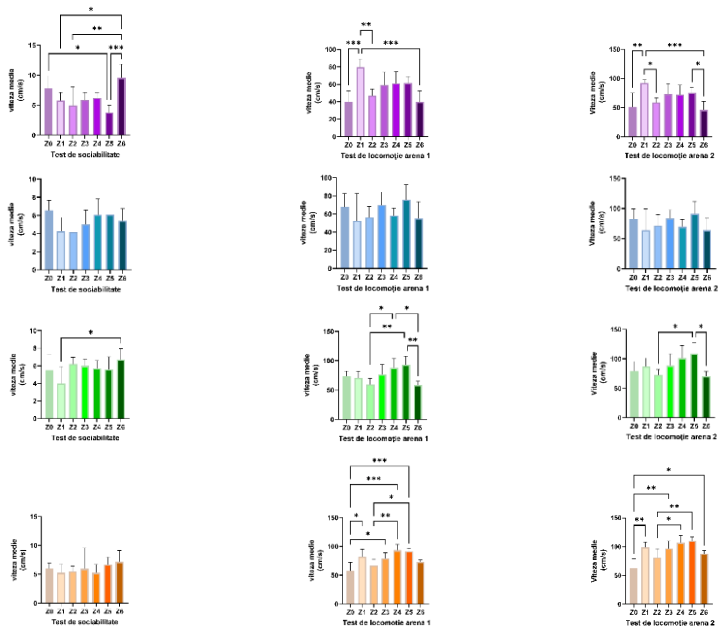


Figura. 5.4 Viteza medie parcursă de către grupurile experimentale (cm/s) în funcție de ziua de testare a testului de sociabilitate și locomoție. Rezultatele sunt prezentate sub forma mediei $\pm$ SEM; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ și *** $p < 0,001$.

În testele de locomoție și de sociabilitate performanța de înot a fost luată în considerare și din punct de vedere al frecvenței de rotație pe care au realizat-o peștii în timpul testelor, dar și cât timp aceștia au avut perioade de nemișcare care ne poate conduce la depistarea unor situații de stări precum cele de disociere, de ruptură de sine sau de acceptare a suferinței care pare inevitabilă.

S-au observat că la toate loturile nu au existat diferențieri semnificative statistice la testul de sociabilitate. În schimb la testul de locomoție s-au remarcat diferențieri semnificative la lotul control și la lotul în care s-a administrat PTZ și 7.500 μ M VPA. Astfel frecvența de rotație a avut diferențieri la lotul control în arena 1 (lateral) a existat o scădere semnificativă a numărului de rotații Z₀ și Z₆ ($p=0,001$), în arena 2 (vertical) nu au existat diferențieri semnificative statistic. La lotul 4 s-a observat diferențieri semnificative statistic doar în cazul arenei 2, unde se regăsește o creștere a numărului de rotații între ziua de pretratament față de prima zi de testare în timpul tratamentului Z₀ și Z₁ ($p=0,0364$), și o scădere a mediei de frecvență a rotațiilor între prima zi de testare locomotorie sub influența medicamentoasă comparativ cu ultima zi de testare locomotorie Z₁ și Z₆ ($p=0,0294$) (Figura 5.5).

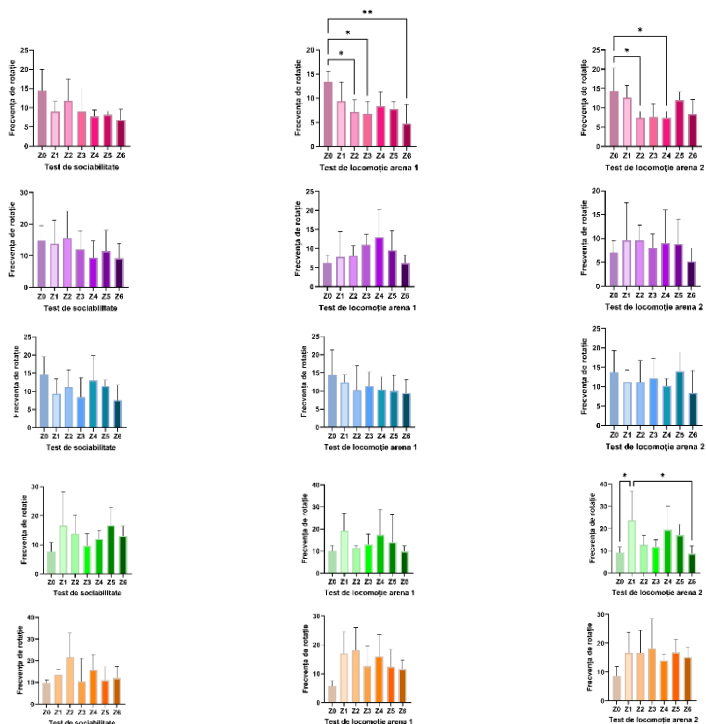


Figura. 5.5 Frecvența de rotație parcursă de către grupurile experimentale în funcție de ziua de testare a testului de sociabilitate și locomotie. Rezultatele sunt prezentate sub forma mediei $\pm$ SEM; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ și *** $p < 0,001$.

În cazul repausului peștilor a perioadei de îngheț în timpul testării sociabilității s-au putut identifica diferențieri semnificative statistic la lotul 4 în care s-a administrat PTZ și 7.500 μ M VPA, această diferențiere există între ziua pretratament și ultima zi de testare a tratamentului: Z0 și Z6 ($p=0,0175$). În cazul testului de locomotie au existat diferențe semnificativ statistic la lotul cu administrare de PTZ (lateral) și lotul cu administrare de PTZ + 7.500 μ M VPA (arena 1). Astfel că la lotul 2 în ziua de pretatament au stat mai mult timp în perioada de staționare față de prima zi de tratament diferențele semnificative a mediei scad față de ziua pretratament Z0 și. Z1 ($p=0,0069$), iar apoi există o creștere a mediei de staționare a peștilor în ziua 6 de testare a locomotiei față de prima zi de testare sub influența tratamentului Z1 și. Z6 ($p=0,0069$). La lotul 4 s-a observat o scădere față de ziua pretratament Z0 și. Z1 ($p=0,0170$) (Figura 5.6).

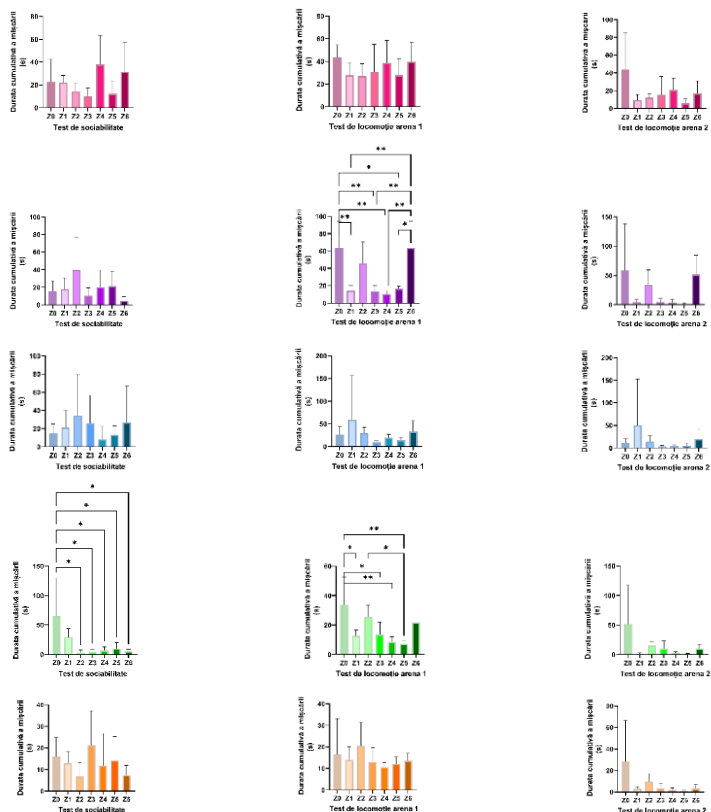


Figura. 5.6 Timpul de staționare obținut de către grupurile experimentale (s) în funcție de ziua de testare a testului de sociabilitate și locomotie. Rezultatele sunt prezentate sub forma mediei $\pm$ SEM; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ și *** $p < 0,001$.

La testul de sociabilitate, preferința de înot în una dintre cele trei brațe a putut să sugereze dacă peștii zebra în funcție de lotul experimental a dorit să exploreze mai mult brațul (stâng) unde se aflau alți doi pești în spatele unei fante transparente. Din punct de vedere a duratei cumulative petrecute în fiecare braț peștii din toate loturilor au avut o preferință mai mare de a explora brațul central al testului T însă s-a putut observa că la lotul control s-a văzut o creștere a preferinței de socializare în primele două zile de testare comportamentală, după care aceasta a început să fluctueze în fiecare zi, ajungând în ziua 6 să fie cea mai ridicată valoare din cele 6 zile de testare (Figura 4.7. a). La lotul în care s-a administrat timp de 26 de zile PTZ se poate observa că asemănător cu lotul control, preferința socială a peștilor a crescut în primele două zile, însă la acest lot a început explorarea brațului central mai mult din ziua 2 până în ziua 6 de testare, scăzând astfel timpul petrecut în brațul stâng (Figura 4.7. b). O fluctuație

constantă a preferinței din brațul stâng au avut peștii din lotul 3 (PTZ+5 mM VPA), unde s-a putut observa că comparativ între de dinainte de tratament și prima zi de tratament a existat o creștere a preferinței sociale (braț stâng), dar și a explorării brațului drept, iar z1 de testare socială față de ultima zi (z6) se poate observa ca interesul față de a explora brațul central a fost mai mare față de celelalte două brațe (Figura 3.7. c). lotul în care administrarea a fost de PTZ+7,5 mM VPA se poate observa o creștere a preferinței de înot a brațului stâng față de brațul central sau brațul drept în primele două zile de testare comportamentală, în ziua 3 și ziua 6 există o scădere a explorării brațului stâng față de zilele anterioare, dar o creștere a înotului în brațul drept (Figura 3.7. d). în ultimul lot s-a putut observa o creștere semnificativă a performanței de înot în brațul stâng comparativ cu ziua înainte de tratament și prima zi de testare comportamentală după începerea tratamentului (Figura 3.7. e).

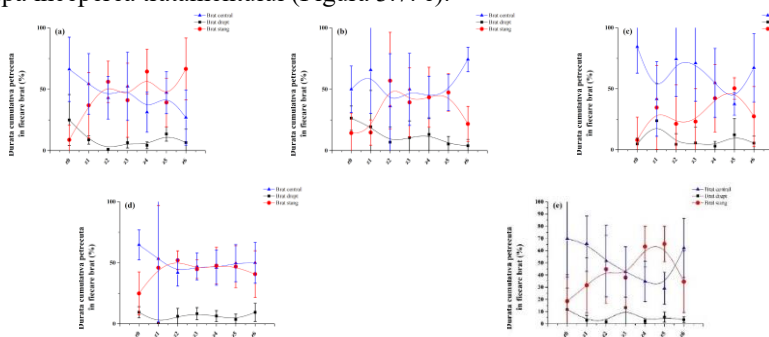


Figura 5.7. Fluctuații comportamentale de tip social în funcție de timp

- (a) Lot 1 Control;
- (b) Lot 2 10mM Pentilentetrazol;
- (c) Lot 3 10mM Pentilentetrazol + 5000μM VPA;
- (d) Lot 4 10mM Pentilentetrazol + 7500μM VPA;
- (e) Lot 5 10mM Pentilentetrazol + 10000μM VPA.

5.2.2 *Efectul substanțelor asupra comportamentului agresiv*

În testul de agresivitate s-au urmărit diferențele parametrilor precum distanța totală parcursă, viteza medie, frecvența de rotație, respectiv perioadele de inactivitate a mișcării. La lotul control s-a observat semnificații statistice la trei din cei patru parametri în care s-a utilizat ANOVA unidirecțională astfel că la distanța totală parcursă s-a observat o scădere semnificativ statistică între Z_0 și Z_1 ($p=0,0018$).

La viteza medie s-a văzut cinci scăderi a vitezei medii ceea ce a condus la diferențiere statistică Z_0 și Z_1 ($p=0,0008$). Iar la parametrul de inactivitate a peștilor din lotul control s-a observat că în ziua a 6-a ei au fost mai puțini activi față de prima zi înainte de începerea tratamentului și după începere Z_0 și Z_6 ($p=0,0042$), Z_1 și Z_6 ($p=0,0352$) (Figura 5.8).

La loturile unde s-a administrat PTZ s-a observat o diferențiere semnificativă statistic, mai precis la Lotul 3 unde s-a administrat și 5 mM VPA, această diferență a fost între prima zi de tratament și ultima zi de tratament la parametru care indică frecvența de rotație, unde a scăzut media acestor rotiri în sensul acelor de ceasornic. z_1 față de z_6 ($p=0,0217$) (Figura 5.8).

În testul de agresivitate s-a urmărit și timpul petrecut în fiecare braț, în special în brațul stâng, unde pe peretele brațului a fost atașată o oglindă care ajută la reflexia mișcărilor peștelui, inducându-i un tip de agresivitate vizuală. La toate loturile se poate observa că preferința a fost în brațul central, cu excepția lotului control și lotului 5. Astfel în lotul control s-a observat o schimbare de la o zi de testare la alta atât în brațul stâng, cât și în brațul central, în brațul drept a avut mici modificări a timpului petrecut (Figura 5.9. a).

În cazul lotului la care s-a administrat 10 mM pentilentetrazol o creștere a preferinței de înot în ziua 1 și z2 de testare comportamentală, explorarea celorlalte două brațe fiind în scădere față de ziua înainte de tratament. În ultima zi de testare a agresivității s-a observat o scădere a performanței de înot atât în brațul stâng cât și în brațul drept (Figura 5.9. b). la loturile în care s-a administrat PTZ împreună cu 5 mM VPA (Figura 5.9. c), respectiv 7,5 mM VPA (Figura 5.9. d) se poate observa în brațul central o creștere semnificativ mai mare în zilele 4 și 5 de testare comportamentală, urmată de o scădere bruscă în ziua 6, crescând astfel preferința de înot a peștilor în brațul stâng unde este așezată oglinda. La lotul 5 se poate observa că între ziua de dinainte de tratament și prima zi de tratament există o creștere a explorării brațului unde este atașată oglinda, scăzând astfel preferința de a înota în brațul central și drept. În ziua 3 până în ziua 6 se poate observa fluctuații concomitente a timpului petrecut în brațul drept, respectiv brațul central, dar o creștere a explorării brațului stâng (Figura 5.9. e).

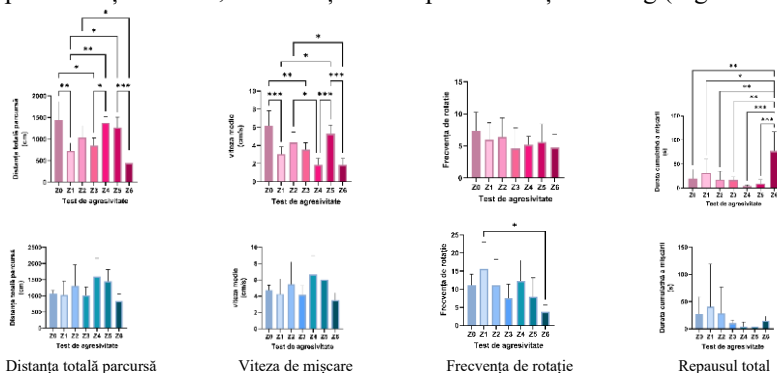


Figura. 5.8. Parametrii obținuți de către grupurile experimentale în funcție de ziua de testarea agresivității. Rezultatele sunt prezentate sub forma mediei $\pm$ SEM; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ și *** $p < 0,001$.

În cazul lotului la care s-a administrat 10 mM pentilentetrazol o creștere

a preferinței de înot în ziua 1 și z2 de testare comportamentală, explorarea celorlalte două brațe fiind în scădere față de ziua înainte de tratament. În ultima zi de testare a agresivității s-a observat o scădere a performanței de înot atât în brațul stâng cât și în brațul drept (Figura 5.9. b). la loturile în care s-a administrat PTZ împreună cu 5 mM VPA (Figura 5.9. c), respectiv 7,5 mM VPA (Figura 5.9. d) se poate observa în brațul central o creștere semnificativ mai mare în zilele 4 și 5 de testare comportamentală, urmată de o scădere bruscă în ziua 6, crescând astfel preferința de înot a peștilor în brațul stâng unde este așezată oglinda. La lotul 5 se poate observa că între ziua de dinainte de tratament și prima zi de tratament există o creștere a explorării brațului unde este atașată oglinda, scăzând astfel preferința de a înota în brațul central și drept. În ziua 3 până în ziua 6 se poate observa fluctuații concomitente a timpului petrecut în brațul drept, respectiv brațul central, dar o creștere a explorării brațului stâng (Figura 5.9. e).

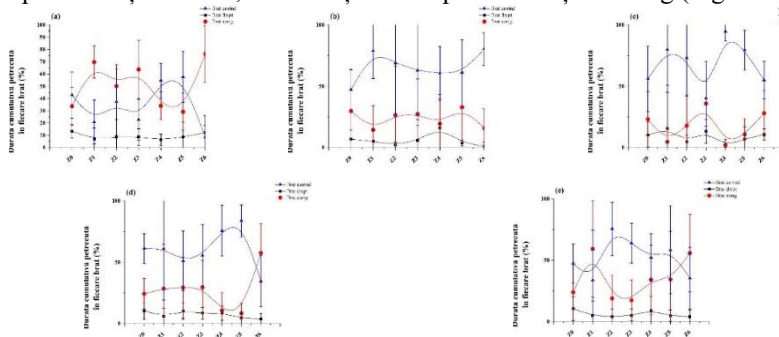


Figura 5.9. Fluctuații comportamentale de tip agresiv în funcție de timp

- (a) Lot 1 Control;
- (b) Lot 2 10mM Pentilentetrazol;
- (c) Lot 3 10mM Pentilentetrazol + 5000μM VPA;
- (d) Lot 4 10mM Pentilentetrazol + 7500μM VPA;
- (e) Lot 5 10mM Pentilentetrazol + 10000μM VPA.

5.2.3 *Efectul substanțelor asupra stresului oxidativ*

PTZ-ul este un proconvulsivant care generează stresul oxidativ în organismul modelelor de animale. În urma realizării celor trei teste s-a putut observa o scădere semnificativă nivelului de SOD a lotul control (LOT 1) cu semnificație statistică comparativ cu LOT 3 ($p=0,0489$), LOT 4 ($p=0,0002$) și lot 5 ($p=0,0004$), respectiv o scădere a loturilor 2 și 3 comparativ de loturile 4 și 5 (LOT 2 și LOT 4 ($p=0,0024$), LOT 2 și LOT 5 ($p=0,0067$), LOT 3 și LOT 4 ($p=0,0150$), LOT 3 și LOT 5 ($p=0,0445$), unde SOD a avut cele mai mari valori acest aspect ne sugerează că în primele trei loturi există stres oxidativ. Activitatea enzimatică a condus la o creșterea a cantității de MDA față de lotul control (LOT 1 și LOT 2 ($p=0,0082$), LOT 1 și LOT 3 ($p=0,0015$), LOT 1 și LOT 4 ($p=0,0012$), LOT 1 și LOT 5 ($p=0,0007$) Activitatea GPx a prezentat niveluri scăzute la 4

grupuri ceea ce reprezintă existența stresului oxidativ la aceste grupuri (Figura 5.10).

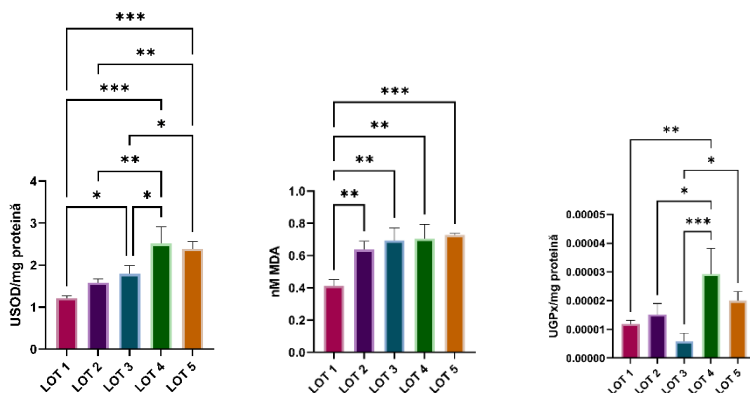


Figura. 5.10. Rezultatele parametrilor stresului oxidativ prezentate sub forma mediei $\pm$ SEM; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ și *** $p < 0,001$.

5.2.4 Discuții

Peștele zebură (*Danio rerio*) a devenit în ultimii ani un model optim pentru studiul tulburărilor neurodegenerative datorită repertoriului larg de care beneficiază, în special în termen de comportament (Vaz et al., 2018; Kalueff et al., 2013). Sunt specii în mod intrinsec colective, care trăiesc în bancuri, așa că înfățișează o varietate de comportamente sociale. Ei posedă expresii bine documentate de frică și anxietate și pot învăța asocieri complexe (Lieschke and Currie, 2007).

Administrarea proconvulsivantului pentilentetrazol (PTZ) a condus la rezultate fiabile care pot să ne conducă la efectul convulsivant arătând un dezechilibru în majoritatea parametrilor analizați în testele de comportament (locomoție, sociabilitate, agresivitate), însă acest dezechilibru a fost mai pronunțat la grupurile unde s-a administrat acid valproic în concentrație de 7,5 mM, respectiv 10 mM, și nu s-a observat nicio modificare semnificativă în lotul în care s-a administrat PTZ și 5 mM VPA.

Pentru că efectul PTZ să fie cât mai sigur, administrarea repetitivă timp de 26 de zile a putut să determine diferențele care au existat în cele 6 zile de testare a comportamentului față de ziua pretratament (z_0) și efectul VPA ca un anticonvulsivant a fost la fel de importantă pentru a putea înțelege capacitatea acestui medicament pentru a opri convulsiile epileptice, dar și de a stopa comportamentul indus de proconvulsivant (PTZ). Acest lucru a fost observat de către alți cercetători la larvele de pești zebură, după începerea administrării de PTZ s-a putut observa modificări locomotorii care au durat de la câteva secunde până la finalizarea administrării, însă acestea se pot observa și după administrare

(Gawel et al., 2020; Li et al., 2018).

Robea și colab. au efectuat un studiu asupra larvelor de pește zebură la 6 zile post-fertilizare (dpf) expuse la 48 μM VPA pe parcursul a 24, 48 și 72 de ore. Grupul expus la VPA timp de 72 de ore a petrecut cea mai mare parte a timpului lângă oglindă (Robea et al., 2021). Există, de asemenea, unele controverse cu privire la acest subiect deoarece Zimmermann et al. (Zimmermann et al., 2015) contrazic aceste constatări în urma administrării tot a 48 μM . VPA influențează componenta socială, anxietatea și locomotia mai mult decât comportamentul agresiv. Am evidențiat absența oricărui indicator care să indice existența unei tulburări neurologice. Această stare era complementară comportamentului social, dar combinată cu agresivitate ridicată. Liu și colab. (Liu, et al., 2016) au adus dovezi relevante cu privire la modul în care 20/100 μM VPA timp de 7 ore pe zi timp de 6 zile la larvele de 24 de ore pf. Această substanță cauzează un deficit de preferință socială, în timp ce expunerea acută afectează activitatea locomotorie. Administrarea de acid valproic nu a modificat semnificativ răspunsul comportamental la lumină, dar nici inhibarea răspunsului de anxietate, astfel de leagă de expunerea cronică care nu a modificat activitatea locomotorie.

În rezultatele testului de agresivitate prezentate mai sus, se poate observa că există diferențe statistice în același lot, dar în funcție de zilele de administrare a acidului valproic cu pentilentetrazol. Acestea indicând de cele mai multe ori preferința pe care peștii au dobândit-o pe parcursul explorării acvariului T, dar și dominanța de agresivitate.

Pe parcursul tuturor testelor de comportament, nu s-a observat în comportamentul peștilor zebură perioade de repaus pentru câteva secunde care să fie asociate cu un răspuns de paralizie fizică, emoțională și cognitivă, cea ce ne duce cu gândul că indiferent de concentrația de VPA din tratamentul antiepileptic, aceștia nu au avut anxietăți bruște de câteva secunde a sistemului nervos autonom.

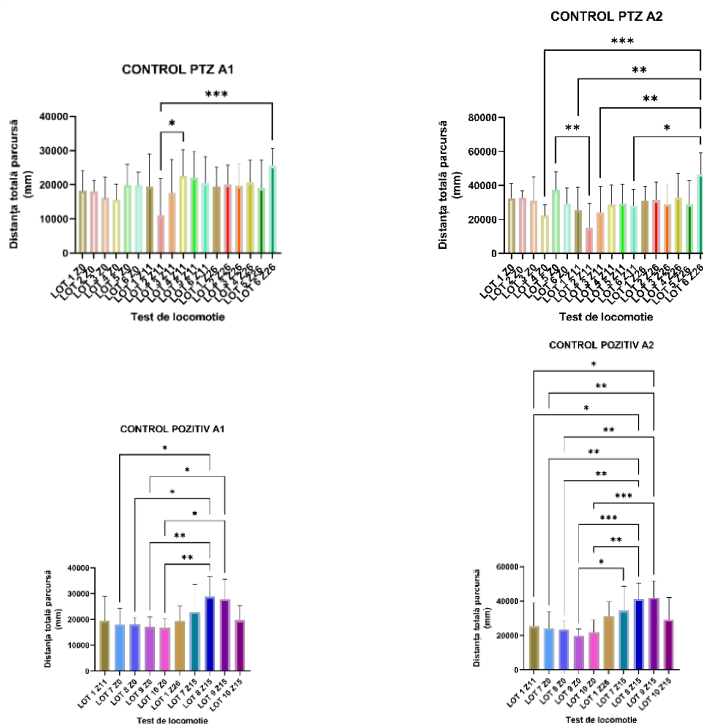
5.3 Studiu experimental III

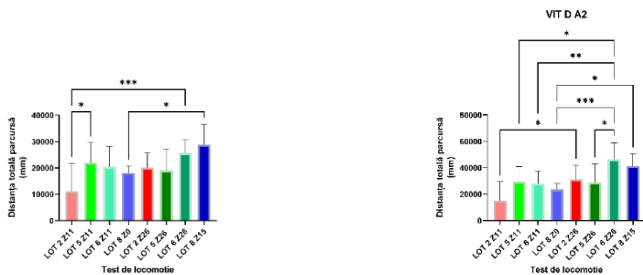
Ca să putem identifica cât mai concis comportamentul peștilor zebură, s-a utilizat testul de locomotie într-un acvariu nou, în care am adăugat un litru de apă în plus față de acvariile în care aceștia au fost ținuti. Analiza datelor s-a realizat pe fiecare dintre cele două arene, care reprezintă partea verticală, respectiv partea laterală din unghiul în care s-a filmat comportamentul. Astfel că în graficele de mai jos se va observa o analiză cu ajutorul ANOVA, unde am folosit câte o singură variabilă per lot. În cazurile în care s-au identificat semnificații statistice, acestea au fost notate sub formă de stelute ce reprezintă comparații cu valoarea $p \leq 0,05$.

5.3.1 Performanța de înot

La parametru de măsurare a distanței totale parcursă s-au observat

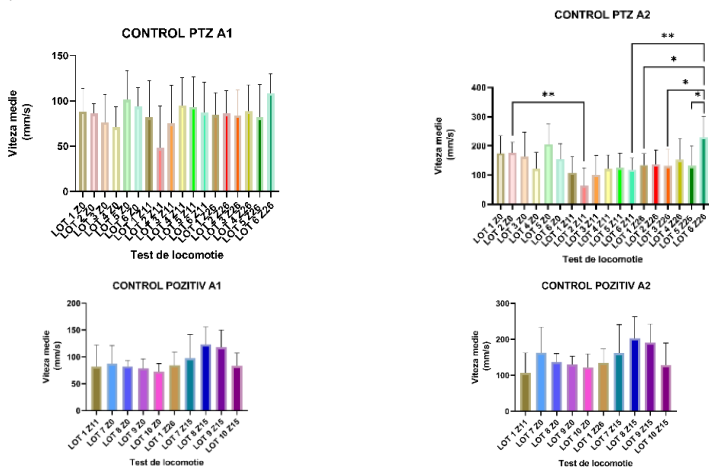
semnificații statistice la grupul cu loturile unde s-a administrat PTZ astfel: pe arena 1 (lateral) s-a observat o creștere semnificativă între LOT 2 Z_{11} și LOT 4 Z_{11} ($p=0,0367$), iar pe arena 2 (vertical) s-au observat creșteri a diferențierii semnificative între LOT 6 Z_{11} și LOT 6 Z_{26} ($p=0,0420$), la grupurile unde toate loturile au fost considerate control pentru celelalte grupuri (loturile pozitive) s-au observat câte o creștere a diferențierii statistice pe fiecare arena astfel pe arena 1 lotul 9 a avut o diferență între Z_0 și Z_{15} ($p=0,0219$) și la arena 2 lotul 8 a avut o diferență între Z_0 și Z_{15} ($p=0,0045$). La oturile unde s-a administrat Vit D ca anticonvulsivante s-au observat pe arena 1 două creșteri semnificative LOT 2 Z_{11} și LOT 5 Z_{11} ($p=0,0262$), LOT 8 Z_0 și LOT 8 Z_{15} ($p=0,0303$), iar pe arena 2 s-au observat patru creșteri semnificative LOT 2 Z_{11} și LOT 2 Z_{26} ($p=0,0358$), LOT 6 Z_{11} și LOT 6 Z_{26} ($p=0,0098$), LOT 8 Z_0 și LOT 8 Z_{15} ($p=0,0159$), LOT 5 Z_{26} și LOT 6 Z_{26} ($p=0,0165$) (Figura 5.11).

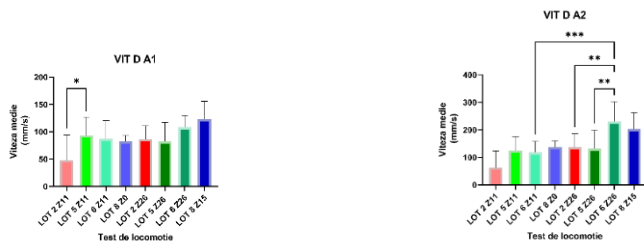




Arena 1 (filmare laterală) Arena 2 (filmare verticală)
 Figura 5.11 Distanța totală parcursă (mm) la peștii zebra ne(tratați) (n=10) pe parcursul a 26 de zile * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,10$

Viteza medie (mm/s) pe care au obținut peștii zebra în timpul testului de locomoție, a fost diferită în funcție de camera utilizată. Astfel în grupul în care s-a administrat PTZ s-au observat existența crescătoare a diferențelor semnificativ statistic doar în arena 2 (vertical) LOT 6 Z₁₁ și LOT 6 Z₂₆ ($p=0,0046$), LOT 1 Z₂₆ și LOT 6 Z₂₆ ($p=0,0408$), LOT 3 Z₂₆ și LOT 6 Z₂₆ ($p=0,0252$), LOT 5 Z₂₆ și LOT 6 Z₂₆ ($p=0,0281$). la grupurile unde s-a administrat vit D s-au observat că există creșteri a mediei ceea ce conduce la diferențelor statistice, în arena 1 (lateral) LOT 2 Z₁₁ și LOT 5 Z₁₁ ($p=0,0384$), respective în arena 2 LOT 6 Z₁₁ și LOT 6 Z₂₆ ($p=0,0006$), LOT 2 Z₂₆ și LOT 6 Z₂₆ ($p=0,0076$) LOT 5 Z₂₆ și LOT 6 Z₂₆ ($p=0,0038$). La grupurile cu loturile pozitive nu s-au regăsit diferențieri statistice în funcție de viteza medie (Figura 5.12).



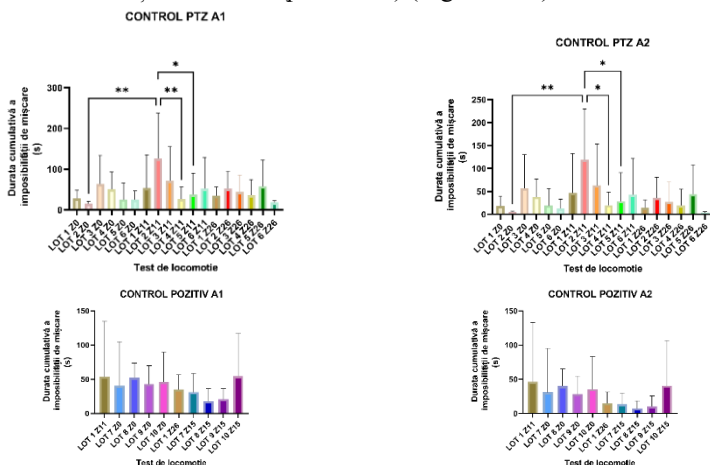


Arena 1 (filmare laterală)

Arena 2 (filmare verticală)

Figura 5.12 Viteza medie parcursă (mm/s) la peștii zebra ne(tratați) (n=10) pe parcursul a 26 de zile *- $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,10$;

Episoade de inactivitate s-au regăsit aproximativ la toți peștii din toate loturile. La loturile cu administrare de PTZ în arena 1 (lateral) s-a observat o creștere a mediei duratei LOT 2 Z₀ și LOT 2 Z₁₁ ($p=0.0016$) și două scăderi a diferențelor semnificative LOT 2 Z₁₁ și LOT 4 Z₁₁ ($p=0.0097$), LOT 2 Z₁₁ și LOT 5 Z₁₁ ($p=0.0390$), iar pe arena 2 (vertical) s-au observat o creștere LOT 2 Z₀ și LOT 2 Z₁ ($p=0.0016$) și două scăderi a mediei LOT 2 Z₁₁ și LOT 4 Z₁₁ ($p=0.0151$), LOT 2 Z₁₁ și LOT 5 Z₁₁ ($p=0.0482$). La grupurile unde s-a administrat vit D s-au observat câte o diferențiere a mediei de repaus aceasta fiind în scădere în fiecare arenă astfel arena 1 LOT 2 Z₁₁ și LOT 5 Z₁₁ ($p=0.0247$) și arena 2 LOT 2 Z₁₁ și LOT 5 Z₁₁ ($p=0.0282$) (Figura 5.13).



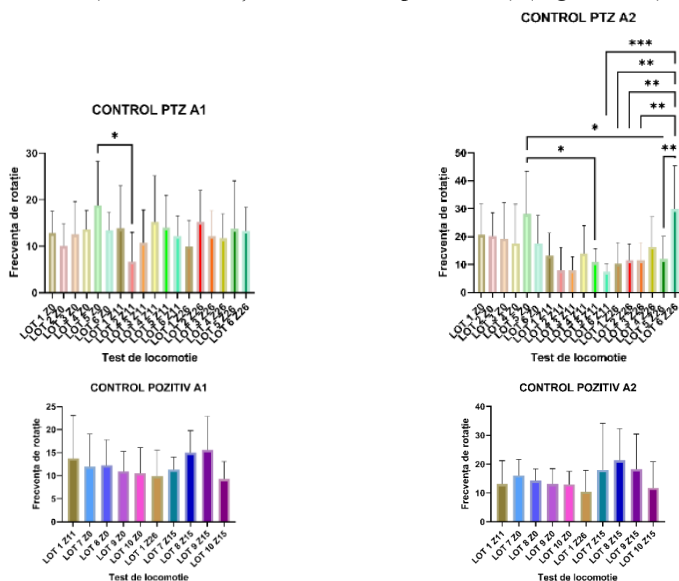


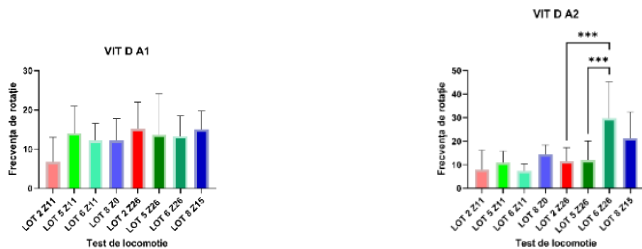
Arena 1 (filmare laterală)

Arena 2 (filmare verticală)

Figura 5.13 Durata de repaus acumulată (s) la peștii zebra ne(tratați) (n=10) pe parcursul a 26 de zile *- $p<0,05$; ** - $p<0,01$; *** - $p<0,01$

Pentru testul de locomoție s-a analizat numărul de tendințe de a se întoarce peștele zebra în sensul acelor de ceasornic au existat. Astfel că pe arena 1 (lateral) nu s-a remarcat diferențe cu semnificație statistică, însă la arena 2 (vertical) s-au identificat diferențe ale mediei frecvenței de rotație în grupurile în care s-a administrat PTZ fiind în scădere semnificativă pentru LOT 5 Z₀ și LOT 5 Z₁₁ ($p=0.0161$), LOT 5 Z₀ și LOT 5 Z₂₆ ($p=0.0342$) și în creștere semnificativă LOT 6 Z₁₁ și LOT 6 Z₂₆ ($p=0.0001$), LOT 1 Z₂₆ și LOT 6 Z₂₆ ($p=0.0023$), LOT 2 Z₂₆ și LOT 6 Z₂₆ ($p=0.0061$), LOT 3 Z₂₆ și LOT 6 Z₂₆ ($p=0.0066$), LOT 5 Z₂₆ și LOT 6 Z₂₆ ($p=0.0085$). la loturile unde s-a administrat VIT D s-au observat două creșteri semnificative a mediei frecvenței LOT 2 Z₂₆ și LOT 6 Z₂₆ ($p=0.0002$), LOT 5 Z₂₆ și LOT 6 Z₂₆ ($p=0.0003$), respective la loturile unde s-a administrat CBZ s-au observat o creștere a mediei și o scădere LOT 4 Z₂₆ și LOT 6 Z₂₆ ($p=0.0339$), LOT 6 Z₂₆ și LOT 10 Z₁₅ ($p=0.0016$) (Figura 5.14).



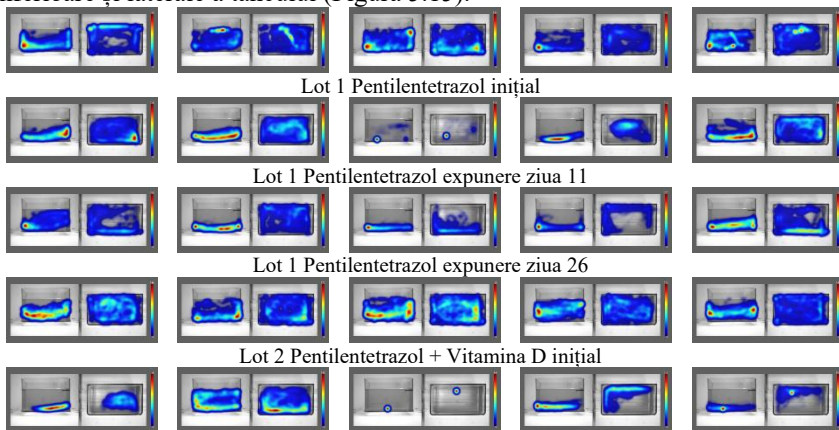


Arena 1 (filmare laterală)

Arena 2 (filmare verticală)

Figura 5.14 Frecvența de rotație la peștii zebură ne(tratați) (n=10) pe parcursul a 26 de zile *- $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,10$

În timpul acesta s-au realizat hărți termografice în care se poate observa timpul petrecut de peștii zebură în acvariu nou. În funcție de intensificarea culorii, se poate da seama de preferința acestora de a sta sau de a explora. Aceștia în timpul experimentelor pretratament, au petrecut în mare parte spre partea inferioară a acvariu, explorând o parte sau total suprafața. O parte dintre aceștia au analizat și o una dintre părțile laterale ale acvariuului. După cele 11 zile de expunere la PTZ, la cele 6 loturi, s-a observat o asemănare ca în ziua de test precedentă, dar cu o intensificare a stării de anxietate prin examinarea acvariuului doar pe o parte a părții inferioare. În cele 15 zile de tratament cu medicamente anticonvulsive s-a observat că la patru din cele cinci loturile pozitive (Lot 7 Control, Lot 8 Vitamina D, Lot 9 Acid Valproic, Lot 10 Carbamazepină) peștii zebură au fost mai activi în partea superioară, dar și laterală a acvariuului, în schimb, la lotul pozitiv, Lot 1 Pentilentetrazol, s-a observat că peștii au menținut o constantă de a explora acvariuul nou. La loturile în care s-a administrat proconvulsivul pentilentetrazol timp de 26 de zile, dar și tratamente anticonvulsive timp de 15 zile s-a observat o constantă examinare a părții inferioare și laterale a tancului (Figura 5.15).





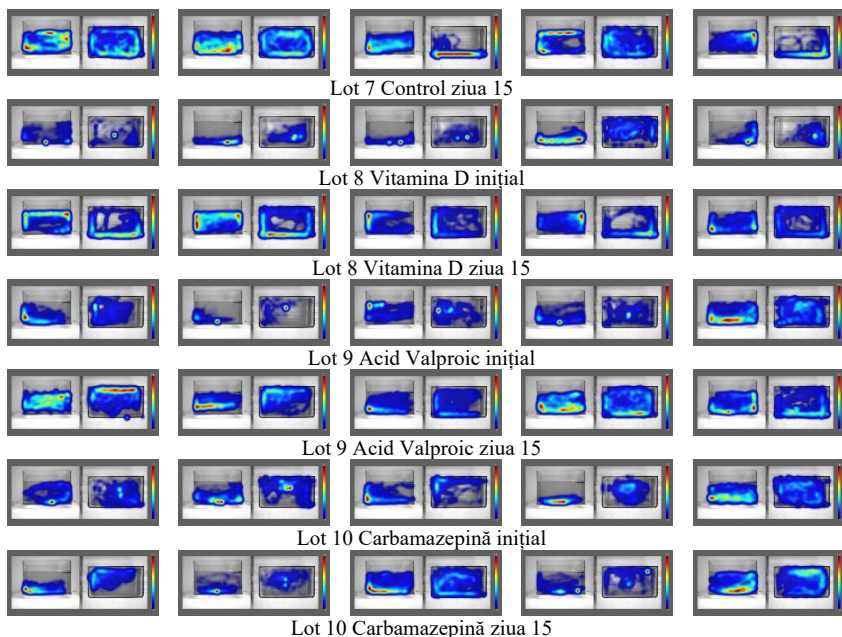


Figura 5.15. Modelul hărților termografice la peștii zebură (ne)tratați (n=10) pe parcursul a celor 26 zile de expunere/ 15 zile tratament

În timpul testelor de sociabilitate, în brațul stâng al acvariului în formă de T au fost adăugați doi pești zebură din afara lotului, pentru a se putea observa cât de sociabili pot fi aceștia de la începutul interacțiunii. Astfel s-a urmărit timpul (în secunde) în care au stat în fiecare braț, fiecare lot, respectiv distanța totală parcursă (centimetri), frecvența de rotație în sensul acelor de ceasornic și viteza medie (cm/s) pe cele cinci grupuri în funcție de tratamentul aplicat.

În timpul celor 26 de zile în care s-a administrat pentilentetrazol, s-au observat la testele de sociabilitate o scădere a timpului petrecut în brațul stâng, dar o creștere în brațul central la loturile unde a existat tratament din ziua 11 până în ziua 26, cu excepția lotului 6, unde a fost administrat Pentilentetrazol + Carbamazepină + Vitamina D în care există o creștere mică a timpului petrecut în brațul stâng. În loturile pozitive s-au observat aceleași scăderi a fluctuației în brațul stâng pentru lotul control, dar și pentru lotul unde s-a administrat vitamina D, respectiv o creștere ușoară în brațul stâng pentru lotul în care s-a administrat acid valproic și în lotul cu administrare carbamazepină (Figura 5.16).

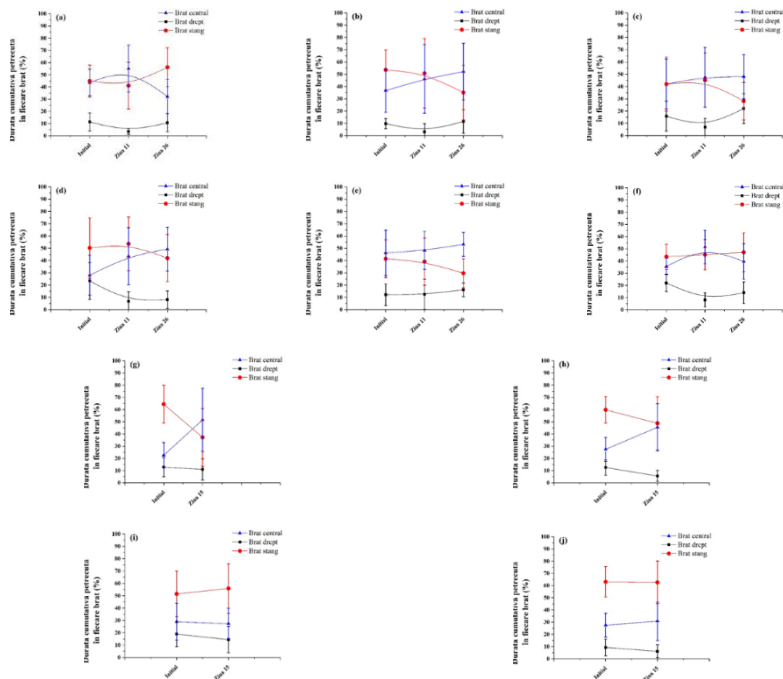


Figura 5.16. Fluctuații comportamentale de tip social în funcție de timp la peștii zebură ne(tratați) ($n = 10$) pe parcursul a 26 de zile

- | | |
|---|--|
| (a) Lot 1 Pentilentetrazol | (b) Lot 2 Pentilentetrazol + Vitamina D |
| (c) Lot 3 Pentilentetrazol + Acid Valproic | (d) Lot 4 Pentilentetrazol + Carbamazepină |
| (e) Lot 5 Pentilentetrazol + Acid Valproic + Vitamina D | |
| (f) Lot 6 Pentilentetrazol + Carbamazepină + Vitamina D | |
| (g) Lot 7 Control | (h) Lot 8 Vitamina D |
| (i) Lot 9 Acid Valproic | (j) Lot 10 Carbamazepină |

Rezultatele testului de sociabilitate parcurs de peștii celor 10 loturi au fost calculate în parametrii precum distanța totală parcursă (cm), viteza medie (cm/s) și frecvența de rotație. La primul parametru calculat se poate observa că nu există diferențe semnificative statistic a mediei în grupurile cu administrare de PTZ, control pozitive, însă la loturile unde s-a administrat vitamina D există două creșteri a mediei distanței sunt semnificative LOT 4 Z_{26} și LOT 6 Z_2 ($p=0.0339$), LOT 6 Z_{26} și LOT 10 Z_{15} ($p=0.0016$) (Figura 5.17).

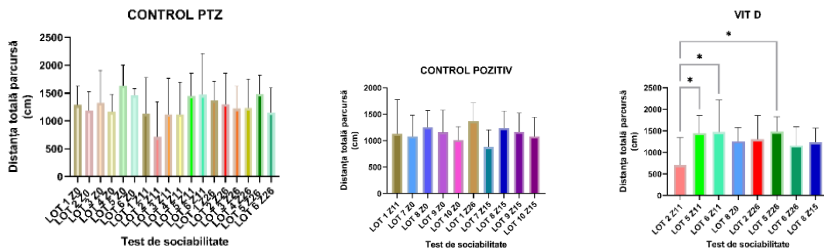


Figura 5.17. Distanța totală parcursă (cm) la peștii zebra ne(tratați) ($n=10$) pe parcursul a 26 de zile *- $p<0,05$; ** - $p<0,01$; ***- $p<0,10$

În cazul parametrului vitezei medii nu se pot remarca diferențe semnificative a mediei la loturile în care s-a administrat PTZ, respectiv loturile unde au existat control, astfel se poate observa o constantă a nivelurile medie. Însă la loturile în care tratamentul a fost cu VIT D s-a observat două creșteri semnificative a mediei LOT 2 Z_{11} și LOT 5 Z_{11} ($p=0,0242$), LOT 2 Z_{11} și LOT 6 Z_{11} ($p=0,0192$). (Figura 5.18).

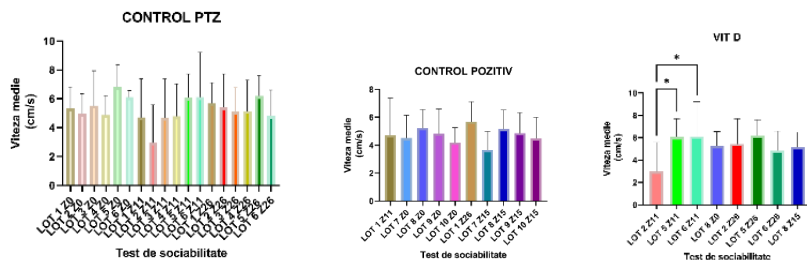


Figura 5.18. Viteza medie parcursă (cm/s) la peștii zebra ne(tratați) ($n=10$) pe parcursul a 26 de zile *- $p<0,05$; ** - $p<0,01$; ***- $p<0,10$

Frecvența punctului central de rotație în sensul acelor de ceasornic poate indica un comportament epileptic, înainte, în timpul sau în urma unei convulsii epileptice. Această tendință de rotație a existat la toți peștii din fiecare lot, însă nu a existat o diferență semnificativă între loturi în cele trei situații (Figura 5.19).

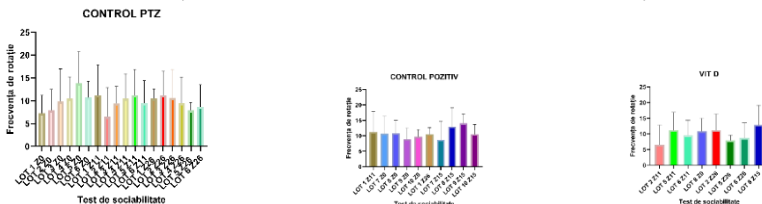


Figura 5.19. Frecvența de rotație la peștii zebra ne(tratați) ($n=10$) pe parcursul a 26 de zile *- $p<0,05$; ** - $p<0,01$; ***- $p<0,10$

Ultimul test realizat a fost cel de agresivitate în care s-a urmărit de câte ori aceștia au înotat spre brațul stâng, unde pe peretele exterior la acvariului în

formă de T a fost așezată o oglindă. Parametrii care s-au urmărit în acest test au fost cei de distanța parcursă și timpul pe care l-au petrecut aceștia în fiecare dintre brațe, respectiv diferența în cinci grupuri dintre distanța totală parcursă, viteza, inactivitatea și frecvența rotațiilor în sensul acelor de ceasornic acestora pe tot parcursul testului.

Timpul pe care le-au petrecut peștii zebra în cele trei brațe în timpul testelor de agresivitate diferă în funcție de ziua de administrare. În toate loturile s-a observat o creștere a timpului petrecut în brațul central, însă la cinci loturi (Lot 1 PTZ, Lot 2 PTZ+Vit D, Lot 4 PTZ+CBZ, Lot 7 Control, Lot 8 Vit D) se observă o creștere de peste 50% de timp petrecut în acest braț. În ultima zi de tratament doar la Lot 3 PTZ+VPA și Lot 9 VPA s-a observat o ușoară creștere a timpului petrecut în brațul stâng, unde a existat oglinda, ceea ce sugerează o ușoară creștere a comportamentului de tip agresiv (Figura 5.20).

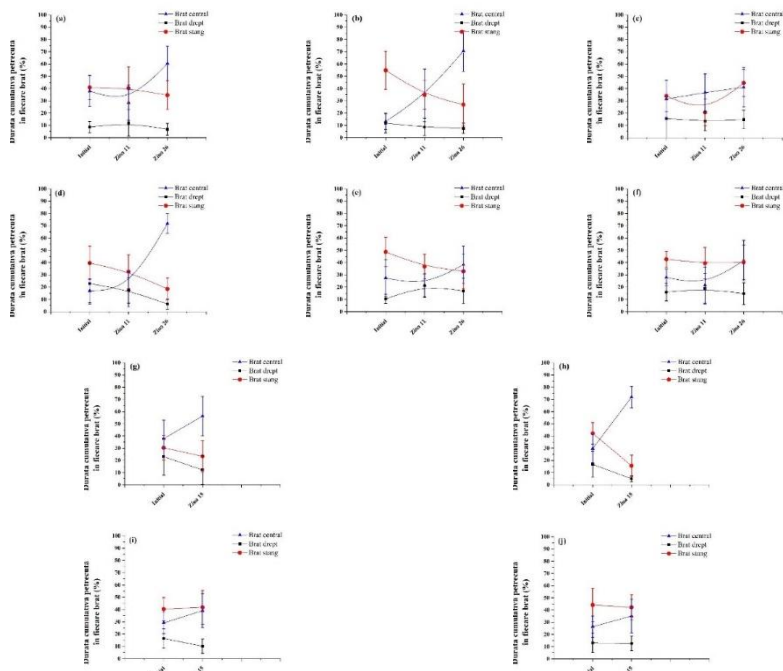


Figura 5.20. Fluctuații comportamentale de tip agresiv măsurate în timp la peștii zebra ne(tratați) (n = 10) pe parcursul a 26 de zile

- | | |
|---|--|
| (a) Lot 1 Pentilentetrazol | (b) Lot 2 Pentilentetrazol + Vitamina D |
| (c) Lot 3 Pentilentetrazol + Acid Valproic | (d) Lot 4 Pentilentetrazol + Carbamazepină |
| (e) Lot 5 Pentilentetrazol + Acid Valproic + Vitamina D | |
| (f) Lot 6 Pentilentetrazol + Carbamazepină + Vitamina D | |
| (g) Lot 7 Control | (h) Lot 8 Vitamina D |
| (i) Lot 9 Acid Valproic | (j) Lot 10 Carbamazepină |

5.3.2 Efectul medicamentelor asupra comportamentului agresiv

Agresivitatea este definită prin capacitatea peștilor zebra de a se apropia, de a-și ridica înotătoarele, de a face mișcări ondulate ale corpului, pot deschide gura spre „inamic”, schimbarea culorii, mușcătură, urmărire și învârtirea în cerc. Aceste comportamente pot să apară datorită faptului că trebuie să apare un teritoriu (comportament teritorial), masculii pot deveni agresivi pentru a-și proteja femelele sau alte resurse care trebuie ocrotite, dar și pentru a-și stabili dominanța, teritoriu, toate acestea s-au observat la peștii examinați.

La testul de agresivitate s-a observat la parametru distanței totale parcurse o diferență statistică la grupul în care sunt regăsite loturile pozitive astfel LOT 2 Z₀ și LOT 1 Z₁₁ ($p=0.0440$), LOT 4 Z₀ și LOT 1 Z₁₁ ($p=0.0032$), LOT 4 Z₀ și LOT 3 Z₁₁ ($p=0.0346$) unde s-a observat o creștere a mediei. Însă între celelalte grupuri cu administrare PTZ, VIT D, VPA sau CBZ nu au existat semnificații statistice (Figura 5.21).

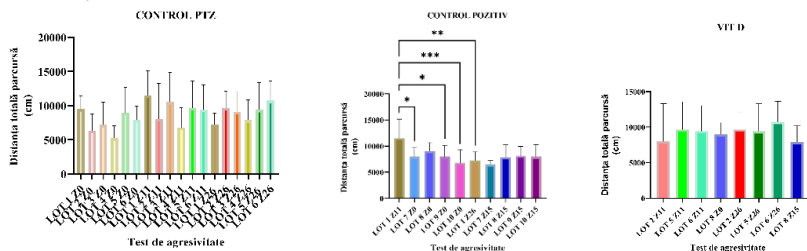


Figura 5.21. Distanța totală parcursă (cm) la peștii zebra ne(tratați) (n=10) pe parcursul a 26 de zile * - $p<0,05$; ** - $p<0,01$; *** - $p<0,10$

La viteza medie au fost descoperite câte o semnificație statistică la grupul cu administrarea PTZ LOT 1 Z₁₁ și LOT 1 Z₂₆ ($p=0.0023$) și la grupul cu loturile pozitive LOT 1 Z₁₁ și LOT 10 Z₀ ($p=0.0005$), amândouă fiind în scădere a medie (Figura 5.22).

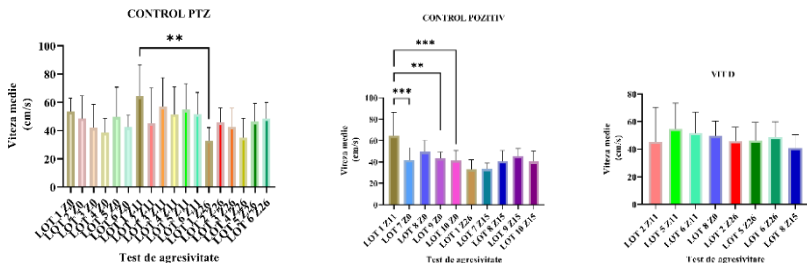


Figura 5.22. Viteza medie parcursă (cm/s) la peștii zebra ne(tratați) (n=10) pe parcursul a 26 de zile * - $p<0,05$; ** - $p<0,01$; *** - $p<0,10$

Au existat momente de inactivitate, ele fiind de scurtă durată (între 0,1-26,70s), însă acestea nu au existat pe parcursul tuturor testelor de agresivitate, astfel nu a existat nicio diferență semnificativ statistică la niciun grup de loturi

(Figura 5.23).

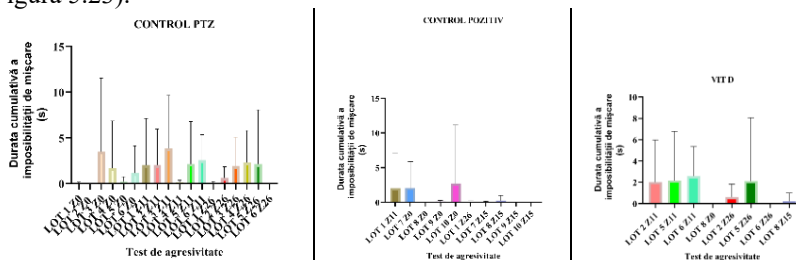


Figura 5.23. Episoade de inactivitate la peștii zebură ne(tratați) (n=10) pe parcursul a 26 de zile

Tendința de rotație în sensul acelor de ceasornic a existat în grupul cu administrare Pentilentetrazol, fiind în scădere a mediei LOT 1 Z₀ și LOT 1 Z₂₆ ($p=0.0060$), LOT 1 Z₁₁ și LOT 1 Z₂₆ ($p=0.0369$), la grupul cu loturile pozitive a existat o scădere a mediei semnificativă statistic LOT 1 Z₁₁ și LOT 1 Z₂₆ ($p=0.0024$), respectiv două creșteri a mediei ce au condus la semnificații statistice LOT 1 Z₂₆ și LOT 10 Z₁₅ ($p=0.0037$), LOT 7 Z₁₅ și LOT 9 Z₁₅ ($p=0.0379$). Astfel că în cazul grupurilor în care s-au administrat VIT D, VPA sau CBZ nu au existat diferențieri statistici (Figura 5.24).

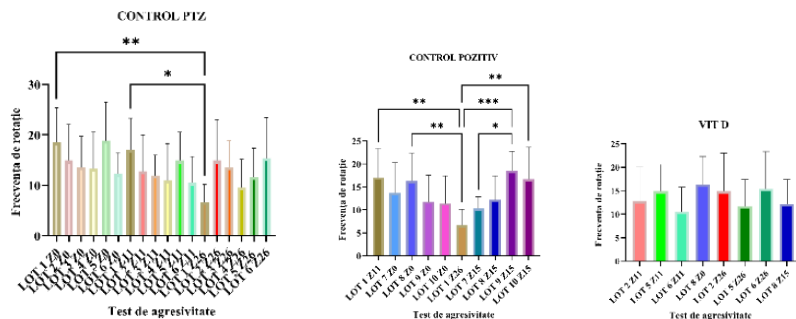


Figura 5.24. Frecvența de rotație la peștii zebură ne(tratați) (n=10) pe parcursul a 26 de zile

* - $p<0,05$; ** - $p<0,01$; *** - $p<0,01$

5.3.3 Efectul medicamentelor asupra stresului oxidativ

Aceste rezultate ne dovedesc că pentilentetrazolul a fost un factor a stresului oxidativ. În urma testului de în urma realizării celor trei teste s-a putut observa activitatea enzimatică se poate observa că există stres oxidativ prin creșterea nivelului de SOD la anumite loturi s-a constatat că nivelul stresului oxidativ este mai mic față de lotul 1 în care s-a administrat doar proconvulsivant (lot 2 PTZ+VIT D $p=0,0001$, lot 3 PTZ+VPA $p=0,0008$, lot 5 PTZ+VIT D+VPA $p=0,0036$, lot 8 VIT D $p=0,0145$, lot 9 VPA $p=0,0079$), respectiv lotul 2 PTZ+VIT D a indicat o creștere semnificativă față de lot 4 PTZ+CBZ $p=0,0037$ și lot 7 CONTROL $p=0,0145$, același lucru se poate observa între lot 3 PTZ+VPA și lot 4 PTZ+CBZ $p=0,0240$. Activitatea GPx este ridicată doar la Lotul 4

PTZ+CBZ unde existența stresului oxidativ este mai mică și există diferențieri semnificative statistic cu lotul 1 PTZ ($p=0,0068$), lot 2 PTZ+VIT D ($p=0,0355$) și lot 9 VPA ($p=0,0371$) acest lucru ne poate duce cu gândul că SOD suplinește activitatea GPx la celelalte loturi.

Nivelurile crescute de MDA în 8 loturi ne indică faptul că există o activitate a stresului oxidativ, lotul 1 PTZ ne arată o cantitate mică de MDA cu semnificații statistice față de lot 4 PTZ+CBZ ($p=0,0091$), lot 5 PTZ+VIT D+VPA ($p=0,0012$), lot 6 PTZ+VIT D+CBZ ($p=0,0027$), respectiv lot 8 VIT D ($p=0,0379$), dar și la lot 3 cu o cantitate mică de MDA față de lot 5 PTZ+VIT D+VPA ($p=0,0189$), respectiv lot 6 PTZ+VIT D+CBZ ($p=0,0408$) (Figura 5.25).

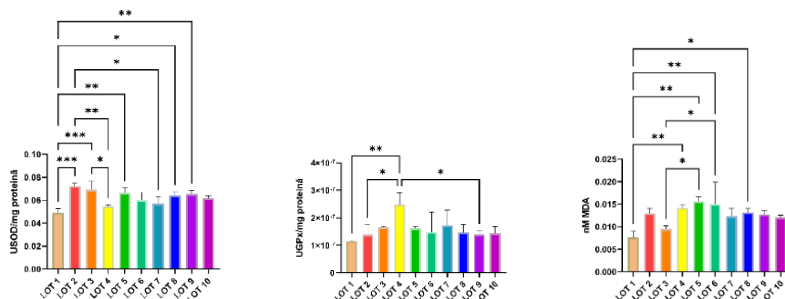


Figura 5.25. Rezultatele parametrilor stresului oxidativ după expunerea la tratament prezentate sub forma mediei ± SEM * - $p<0,05$; ** - $p<0,01$; *** - $p<0,10$

5.3.4. Discuții

Testele de locomoție, social, agresivitate au fost realizate înainte, în timpul, dar și după administrarea proconvulsivantului pentilentetrazol, respectiv înainte și după tratament cu anticonvulsivantele: Vitamina D, acidul valproic, carbamazepină. Așadar, s-a putut observa că există un grad de vizibilitate prin care se poate corela vitamina D cu alte medicamente anticonvulsivante, astfel încât să se reducă numărul convulsiilor epileptice, dar și comorbidități psihiatrice asociate.

Concentrațiile medicamentelor utilizate în experiment au avut rolul de protecție antiepileptică, prin intermediul lor am încercat să observăm diferențele care pot exista comparativ

cu loturile în care s-a administrat proconvulsivant, dar și în loturile control pozitiv în care s-a administrat doar substanța cheie. Vitamina D a avut rolul de a observa dacă această vitamină poate avea efecte pozitive la peștii care li s-a administrat PTZ și dacă ar putea susține în tratament două dintre medicamentele care inhibă vit D în organism.

Canzian și colaboratorii săi au arătat că PTZ-ul a provocat convulsii acute la peștii adulți, dar și că au fost supuși în același timp la un factor de stres, aceștia au prezentat un comportament agresiv, anxios, dar și le-a fost afectată memoria, fiind un perturbator de coeziune a bancului de pești după perioada de

recuperare (Canzian et al., 2021). Acest lucru l-am observat și noi prin testul de locomoție unde peștii au avut preferințe de a sta în același loc sau să înoate doar într-o parte a acvariumului unde se simțeau mai în siguranță, fără a vizualiza tot acvariumul, dar și în celelalte două teste, unde s-a observat perioade de îngheț.

Nu se cunoaște cu exactitate dacă concentrația de PTZ administrată este direct proporțională cu reacția pe care o produce, declanșând astfel stimulii creierului posterior (Pineda et al., 2013). Ceea ce va genera ca medicația farmacologică să atrofieze legăturile stimulente efectuate de proconvulsivant. Astfel Acidul Valproic poate să genereze o inhibare a transaminazei GABA ajungându-se astfel la o atenuare parțială a convulsiilor (Pineda et al., 2013; Pieróg et al., 2021).

Un marker prin care se reflectă stresul oxidativ este MDA. Peroxidarea lipidelor prin reacția autocatalitică este periculoasă datorită faptului că inițiază deteriorarea celulară. În studii realizate pe oameni, s-a arătat că nivelul MDA a crescut la pacienții care prezentau afecțiunea epilepsie față de pacienții din grupul control (Ir și Demir, 2024). Astfel în acest studiu a rezultat stresul oxidativ la lotul în care s-a administrat doar proconvulsivant (5 mM PTZ) a avut o cantitate mai mică MDA față de celelalte loturi în care s-a administrat doar vitamina D sau s-a administrat PTZ împreună cu Vit D și anticonvulsivante acid valproic sau carbamazepină.

În studiile realizate pe epilepsie asupra cu antioxidanților s-a observat că pacienții care au această afecțiune au un nivel mai scăzut de SOD, în epilepsia refractară acest lucru posibil să fie din cauza faptului că se acumulează în cantitate mare compuși lipidici în creier (Yilgor și Demir, 2024). În acest studiu, s-a observat că lotul în care s-a administrat doar PTZ, respectiv PTZ + CBZ, acest antioxidant a scăzut față de celelalte loturi în care s-a administrat PTZ sau nu, dar a existat o cantitate mare de SOD în loturile în care s-a administrat PTZ și Vit D, respectiv PTZ și VPA.

Concluzii generale

Epilepsia este o boală neurologică care afectează aproximativ 50 de milioane de oameni din populația globală, dar poate să existe în mod natural și la animale. De cele mai multe ori ea este asociată cu diferite comorbidități psihiatrice. Există trei tipuri de epilepsie, acestea sunt diferite în funcție de zona în care creierul are predispoziția de a genera activitatea electrică numită convulsie.

În funcție de natura convulsiilor și de declanșarea acestora, se prescriu de medicul neurolog diferite medicamente antiepileptice. Aceste medicamente pot să aibă un rol negativ asupra metabolismului inducând catabolismul anumitor substanțe nutritive precum vitamina D.

Există convulsii epileptice care sunt produse prin intermediul reducerii acidului gamma aminobutiric (GABA). Astfel că vitamina D joacă un rol

fiziologic prin funcțiile ei biochimice de a se sintetiza, și de a ajuta la formarea receptorilor vitaminei D (VDR) care ajută la generarea de receptori GABA.

În primul experiment în care am descris meta analiza, s-a putut observa corelația care există între regiunea creierului și epilepsia mioclonică juvenilă la pacienții care sunt diagnosticați cu aceasta în comparație cu pacienți martori care nu prezintă epilepsia mioclonică juvenilă.

Există studii care dovedesc rolul vitaminei D în epilepsie și pe modele animale precum șoarecii și șobolanii. Nu există studii pe modelele de pești zebură, însă acest lucru poate fi relevant pentru că am arătat în capitolul de la materiale de cercetare, importanța studiilor pe pești zebură pentru cercetarea biomedicală și controlul metabolic, fiind mai accesibilă observarea comunicării creier-organe

În al doilea experiment s-a putut observa diferențele care pot exista la nivelul testelor de comportament, dar și a testelor asupra enzimelor stresului oxidativ între loturile în care s-a administrat trei concentrații diferite de acid valproic pur, împreună cu proconvulsivant, un lot martor și un lot control al pentilentetrazolului. Astfel testarea locomotorie și a sociabilității ne-a arătat diferențe semnificative statistic doar la loturile în care s-a administrat o concentrație mare de acid valproic (7500 μM și 10000 μM), iar la testarea agresivității s-a observat că există diferențieri statistici la lotul control și lotul martor proconvulsivant.

Parametrii aleși pentru cele trei teste de comportament au evidențiat faptul că există diferențe semnificative din punct de vedere statistic la loturile pozitive (în care s-a administrat doar câte o substanță) și la loturile în care s-a administrat proconvulsivantul timp de 26 de zile. Nu putem să concluzionăm dacă există o diferență din punct de vedere locomotor, social și agresiv asupra populației care suferă de epilepsie cu medicație acid valproic sau carbamazepină care iau suplimente de vitamina D.

Rezultatele anterior prezentate indică faptul că suplimentarea vitaminei D la pacienții care suferă de comorbidități psihiatrice asociate epilepsiei ar juca un rol important față de populația care nu prezintă convulsii. Cercetările ulterioare sunt esențiale în special din punct de vedere biochimic pentru a înțelege legăturile care există între medicamentele antiepileptice și metabolism, pentru a diversifica o dietă cât mai corespunzătoare, dar și din punct de vedere molecular pentru a opri producerea de noi convulsii epileptice.

Aceste rezultate preliminare pot ajuta la potențiale strategii terapeutice între vitamina D și medicamentele farmacologice care sunt deja utilizate în diferite terapii epileptice, datorită răspunsurilor asupra peștilor zebură care sunt un model animal important.

Limitările studiilor au fost ca și în alte cercetări științifice:

- la modele animale: numărul de loturi concomitente, testarea

biochimică și fiziologică pe diferite secțiuni ale corpului peștelui zebra, fiind ființe vii fiecare reacționează în mod diferit, astfel a trebuit să fie calculată și precisă excluderea valorilor aberante din fiecare lot;

- constrângeri bugetare pentru achiziția de pești zebra cu polimorfisme genetice sau mutații care prezintă epilepsia nativă, reactivi, materiale și software;

- nu au existat date colectate de la subiecți umani pentru a întări scopul cercetării prin care vitamina D joacă un rol important asupra epilepsiei asociată cu diferite comorbidități psihiatrice.

Bibliografie selectivă

1. Adelöw C, Andersson T, Ahlbom A, Tomson T. Hospitalization for psychiatric disorders before and after onset of unprovoked seizures/epilepsy. *Neurology* 2012; 78(6): 396-401.
2. Albajes-Eizaguirre, A., Solanes, A., Fullana, M.A., Ioannidis, J.P., Fusar-Poli, P., Torrent, C., Sole, B., Bonnín, C.M., Vieta, E., Mataix-Cols, D. and Radua, J., 2019. Meta-analysis of voxel- based neuroimaging studies using seed-based d mapping with permutation of subject images (SDM-PSI). *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (153), p.e59841.
3. Al-Mufti, F. and Claassen, J., 2014. Neurocritical care: status epilepticus review. *Critical care clinics*, 30(4), pp.751-764.
4. Angeles, D.K., 1981. Proposal for revised clinical and electroencephalographic classification of epileptic seizures. *Epilepsia*, 22(4), pp.489-501.
5. Anjum, I., Jaffery, S.S., Fayyaz, M., et al., 2018. The role of vitamin D in brain health: a mini literature review. *Cureus*, 10(7).
6. Beghi, E. and Giussani, G., 2018. Aging and the epidemiology of epilepsy. *Neuroepidemiology*, 51(3-4), pp.216-223.
7. Beghi, E., 2020. The epidemiology of epilepsy. *Neuroepidemiology*, 54(2), pp.185-191;
8. Berg, E.M., Björnfors, E.R., Pallucchi, I., Picton, L.D. and El Manira, A., 2018. Principles governing locomotion in vertebrates: lessons from zebrafish. *Frontiers in neural circuits*, 12, p.73.
9. Caggiano, V., Leiras, R., Goñi-Erro, H., Masini, D., Bellardita, C., Bouvier, J., Caldeira, V., Fisone, G. and Kiehn, O., 2018. Midbrain circuits that set locomotor speed and gait selection. *Nature*, 553(7689), pp.455-460.
10. Caveness, W., AM LORENTZ, H.J.M. and Radermecker, J., 1964. A proposed international classification of epileptic seizures. *Epilepsia*, 5, pp.297-306.
11. Chang YT, Chen PC, Tsai IJ, Sung FC, Chin ZN, Kuo HT, et al. Bidirectional relation between schizophrenia and epilepsy: A population-based retrospective cohort study. *Epilepsia* 2011; 52(11): 2036-2042.

12. Chen, Z., Brodie, M.J., Ding, D. and Kwan, P., 2023. Epidemiology of epilepsy and seizures.
13. Chitolina, R., Gallas-Lopes, M., Reis, C.G., Benvenuti, R., Stahlhofer-Buss, T., Calcagnotto, M.E., Herrmann, A.P. and Piatto, A., 2023. Chemically-induced epileptic seizures in zebrafish: A systematic review. *Epilepsy Research*, p.107236.
14. Choi, T.Y., Choi, T.I., Lee, Y.R., Choe, S.K. and Kim, C.H., 2021. Zebrafish as an animal model for biomedical research. *Experimental & Molecular Medicine*, 53(3), pp.310-317.
15. Choi, T.Y., Choi, T.I., Lee, Y.R., Choe, S.K. and Kim, C.H., 2021. Zebrafish as an animal model for biomedical research. *Experimental & Molecular Medicine*, 53(3), pp.310-317.
16. Christakos, S., Dhawan, P., Verstuyf, A., et al., 2016. Vitamin D: metabolism, molecular mechanism of action, and pleiotropic effects. *Physiological reviews*, 96(1), pp.365-408.
17. Duță, R., Visternicu, M., Miler, A. and Ciobică, A., 2024. The impact of vitamin D on psychiatric and physiological mechanisms in the context of epilepsy. *Bulletin of Integrative Psychiatry*, (4).
18. Eadie, M.J., 1999. The origin of the concept of partial epilepsy. *Journal of clinical neuroscience*, 6(2), pp.103-105.
19. Elger, C.E., Johnston, S.A. and Hoppe, C., 2017. Diagnosing and treating depression in epilepsy. *Seizure*, 44, pp.184-193.
20. Engel, J., 2001. A proposed diagnostic scheme for people with epileptic seizures and with epilepsy: report of the ILAE Task Force on Classification and Terminology. *Epilepsia* (Series 4), 42(6).
21. Falco-Walter, J.J., Scheffer, I.E. and Fisher, R.S., 2018. The new definition and classification of seizures and epilepsy. *Epilepsy research*, 139, pp.73-79.
22. Fiest, K.M., Sauro, K.M., Wiebe, S., Patten, S.B., Kwon, C.S., Dykeman, J., Pringsheim, T., Lorenzetti, D.L. and Jetté, N., 2017. Prevalence and incidence of epilepsy: a systematic review and meta-analysis of international studies. *Neurology*, 88(3), pp.296-303.
23. Finucane AK. From the epilepsy foundation: Restoring the pediatric rule. *Behavior* 2003; 4(5): 453-4.
24. Fisher RS, Acevedo C, Arzimanoglou A, Bogacz A, Cross JH, Elger CE, et al. ILAE Official Report: A practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia* 2014; 55(4): 475-482.
25. Fisher RS, Acevedo C, Arzimanoglou A, Bogacz A, Cross JH, Elger CE, et al. ILAE Official Report: A practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia* 2014; 55(4): 475-482.
26. Fisher, R.S., Cross, J.H., D'souza, C., French, J.A., Haut, S.R., Higurashi, N., Hirsch, E., Jansen, F.E., Lagae, L., Moshé, S.L. and Peltola, J., 2017. Instruction manual for the ILAE 2017 operational classification of seizure types. *Epilepsia*, 58(4), pp.531-542.

27. Fisher, R.S., Cross, J.H., D'souza, C., French, J.A., Haut, S.R., Higurashi, N., Hirsch, E., Jansen, F.E., Lagae, L., Moshé, S.L. and Peltola, J., 2017. Instruction manual for the ILAE 2017 operational classification of seizure types. *Epilepsia*, 58(4), pp.531-542.
28. Fisher, R.S., Cross, J.H., French, J.A., Higurashi, N., Hirsch, E., Jansen, F.E., Lagae, L., Moshé, S.L., Peltola, J., Roulet Perez, E. and Scheffer, I.E., 2017. Operational classification of seizure types by the International League Against Epilepsy: Position Paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia*, 58(4), pp.522-530.
29. Fisher, R.S., Cross, J.H., French, J.A., Higurashi, N., Hirsch, E., Jansen, F.E., Lagae, L., Moshé, S.L., Peltola, J., Roulet Perez, E. and Scheffer, I.E., 2017. Operational classification of seizure types by the International League Against Epilepsy: Position Paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia*, 58(4), pp.522-530. *Frontiers in Epidemiology*, 3, p.1273163.
30. Howe, K., Clark, M.D., Torroja, C.F., Torrance, J., Berthelot, C., Muffato, M., Collins, J.E., Humphray, S., McLaren, K., Matthews, L. and McLaren, S., 2013. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*, 496(7446), pp.498-503.
31. Iftomovici R., 1995. Istoria medicinei, Ed. ALL București
32. Iqbal, N., Caswell, H., Muir, R., Cadden, A., Ferguson, S., Mackenzie, H., Watson, P. and Duncan, S., 2015. Neuropsychological profiles of patients with juvenile myoclonic epilepsy and their siblings: an extended study. *Epilepsia*, 56(8), pp.1301-1308.
33. Kaculini, C.M., Tate-Looney, A.J. and Seifi, A., 2021. The history of epilepsy: from ancient mystery to modern misconception. *Cureus*, 13(3).
34. Kanner AM. Psychiatric comorbidities in new onset epilepsy: Should they be always investigated? *Seizure* 2017; 49: 79-82.
35. Kazis, D., Petridis, F., Chatzikonstantinou, S., Karantali, E., Jamali, R., Chowdhury, R., Duta, R., Luca, A.C., Ciobica, A. and Mavroudis, I., 2021. Gray matter changes in juvenile myoclonic epilepsy. A voxel-wise meta-analysis. *Medicina*, 57(11), p.1136.
36. Kim, J.H., Kim, J.B. and Suh, S.I., 2019. Alteration of cerebello-thalamocortical spontaneous low-frequency oscillations in juvenile myoclonic epilepsy. *Acta Neurologica Scandinavica*, 140(4), pp.252-258.
37. Löscher, W., 2022. Dogs as a natural animal model of epilepsy. *Frontiers in veterinary science*, 9, p.928009.
38. Menninga, N., Koukounas, Y., Margolis, A., Breslow, R. and Gidal, B., 2020. Effects of enzyme-inducing antiseizure medication on vitamin D dosing in adult veterans with epilepsy. *Epilepsy Research*, 161, p.106287.
39. Meyer, M.B. and Pike, J.W., 2020. Mechanistic homeostasis of vitamin D metabolism in the

- kidney through reciprocal modulation of Cyp27b1 and Cyp24a1 expression. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 196, p.105500.
40. Mínguez, J.J., El Bouyafrouri, Y., Godoy, J.A., Rivas, A., Fernández, J., Asensio, V., Serra, R., Perez-Aspa, M.J. and Lorenzo, V., 2021. Benign juvenile idiopathic epilepsy in captive Iberian lynx (*Lynx pardinus*) in the ex situ conservation program (2005–2019). *BMC Veterinary Research*, 17, pp.1-9.
 41. O'Neill, D.G., Phillipps, S.A., Egan, J.R., Brodbelt, D., Church, D.B. and Volk, H.A., 2020. Epidemiology of recurrent seizure disorders and epilepsy in cats under primary veterinary care in the United Kingdom. *Journal of veterinary internal medicine*, 34(6), pp.2582-2594.
 42. Pack, A.M., 2019. Epilepsy overview and revised classification of seizures and epilepsies.
 43. Pan, P.L., Song, W. and Shang, H.F., 2012. Voxel-wise meta-analysis of gray matter abnormalities in idiopathic Parkinson's disease. *European journal of neurology*, 19(2), pp.199- 206.
 44. Pieróg, M., Socała, K., Doboszewska, U., Wyska, E., Guz, L., Szopa, A., Serefko, A., Poleszak, E. and Wlaź, P., 2021. Effects of classic antiseizure drugs on seizure activity and anxiety-like behavior in adult zebrafish. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 415, p.115429.
 45. Pineda, R., Beattie, C.E. and Hall, C.W., 2013. Closed-loop neural stimulation for pentylenetetrazole-induced seizures in zebrafish. *Disease Models & Mechanisms*, 6(1), pp.64-71.
 - Pitkänen, A., Lukasiuk, K., Dudek, F.E. and Staley, K.J., 2015. Epileptogenesis. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 5(10), p.a022822.
 46. Sahin, S., Gürgen, S.G., Yazar, U., et al., 2019. Vitamin D protects against hippocampal apoptosis related with seizures induced by kainic acid and pentylenetetrazol in rats. *Epilepsy research*, 149, pp.107-116.
 47. Salpietro, V., Dixon, C.L., Guo, H., Bello, O.D., Vandrovцова, J., Efthymiou, S., Maroofian, R., Heimer, G., Burglen, L., Valence, S. and Torti, E., 2019. AMPA receptor GluA2 subunit defects are a cause of neurodevelopmental disorders. *Nature communications*, 10(1), p.3094.
 48. Sassen, W.A. and Köster, R.W., 2015. A molecular toolbox for genetic manipulation of zebrafish. *Advances in Genomics and Genetics*, pp.151-163.
 49. Savic, I., Österman, Y. and Helms, G., 2004. MRS shows syndrome differentiated metabolite changes in human-generalized epilepsies. *Neuroimage*, 21(1), pp.163-172.
 50. Seidman, L.J., Biederman, J., Liang, L., Valera, E.M., Monuteaux, M.C., Brown, A., Kaiser, J., Spencer, T., Faraone, S.V. and Makris, N., 2011. Gray matter alterations in adults with attention-deficit/hyperactivity disorder identified by voxel based morphometry. *Biological psychiatry*, 69(9), pp.857-866.

51. Siniscalchi, A., Murphy, S., Cione, E., Piro, L., De Sarro, G. and Gallelli, L., 2020. Antiepileptic drugs and bone health: current concepts. *Psychopharmacology bulletin*, 50(2), p.36. Sizar, O., Khare, S., Goyal, A., Bansal, P. and Givler, A., 2021. Vitamin D deficiency.
52. Specchio, N., Wirrell, E.C., Scheffer, I.E., Nabbout, R., Riney, K., Samia, P., Guerreiro, M., Gwer, S., Zuberi, S.M., Wilmshurst, J.M. and Yozawitz, E., 2022. International League Against Epilepsy classification and definition of epilepsy syndromes with onset in childhood: Position paper by the ILAE Task Force on Nosology and Definitions. *Epilepsia*, 63(6), pp.1398- 1442.
53. StatPearls [Internet].
54. Thijs, R.D., Surges, R., O'Brien, T.J. and Sander, J.W., 2019. Epilepsy in adults. *The Lancet*, 393(10172), pp.689-701.
55. Vaz, R.L., Outeiro, T.F. and Ferreira, J.J., 2018. Zebrafish as an animal model for drug discovery in Parkinson's disease and other movement disorders: a systematic review. *Frontiers in neurology*, 9, p.347.
56. Vera, V., Moran, J.M., Barros, P., Canal-Macias, M.L., Guerrero-Bonmatty, R., Costa-Fernandez, C., Lavado-Garcia, J.M., Roncero-Martin, R. and Pedrera-Zamorano, J.D., 2015. Greater calcium intake is associated with better bone health measured by quantitative ultrasound of the phalanges in pediatric patients treated with anticonvulsant drugs. *Nutrients*, 7(12), pp.9908- 9917.
57. Vezzani, A., Lang, B. and Aronica, E., 2016. Immunity and inflammation in epilepsy. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 6(2), p.a022699.
58. Vollmar, C., O'muircheartaigh, J., Symms, M.R., Barker, G.J., Thompson, P., Kumari, V., Stretton, J., Duncan, J.S., Richardson, M.P. and Koepp, M.J., 2012. Altered microstructural connectivity in juvenile myoclonic epilepsy: the missing link. *Neurology*, 78(20), pp.1555- 1559.
59. Voutsadakis, I.A., 2020. Vitamin D receptor (VDR) and metabolizing enzymes CYP27B1 and CYP24A1 in breast cancer. *Molecular Biology Reports*, pp.1-10.
60. Webster, K.M., Sun, M., Crack, P., O'Brien, T.J., Shultz, S.R. and Semple, B.D., 2017. Inflammation in epileptogenesis after traumatic brain injury. *Journal of neuroinflammation*, 14, pp.1-17.
61. Wiglusz, M.S., Landowski, J. and Cubala, W.J., 2018. Prevalence of anxiety disorders in epilepsy. *Epilepsy & Behavior*, 79, pp.1-3.
62. Williams, P.A., White, A.M., Clark, S., Ferraro, D.J., Swiercz, W., Staley, K.J. and Dudek, F.E., 2009. Development of spontaneous recurrent seizures after kainate-induced status

- epilepticus. *Journal of Neuroscience*, 29(7), pp.2103-2112.
63. Wilson, J.K. and Reynolds, E.H., 1990. Translation and analysis of a cuneiform text forming part of a Babylonian treatise on epilepsy. *Medical history*, 34(2), pp.185-198.
64. Wolf, P., 2014. History of epilepsy: nosological concepts and classification. *Epileptic Disorders*, 16(3), pp.261-269.
65. World Health Organization; Epilepsy: a public health imperative. Geneva. 2019. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO; ISBN 978-92-4-151593-1
66. Wrzosek, M., Ives, J.R., Karczewski, M., Dziadkowiak, E. and Gruszka, E., 2017. The relationship between epileptiform discharges and background activity in the visual analysis of electroencephalographic examinations in dogs with seizures of different etiologies. *The Veterinary Journal*, 222, pp.41-51.
67. Yang, X., Lin, J., Peng, X., Zhang, Q., Zhang, Y., Guo, N., Zhou, S. and Li, Q., 2017. Effects of picrotoxin on zebrafish larvae behaviors: A comparison study with PTZ. *Epilepsy & Behavior*, 70, pp.224-231;
68. Zabegalov, K.N., Kolesnikova, T.O., Khatsko, S.L., Volgin, A.D., Yakovlev, O.A., Amstislavskaya, T.G., Friend, A.J., Bao, W., Alekseeva, P.A., Lakstygal, A.M. and Meshalkina, D.A., 2019. Understanding zebrafish aggressive behavior. *Behavioural processes*, 158, pp.200- 210.
69. Zang, L., Torracca, V., Shimada, Y. and Nishimura, N., 2022. Zebrafish Models for Human Disease Studies. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 10, p.861941.
70. Zimmermann, F.F., Gaspary, K.V., Leite, C.E., Cognato, G.D.P. and Bonan, C.D., 2015. Embryological exposure to valproic acid induces social interaction deficits in zebrafish (*Danio rerio*): A developmental behavior analysis. *Neurotoxicology and teratology*, 52, pp.36-41.
71. Zuberi, S.M., Wirrell, E., Yozawitz, E., Wilmshurst, J.M., Specchio, N., Riney, K., Pressler, R., Auvin, S., Samia, P., Hirsch, E. and Galicchio, S., 2022. ILAE classification and definition of epilepsy syndromes with onset in neonates and infants: Position statement by the ILAE Task Force on Nosology and Definitions. *Epilepsia*, 63(6), pp.1349-13.

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

Diseminarea rezultatelor

Lista lucrărilor publicate ce conțin rezultate ale tezei de doctorat

Articole publicate în reviste cotate ISI Web of Science cu factor de impact:

Kazis, D., Petridis, F., Chatzikonstantinou, S., Karantali, E., Jamali, R., Chowdhury, R., **Duta, R.**, Luca, A.C., Ciobica, A. and Mavroudis, I., Gray matter changes in juvenile myoclonic epilepsy. A voxel-wise meta-analysis, *Medicina -Lithuania*, 57(11) 2021 p.1136. DOI:10.3390/medicina57111136 (FI = 2.948, AIS = 0.523)

Ilie, O.D., **Duta, R.**, Balmus, I.M., Savuca, A., Petrovici, A., Nita, I.B., Antoci, L.M., Jijie, R., Mihai, C.T., Ciobica, A. and Nicoara, M., . Assessing the neurotoxicity of a sub-optimal dose of rotenone in zebrafish (*Danio rerio*) and the possible neuroactive potential of valproic acid, combination of levodopa and carbidopa, and lactic acid bacteria strains. *Antioxidants*, 11(10) 2022, p.2040. DOI:10.3390/antiox11102040 (FI = 7, AIS = 0.946), 6 citari

Articole publicate în reviste indexate în Baza de Date Internațională (BDI)

Duță, R., Visternicu, M., Miler, A. and Ciobică, A., 2024. The impact of vitamin d on psychiatric and physiological mechanisms in the context of epilepsy. *Bulletin of Integrative Psychiatry*, (4). DOI:10.36219/BPI.2024.4.01

Kinda, P.T., Guenne, S., Basile Tindano, N.O.U.F.O.U., Ouedraogo, N.O., Zerbo, P., **Duta, R.**, Ciobica A., And Kiendrebeogo, M., 2021. Studying some neuroprotective effects of *Calotropis procera* extracts against scopolamine-induced neuropsychiatric comorbidities in a rodent model of epilepsy. *Romanian Biotechnological Letters.*, 26, p.3114. DOI:10.25083/rbl/26.6/3114-3119

Lista lucrărilor susținute la conferințe internaționale și naționale

Ecology and Protection of Ecosystems” (EPE) XIV Edition, 2023, Bacau, Romania, **R.E. Duță**, A. Săvucă, A.S. Ciobică, R. Lefter, M.N. Nicoară– “Preliminary results regarding the effects of antiepileptic drugs in zebrafish”, 2-4.11.2023 www.epe.ub.ro

Lista de lucrări publicate în afara subiectului tezei de doctorat dar în același domeniu de cercetare

Singeap, A.M., Minea, H., Petrea, O., Robea, M.A., Balmuş, I.M., **Duta, R.**, Ilie, O.D., Cimpoesu, C.D., Stanciu, C. and Trifan, A., Real-world utilization of corticosteroids in severe alcoholic hepatitis: eligibility, response, and outcomes. *Medicina*, 60(2) 2024, p.311. DOI:10.3390/medicina60020311 (FI = 2.4, AIS = 0.558), 2 citari

Ilie, O.D., **Duta, R.**, Nita, I.B., Dobrin, I., Gurzu, I.L., Gîrleanu, I., Huiban, L.,

Muzica, C., Ciobica, A., Popescu, R. and Cianga, P., A Comprehensive Overview of the Past, Current, and Future Randomized Controlled Trials in Hepatic Encephalopathy. *Medicina*, 59(12), 2023. p.2143. DOI:10.3390/medicina59122143 (FI = 2.4, AIS = 0.558),

Ilie, O.D., **Duta, R.**, Jijie, R., Nita, I.B., Nicoara, M., Faggio, C., Dobrin, R., Mavroudis, I., Ciobica, A. and Doroftei, B., Assessing anti-social and aggressive behavior in a zebrafish (*Danio rerio*) model of Parkinson's disease chronically exposed to rotenone. *Brain Sciences*, 12(7) 2022., ps.898. DOI:10.3390/brainsci12070898 (FI = 3.3, AIS = 0.772), 11 citari