

**UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ
DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE
POLITEHNICA BUCUREȘTI**

CENTRUL UNIVERSITAR PITEȘTI

**FACULTATEA DE ȘTIINȚE, EDUCAȚIE FIZICĂ ȘI
INFORMATICĂ**

**ȘCOALA DOCTORALĂ INTERDISCIPLINARĂ
DOMENIUL BIOLOGIE**

**STUDIUL UTILIZĂRII EXTRACTELOR FUNGICE ȘI
VEGETALE ÎN TERAPIA NEUROPATIEI DE TIP
ALZHEIMER**

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Conducător de doctorat:

Prof. Univ. Dr. Habil. Marian PETRE

Student-doctorand:

Mihai-Vlad VĂLU

PITEȘTI

-2024-

CUPRINS

INTRODUCERE.....	5
PARTEA I – STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII ÎN DOMENIUL PATOLOGIEI NEUROPATIILOR DEGENERATIVE.....	7
CAPITOLUL I.....	8
CONSIDERAȚII TEORETICE PRIVIND ETIOLOGIA, PROFILAXIA ȘI TERAPIA NEUROPATIILOR DEGENERATIVE DE TIP ALZHEIMER	8
I.1 Factorii etiologici și favorizanți în neuropatia Alzheimer	8
I.2 Profilaxie și metode de tratament.....	8
I.3 Modelul de pește zebra utilizat în studierea neuropatiei Alzheimer	9
CAPITOLUL II	10
ASPECTE TEORETICE PRIVIND EXTRAȚIA CU ULTRASUNETE A COMPUȘILOR BIOLOGIC ACTIVI	10
II.1 Procedeu extracției cu ultrasunete	10
II.2 Avantajele extracției cu ultrasunete, comparativ cu tehnicile convenționale	10
II.3 Liofilizarea extractelor obținute cu ultrasunete	11
CAPITOLUL III.....	12
COMPUȘII BIOLOGIC ACTIVI DIN SPECIA <i>HERICIUM ERINACEUS</i> CU EFECT REGENERATIV ÎN NEUROPATIA ALZHEIMER	12
III.1 Descrierea speciei <i>Hericum erinaceus</i>	12
III.2 Caracteristicile chimice și farmacologice ale speciei <i>Hericum erinaceus</i>	12
III.3 Efectul regenerativ al speciei <i>Hericum erinaceus</i> asupra neuronilor	13
CAPITOLUL IV	14
COMPUȘII BIOLOGIC ACTIVI DIN SPECIA <i>LYCOPODIUM SELAGO</i> CU EFECT REGENERATIV ÎN NEUROPATIA ALZHEIMER	14
IV.1 Caracterizarea morfo-fiziologică a speciei <i>Lycopodium selago</i>	14
IV.2 Caracterizarea chimică și farmacologică a extractelor din specia <i>Lycopodium selago</i>	14

IV.3 Efectul regenerativ al speciei <i>Lycopodium selago</i> asupra neuronilor	15
PARTEA EXPERIMENTALĂ	16
SCOPUL ȘI OBIECTIVELE CERCETĂRIILOR EFECTUATE	16
CAPITOLUL V	18
MATERIALE ȘI METODE	18
V.1 Biomasa de <i>Hericium erinaceus</i> utilizată în experimente	18
V.2 Materialul vegetal din specia <i>Lycopodium selago</i>	18
V.3 Stabilirea parametrilor optimi de obținere a extractelor etanolice din speciile <i>Hericium erinaceus</i> și <i>Lycopodium selago</i>	18
V.4 Metode de caracterizare biochimică a extractelor etanolice obținute prin EU	19
V.4.1 Determinarea activității antioxidante prin metoda DPPH	20
V.4.2 Determinarea activității antioxidante prin metoda FRAP	20
V.4.3 Determinarea activității antioxidante prin metoda ABTS	21
V.4.4 Determinarea activității antioxidante prin metoda ORAC	21
V.4.5 Determinarea CTP și CTF	21
V.4.6 Determinarea activităților inhibitoare ale acetilcolinesterazei (AChE) și butirilcolinesterazei (BChE)	22
V.4.7 Izolarea și purificarea extractelor prin metoda HPLC/DAD a diterpenoidului erinacină A	22
V.4.8 Izolarea și purificarea extractelor prin metoda HPLC/DAD a alcaloidului huperzine A	22
V.5 Modele animale utilizate pentru evaluarea efectelor neuroprotective ale extractelor etanolice vegetale și fungice	22
V.6 Administrarea substanțelor chimice – scopolamină și extractele etanolice vegetale și fungice	23
V.7 Metodele utilizate pentru evaluarea <i>in vivo</i> a performanțelor comportamentale la animalele de laborator tratate cu extracte etanolice	23
V.7.1 Testul de scufundare în acvariul nou (NTT)	24
V.7.2 Testul labirintului Y	24

V.7.3 Testul de recunoaștere a obiectului nou (NOR).....	25
V.8 Evaluarea efectelor extractelor etanolice asupra țesutului cerebral de la modelul de pește zebură al neuropatiei Alzheimer.....	25
V.8.1 Prelevarea probelor	25
V.8.2 Metoda de determinare a activității enzimatică a catalazei.....	26
V.8.3 Metoda de determinare a activității enzimatică a superoxid dismutazei.....	26
V.8.4 Metoda de determinare a activității enzimatică a glutatión peroxidazei.....	26
V.8.5 Metoda de determinare a conținutului de glutatión redus	26
V.8.6 Metoda de determinare a nivelului de malondialdehidă	27
V.8.7 Metoda de determinare a nivelului proteinelor carbonilate	27
V.8.8 Metoda de determinare a activității acetilcolinesterazei	27
V.9 Metode de prelucrare statistică a datelor experimentale.....	27
CAPITOLUL VI.....	29
REZULTATE OBȚINUTE ȘI DISCUȚII	29
VI.1 Randamentul de extracție a materialului fungic.....	29
VI.1.1 Influența parametrilor de proces în tehnica EU asupra randamentului de extracție și a activității antioxidante prin testele specifice CTP, CTF și DPPH	29
VI.2 Randamentul de extracție a materialului vegetal	29
VI.2.1 Influența parametrilor de proces în tehnica EU asupra randamentului de extracție și a activității antioxidante prin testele specifice CTP, CTF și DPPH la specia <i>Lycopodium selago</i>	29
VI.3 Rezultatele evaluării activității antioxidante prin testele specifice: FRAP, ABTS, ORAC	30
VI.4 Efecte inhibitoare ale acetilcolinesterazei (AChE) și butirilcolinesterazei (BChE) pentru extractele utilizate.....	30
VI.5 Rezultatele izolării și purificării prin metoda HPLC/DAD a diterpenoidului erinacine A	31
VI.6 Rezultatele izolării și purificării prin metoda HPLC/DAD a alcaloidului huperzine A	31

VI.7 Evaluarea <i>in vivo</i> a efectelor extractului etanolic de <i>Hericium erinaceus</i> asupra neuropatiei Alzheimer induse la peștele zebă	32
VI.7.1 Rezultatele evaluării efectelor extractului etanolic de <i>Hericium erinaceus</i> asupra anxietății în testul NTT.....	32
VI.7.2 Evaluarea efectelor extractului etanolic de <i>Hericium erinaceus</i> asupra memoriei spațiale și funcției cognitive în testul labirintului Y	33
VI.7.3 Evaluarea efectelor extractului etanolic de <i>Hericium erinaceus</i> asupra memoriei de recunoaștere în testul NOR.	34
VI.8 Evaluarea efectelor extractului etanolic de <i>Hericium erinaceus</i> asupra statusului oxidativ din țesuturile cerebrale provenite de la modelul de pește zebă afectat de Alzheimer	35
VI.9 Corelații Pearson între parametrii comportamentali și biochimici la specia <i>H. erinaceus</i>	35
VI.10 Evaluarea <i>in vivo</i> a efectelor extractului etanolic de <i>Lycopodium selago</i> asupra neuropatiei Alzheimer induse la peștele zebă	36
VI.10.1 Evaluarea efectelor extractului etanolic de <i>Lycopodium selago</i> asupra anxietății utilizând testul NTT.....	36
VI.10.2 Rezultatele evaluării efectelor extractului etanolic de <i>Lycopodium selago</i> asupra memoriei spațiale și funcției cognitive în testul labirintului Y	36
VI.10.3 Evaluarea efectelor extractului etanolic de <i>Lycopodium selago</i> asupra memoriei de recunoaștere în testul NOR.	37
VI.11 Evaluarea efectelor extractului etanolic de <i>Lycopodium selago</i> asupra statusului oxidativ din țesuturile cerebrale provenite de la peștele zebă.....	38
VI.12 Corelații Pearson între parametrii comportamentali și biochimici la specia <i>L. selago</i>	39
CONCLUZII GENERALE.....	41
Bibliografie selectivă.....	44
PRESCURTĂRI ȘI ABREVIERI	57
CUVINTE CHEIE	60

INTRODUCERE

În prezenta teză de doctorat se abordează demența Alzheimer, care este o afecțiune complexă și afectează milioane de oameni din întreaga lume. Până în prezent, cercetătorii nu au reușit să identifice un tratament curativ pentru această boală devastatoare, limitându-se în mare parte la gestionarea simptomelor și încetinirea progresiei sale. Totuși, numeroase studii au indicat efectele benefice ale diferitelor extracte de origine vegetală și fungică asupra bolii Alzheimer (BA).

Teza de doctorat este structurată în două părți majore, dintre care prima parte conține baza teoretică pe care s-a construit subiectul referitoare la maladia Alzheimer, la nivelul actual al cunoașterii, precum și metode avansate de obținere și de procesare a compușilor biologic activi din extractele fungice și vegetale utilizate.

A doua parte a tezei prezintă rezultatele experimentelor efectuate pe parcursul stagiului doctoral, prin administrarea extractelor fungice și vegetale unor subiecți animalii (pești de tip zebură), iar apoi au fost studiate comportamentele acestora prin evidențierea potențialului antioxidant și neuroprotectiv. De foarte mult timp au existat preocupări legate de cunoașterea plantelor și ciupercilor medicinale, multe dintre acestea fiind studiate datorită proprietăților lor tămăduitoare.

De-a lungul timpului studiile asupra extractelor de tip vegetal și fungic au evoluat, ajungându-se la tehnici ultraperformante și rapide de extracție, separare și identificare a principiilor active, responsabile pentru o gamă largă de acțiuni benefice asupra sănătății umane. Având în vedere aceste considerente, pentru realizarea experimentelor din prezenta lucrare, s-a utilizat tehnica de extracție cu ultrasunete (EU).

Procesul de extracție a compușilor biologic activi din specia de ferigă *Lycopodium selago* (LS) și din cea de macromicetă *Hericium erinaceus* (HE) a fost optimizat pentru a se identifica randamentul optim de extragere a compușilor implicați în activitățile antioxidante, prin metoda suprafeței de răspuns (MSR). Această metodă se referă la procedee matematice și statistice care explorează relația dintre variabilele independente și variabila-răspuns, cu scopul de a optimiza răspunsul sistemului investigat, în vederea explorării condițiilor de operare

În plus, pentru a se confirma potențialul antioxidant al extractelor, s-au efectuat analize biochimice, pentru indentificarea prezenței polifenolilor, flavonoizilor, dar și a diterpenoidului erinacine A.

Astfel, în următoarea parte a studiului, s-a pus accentul pe aplicabilitatea extractelor care au demonstrat un potențial antioxidant ridicat, prin efectuarea experimentelor pe animale (pești de tip zebură - *Danio rerio*) cu simptome induse ale neuropatiei degenerative de tip Alzheimer, în scopul evidențierii efectelor neurofarmacologice.

PARTEA I – STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII ÎN DOMENIUL PATOLOGIEI NEUROPATIILOR DEGENERATIVE

Scurt istoric al maladiei Alzheimer

Când Alois Alzheimer a cunoscut-o pe Auguste Deter în 1901, acesta nu și-ar fi imaginat că povestea ei tristă va face din numele său un cuvânt cunoscut în întreaga lume.

Alzheimer era un tânăr psihiatru în vârstă de peste 30 de ani, un clinician devotat muncii și dedicat ideii de a înțelege relația dintre patologia creierului și bolile mintale. După moartea soției sale la începutul aceluși an, el s-a dedicat îngrijirii pacienților cu afecțiuni psihice la Spitalul comunitar pentru bolnavi psihici și de epilepsie din Frankfurt, Germania.

Auguste Deter, la care s-a făcut referire, avea doar 50 de ani când soțul ei a observat că problemele ei de memorie cresc. Curând, ea a devenit mai temătoare, paranoică și mai agresivă, fiind necesară internarea sa la spitalul de psihiatrie la vârsta de 51 de ani. Aceasta a rămas internată acolo până la moartea sa în 1906.

Fostul șef al doctorului Alzheimer, din Frankfurt, Dr. Emil Sioli, l-a informat pe Dr. Alzheimer despre moartea fostei sale paciente. Acesta a trimis materialul din creierul ei către Dr. Alzheimer, care a examinat creierul doamnei Deter la microscop folosind noi substanțe care au dezvăluit prezența unor plăci amiloide (βA) și neurofibrilări intracelulare (NFT).

Neurofibrilarea intracelulară este definită ca fiind o acumulare intracelulară de proteine tau și reprezintă un biomarker esențial al neuropatologiei Alzheimer (Thawkar și Kaur, 2021). Prezentarea inițială a lui Alzheimer din 1906 care leagă această patologie cerebrală specifică de un sindrom clinic a fost întâmpinată cu entuziasm limitat de către colegii săi (Hippius și Neundörfer, 2003).

Neurologul american Robert Katzman a sugerat în 1976 că ar trebui să fie eliminată distincția de vârstă care separă demența pre-senilă de demența senilă de tipul Alzheimer.

Actualmente, prevalența globală a demenței se ridică la 24 de milioane de persoane și se prevede că se va mări de patru ori până în anul 2050 (Morley și colab., 2018).

Numai în Statele Unite ale Americii (SUA), maladia Alzheimer constituie cauza cea mai frecventă a demenței caracterizată printr-un declin progresiv al funcției cognitive, în special, în privința memoriei, care determină costuri de îngrijiri medicale estimate la aproximativ 172 de miliarde de dolari pe an (Morley și colab., 2018).

CAPITOLUL I

CONSIDERAȚII TEORETICE PRIVIND ETIOLOGIA, PROFILAXIA ȘI TERAPIA NEUROPATIILOR DEGENERATIVE DE TIP ALZHEIMER

I.1 Factorii etiologici și favorizanți în neuropatia Alzheimer

Demența este un sindrom clinic caracterizat prin declin progresiv în două sau mai multe sfere cognitive, incluzând astfel memoria, limbajul, funcția executivă și memoria spațială, personalitatea și comportamentul, care determină pierderea abilităților de a efectua activități de bază ale vieții de zi cu zi (Duong și colab., 2017). Neuropatia Alzheimer este cea mai frecventă cauză a demenței și reprezintă aproximativ 80% dintre toate cazurile de demență (Morley și colab., 2018).

Deși rata totală a deceselor din SUA din cauza accidentului vascular cerebral (AVC) și a bolilor cardiovasculare este în scădere, proporția deceselor legate de BA este în continuă creștere, cu 89% între 2000 și 2014 (Go și colab., 2014), conform ultimelor statistici.

Principalele repere neuropatologice ale creierului afectat de BA sunt plăcile amiloide extracelulare difuze și neuritice, adesea înconjurate de neurite distrofice și NFT. Aceste modificări patologice sunt însoțite frecvent de microglioză reactivă și pierderea neuronilor, dar și a substanței albe și a sinapselor (Serrano-Pozo și colab., 2011). Mecanismele etiologice care stau la baza acestor modificări neuropatologice rămân neclare, dar sunt probabil cauzate atât de factori de mediu, cât și de factori genetici.

I.2 Profilaxie și metode de tratament

Pentru început, important de precizat este că BA nu este o afecțiune care poate fi prevenită (Zhang și colab., 2017). Cu toate acestea, o serie de factori de risc legați de stilul de viață pot fi modificați ca o posibilă metodă de prevenire a apariției acestei neuropatii degenerative.

O dovadă în acest sens este un articol recent publicat care sugerează că modificările în alimentație, exercițiile fizice și obiceiurile unui stil de viață sănătos sunt pași esențiali pentru reducerea riscului de boli cardiovasculare și de asemenea, pentru riscul de a dezvolta BA dar și alte tulburări care provoacă demență (Arab și Sabbagh, 2010).

În prezent, doar două clase de terapie farmacologică sunt disponibile pentru pacienții cu BA. Tratamentele actuale disponibile și recomandate includ inhibitori de colinesterază pentru pacienții cu orice stadiu de demență al BA și memantină pentru persoanele cu demență de tip BA moderată spre severă.

Tratamentul simptomatic curent al pacienților cu BA are la bază administrarea următoarelor medicamente: memantină, galantamină, donepezil și rivastigmină. Însă, acestea au fost asociate cu efecte secundare grave, conform datelor din studiile clinice (Lancôt și colab., 2017). Medicamentele utilizate astfel, sunt capabile să reducă semnele bolii dar nu au potențialul de a o trata.

I.3 Modelul de pește zebură utilizat în studierea neuropatiei Alzheimer

Conform site-ului web „AlzForum” (Forumul de cercetare pentru boala Alzheimer), există cel puțin 168 de modele animale (cu scopolamină, cu β A, cu acid okadaic, etc) utilizate pentru studierea BA. Cele mai multe dintre modelele menționate se concentrează pe utilizarea șoarecilor transgenici care pot exprima gene umane implicate în producerea plăcilor amiloide și a neurofibrilărilor intracelulare (Saraceno și colab., 2013).

Într-o comparație genomică cu ADN-ul uman peștele zebură a prezentat 70,1% asemănare, iar 84% din genele bolilor umane s-au dovedit că se potrivesc în cazul acestei specii, conform unei cercetări realizate de o serie de autori (Howe și colab., 2013). BA este o afecțiune multifactorială cu o combinație complexă de componente genetice și non-genetice, iar deficitele și modificările din sistemele glutamatergic, serotoninergic și catecolaminergic sunt frecvente în această patologie (Tönnies și Trushina, 2017).

Peștele zebură, membru al familiei *Cyprinidae*, originar din Asia de Sud a devenit recent un model animal utilizat frecvent în multe ramuri științifice, cum ar fi analiza dezvoltării, biologia moleculară, genetica, imunitatea, dar și pentru studiul mai multor boli (Cognato și colab., 2012).

Astfel, această specie a devenit un punct central al studiilor neurocomportamentale, deoarece prezintă fenotipuri neuropatologice și comportamentale care sunt cuantificabile și a fost propusă ca o paradigmă experimentală validă pentru studiul BA.

În literatura de specialitate, s-a raportat că peștele zebură este un model ideal pentru studiul bolilor umane, deoarece prezintă o serie de caracteristici care îl fac un animal unic (Stefanello și colab., 2019). Din acest motiv, această specie a cunoscut o creștere importantă a popularității ca organism experimental (Vaz și colab., 2019).

CAPITOLUL II

ASPECTE TEORETICE PRIVIND EXTRAȚIA CU ULTRASUNETE A COMPUȘILOR BIOLOGIC ACTIVI

Extracția reprezintă separarea porțiunilor active din punct de vedere biochimic ale plantelor și ale microorganismelor folosind solvenți selectivi prin aplicarea de proceduri standard. Scopul tuturor metodelor de extracție este de a separa metaboliții solubili, eliminând reziduul celular insolubil (Fernandes și colab., 2016).

Tehnicile convenționale pentru extragerea constituenților activi sunt consumatoare de timp și de solvenți, fiind labile din punct de vedere termic, având uneori o eficiență scăzută. Multe produse naturale sunt instabile din punct de vedere termic, astfel cauzând degradarea compușilor de interes (Abubakar și Haque, 2020).

II.1 Procedul extracției cu ultrasunete

Extracția cu ultrasunete (EU) poate fi definită ca o metodă cu o intensitate ridicată pentru a accelera extracția unui material solid într-un solvent lichid. Activarea cu ultrasunete a extracției solid-lichid este în principal atribuită activităților hidrodinamice ale cavitației acustice (Chemat și colab., 2017).

Ultrasonarea unei probe provoacă oscilații ale elementelor lichide, conducând la regiuni alternative de compresie și formarea de cavități sau microbule în regiunea aflată sub presiune negativă. Astfel, bulele cresc la o dimensiune mare și colapsează în cele din urmă, generând unde de șoc și o forță de forfecare ridicată.

Prin urmare, forțele hidrodinamice pot provoca ruperea pereților celulei și favorizează transportul moleculelor de interes, activând astfel extracția (Quintero Quiroz și colab., 2019).

II.2 Avantajele extracției cu ultrasunete, comparativ cu tehnicile convenționale

Ultrasunetele de mare intensitate au fost aplicate pe scară largă în obținerea extractelor din diferite materiale vegetale și/sau fungice, deoarece prin intermediul acestora, absorbția celulară și a solvenților intensifică extracția compușilor polifenolici, astfel crescând activitatea antioxidantă (Dzah și colab., 2020).

EU are unele avantaje față de metodele tradiționale, dar și față de alte procese de extracție noi și convenționale, printre care echipamentul simplu de procesare, operarea la temperatură scăzută și lipsită de pericole, reducerea timpului de analiză, dar și înalta eficiență a procesului prin puritatea mai mare a produsului final.

Tehnica EU este considerată utilă deoarece nu necesită instrumente complexe și este relativ ieftină comparativ cu tehnici mai complexe (extracție cu fluid supercritic, Soxhlet, etc).

Procesul de EU poate fi folosit atât la nivel de cercetare cât și la nivel industrial.

Pe această cale, au fost propuse câteva mecanisme pentru intensificarea extracției cu ultrasunete, cum ar fi dezintegrarea celulelor, o penetrare îmbunătățită, efectul capilar dar și procesul de hidratare (Bimakr și colab., 2017).

II.3 Liofilizarea extractelor obținute cu ultrasunete

Liofilizarea, cunoscută și sub denumirea de crio-desicare, este procedeul de evaporare în vid la temperaturi foarte scăzute prin care apa este eliminată dintr-o probă fără a fi necesară aplicarea de căldură. Având în vedere efectele adverse ale căldurii și apei asupra stocării pe termen lung a probelor obținute prin extracție cu ultrasunete spre exemplu, liofilizarea este adesea cea mai bună soluție pentru stocarea lor.

Pe lângă creșterea duratei de depozitare a probelor, liofilizarea reduce greutatea și volumul acestora, ceea ce poate conduce la scăderea costurilor de depozitare și de transport (Tchessalov și colab., 2021).

De asemenea, liofilizarea poate elimina necesitatea de a expedia eșantioanele pe gheață carbonică, deoarece sunt mult mai stabile la temperatura camerei (Molnar și colab., 2021), acesta fiind un alt considerent important expus în literatură, dar și pentru studiul de față, având în vedere experimentele *in vivo* pe pești de tip zebră, care au fost efectuate la un interval mai lung de timp de la obținerea extractelor.

CAPITOLUL III

COMPUȘII BIOLOGIC ACTIVI DIN SPECIA *HERICIUM ERINACEUS* CU EFECT REGENERATIV ÎN NEUROPATIA ALZHEIMER

Din punct de vedere taxonomic, ciupercile *basidiomicete* - aparțin regnului Fungi. Conform studiilor, se estimează că numărul de specii de ciuperci de pe pământ este de aproximativ 140.000, doar 10% fiind cunoscute (Performance, 2006).

De asemenea, ciupercile au fost utilizate pentru menținerea sănătății și pentru tratarea bolilor comune simple, caracteristice vârstei înaintate, cum sunt afecțiunile cutanate, dar și a maladiilor complexe și pandemice precum sindromul imunodeficienței umane dobândite (SIDA) (Valverde și colab., 2015).

III.1 Descrierea speciei *Hericum erinaceus*

Hericum este un gen de ciuperci comestibile din familia *Hericiaceae*. Speciile din acest gen sunt de culoare albă, cărnoase și cresc pe lemn mort sau aflat în faza de descompunere; carpororii se aseamănă cu o masă de tije fragile, asemănătoare cu țurțurii de gheață, care sunt suspendate fie dintr-un cadru de susținere ramificat, fie dintr-o pernă de țesut rigidă, neramificată.

De precizat este faptul că, din punct de vedere taxonomic, acest gen a fost anterior plasat în ordinul *Aphyllophorales*, dar studii moleculare recente îl plasează acum în ordinul *Russulales* (Kunca și Čiliak, 2017).

Sporii sunt sferici spre elipsoidali, netezi sau acoperiți cu negi foarte fini. Specii de *Hericum* se găsesc pe scară largă în zonele nordice ale lumii, inclusiv în America de Nord, Europa și Asia, adesea crescând pe bușteni vechi și căzuți în zone întunecate și umbrite de păduri de foioase și alpine. În medicina populară din China și Japonia, speciile de *Hericum* sunt foarte apreciate pentru posibilele lor proprietăți medicinale (Kunca și Čiliak, 2017).

III.2 Caracteristicile chimice și farmacologice ale speciei *Hericum erinaceus*

Ciupercile comestibile și medicinale sunt surse abundente de compuși bioactivi cu proprietăți notabile antitumorale, imunomodulatoare și alte proprietăți funcționale pentru

utilizările nutraceutice și farmaceutice, așa cum se raportează în multe studii științifice (Li și colab., 2018; Mori și colab., 2008; Zhang și colab., 2015).

Hericium erinaceus produce substanțe active cum sunt erinacine și hericenone, - compuși biologici cercetați pentru posibilele lor proprietăți farmacologice (Lu și colab., 2014; Shen și colab., 2015).

Astfel, așa cum este raportat în literatură, polizaharidele fungice se găsesc în pereții celulelor ciupercii și sunt prezente în cantități mari atât în carpoforii, cât și în miceliul secundar, inclusiv în cazul speciei HE (Schwartz și Hadar, 2014).

III.3 Efectul regenerativ al speciei *Hericium erinaceus* asupra neuronilor

Metabolismul neuronal a fost catalogat de o serie de autori (Alexandrov și Pletnikov, 2022; Falkowska și colab., 2015; Watts și colab., 2018) ca fiind responsabil pentru activitatea intrinsecă a neuronilor, constând în glicoliza submembranară legată de pomparea ionilor membranari și de glicoliza aerobă pentru generarea de acid piruvic.

De asemenea, în literatura de specialitate s-a specificat faptul că anumite caracteristici ale metabolismului neuronal joacă un rol în învățare și memorie (Vaynman și Gomez-Pinilla, 2006). Modificările metabolice dinamice care apar în neuroni sunt de o importanță critică în direcționarea plasticității creierului și a funcției cognitive, fiind asociate cu stresul celular.

Înțelegerea rolului metabolismului și al genelor reglate metabolic în funcția neuronală va fi critică în elucidarea modului în care funcțiile cognitive sunt perturbate în condiții patologice în care metabolismul neuronal este afectat (Watts și colab., 2018).

CAPITOLUL IV

COMPUȘII BIOLOGIC ACTIVI DIN SPECIA *LYCOPODIUM SELAGO* CU EFECT REGENERATIV ÎN NEUROPATIA ALZHEIMER

Se cunoaște faptul că substanțele fitochimice posedă proprietăți antioxidante, antibacteriene, antifungice, antidiabetice, antiinflamatoare, antiartritice și radio-protectoare, datorită acestor proprietăți, fiind utilizate în mare măsură în scop medicinal (Veeresham, 2012).

Dezvoltarea rezistenței la medicamente și efectele secundare nedorite ale anumitor antibiotice au condus la căutarea de noi agenți antimicrobieni, în principal în regnul vegetal, dar și în regnul fungi.

IV.1 Caracterizarea morfo-fiziologică a speciei *Lycopodium selago*

Lycopodium selago este una dintre cele mai răspândite specii de pteridofite din genul *Lycopodium*, încadrată în familia *Lycopodiaceae*, fiind o plantă vasculară cu spori. Sporofilele au lățimea de 1 până la 1,5 mm; sporii au diametrul de 32 până la 38 μm , cu laturile concave și fețele comisurale netede (Szypuła și colab., 2011).

Frunzele acestei specii, de obicei ascendente, de dimensiuni egale, în aproximativ 8 rânduri, cele mai late la bază sau în apropierea bazei, care se îngustează treptat până la un vârf ascuțit la extremitate, sunt lucioase, lungi de 3 până la 5 mm și late de 0,6 până la 0,8 mm, adesea cu muguri axilari (Borloz și colab., 2006).

IV.2 Caracterizarea chimică și farmacologică a extractelor din specia *Lycopodium selago*

Lycopodium este un gen din familia *Lycopodiaceae*, larg răspândit în climatele temperate și tropicale. Plantele din ordinul *Lycopodiales* au fost utilizate tradițional pentru a trata numeroase boli, în special SNC și boli legate de inflamații (Kobayashi și Morita, 2005).

Până în prezent conform literaturii de specialitate, s-a raportat un număr total de 508 metaboliți secundari, existenți în cele 46 de specii aparținând genului *Lycopodium*. Dintre acești metaboliți, alcaloizii și triterpenoizii reprezintă două clase majore de componente bioactive (Guðmundsdóttir, 2020).

În special, HupA, un alcaloid de tip Lycodane, a fost autorizat în China ca medicament pentru tratamentul BA și în SUA ca supliment alimentar (Little și colab., 2008).

De-a lungul anilor, alcaloidul HupA a fost studiat pe larg de către cercetătorii din China (Thongbai și colab., 2015; Wang și colab., 2021), în special datorită utilizării frecvente a speciei *L. serrata* în medicina tradițională chineză pentru tratamentul și prevenirea demenței. Până în prezent, s-a dovedit în mod repetat că HupA este un inhibitor puternic al AChE lipsit de toxicitate colinergică (Ferreira și colab., 2016).

IV.3 Efectul regenerativ al speciei *Lycopodium selago* asupra neuronilor

Deși există puține date în literatura științifică cu privire la specia *Lycopodium selago*, printr-o serie de studii fitochimice, au fost izolați mulți alcaloizi noi și au fost elucidate structurile chimice ale acestora, inclusiv cea a HupA, care este responsabilă atât de efectele terapeutice, cât și de cele toxice ale plantei (Kobayashi și Morita, 2005).

Spre exemplu, pentru pacienții care aleg terapia alternativă, HupA nutraceutică a demonstrat beneficii atât pentru funcția de memorie cât și în activitățile vieții zilnice (Calderón și colab., 2013). HupA este un medicament anti-Alzheimer licențiat în China și este disponibil ca nutraceutic în SUA (Qian și Ke, 2014). Un număr tot mai mare de dovezi a demonstrat că HupA are efecte farmacologice (Erdogan Orhan și colab., 2011).

HupA și alți inhibitori de colinesterază pot produce un efect marcant în inhibarea AChE, întârziind reacția de hidroliză a acetilcolinei și creșterea nivelului de acetilcolină în fanta sinaptică (Ma și Gang, 2004).

PARTEA EXPERIMENTALĂ

SCOPUL ȘI OBIECTIVELE CERCETĂRILOR EFECTUATE

Teza de doctorat intitulată „Studiul utilizării extractelor fungice și vegetale în terapia neuropatiei de tip Alzheimer” abordează un subiect important în domeniul științelor biomedicale. Boala Alzheimer este o afecțiune neurodegenerativă care afectează un număr din ce în ce mai mare de persoane la nivel global, motiv pentru care cercetarea în această direcție este crucială. Utilizarea de extracte etanolice pentru a evalua efectele lor anti-Alzheimer pe peștii zebra poate fi benefică în identificarea unor potențiale tratamente pentru această boală.

De asemenea, utilizarea unui model animal, precum peștii zebra, poate oferi o perspectivă interesantă asupra efectelor extractelor etanolice, furnizând astfel un fundament pentru a continua cercetările în domeniul medical. În general, abordarea acestei teme poate contribui la creșterea cunoștințelor și înțelegerii mecanismelor de acțiune ale substanțelor din plante și ciuperci, putând oferi o nouă perspectivă asupra modului în care acestea pot fi utilizate pentru a trata diverse afecțiuni, inclusiv maladia Alzheimer.

Prin urmare, conținutul prezentei teze de doctorat s-a bazat pe investigarea efectelor extractelor etanolice obținute din miceliul speciei *Hericium erinaceus*, precum și din biomasa speciei de ferigi *Lycopodium selago* asupra deficitelor cognitive induse de scopolamină la peștii zebra.

Aceste aspecte sunt abordate prin aplicarea unor metode specifice de testare comportamentală, analizarea nivelurilor de antioxidanți și speciilor reactive de oxigen în procesele cognitive și inflamatorii în creierul peștilor zebra.

Scopul acestei teze este de a investiga eficacitatea extractelor etanolice obținute din miceliul speciei *Hericium erinaceus* și din biomasa speciei de ferigi *Lycopodium selago* în protejarea creierului împotriva deficitelor cognitive induse de scopolamină la peștii zebra.

Prin intermediul studiilor comportamentale și biochimice, se urmărește demonstrarea interdependențelor complexe dintre extractele cu potențial antioxidant și efectele lor neuroprotectoare. Această cercetare are ca scop identificarea unor posibile opțiuni terapeutice pentru combaterea deteriorării cognitive în contextul bolii Alzheimer și a altor afecțiuni neurodegenerative.

Obiectivul general al experimentelor a fost reprezentat de evaluarea efectului neuroprotector al unor extracte cu potențial neurofarmacologic, obținute prin ultrasonarea

biomasei din specia de fungi *Hericium erinaceus* și, respectiv, din cea de pteridofite *Lycopodium selago*.

Astfel, obiectivele specifice din cadrul studiului care derivă din obiectivul principal se referă la:

- Elaborarea protocolului de obținere a extractelor etanolice din miceliul speciei *Hericium erinaceus*, precum și din biomasa speciei de ferigi *Lycopodium selago* prin tehnica de extracție cu ultrasunete;
- Stabilirea modalităților de ameliorare a neuropatiei degenerative de tip Alzheimer prin administrarea extractelor de *Hericium erinaceus* și *Lycopodium selago* peștilor de tip zebură;
- Evidențierea efectelor anti-Alzheimer ale extractelor prin teste comportamentale de labirint specifice, utilizând pești zebură cu neurotoxicitate indusă de substanța scopolamină;
- Evidențierea potențialului extractelor în prevenirea și ameliorarea deteriorării neurologice și a tulburărilor legate de stresul oxidativ, în special în contextul bolilor neurodegenerative, precum boala Alzheimer.

CAPITOLUL V

MATERIALE ȘI METODE

V.1 Biomasa de *Hericium erinaceus* utilizată în experimente

În prima parte a experimentelor, biomasa fungică de *Hericium erinaceus* a fost obținută pe un mediu de cultură solid, în condiții controlate, pentru a se obține diterpenoidul erinacine A, conform unui protocol publicat de un grup de cercetare (Li și colab., 2018). Practic, biomasa a fost obținută după cultivarea miceliului de *Hericium erinaceus* timp de 21 de zile, conform protocolului descris de Petre și colab., 2016.

V.2 Materialul vegetal din specia *Lycopodium selago*

O cantitate de aproximativ 2 kg de material vegetal aparținând speciei *Lycopodium selago* a fost colectată în anul 2020 din pădurea Făget, județul Cluj, având coordonatele GPS 46°42'46" N, 23°33'55" E, în perioada de sporificare din luna iulie. Plantele au fost identificate, iar o serie de exemplare au fost conservate și depozitate în Laboratorul de Fitochimie al Universității din Pitești.

V.3 Stabilirea parametrilor optimi de obținere a extractelor etanolice din speciile *Hericium erinaceus* și *Lycopodium selago*

Tehnologia de obținere și concentrare a produșilor bioactivi din biomasa vegetală de LS și cea fungică de HE a fost dezvoltată pe baza principiilor de dezintegrare a structurilor celulare cu ajutorul undelor ultrasonice, urmând un procedeu descris și modificat ulterior de către un grup de cercetare (Aguiló-Aguayo și colab., 2017).

Dispozitivul utilizat pentru extracție a fost un procesor cu ultrasunete Hielscher (Hielscher UIP1000hdT Berlin, Germania) echipat cu o sonotrodă, având diametrul de 40 mm, 1000 W, 20 kHz și amplitudine reglabilă (raport de amplitudine 1:0,7).

Înainte de experimentele de extracție, procesorul cu ultrasunete a fost calibrat pentru a afla consumul de energie al echipamentului. În timpul procesului de sonicare, această valoare a fost dedusă automat din consumul brut de energie, permițând astfel aflarea puterii nete livrate mediului de extracție.

Metodologia suprafeței de răspuns (MSR) a fost aplicată pentru a investiga impactul a trei variabile independente asupra randamentului extracției. MSR este o tehnică matematică de optimizare a proceselor experimentale, care implică construirea unui model matematic al relației dintre variabilele de intrare și de ieșire ale unui sistem.

Această metodologie poate fi aplicată într-o gamă largă de domenii, inclusiv în extracția biologică. Astfel, în extracția biologică, MSR poate fi utilizată pentru a optimiza parametrii cheie ai procesului, cum ar fi pH-ul, timpul de extracție, cantitatea de solvent utilizată, temperatura și presiunea (Kobus și colab., 2023; Weremfo și colab., 2023).

Prin urmare, motivația și scopul utilizării MSR în cadrul experimentelor efectuate a fost de a obține o eficiență maximă de extracție cu costuri și timp de lucru minime. Importanța acesteia pentru evaluarea calității extracției derivă din faptul că este o metodă eficientă de optimizare a procesului de extracție biologică, deoarece poate fi utilizată pentru a identifica relațiile complexe dintre variabilele studiate, ajutând la obținerea unui proces de extracție mai eficient și mai rentabil, cu beneficii semnificative.

V.4 Metode de caracterizare biochimică a extractelor etanolice obținute prin EU

Activitățile antioxidante *in vitro* ale extractelor obținute au fost evaluate prin metode diferite, după cum urmează:

- metoda 2,2-difenil-1-picril-hidrazilului, fiind notată și descrisă în continuarea lucrării cu abrevierea DPPH;
- metoda de determinare a conținutului total de polifenoli, fiind notată și descrisă în continuarea lucrării cu abrevierea CTP;
- metoda de determinare a conținutului total de flavonoizi, fiind notată și descrisă în continuarea lucrării cu abrevierea CTF;
- metoda reducerii ionului ferric/puterea antioxidantă, fiind notată și descrisă în continuarea lucrării cu abrevierea FRAP;
- metoda 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)/capacitatea antioxidantă a echivalentului Trolox, fiind notată și descrisă în continuarea lucrării utilizând abrevierile ABTS/TEAC;

- metoda capacității de absorbție a radicalilor de oxigen, fiind notată și descrisă în continuarea lucrării utilizând abrevierea ORAC;
- activitatea acetilcolinesterazei (AChE) și butirilcolinesterazei (BChE);
- analiză cromatografică lichidă de înaltă performanță (HPLC) cuplată cu detector cu șir de diode (DAD).

Justificarea efectuării mai multor metode de determinare a activităților antioxidante derivă din faptul că se poate obține o imagine mai precisă a capacității antioxidative a unor plante și ciuperci, așa cum a fost menționat și într-un articol publicat recent (Gulcin, 2020).

Pentru toate determinările care au vizat activitatea antioxidantă, probele au fost analizate la diferite concentrații (0-3 mg/mL) cu apă distilată ca martor și cu substanțele de referință pentru activitatea antioxidantă.

În plus, la finalizarea interpretării rezultatelor analizelor antioxidante, extractele care au prezentat activitatea cea mai ridicată au fost testate ulterior pentru investigarea acțiunilor inhibitoare ale acetilcolinesterazei și butirilcolinesterazei.

De asemenea, HPLC conectat cu DAD a fost folosit pentru a identifica cu ajutorul standardelor compușii țintă care ar avea un răspuns pozitiv în BA.

V.4.1 Determinarea activității antioxidante prin metoda DPPH

Metoda se bazează pe transferul de electroni și utilizează ca oxidant radicalul DPPH, un radical cromogen de culoare violet închis. Rata de eliminare a radicalilor liberi a fost determinată prin măsurarea DPPH cu acid L-ascorbic ca standard de referință ($\mu\text{g/mL}$). Pentru testul DPPH, s-a utilizat o procedură descrisă într-un studiu anterior (Ozgen și colab., 2006).

V.4.2 Determinarea activității antioxidante prin metoda FRAP

Metoda FRAP s-a bazat pe transferul de electroni care măsoară reducerea complexului ligand al ionului feric (Fe^{3+}) la complexul feros (Fe^{2+}) intens colorat în albastru sub acțiunea antioxidantilor în mediu acid. Analiza a fost efectuată în conformitate cu metoda descrisă în detaliu de Dudonné și colaboratorii în 2009.

Testul de reducere ferică-antioxidantă se bazează pe reducerea a 2,4,6-tris(2-piridil)-1,3,5-triazinei ferice [Fe(III)-TPTZ] sub forma unui complex feros, urmată de o analiză spectrofotometrică (Rubio și colab., 2016).

V.4.3 Determinarea activității antioxidante prin metoda ABTS

Pentru determinarea activității antioxidante, s-a efectuat testul ABTS prezentat de (Nilsson și colab., 2005). Soluțiile stoc au inclus 7 mM de soluție ABTS și 2,4 mM de soluție persulfat de potasiu. Această metodă măsoară capacitatea antioxidantilor de a capta radicalul cationic stabil al ABTS. Acest cromofor albastru-verde absoarbe la 734 nm și scade în intensitate în prezența compușilor antioxidanți. Radicalul cationic $ABTS^{+}$ este solubil atât în mediile hidrofile, cât și în cele lipofile și nu este influențat de puterea ionică (Quintero Quiroz și colab., 2019).

V.4.4 Determinarea activității antioxidante prin metoda ORAC

Metoda ORAC utilizează un substrat fluorescent (fluoresceină) și un generator de radicali peroxil, 2,2'-azobis(2-amidinopropan) dihidroclorură (AAPH). În prezența unui antioxidant, acesta va face legătura cu substratul, inhibând atacul radicalilor peroxil asupra fluoresceinei (Dudonné și colab., 2009). Pentru aceasta analiză, s-a aplicat metoda descrisă de Gorjanović și colaboratorii în 2013.

V.4.5 Determinarea CTP și CTF

Cuantificarea conținutului total de polifenoli din extracte a fost efectuată cu ajutorul reactivului Folin-Ciocalteu, conform metodei descrise de Sánchez-Rangel și colaboratorii în 2013 prin care acidul galic (mg AG/g s.u) a fost utilizat ca antioxidant standard. Analiza a fost efectuată cu același spectrofotometru folosit și în cadrul determinărilor anterioare.

V.4.6 Determinarea activităților inhibitoare ale acetilcolinesterazei (AChE) și butirilcolinesterazei (BChE)

Activitățile inhibitoare ale acetilcolinesterazei și butirilcolinesterazei au fost măsurate prin metoda spectrofotometrică dezvoltată de Orhan și colaboratorii în 2004, care se bazează pe reacția tiocolinei eliberate pentru a se obține un produs colorat cu un reactiv cromogen.

V.4.7 Izolarea și purificarea extractelor prin metoda HPLC/DAD a diterpenoidului erinacină A

Analiza HPLC-DAD a fost efectuată cu ajutorul unui sistem cromatografic DIONEX Ultimate 3000 (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germania). În analiza cromatografică, s-a utilizat coloana Kinetex EVO C18 (4.6×250 mm și cu un diametru al particulelor de 5 μ m) cu un volum de injecție de 10 μ L. Solvenții utilizați au fost acid trifluoroacetic (TFA) 0,1 % în apă și 0,1 % în acetonitril.

V.4.8 Izolarea și purificarea extractelor prin metoda HPLC/DAD a alcaloidului huperzine A

În cadrul acestei etape a studiului, izolarea și purificarea alcaloizilor au fost realizate utilizând analiza HPLC-DAD cu același sistem cromatografic menționat în subcapitolul anterior, cu modificări minore, în conformitate cu un studiu precedent (Yang și colab., 2003). Astfel, extractul de LS a fost fracționat folosind o pâlnie de separare, timp de 45 min.

Procedura a fost repetată de trei ori, utilizând același volum de solvent. Înainte de analiza HPLC, straturile organice au fost evaporate sub presiune redusă (240 mbar) timp de 15-20 min. Înainte de injectarea în coloana de separare, extractul a fost filtrat cu un filtru cu porozitatea de 0,45 μ m.

V.5 Modele animale utilizate pentru evaluarea efectelor neuroprotective ale extractelor etanolice vegetale și fungice

Peștele zebură este un instrument important în cercetarea translațională în domeniul neuroștiințelor, având fenotipuri comportamentale robuste și o sensibilitate ridicată la stres și la diverse manipulări genetice, epigenetice și farmacologice (Levin, 2011).

Peștii au fost întreținuți și tratați în conformitate cu Ghidul Institutului Național de Sănătate pentru îngrijirea și utilizarea animalelor de laborator (Directiva 2010/63/EU).

De asemenea, studiul prezentat în această teză de doctorat a fost aprobat de către Comitetul de etică a experimentelor pe animale a Universității „Alexandru Ioan Cuza” din Iași (UAIC Iași); (Numărul autorizației: 2198). Pentru realizarea părții experimentale a prezentului studiu s-au utilizat 150 de pești adulți zebură (*Danio rerio*) (cu vârstă cuprinsă între 3-4 luni), femele și masculi în raport de 50:50, de 3-4 cm lungime, și cu o greutate medie de 0,3-0,5 g.

Numărul de animale (n=10 per grup) a fost selectat în urma unor studii biostatistice (InVivoStat v4.1.0), care au arătat că acesta este numărul necesar pentru realizarea analizei statistice.

V.6 Administrarea substanțelor chimice – scopolamină și extractele etanolice vegetale și fungice

Cu o oră înainte de demararea testărilor comportamentale, animalele de laborator au fost plasate individual, timp de 30 de minute, într-un bazin de 2L cu soluție de SCOP (Sigma-Aldrich, Germania), dizolvată în soluție izotonică (0.9 % NaCl) pentru a se induce modelul experimental al BA prin imersie, așa cum a fost descris anterior de un grup de cercetare (Dumitru și colab., 2019). Soluția de SCOP a fost preparată înainte de utilizare și schimbată după fiecare expunere pentru a minimiza variabilele care ar putea afecta comportamentul.

Mai mult decât atât, doza și timpul de expunere la SCOP s-a realizat consultând Drugs.com (enciclopedia farmaceutică online care oferă informații despre medicamente) și numărul CAS:51-34-3 al substanței utilizate în prezentul studiu. Animalele de control au fost găzduite în camere separate și nu au avut niciun contact cu animalele stresate.

Farmacocinetica complexă a extractelor de HE și LS nu a fost deocamdată caracterizată la peștele zebură, însă studiile pe rozătoare au fost un punct de reper important. Dozajul extractelor a fost determinat prin studii pilot, testând efectele diferitelor concentrații, și anume de la ineficiente până la cele cu efecte toxice acute.

V.7 Metodele utilizate pentru evaluarea *in vivo* a performanțelor comportamentale la animalele de laborator tratate cu extracte etanolice

Înainte de demararea procedurilor de evaluare comportamentală, animalele au fost transferate din camera de adăpostire și aclimatizate în camera de testare, timp de 1 oră.

Diferite teste comportamentale sunt utilizate în prezent pentru a evalua funcțiile senzoriale-motorii, interacțiunile sociale, comportamentul anxios și dependența de substanțe (Bailey și colab., 2015; Thawkar și Kaur, 2021). În acest studiu, animalele au fost supuse următoarelor testări comportamentale:

- testul de scufundare în acvariul nou (NTT) pentru evaluarea manifestărilor de anxietate;
- testul labirintului Y pentru evaluarea memoriei spațiale, cogniția și activitatea locomotorie;
- testul de recunoaștere a obiectului nou (NOR) pentru evaluarea memoriei pe termen scurt, pe termen lung și memoria de recunoaștere.

V.7.1 Testul de scufundare în acvariul nou (NTT)

Evaluarea prin intermediul testului NTT se bazează pe instinctul natural al animalelor care caută protecție într-un mediu specific pentru a manifesta stări de înghețare, scufundare, de reducere a explorării și anxietate provocată de noutate (petrecerea timpului în partea superioară sau inferioară a bazinului atunci când brațul nou a fost deblocat pentru a explora obiectul nou) (Levin, 2011).

Pe măsură ce peștele se aclimatizează treptat la noul mediu, se produce în general o creștere a explorării (activitate locomotorie crescută, imobilitate scăzută și mai multe intrări în zona superioară a bazinului) (Levin, 2011).

V.7.2 Testul labirintului Y

Peștii au fost testați într-un acvariu din material de sticlă sub forma literei Y, având trei brațe la un unghi de 120° unul față de celălalt. De asemenea, s-au utilizat forme geometrice (cercuri, triunghiuri și pătrate) din hârtie albă pe post de indici (stimuli) vizuali plasați pe pereții exteriori ai fiecărui braț, făcându-i vizibili din interiorul labirintului. Acești indici vizuali au fost stabiliți anterior de (Cognato și colab., 2012) care au arătat că față de aceste forme geometrice, peștele nu prezintă semne de evitare sau preferință.

Testul labirintului Y a constat din două etape separate de un interval de o oră între acestea pentru a evalua răspunsul la noutate (peștele plasat în aparat atunci când brațul nou a fost deblocat) și memoria de recunoaștere spațială.

V.7.3 Testul de recunoaștere a obiectului nou (NOR)

Testul de recunoaștere a obiectului nou reprezintă o evaluare comportamentală utilizată în mod obișnuit pentru investigarea diferitelor aspecte ale învățării și memoriei (Lueptow, 2017). Testul NOR s-a realizat în 3 zile, cu următoarele etape: ziua de obișnuință, ziua de antrenament și ziua de testare. În timpul antrenamentului, peștii de tip zebra sunt lăsați să exploreze 2 obiecte identice, așa cum este raportat în literatura de specialitate (Boiangiu și colab., 2020).

Totodată, acest test este foarte util pentru studierea memoriei pe termen scurt și lung (Antunes și Biala, 2012). În studiul de față acest test de evaluare comportamentală a fost efectuat într-un acvariu de sticlă de ~20 L cu dimensiunile de 30 x 30 x 30 cm (lungime x lățime x înălțime).

V.8 Evaluarea efectelor extractelor etanolice asupra țesutului cerebral de la modelul de pește zebra al neuropatiei Alzheimer

În această parte a studiului s-a investigat dacă afectarea performanței cognitive cauzată de SCOP este în corelație cu indicii modificați ai stresului oxidativ. O serie de publicații au evidențiat că SCOP provoacă stres oxidativ, blochează acțiunea acetilcolinei în creier și provoacă degradarea memoriei (Karthivashan și colab., 2018; Thirathmatrakul și colab., 2014; Tung și colab., 2017). Astfel, probele de creier întreg prelevate de la peștii de tip zebra au fost cântărite și omogenizate.

V.8.1 Prelevarea probelor

La sfârșitul testelor comportamentale, toți peștii zebra au fost eutanasiați prin răcire rapidă (10 minute de imersie în apă cu gheață, la 2-4°C până la pierderea mișcărilor operculare), generând un șoc hipotermic, conform metodei descrise de Wallace și colab., 2018. Pe tot parcursul procesului de eutanasiere, temperatura băii de gheață a fost monitorizată pentru a se asigura că aceasta se menține între temperaturile specificate.

Deși nu este inclusă în lista de metode de eutanasiere a peștilor din Directiva 2010/63/UE a Parlamentului European, această tehnică este des menționată în publicațiile științifice și există o cerință tot mai mare de a fi inclusă în legislația europeană (Martins și colab., 2016).

V.8.2 Metoda de determinare a activității enzimatică a catalazei

Determinarea activității specifice a catalazei (CAT, EC 1.11.1.6) a fost determinată printr-o metodă colorimetrică descrisă de (Sinha, 1972). Astfel, reacția de amestec constă în 150 μL de tampon fosfat (0,01M, pH 7,0) și 100 μL de supernatant.

V.8.3 Metoda de determinare a activității enzimatică a superoxid dismutazei

Determinarea activității superoxid dismutazei (SOD, EC 1.15.1.1.1) a fost realizată prin monitorizarea capacității sale de a inhiba reducerea fotochimică a NBT (testul Nitroblue Tetrazolium), conform metodei descrise de (Winterbourn și colab., 1975). Activitatea enzimei a fost exprimată în unități SOD/mg proteină.

V.8.4 Metoda de determinare a activității enzimatică a glutatation peroxidazei

În această parte a studiului, s-a utilizat un test spectrofotometric pentru analiza activității glutatation peroxidazei (GPx, E.C. 1.11.1.9), conform metodei descrise și modificată de (Razygraev și colab., 2018). Amestecul de reacție a constă din 1 mL de tampon fosfat 0,4 M (pH 7,0) conținând 0,4 mM EDTA, 1 mL de 5 mM NaN_3 , 1 mL de 4 mM GSH și 200 μL de supernatant și a fost incubat la 37°C timp de 5 minute. O unitate de GPx a fost definită ca fiind cantitatea de enzimă necesară pentru a oxida 1 nmol GSH/min.

V.8.5 Metoda de determinare a conținutului de glutatation redus

În general, glutationul este o tripeptidă și este considerată cea mai importantă formă de stocare și transport a sulfului scăzut. Glutationul reprezintă o componentă esențială a sistemului de apărare antioxidant celular și este direct implicat în menținerea homeostaziei redox-ului celular și a concentrațiilor scăzute de ROS (Zhu și colab., 2006). GSH a fost determinat pe baza metodei descrise de (Massarsky și colab., 2017).

V.8.6 Metoda de determinare a nivelului de malondialdehidă

Malondialdehida este un indicator al peroxidării lipidelor și a fost măsurată spectrofotometric folosind testul acidului tiobarbituric conform metodei descrise de (Ito și colab., 2019).

De asemenea, MDA este considerat a fi unul din cei mai importanți indicatori ai peroxidării lipidice, fiind produsul principal al conversiei acidului arahidonic în prostaglandină PGH₂ (Prostaglandină H₂) de către ciclooxygenaza 1 sau 2 (Lykkesfeldt, 2007). Rezultatele au fost exprimate în nmol/mg de proteină.

V.8.7 Metoda de determinare a nivelului proteinelor carbonilate

Gradul de oxidare a proteinelor din creierul de pește zebură s-a evaluat conform metodelor descrise de (Lacave și colab., 2018; Müller și colab., 2018; Quadros și colab., 2019). Pe scurt, supernatantul a fost împărțit în două probe, fiecare conținând aproximativ 2 mg de proteine.

V.8.8 Metoda de determinare a activității acetilcolinesterazei

Activitatea acetilcolinesterazei din probele de creier a fost monitorizată prin metoda descrisă de (Richetti și colab., 2011), urmărind de asemenea și metoda republicată recent de un alt grup de cercetare (Gravato și colab., 2021), folosind acetiltiocolina (ATC) ca substrat artificial. Amestecul de reacție din microeprubete (600 μ L volum final) a fost format din 0,26 M tampon fosfat pH 7,4, 1 mM DTNB, acetonă și 5 mM ATC.

V.9 Metode de prelucrare statistică a datelor experimentale

În cadrul analizei statistice s-au utilizat testele Tukey și ANOVA, folosind programul GraphPad Prism 9 (La Jolla California USA). Toate datele video au fost procesate de un computer cu un nucleu Intel i7-5820K la 3,3 GHz și 8 GB de memorie RAM (memorie cu acces aleator). Programul Any-Maze a fost utilizat pentru a colecta și a converti datele de mișcare a peștilor în traiectorii. Deplasarea acestora în acvarii a fost cuantificată separat pentru fiecare lot.

Programul ChemDraw®JS Pro 8.0 a fost utilizat pentru modelarea structurilor chimice prezentate în partea introductivă a tezei. De asemenea, programul OriginLab® 8.5.1 a fost utilizat în interpretarea rezultatelor HPLC. Programul Matlab versiunea 12.0 a fost de un real ajutor în stabilirea parametrilor optimi cu privire la randamentul metodei de extracție prin ultrasunete.

CAPITOLUL VI

REZULTATE OBȚINUTE ȘI DISCUȚII

VI.1 Randamentul de extracție a materialului fungic

VI.1.1 Influența parametrilor de proces în tehnica EU asupra randamentului de extracție și a activității antioxidante prin testele specifice CTP, CTF și DPPH

În literatura de specialitate, multe studii au confirmat că EU prezintă o înaltă eficiență, chiar în condiții de variație a parametrilor de lucru, cu scopul de a se stabili metoda optimă în corelație directă cu proba destinată extracției (Aguiló-Aguayo și colab., 2017; Li și colab., 2016; Rahman și Lamsal, 2021; Valu și colab., 2021).

Astfel, în prezentul studiu s-a observat ca creșterea procentelor de etanol de la 40% la 80% concomitent cu timpul de extracție de la 20 la 45 min a îmbunătățit randamentul de extracție și totodată activitatea antioxidantă a probelor de HE obținute prin aceste variabile.

Conținuturile totale de flavonoizi și polifenoli din HE au fost cuantificate pentru evidențierea potențialului antioxidant al acestei specii fungice. S-a constatat că conținutul total de polifenoli din HE a ajuns la 23,2 mg EAG/g s.u, iar conținutul total de flavonoide a ajuns la 3,26 mg QE/g s.u atunci când s-a utilizat o concentrație de 80% etanol, un timp de extracție de 45 min și un raport solvent-material de 30 mL/g.

VI.2 Randamentul de extracție a materialului vegetal

VI.2.1 Influența parametrilor de proces în tehnica EU asupra randamentului de extracție și activității antioxidante prin testele specifice CTP, CTF și DPPH la specia *Lycopodium selago*

Urmând în detaliu același procedeu de analiză realizat prin intermediul metodologiei suprafeței de răspuns, în această parte a studiului s-a examinat fezabilitatea aceluiași parametrii (concentrația de etanol, timpul de extracție și raportul solvent-material vegetal) de extracție, prin aplicarea ultrasunetelor ca metodă potențială de extracție din specia *Lycopodium selago*.

Datele sunt semnificative și aproape coincid totodată cu datele din cadrul analizei MSR pentru materialul fungic prezentat în subcapitolul precedent.

Acest lucru poate să conducă din nou la ideea că eficiența extracției prin EU este în strânsă legătură cu o concentrație mai ridicată de etanol, alături de un timp de extracție mai îndelungat cu privire la obținerea masei nete de extract liofilizat și activitatea antioxidantă exprimată. Atunci când concentrația de etanol a atins 80%, polaritatea solventului de extracție a fost mai apropiată de polaritatea antioxidantilor, astfel activitățile au atins o valoare maximă.

Astfel, rezultatele sugerează că fenolii și flavonoidele sunt componente importante ale extractelor de LS, iar acest lucru ar putea explica activitatea lor ridicată de îndepărtare a radicalilor. Extractele de LS sunt inhibitori sau agenți de eliminare a radicalilor liberi, acționând probabil ca antioxidanți primari.

VI.3 Rezultatele evaluării activității antioxidante prin testele specifice: FRAP, ABTS, ORAC

În această parte a tezei, s-a efectuat evaluarea activității antioxidante utilizând metode suplimentare asupra extractelor de *Lycopodium selago* și *Hericium erinaceus* care au prezentat valorile cele mai ridicate în analizele efectuate anterior (DPPH, CTP, CTF). Aceste extracte au fost obținute utilizând un raport solvent-material de 30 mL/g, un timp de extracție de 45 de minute și o concentrație a etanolului de 80%.

Rezultatele din acest studiu sunt în concordanță cu raportările făcute de alți autori (Dudonné și colab., 2009; Moniruzzaman și colab., 2012) cu privire la studiul activității antioxidante prin mai multe metode, evidențiind repetabilitate și comparabilitate între ele.

VI.4 Efecte inhibitoare ale acetilcolinesterazei (AChE) și butirilcolinesterazei (BChE) pentru extractele utilizate

Studiul extractelor obținute precedent prin tehnica de EU s-a axat pe evidențierea posibilului rol de inhibare a activității față de acetilcolinesterază și butirilcolinesterază.

În prezent, inhibarea colinesterazei este principalul tratament pentru BA, iar inhibarea AChE și BChE sunt ținte terapeutice pentru ameliorarea deficitului colinergic. În creierul sănătos, AChE este prezentă într-o cantitate mai mare și are rolul principal de a descompune acetilcolina, un neurotransmițător important în transmiterea semnalelor nervoase.

Pe de altă parte, BChE este considerată a juca un rol secundar în reglarea nivelului de acetilcolină din creier.

Ambele enzime sunt implicate în metabolismul acetilcolinei și pot influența funcționarea sistemului nervos central (Pohanka, 2014). Cu toate acestea, activitatea BChE crește progresiv la pacienții cu BA în timp ce activitatea AChE rămâne neschimbată sau scade (Erdogan Orhan și colab., 2011).

VI.5 Rezultatele izolării și purificării prin metoda HPLC/DAD a diterpenoidului erinacine A

În cadrul acestui subcapitol s-a investigat prezența diterpenoidului erinacine A în extractul obținut prin EU care a prezentat cea mai importantă activitate antioxidantă, determinată prin metodele specifice.

Pentru prima dată, s-a investigat diterpenoidului erinacine A în extractul obținut prin EU din biomasa fungică de *Hericium erinaceus* care a fost dezvoltată pe un mediu de cultură solid în condiții controlate. Erinacine A a fost cuantificată prin comparație cu molecula standard.

Timpul de retenție la 17,846 min reprezintă erinacine A, unul dintre cei mai caracteristici compuși care se găsesc în general în speciile de *Hericium* (Tzeng și colab., 2018), conform datelor din literatură, și este de asemenea, responsabil pentru efectele antioxidante ale speciei *Hericium erinaceus*.

VI.6 Rezultatele izolării și purificării prin metoda HPLC/DAD a alcaloidului huperzine A

Metoda de analiză HPLC a fost utilizată pentru a determina huperzine A pe baza condițiilor cromatografice și a elementelor constitutive majore (alcaloizi) din extractul etanolic de *L. selago*. Tehnica de cromatografie a fost utilizată ca metodă de separare, iar DAD a fost folosită ca metodă de identificare.

Precizia metodei a fost determinată prin analizarea unui eșantion de LS și abaterea standard relativă. Curba de calibrare pentru HupA a fost construită prin diagrama de concentrație vs. zona de vârf și a arătat o liniaritate bună în intervalul 5,0–100,0 g/mL. HupA a fost analizată în extractul etanolic prin compararea timpului de retenție cu cel al standardului. Acesta a fost detectat la 14,812 min, fiind bine separat de celelalte vârfuri cromatografice și considerat o componentă majoră în extractul studiat.

Rezultatele obținute evidențiază potențialul puternic al speciei *Lycopodium selago* în ceea ce privește efectele sale antioxidante și neuroprotectoare. Acești compuși prezintă un potențial terapeutic considerabil și sunt obiectul unor cercetări extinse în domeniul dezvoltării tratamentelor pentru diverse afecțiuni. Rezultatele obținute în cadrul acestei cercetări sprijină importanța și relevanța utilizării *L. selago* în contextul dezvoltării de terapii pentru diverse boli, cu accent special pe aspectele neurologice.

Ambele extracte (HE și LS) posedă efecte antioxidante ridicate, evidențiate prin valorile DPPH și CTP. De asemenea, s-a observat că specia vegetală *Lycopodium selago* a evidențiat un conținut total de flavonoizi mai ridicat față de specia fungică *Hericium erinaceus*.

VI.7 Evaluarea *in vivo* a efectelor extractului etanolic de *Hericium erinaceus* asupra neuropatiei Alzheimer induse la peștele zebă

VI.7.1 Rezultatele evaluării efectelor extractului etanolic de *Hericium erinaceus* asupra anxietății în testul NTT

Peștii zebă au fost transvazați individual din acvariul unde au fost plasați în acvariul utilizat pentru testul NTT, cu o manipulare atentă pentru reducerea stresului. Înregistrarea peștilor în cadrul testul NTT a început și a continuat pentru o perioadă de 6 minute.

Comportamentul de imobilitate evidențiat la peștii zebă în testul NTT poate fi utilizat ca un indice al comportamentului de anxietate indus de tratament. Durata totală a tuturor episoadelor de imobilitate indică o anxietate crescută și este, în general mai mare la peștii zebă stresați, conform studiilor raportate (Valu și colab., 2021; Wong și colab., 2010).

În acest studiu, grupul cu SCOP (100 μ M) prezintă diferențe semnificative în comparație cu grupul de control ($p < 0,0001$), care a avut mai puține episoade de imobilitate, acestea fiind raportate în literatură drept episoade de stres (Rahimzadegan și Soodi, 2018).

Comportamentul de imobilitate evidențiat la peștii zebă în testul NTT poate fi utilizat ca o indicație a comportamentului anxios de tip tratament, deoarece loturile care au primit extract de HE au prezentat rezultate apropiate cu lotul IMP legat de perioadele de imobilitate.

Extractele etanolice de HE în dozele de 1 mg/L și 3 mg/L au prevenit în mare măsură hipolocomoția și pierderile de memorie provocate de administrarea SCOP.

Astfel, datele experimentale prezentate indică faptul că extractul etanolic de *H. erinaceus* are o activitate anxiolitică și exercită efecte neuroprotectoare împotriva stresului oxidativ indus de SCOP.

VI.7.2 Evaluarea efectelor extractului etanolic de *Hericium erinaceus* asupra memoriei spațiale și funcției cognitive în testul labirintului Y

Testul labirintului Y pentru evaluarea memoriei la peștii de tip zebă are avantajul de a utiliza o metodă de antrenament simplă și rapidă (Cognato și colab., 2012).

În ceea ce privește distanța totală parcursă a peștilor zebă rezultatele nu sunt semnificative, peștii având aproximativ aceeași distanță parcursă, fără a se determina intensificări semnificative ale activității locomotorii. Pentru studiul comportamental, memoria spațială a fost testată folosind testul Y și s-a evaluat rolul preventiv al modulării semnalizării neuroprotectoare a extractului de HE asupra deficitelor de memorie induse de SCOP la peștii zebă.

Pentru analiza ANOVA, rezultatele sunt $F(5,54)=4,580$, $p=8056$. Durata de timp mai mare petrecută în brațul nou în urma administrării extractului de HE în dozaj de 3 mg/L este un indicator al îmbunătățirii memoriei spațiale de lucru. Peștele zebă a avut un comportament de explorare mai mare către brațul nou, demonstrând astfel că acest lot are o capacitate de învățare mai eficientă în privința memorării brațelor cu indicii vizuali care au fost amplasați.

Peștii zebă expuși la SCOP au explorat mai puțin brațul nou, sugerând deficite în răspunsul la noutate. Mai mult, în timpul testului Y a fost măsurat și alt parametru de comportament, și anume unghiul de rotire/viraj absolut al peștilor zebă, care reprezintă suma tuturor vectorilor unghiului mișcărilor generate de la o poziție a punctului central al animalului la următoarea și cuantificate cu programul Any-maze.

Astfel, valoarea pentru analiza ANOVA a reflectat coeficientul $F(5,54)=10,02$, $p<0,0001$. Prin această valoare se observă că administrarea scopolaminei afectează locomoția peștilor zebă, fapt ce reiese din scăderea unghiului de întoarcere a acestora în timpul sesiunii de înot în acvariul Y.

Prin urmare, lotul cu diferențele cele mai semnificative din punct de vedere statistic a fost cel care a primit extract de HE în 3 mg/L ($p<0,0001$), iar pentru HE cu 1 mg/L valoarea a fost ($p<0,001$).

Comportamentul de învățare și memorie poate fi prezentat prin intermediul mai multor modele experimentale. Astfel, labirintul Y este un dispozitiv util pentru a detecta capacitatea de învățare și memorie a animalelor.

Datorită structurii sale simple și a funcționării convenabile, tot mai multe experimente (Cognato și colab., 2012) pe animale au utilizat acest test pentru a explora învățarea și memoria animalelor.

VI.7.3 Evaluarea efectelor extractului etanolic de *Hericium erinaceus* asupra memoriei de recunoaștere în testul NOR.

Versatilitatea testului NOR oferă o platformă pentru nenumărate aplicații de cercetare. Studiile pot utiliza agenți farmacologici pentru a perturba sau a îmbunătăți memoria. Variația timpului de administrare a medicamentului înainte sau după antrenament sau înainte de testare poate indica mecanismele neuronale care stau la baza perturbării sau îmbunătățirii memoriei (Lueptow, 2017; Magyary, 2019).

În cadrul testului NOR, rezultatul ANOVA a relevat un efect semnificativ al tratamentului asupra procentelor de preferință ($F(5,54)=6,289$, $p<0,0001$). GAL utilizată ca medicament de referință pozitiv a evocat efecte de îmbunătățire a memoriei, lucru observat prin parametrii comportamentali, susținând datele furnizate în cadrul testului Y prezentat precedent. Procentele de preferință au fost determinate ca fiind timpul de explorare a lui N / timpul de explorare a lui F + timpul de explorare a lui N $\times 100$).

Testul NOR a oferit o perspectivă asupra abilităților cognitive ale peștilor și a demonstrat valoarea și contribuția sa importantă în comparațiile făcute între loturile preluate în studiu. La fel ca în cazul șobolanilor și al șoarecilor, peștii zebură, guppy, dar și alți pești au fost capabili să facă distincția între un obiect nou și un obiect familiar, conform raportărilor din literatura de specialitate (Antunes și Biala, 2012; Brinza și colab., 2020; Lueptow, 2017; Stefanello și colab., 2019).

Peștii zebură au fost de asemenea, capabili să evidențieze o memorie de tip episodic, evidențiată prin graficul procentului de preferință prezentat din punct de vedere statistic. Memoria episodică este în general definită ca o recuperare a unei urme de memorie a experienței trecute, care poate fi identificată în funcție de ceea ce s-a întâmplat, contextul în care s-a produs evenimentul și când acesta a avut loc în timp subiectiv (Hamilton și colab., 2016).

Prin datele obținute în urma investigării acțiunii neuroprotective a extractului de *H. erinaceus*, se pot pune în evidență efectele farmacodinamice ale acestui extract activ. Astfel, extractele de HE reduc simptomele pierderii de memorie, conform rezultatelor obținute și prezentate în cadrul testărilor comportamentale.

VI.8 Evaluarea efectelor extractului etanolic de *Hericium erinaceus* asupra statusului oxidativ din țesuturile cerebrale provenite de la modelul de pește zebra afectat de Alzheimer

Deficiența sau funcționarea deficitară a catalazei se presupune că este legată de patogeneza multor boli degenerative asociate vârstei, cum ar fi BA (Dumitru și colab., 2019).

Parametrii biochimici sunt indicatori ai stresului oxidativ (Hritcu și colab., 2009), iar în acest studiu au fost determinați utilizând omogenate celulare provenite de la animalele de laborator cu model de BA indusă de scopolamină și tratate cu soluții de extract etanolic de HE administrat în concentrații de 0,5 mg/mL, 1 mg/mL și 3 mg/mL pentru a evalua potențialul acestor soluții de a contracara efectele induse de speciile reactive de oxigen.

Conform rezultatelor obținute, au fost evidențiate următoarele aspecte: MDA și nivelul proteinelor carbonilate au fost afectate de administrarea extractului de HE la animalele de laborator cu BA. Extractul administrat a indus modificări semnificative statistic, în regiunile hipocampului, în toate cele trei concentrații. La nivelul testului cerebral, creșteri semnificative ale conținutului total de glutathion redus au fost induse de extractul de HE.

În plus, activitatea enzimatică a CAT a fost modulată de administrarea extractelor de *H. erinaceus*, iar activitatea SOD a fost intensificată.

VI.9 Corelații Pearson între parametrii comportamentali și biochimici la specia *H. erinaceus*

Coeficientul de corelație Pearson (r) a fost utilizat pentru a cuantifica asocierea liniară dintre diferite rezultate comportamentale și parametrii biochimici. Rezultatele au arătat că reprezentarea timpului total petrecut în brațul nou în diferite grupuri ($r=-0,7621$, $p<0,001$) măsurat în testul Y și reprezentarea procentelor de preferință în diferite grupuri ($r=-0,8711$, $p<0,001$) determinată în testul de recunoaștere a obiectului nou, se corelează puternic cu MDA, produsul peroxidării lipidelor.

Acest lucru sugerează că îmbunătățirea memoriei peștelui zebra prin administrarea extractului de *H. erinaceus* este bine corelată cu o scădere a nivelului de MDA în hipocamp. Mai mult, s-a corelat, de asemenea AChE și mai multe sisteme de apărare, inclusiv: CAT, GPx, SOD și GSH cu MDA.

De asemenea, rezultatele experimentale provenite din corelația Pearson indică faptul că stimularea proceselor memoriei evaluată prin teste comportamentale specifice este corelată cu

diminuarea stresului oxidativ și a activității acetilcolinesterazei în hipocampus animalelor pretratate cu scopolamină la care s-a administrat extract etanolic de HE.

Studiul actual a fost primul care a investigat o posibilă interacțiune între extractul de HE asupra comportamentului de anxietate și a deficitelor de memorie la peștele zebură.

Rezultatele indică proprietățile medicinale și antioxidante ale materialului fungic de HE, iar compusul erinacine A identificat prin HPLC ar putea fi utilizat pentru tratarea diferitelor boli neurodegenerative ca ingredient funcțional antioxidant.

VI.10 Evaluarea *in vivo* a efectelor extractului etanolic de *Lycopodium selago* asupra neuropatiei Alzheimer induse la peștele zebură

VI.10.1 Evaluarea efectelor extractului etanolic de *Lycopodium selago* asupra anxietății utilizând testul NTT

Continuarea părții experimentale din cadrul prezentei tezei de doctorat s-a axat pe studierea extractului de LS cu privire la modul de manifestare al subiecților animalii în testul NTT.

Administrarea extractului de *L. selago* în toate cele trei doze utilizate în acest studiu (0,5 mg/L, 1 mg/L, 3 mg/L) a avut efecte neurofarmacologice evidente. S-a observat o prelungire a duratei de parcurgere a peștilor în zona superioară a bazinului, iar în același timp s-a înregistrat o creștere a numărului total de intrări în această zonă.

Medicamentele anxiolitice determină peștii zebură să petreacă mai mult timp în zona superioară a bazinului, ceea ce face ca testul NTT efectuat să fie un indicator fiabil al fricii la peștii zebură.

VI.10.2 Rezultatele evaluării efectelor extractului etanolic de *Lycopodium selago* asupra memoriei spațiale și funcției cognitive în testul labirintului Y

Peștii zebură nu au prezentat efecte negative în ceea ce privește comportamentul sau alți indicatori de toxicitate sau mortalitate după ce au primit extract de *L. selago* la trei concentrații diferite, ceea ce înseamnă că dozele de extract nu au fost dăunătoare. Având în vedere aceste aspecte, administrarea extractului de *L. selago* nu ar trebui să provoace simptome adverse.

Conform celor observate, testul Y este dependent de înclinația acestor animale de a investiga fiecare zonă nouă pe care o întâlnesc. Astfel, acest test prezintă descrierea comportamentului animalelor, fiind un test specific și precis de cuantificare a memoriei spațiale la animale.

În prezentul studiu se poate afirma că o doză de 1 mg/L și 3 mg/L de LS poate fi benefică dacă este administrată peștilor zebură cu deficiență cognitivă indusă de SCOP în testul labirintului Y.

Funcția cognitivă este asociată cu o tendință a peștilor zebură de a explora mai mult brațul nou decât alte brațe în cadrul testului Y. Într-adevăr, numărul mai mare de intrări și timpul petrecut în brațul nou sunt indicatori ai funcționării memoriei de lucru spațiale, datorată administrării extractului de LS.

Astfel, peștii zebură au avut un comportament de explorare mai mare la brațul nou, demonstrând încă odată că acești pești au o bună capacitate de învățare în memorarea brațelor cu indicii vizuali.

VI.10.3 Evaluarea efectelor extractului etanolic de *Lycopodium selago* asupra memoriei de recunoaștere în testul NOR.

Testul NOR evaluează memoria pe termen scurt și pe termen lung a peștilor prin intermediul memoriei de recunoaștere (Bhuvanendran și colab., 2018). Testul se bazează pe capacitatea peștilor zebură de a recunoaște un obiect necunoscut atunci când este plasat în zona de interacțiune (Hamilton și colab., 2016).

Parametrul care a fost estimat în acest test efectuat s-a axat pe evidențierea preferinței cu privire la obiectul nou identificat de peștii zebură preluați în studiu. Acest parametru evaluat este evidențiat în procente (%) din timpul total de exprimare.

Au fost utilizate aceleași obiecte, ca și în cazul testării precedente, și anume două cuburi (roșu și verde) pentru evaluarea preferinței din punct de vedere al obiectului familiar și al obiectului nou.

Rezultatele din această parte a studiului au arătat că tratamentul cu 100 μ M de SCOP a scăzut semnificativ ($p < 0,01$) preferința peștilor zebură în comparație cu animalele din grupurile de control și LS (1 mg/L) și LS (3 mg/L), conducând la scoruri mai mici de 50%, sugerând o aversiune relativă față de noul obiect.

Rezultatele experimentale privind extractul de *L. selago* din acest studiu sunt în concordanță cu datele din literatura de specialitate care au arătat că administrarea de extracte

din diferite specii de *Lycopodium* la animale au stimulat semnificativ procesele de memorie, sugerând că aceste specii ar putea fi benefice la pacienții cu deficite de memorie (Bhardwaj și Misra, 2018; Hanif și colab., 2015; Jyoti Biswas și colab., 2014; Kogure și colab., 2016; Li și colab., 2008; Ohba și colab., 2015; Ilkay Orhan și colab., 2007; Wang și colab., 2021; Xi-Can și colab., 1994; Yang și colab., 2010).

În acest studiu, s-a evaluat memoria de recunoaștere și localizarea obiectelor la peștii zebură, precum și influența obișnuinței și a antagonismului SCOP în aceste sarcini. Pe această cale, s-a observat că tratamentul cu extract de LS a afectat memoria de localizare a obiectelor și a avut loc o schimbare a modelului de preferință în recunoașterea obiectelor, dar și în memoria de localizare a acestora din cauza răspunsurilor la stres.

Constatările efectuate pe parcursul derulării experimentelor au demonstrat o preferință pentru obiectul nou în testul NOR, care sunt în concordanță cu studiile anterioare (Dumitru și colab., 2019), unde s-au utilizat forme geometrice simple și perioade de obișnuință repetate.

În privința localizării obiectelor, s-a observat o preferință a animalelor care au primit extract de LS în a explora obiectul nou în comparație cu obiectul familiar în timpul sesiunii de testare. Acest lucru indică faptul că peștii zebură sunt capabili să afișeze o memorie de tip episodic și spațială.

VI.11 Evaluarea efectelor extractului etanolic de *Lycopodium selago* asupra statusului oxidativ din țesuturile cerebrale provenite de la peștele zebură

Această parte a studiului a determinat dacă declinul performanțelor cognitive provocate de administrarea substanței scopolamină este asociat cu indicii modificați ai stresului oxidativ. Numeroase studii experimentale au arătat că scopolamina provoacă stresul oxidativ, blochează acțiunea acetilcolinei în creier și determină scăderea memoriei (Brinza și colab., 2020; Dumitru și colab., 2019). În acest experiment, s-a evaluat dacă extractul de LS are efect asupra activității biologice a AChE în creierul peștilor zebură tratați cu SCOP.

Astfel, efectele extractului de LS administrat în doze diferite asupra stresului oxidativ indus de SCOP în creierul peștelui zebură au fost evaluate prin măsurarea activităților specifice ale enzimelor CAT, SOD, GPx, împreună cu conținutul de GSH, MDA și proteine carbonilate relevante pentru activitatea antioxidantă urmărită.

Analiza biochimică a arătat că administrarea extractului etanolic de *L. selago* (0,5, 1 și 3 mg/L) a condus la o creștere semnificativă a conținutului total de glutatión redus ($p < 0,001$), precum și la o scădere semnificativă a nivelului de proteine carbonilate ($p < 0,001$) și a

nivelului de MDA ($p < 0,01$) în grupurile tratate cu scopolamină, comparativ cu grupurile de control.

În plus, extractul etanolic de *L. selago* are o puternică activitate antiacetilcolinesterazică, sugerând astfel implicarea extractului în îmbunătățirea proceselor cognitive și stimularea sistemului colinergic. Astfel, *L. selago* a demonstrat proprietăți neuroprotectoare prin inhibarea nivelului de MDA, proteine carbonilate și creșterea funcției enzimelor antioxidante endogene (SOD și GPx), sugerând că efectele sale neuroprotectoare se datorează acțiunii sale antioxidante.

Datele experimentale au demonstrat o creștere a activității AChE în urma administrării de scopolamină ($p < 0,0001$) în comparație cu grupul de control, rezultând astfel efecte antiamnezice la peștii tratați cu această substanță neurotoxică.

VI.12 Corelații Pearson între parametrii comportamentali și biochimici la specia *L. selago*

În timp ce au fost interpretate corelațiile Pearson între parametrii biochimici evaluați pentru toate grupurile, s-au observat mai multe corelații semnificative între: timpul în brațul nou vs. MDA: $r = -0,7693$, $p < 0,001$; preferința vs. MDA: $r = -0,7817$, $p < 0,001$; SOD vs. MDA: $r = 0,7478$, $p < 0,01$; CAT vs. MDA: $r = -0,8081$, $p < 0,001$; GPx vs. MDA: $r = -0,8081$, $p < 0,001$; GPx vs. MDA: $r = -0,8081$, $p < 0,001$. MDA: $r = -0,7140$, $p < 0,01$; GSH vs. MDA: $r = -0,5401$, $p < 0,05$; AChE vs. MDA: $r = -0,6455$, $p < 0,01$. Datele experimentale au arătat o scădere a activității SOD, GPx și CAT în urma administrării de scopolamină în comparație cu grupurile de control.

Administrarea extractului etanolic la animalele pretratate cu scopolamină a dus la restabilirea activității enzimelor antioxidante într-o manieră dependentă de doză, comparativ cu grupul tratat doar cu scopolamină, sugerând potențialul antioxidant al extractului etanolic de LS.

Aceste constatări sugerează că stimularea sistemului de apărare antioxidantă de către extractul de LS este bine corelată cu niveluri scăzute de MDA; astfel, acesta intervine în mecanismul neuroprotector.

În plus, s-a constatat că proprietățile antioxidante ale extractului etanolic de LS sunt bine corelate cu îmbunătățirea memoriei și a abilităților anti-AChE într-un model de pește zebra cu BA indusă de scopolamină.

Din datele experimentale prezentate se poate deduce faptul că utilizarea extractului de LS stimulează procesele memoriei pe termen scurt și a memoriei pe termen lung la peștii zebră, efectele fiind semnificative și la doze mai mici (0,5 mg/L și 1 mg/L).

Acest studiu indică faptul că extractul administrat stopează efectele anxiolitice induse de scopolamină la peștele zebră. Mai exact, scopolamina a scăzut timpul pe care peștii zebră l-au petrecut în apropierea obiectului nou în testul NOR, a crescut timpul petrecut în zona inferioară a testului NTT și a scăzut timpul petrecut în brațul nou în timpul testului Y. Toate aceste efecte sunt în concordanță cu medicamentele ce induc stări de degradare a memoriei și care au fost bine stabilite în alte studii pe pești zebră (Karthivashan și colab., 2018).

Astfel, datele au arătat că administrarea unui tratament neurofarmacologic cu extract etanolic de *L. selago* obținut prin extracție cu ultrasunete a prevenit toate tulburările de memorie induse de scopolamină observate în testele de labirint efectuate, dar și în analiza biochimică a țesutului cerebral.

Acest lucru evidențiază efectele antioxidante și neuroprotectoare ale speciei *L. selago* asupra peștilor de tip zebră, demonstrând că acest extract poate îmbunătăți memoria și poate diminua anxietatea prin restabilirea stresului oxidativ cerebral și reglarea activității AchE.

Aspectele menționate sunt evidențiate prin rezultatele statistice care au fost obținute în cadrul determinărilor biochimice. Astfel, s-a remarcat un nivel scăzut de MDA în creierul peștilor zebră tratați cu extract de LS.

Cerințele de bază pentru ca un inhibitor al acetilcolinesterazei să fie util terapeutic în BA sunt biodisponibilitatea mai mare, o selectivitate bună pentru acetilcolinesterază, capacitatea compusului de a pătrunde în SNC și o durată lungă de acțiune (Trang și Khandhar, 2019).

Conform rezultatelor, extractul de LS a prevenit amnezia indusă de SCOP la peștii de tip zebră fără a afecta activitatea locomotorie sau interacțiunea socială a acestora.

CONCLUZII GENERALE

Administrarea extractelor la animalele pretratate cu scopolamină a avut ca rezultat inducerea efectelor anxiolitice și neuroprotective în testele utilizate, lucru care se datorează scăderii nivelului de acetilcolină în creierul peștilor adulți, ducând la efecte neurotrofice.

Extractul etanolic obținut din biomasa speciei *H. erinaceus* și extractul obținut din feriga *L. selago* au evidențiat efecte neuroprotective, raportate prin testele de labirint specifice și prin analizele biochimice efectuate pe țesuturile cerebrale provenite de la peștii zebură utilizați drept model animal al maladiei Alzheimer.

Extracțele obținute din speciile *L. selago* și *H. erinaceus* și studiate pe peștii zebură au prevenit amnezia indusă de scopolamină fără a afecta activitatea locomotorie sau interacțiunea socială, aspecte observate prin testele de labirint specifice.

Prin urmare, extracțele etanolice obținute prin metoda extracției cu ultrasunete ajută la ameliorarea tulburărilor de memorie induse de scopolamină la peștele zebură.

- ✓ Prin extracția cu ultrasunete s-a evidențiat faptul că speciile *L. selago* și *H. erinaceus* au o concentrație ridicată de compuși bioactivi, lucru dovedit prin determinările spectrofotometrice;
- ✓ Totodată, analiza HPLC cuplată cu detector cu șir de diode a evidențiat prezența compușilor bioactivi identificați în extracțele obținute prin ultrasunete;
- ✓ Prin administrarea de scopolamină s-a realizat blocarea receptorilor muscarinici din creier, provocând deficite cognitive la modelele animale de pești zebură prin afectarea memoriei pe termen scurt și lung dar și a comportamentului de anxietate și implicit degradarea funcției cognitive;
- ✓ Administrarea pe termen lung a scopolaminei poate induce, de asemenea, modificări ale activității enzimelor din sistemul antioxidant și indicarea unor efecte toxice ale stresului oxidativ asupra celulelor țesutului cerebral prin mecanismul de reglare a răspunsului inflamator la nivelul neuronilor;

- ✓ Toxicitatea scopolaminei a indus deficiențe cognitive ridicate și modificări comportamentale (anxietate și depresie) la peștii de tip zebură studiați;
- ✓ Administrarea extractului etanolic de *Hericium erinaceus* în doze diferite (0,5 mg/L, 1 mg/L și 3 mg/L) a conferit efecte neuroprotective, comparabile cu rezultatele obținute în cazul loturilor cu scopolamină, astfel observându-se stoparea simptomelor de deteriorare cognitivă;
- ✓ Administrarea extractului etanolic de *Lycopodium selago* în doze diferite (0,5 mg/L, 1 mg/L și 3 mg/L) a indus efecte neuroprotective similare cu cele raportate pentru specia HE;
- ✓ Ambele extracte ce au fost administrate prin imersie peștilor de tip zebură au înregistrat rezultate apropiate de loturile utilizate drept control pozitiv (galantamina și imipramina) în cadrul testărilor efectuate;
- ✓ Administrarea extractelor prin imersie într-un model animal cu boală Alzheimer, a produs efecte antioxidante la nivelul țesutului cerebral care pot diminua efectele pro-oxidante modulate de administrarea scopolaminei.

Rezultatele obținute în prezenta teză de doctorat pot ajuta la formularea unui posibil tratament bazat pe aceste extracte. De asemenea, prin studii suplimentare aceste extracte pot fi testate mai departe în studii clinice, deoarece nu au prezentat toxicitate metabolică în dozajul administrat peștilor de tip zebură. Ca atare, sunt necesare mai multe cercetări științifice pentru a studia posibila eficacitate a acestor extracte și asupra subiecților umani.

Pe baza rezultatelor experimentale se pot evidenția următoarele aspecte:

- ❖ Pentru prima dată, s-a obținut extract etanolic din biomasa speciei *H. erinaceus* și a fost analizat efectul acestuia de ameliorare a maladiei Alzheimer induse modelului animal de pește zebură;
- ❖ Pentru prima dată, au fost investigate efectele extractului etanolic de *L. selago* asupra modelului de boală Alzheimer indusă de scopolamină la peștele zebură.

- Deoarece experimentele s-au efectuat utilizând modele animale, oricare dintre rezultatele prezentate trebuie tratate cu precauție, întrucât ele nu evidențiază decât anumite aspecte ale unei patologii foarte complexe;
- Astfel, extractele de *Hericium erinaceus* și *Lycopodium selago* utilizate în experimentele prezentate trebuie considerate ca un punct de plecare în formularea unui tratament alternativ împotriva neuropatiei de tip Alzheimer.

Pentru ca obiectivele utilizării acestor specii în terapia bolii Alzheimer să fie atinse, sunt necesare investigații suplimentare. Astfel, viitoarele activități științifice și de cercetare vor avea ca direcție principală de dezvoltare dobândirea de noi competențe necesare izolării compușilor biologic activi prin diferite metode de extracție, cum ar fi: extracția asistată de microunde, extracția cu fluid supercritic sau extracția Soxhlet.

De asemenea, se vor putea efectua experimente de optimizare a procedurilor de extracție din alte resurse vegetale și fungice cu potențial antioxidant ridicat dar și studii legate de siguranța administrării acestor produse la pacienții umani.

Bibliografie selectivă

1. Abubakar, A. R., și Haque, M. **2020**. Preparation of medicinal plants: Basic extraction and fractionation procedures for experimental purposes. In *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences* (Vol. 12, Issue 1, pp. 1–10).
2. Aguiló-Aguayo, I., Walton, J., Viñas, I., și Tiwari, B. K. **2017**. Ultrasound assisted extraction of polysaccharides from mushroom by-products. *LWT*, 77, 92–99.
3. Alexandrov, Y. I., și Pletnikov, M. V. **2022**. Neuronal metabolism in learning and memory: The anticipatory activity perspective. In *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* (Vol. 137).
4. Antunes, M., și Biala, G. **2012**. The novel object recognition memory: Neurobiology, test procedure, and its modifications. In *Cognitive Processing* (Vol. 13, Issue 2, pp. 93–110).
5. Arab, L., și Sabbagh, M. N. **2010**. Are certain lifestyle habits associated with lower Alzheimer's disease risk? In *Journal of Alzheimer's Disease* (Vol. 20, Issue 3, pp. 785).
6. Aver, W. A., și Trifonov, L. S. **1994**. Lycopodium Alkaloids. *Alkaloids: Chemistry and Pharmacology*, 45(C), 233–266.
7. Bailey, J. M., Oliveri, A. N., și Levin, E. D. **2015**. Pharmacological analyses of learning and memory in zebrafish (*Danio rerio*). In *Pharmacology Biochemistry and Behavior* (Vol. 139, Issue 00, pp. 103–111).
8. Bhardwaj, A., și Misra, K. **2018**. Homeopathic Remedies. In *Management of High Altitude Pathophysiology* (pp. 217–229).
9. Bhuvanendran, S., Kumari, Y., Othman, I., și Shaikh, M. F. **2018**. Amelioration of cognitive deficit by embelin in a scopolamine-induced Alzheimer's disease-like condition in a rat model. *Frontiers in Pharmacology*, 9(JUN), 665.
10. Bimakr, M., Ganjloo, A., Zarringhalami, S., și Ansarian, E. **2017**. Ultrasound-assisted extraction of bioactive compounds from *Malva sylvestris* leaves and its comparison with agitated bed extraction technique. *Food Science and Biotechnology*, 26(6), 1481–1490.
11. Boiangiu, R. S., Mihasan, M., Gorgan, D. L., Stache, B. A., Petre, B. A., și Hritcu, L. **2020**. Cotinine and 6-hydroxy-l-nicotine reverses memory deficits and reduces oxidative stress in $\text{A}\beta_{25-35}$ -induced rat model of Alzheimer's disease. *Antioxidants*, 9(8), 1–29.
12. Borloz, A., Marston, A., și Hostettmann, K. **2006**. The determination of huperzine A in European Lycopodiaceae species by HPLC-UV-MS. *Phytochemical Analysis*, 17(5), 332–336.

13. Brinza, I., Abd-Alkhalek, A. M., El-Raey, M. A., Boianuiu, R. S., Eldahshan, O. A., și Hritcu, L. **2020**. Ameliorative effects of rhoifolin in scopolamine-induced amnesic zebrafish (*Danio rerio*) model. *Antioxidants*, 9(7), 1–14.
14. Calderón, A. I., Simithy-Williams, J., Sanchez, R., Espinosa, A., Valdespino, I., și Gupta, M. P. **2013**. Lycopodiaceae from panama: A new source of acetylcholinesterase inhibitors. *Natural Product Research*, 27(4–5), 500–505.
15. Chemat, F., Rombaut, N., Sicaire, A. G., Meullemiestre, A., Fabiano-Tixier, A. S., și Abert-Vian, M. **2017**. Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. In *Ultrasonics Sonochemistry* (Vol. 34, pp. 540–560).
16. Cognato, G. de P., Bortolotto, J. W., Blazina, A. R., Christoff, R. R., Lara, D. R., Vianna, M. R., și Bonan, C. D. **2012**. Y-Maze memory task in zebrafish (*Danio rerio*): The role of glutamatergic and cholinergic systems on the acquisition and consolidation periods. *Neurobiology of Learning and Memory*, 98(4), 321–328.
17. Dudonné, S., Vitrac, X., Coutière, P., Woillez, M., și Mérillon, J. M. **2009**. Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(5), 1768–1774.
18. Dumitru, G., El-Nashar, H. A. S., Mostafa, N. M., Eldahshan, O. A., Boianuiu, R. S., Todirascu-Ciornea, E., Hritcu, L., și Singab, A. N. B. **2019**. Agathisflavone isolated from *Schinus polygamus* (Cav.) Cabrera leaves prevents scopolamine-induced memory impairment and brain oxidative stress in zebrafish (*Danio rerio*). *Phytomedicine*, 58, 152889.
19. Duong, S., Patel, T., și Chang, F. **2017**. Dementia: What pharmacists need to know. *Canadian Pharmacists Journal*, 150(2), 118–129.
20. Dzah, C. S., Duan, Y., Zhang, H., Wen, C., Zhang, J., Chen, G., și Ma, H. **2020**. The effects of ultrasound assisted extraction on yield, antioxidant, anticancer and antimicrobial activity of polyphenol extracts: A review. In *Food Bioscience* (Vol. 35, p. 100547).
21. Erdogan Orhan, I., Orhan, G., și Gurkas, E. **2011**. An Overview on Natural Cholinesterase Inhibitors - A Multi-Targeted Drug Class - and Their Mass Production. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 11(10), 836–842.
22. Falkowska, A., Gutowska, I., Goschorska, M., Nowacki, P., Chlubek, D., și Baranowska-Bosiacka, I. **2015**. Energy metabolism of the brain, including the cooperation between astrocytes and neurons, especially in the context of glycogen metabolism. In *International*

Journal of Molecular Sciences (Vol. 16, Issue 11, pp. 25959–25981).

23. Fernandes, R. P. P., Trindade, M. A., Tonin, F. G., Lima, C. G., Pugine, S. M. P., Munekata, P. E. S., Lorenzo, J. M., și de Melo, M. P. **2016**. Evaluation of antioxidant capacity of 13 plant extracts by three different methods: cluster analyses applied for selection of the natural extracts with higher antioxidant capacity to replace synthetic antioxidant in lamb burgers. *Journal of Food Science and Technology*, 53(1), 451–460.
24. Ferreira, A., Rodrigues, M., Fortuna, A., Falcão, A., și Alves, G. **2016**. Huperzine A from *Huperzia serrata*: a review of its sources, chemistry, pharmacology and toxicology. In *Phytochemistry Reviews* (Vol. 15, Issue 1, pp. 51–85).
25. Go, A. S., Mozaffarian, D., Roger, V. L., Benjamin, E. J., Berry, J. D., Blaha, M. J., Dai, S., Ford, E. S., Fox, C. S., Franco, S., Fullerton, H. J., Gillespie, C., Hailpern, S. M., Heit, J. A., Howard, V. J., Huffman, M. D., Judd, S. E., Kissela, B. M., Kittner, S. J., ... Turner, M. B. **2014**. Heart Disease and Stroke Statistics - 2014 Update: A report from the American Heart Association. In *Circulation* (Vol. 129, Issue 3, p. e28).
26. Gorjanović, S. Ž., Alvarez-Suarez, J. M., Novaković, M. M., Pastor, F. T., Pezo, L., Battino, M., și Sužnjević, D. Ž. **2013**. Comparative analysis of antioxidant activity of honey of different floral sources using recently developed polarographic and various spectrophotometric assays. *Journal of Food Composition and Analysis*, 30(1), 13–18.
27. Gravato, C., Abe, F. R., Oliveira, D. P. de, Soares, A. M. V. M., și Domingues, I. **2021**. Acetylcholinesterase (AChE) Activity in Embryos of Zebrafish. *Methods in Molecular Biology*, 2240, 119–124.
28. Guðmundsdóttir, M. 2020. Alkaloid quantitation and chemical fingerprinting of Icelandic *Huperzia selago* genotypes using HPLC-UV and UPLC-QToF-MS. *Biochemical Systematics and Ecology*, 83, pp.77-82.
29. Gulcin, İ. **2020**. Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview. In *Archives of Toxicology* (Vol. 94, Issue 3, pp. 651–715).
30. Hamilton, T. J., Myggland, A., Duperreault, E., May, Z., Gallup, J., Powell, R. A., Schalomon, M., și Digweed, S. M. **2016**. Episodic-like memory in zebrafish. *Animal Cognition*, 19(6), 1071–1079.
31. Hanif, K., Kumar, M., Singh, N., și Shukla, R. **2015**. Effect of homeopathic *Lycopodium clavatum* on memory functions and cerebral blood flow in memory-impaired rats. *Homeopathy*, 104(1), 24–28.
32. Hippus, H., și Neundörfer, G. **2003**. The discovery of Alzheimer's disease. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 5(1), 101–108.

33. Howe, K., Clark, M. D., Torroja, C. F., Torrance, J., Berthelot, C., Muffato, M., Collins, J. E., Humphray, S., McLaren, K., Matthews, L., McLaren, S., Sealy, I., Caccamo, M., Churcher, C., Scott, C., Barrett, J. C., Koch, R., Rauch, G. J., White, S., ... Stemple, D. L. **2013.** The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*, 496(7446), 498–503.
34. Hritcu, L., Ciobica, A., și Gorgan, L. **2009.** Nicotine-induced memory impairment by increasing brain oxidative stress. *Central European Journal of Biology*, 4(3), 335–342.
35. Ito, F., Sono, Y., și Ito, T. **2019.** Measurement and clinical significance of lipid peroxidation as a biomarker of oxidative stress: Oxidative stress in diabetes, atherosclerosis, and chronic inflammation. *Antioxidants*, 8(3).
36. Jyoti Biswas, S., Banerjee, J., Biswas, S., Ranjan Madhu, N., Roy Karmakar, S., Jyoti Biswas Assistant Professor, S., Jyoti Biswas, S., și Jyoti Biswas Assistant Professor, S. **2014.** A better understanding of pharmacological activities and uses of phytochemicals of *Lycopodium clavatum*: A review. 3(1), 207–210.
37. Karthivashan, G., Park, S. Y., Kweon, M. H., Kim, J., Haque, M. E., Cho, D. Y., Kim, I. S., Cho, E. A., Ganesan, P., și Choi, D. K. **2018.** Ameliorative potential of desalted *Salicornia europaea* L. extract in multifaceted Alzheimer's-like scopolamine-induced amnesic mice model. *Scientific Reports*, 8(1), 8826.
38. Kobayashi, J., și Morita, H. **2005.** The Lycopodium Alkaloids. *Alkaloids: Chemistry and Biology*, 61(05), 1–57.
39. Kobus, Z., Buczaj, A., Pecyna, A., Kapica, J., Findura, P., și Kocira, S. **2023.** Application of Response Surface Method in Pulsed Ultrasound-Assisted Extraction of Complex Plant Materials—A Case Study on *Cannabis sativa* L. *Applied Sciences (Switzerland)*, 13(2), 760.
40. Kogure, N., Maruyama, M., Wongseripipatana, S., Kitajima, M., și Takayama, H. **2016.** New lycopodine-type alkaloids from *Lycopodium carinatum*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 64(7), 793–799.
41. Kunca, V., și Čiliak, M. **2017.** Habitat preferences of *Herichium erinaceus* in Slovakia. *Fungal Ecology*, 27, 189–192.
42. Lacave, J. M., Vicario-Parés, U., Bilbao, E., Gilliland, D., Mura, F., Dini, L., Cajaraville, M. P., și Orbea, A. **2018.** Waterborne exposure of adult zebrafish to silver nanoparticles and to ionic silver results in differential silver accumulation and effects at cellular and molecular levels. *Science of the Total Environment*, 642, 1209–1220.
43. Lanctôt, K. L., Amatniek, J., Ancoli-Israel, S., Arnold, S. E., Ballard, C., Cohen-

- Mansfield, J., Ismail, Z., Lyketsos, C., Miller, D. S., Musiek, E., Osorio, R. S., Rosenberg, P. B., Satlin, A., Steffens, D., Tariot, P., Bain, L. J., Carrillo, M. C., Hendrix, J. A., Jurgens, H., și Boot, B. **2017**. Neuropsychiatric signs and symptoms of Alzheimer's disease: New treatment paradigms. In *Alzheimer's and Dementia: Translational Research and Clinical Interventions* (Vol. 3, Issue 3, pp. 440–449).
44. Levin, E. D. **2011**. Zebrafish assessment of cognitive improvement and anxiolysis: Filling the gap between in vitro and rodent models for drug development. *Reviews in the Neurosciences*, 22(1), 75–84.
 45. Li, H. Z., Zhang, Z. J., Xue, J., Cui, L. X., Hou, T. Y., Li, X. J., și Chen, T. **2016**. Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds, antioxidants and rosmarinic acid from perilla leaves using response surface methodology. *Food Science and Technology*, 36(4), 686–693.
 46. Li, I. C., Lee, L. Y., Tzeng, T. T., Chen, W. P., Chen, Y. P., Shiao, Y. J., și Chen, C. C. **2018**. Neurohealth Properties of *Herichium erinaceus* Mycelia Enriched with Erinacines. In *Behavioural Neurology* (Vol. 2018).
 47. Li, J., Wu, H. M., Zhou, R. L., Liu, G. J., și Dong, B. R. **2008**. Huperzine A for Alzheimer's disease. In *Cochrane Database of Systematic Reviews* (Issue 2).
 48. Little, J. T., Walsh, S., și Aisen, P. S. **2008**. An update on huperzine A as a treatment for Alzheimer's disease. In *Expert Opinion on Investigational Drugs* (Vol. 17, Issue 2, pp. 209–215).
 49. Lu, Q. Q., Tian, J. M., Wei, J., și Gao, J. M. **2014**. Bioactive metabolites from the mycelia of the basidiomycete *Herichium erinaceum*. *Natural Product Research*, 28(16), 1288–1292.
 50. Lueptow, L. M. **2017**. Novel object recognition test for the investigation of learning and memory in mice. *Journal of Visualized Experiments*, 2017(126), 55718.
 51. Lykkesfeldt, J. **2007**. Malondialdehyde as biomarker of oxidative damage to lipids caused by smoking. In *Clinica Chimica Acta* (Vol. 380, Issues 1–2, pp. 50–58). Clin Chim Acta.
 52. Ma, X., și Gang, D. R. **2004**. The *Lycopodium* alkaloids. In *Natural Product Reports* (Vol. 21, Issue 6, pp. 752–772).
 53. Magyary, I. **2019**. Floating novel object recognition in adult zebrafish: a pilot study. *Cognitive Processing*, 20(3), 359–362.
 54. Martins, T., Valentim, A. M., Pereira, N., și Antunes, L. M. **2016**. Anaesthesia and analgesia in laboratory adult zebrafish: A question of refinement. *Laboratory Animals*, 50(6), 476–488.
 55. Massarsky, A., Kozal, J. S., și Di Giulio, R. T. **2017**. Glutathione and zebrafish: Old

- assays to address a current issue. *Chemosphere*, 168, 707–715.
56. Molnar, A., Lakat, T., Hosszu, A., Szebeni, B., Balogh, A., Orfi, L., Szabo, A. J., Fekete, A., și Hodrea, J. **2021**. Lyophilization and homogenization of biological samples improves reproducibility and reduces standard deviation in molecular biology techniques. *Amino Acids*, 53(6), 917–928.
 57. Moniruzzaman, M., Khalil, M. I., Sulaiman, S. A., și Gan, S. H. **2012**. Advances in the analytical methods for determining the antioxidant properties of honey: A review. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 9(1), 36.
 58. Mori, K., Obara, Y., Hirota, M., Azumi, Y., Kinugasa, S., Inatomi, S., și Nakahata, N. **2008**. Nerve growth factor-inducing activity of *Herichium erinaceus* in 1321N1 human astrocytoma cells. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 31(9), 1727–1732.
 59. Morley, J. E., Farr, S. A., și Nguyen, A. D. **2018**. Alzheimer Disease. In *Clinics in Geriatric Medicine* (Vol. 34, Issue 4, pp. 591–601).
 60. Müller, T. E., Nunes, M. E., Menezes, C. C., Marins, A. T., Leitemperger, J., Gressler, A. C. L., Carvalho, F. B., de Freitas, C. M., Quadros, V. A., Fachinetto, R., Rosemberg, D. B., și Loro, V. L. **2018**. Sodium Selenite Prevents Paraquat-Induced Neurotoxicity in Zebrafish. *Molecular Neurobiology*, 55(3), 1928–1941.
 61. Nilsson, J., Pillai, D., Önning, G., Persson, C., Nilsson, Å., și Åkesson, B. **2005**. Comparison of the 2,2'-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) methods to assess the total antioxidant capacity in extracts of fruit and vegetables. *Molecular Nutrition and Food Research*, 49(3), 239–246.
 62. Ohba, T., Yoshino, Y., Ishisaka, M., Abe, N., Tsuruma, K., Shimazawa, M., Oyama, M., Tabira, T., și Hara, H. **2015**. Japanese *Huperzia serrata* extract and the constituent, huperzine A, ameliorate the scopolamine-induced cognitive impairment in mice. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 79(11), 1838–1844.
 63. Orhan, I., Şener, B., Choudhary, M. I., și Khalid, A. **2004**. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory activity of some Turkish medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 91(1), 57–60.
 64. Orhan, Ilkay, Özçelik, B., Aslan, S., Kartal, M., Karaoglu, T., Şener, B., Terzioğlu, S., și Choudhary, M. I. **2007**. Antioxidant and antimicrobial actions of the clubmoss *Lycopodium clavatum* L. *Phytochemistry Reviews*, 6(1), 189–196.
 65. Ozgen, M., Reese, R. N., Tulio, A. Z., Scheerens, J. C., și Miller, A. R. **2006**. Modified 2,2'-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) method to measure antioxidant capacity of selected small fruits and comparison to ferric reducing antioxidant

- power (FRAP) and 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(4), 1151–1157.
66. Performance, R. **2006**. Tropical and Subtropical Agroecosystems. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 1(6), 117–122.
 67. Petre, M., Pătrulescu, F., și Teodorescu, R. I. **2016**. Controlled Cultivation of Mushrooms on Winery and Vineyard Wastes. In *Mushroom Biotechnology: Developments and Applications* (pp. 31–47).
 68. Pohanka, M. **2014**. Inhibitors of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase meet immunity. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 15, 6, pp. 9809–9825).
 69. Qian, Z. M., și Ke, Y. **2014**. Huperzine A: Is it an effective disease-modifying drug for Alzheimer's disease? In *Frontiers in Aging Neuroscience* (Vol. 6, Issue AUG, p. 216).
 70. Quadros, V. A., Rosa, L. V., Costa, F. V., Müller, T. E., Stefanello, F. V., Loro, V. L., și Rosemberg, D. B. **2019**. Involvement of anxiety-like behaviors and brain oxidative stress in the chronic effects of alarm reaction in zebrafish populations. *Neurochemistry International*, 129, 104488.
 71. Quintero Quiroz, J., Naranjo Duran, A. M., Silva Garcia, M., Ciro Gomez, G. L., și Rojas Camargo, J. J. **2019**. Ultrasound-assisted extraction of bioactive compounds from annatto seeds, evaluation of their antimicrobial and antioxidant activity, and identification of main compounds by LC/ESI-MS analysis. *International Journal of Food Science*, 2019.
 72. Rahimzadegan, M., și Soodi, M. **2018**. Comparison of memory impairment and oxidative stress following single or repeated doses administration of scopolamine in rat hippocampus. *Basic and Clinical Neuroscience*, 9(1), 5–14.
 73. Rahman, M. M., și Lamsal, B. P. **2021**. Ultrasound-assisted extraction and modification of plant-based proteins: Impact on physicochemical, functional, and nutritional properties. In *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* (Vol. 20, Issue 2, pp. 1457–1480).
 74. Razygraev, A. V., Yushina, A. D., și Titovich, I. A. **2018**. A Method of Measuring Glutathione Peroxidase Activity in Murine Brain in Pharmacological Experiments. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 165(2), 292–295.
 75. Richetti, S. K., Rosemberg, D. B., Ventura-Lima, J., Monserrat, J. M., Bogo, M. R., și Bonan, C. D. **2011**. Acetylcholinesterase activity and antioxidant capacity of zebrafish brain is altered by heavy metal exposure. *NeuroToxicology*, 32(1), 116–122.
 76. Rubio, C. P., Hernández-Ruiz, J., Martinez-Subiela, S., Tvarijonaviciute, A., și Ceron, J. J. **2016**. Spectrophotometric assays for total antioxidant capacity (TAC) in dog serum: An

- update. *BMC Veterinary Research*, 12(1), 1–7.
77. Sánchez-Rangel, J. C., Benavides, J., Heredia, J. B., Cisneros-Zevallos, L., și Jacobo-Velázquez, D. A. **2013**. The Folin-Ciocalteu assay revisited: Improvement of its specificity for total phenolic content determination. *Analytical Methods*, 5(21), 5990–5999.
 78. Saraceno, C., Musardo, S., Marcello, E., Pelucchi, S., și Di Luca, M. **2013**. Modeling Alzheimer's disease: From past to future. In *Frontiers in Pharmacology: Vol. 4 JUN* (p. 77).
 79. Schwartz, B., și Hadar, Y. **2014**. Possible mechanisms of action of mushroom-derived glucans on inflammatory bowel disease and associated cancer. *Annals of Translational Medicine*, 2(2).
 80. Serrano-Pozo, A., Frosch, M. P., Masliah, E., și Hyman, B. T. **2011**. Neuropathological alterations in Alzheimer disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 1(1).
 81. Shen, T., Morlock, G., și Zorn, H. **2015**. Production of cyathane type secondary metabolites by submerged cultures of *Herichium erinaceus* and evaluation of their antibacterial activity by direct bioautography. *Fungal Biology and Biotechnology*, 2(1).
 82. Sinha, A. K. **1972**. Colorimetric assay of catalase. *Analytical Biochemistry*, 47(2), 389–394.
 83. Stefanello, F. V., Fontana, B. D., Ziani, P. R., Müller, T. E., Mezzomo, N. J., și Rosemberg, D. B. **2019**. Exploring Object Discrimination in Zebrafish: Behavioral Performance and Scopolamine-Induced Cognitive Deficits at Different Retention Intervals. *Zebrafish*, 16(4), 370–378.
 84. Suh, G. H., și Shah, A. **2001**. A review of the epidemiological transition in dementia - Cross-national comparisons of the indices related to Alzheimer's disease and vascular dementia. In *Acta Psychiatrica Scandinavica* (Vol. 104, Issue 1, pp. 4–11).
 85. Szypuła, W., Kiss, A., Pietrosiuk, A., Świst, M., Danikiewicz, W., și Olszowska, O. **2011**. Determination of huperzine a in *Huperzia selago* plants from wild population and obtained in in vitro culture by high-performance liquid chromatography using a chaotropic mobile phase. *Acta Chromatographica*, 23(2), 339–352.
 86. Tchessalov, S., Latshaw, D., Nulu, S., Bentley, M., Tharp, T., Ewan, S., și Chen, X. **2021**. Application of First Principles Primary Drying Model to Lyophilization Process Design and Transfer: Case Studies From the Industry. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 110(2), 968–981.
 87. Thawkar, B. S., și Kaur, G. **2021**. Zebrafish as a Promising Tool for Modeling

- Neurotoxin-Induced Alzheimer's Disease. In *Neurotoxicity Research*, Vol. 39, 3, 949–965
88. Thiratmatrakul, S., Yenjai, C., Waiwut, P., Vajragupta, O., Reubroycharoen, P., Tohda, M., și Boonyarat, C. **2014**. Synthesis, biological evaluation and molecular modeling study of novel tacrine-carbazole hybrids as potential multifunctional agents for the treatment of Alzheimer's disease. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 75, 21–30.
 89. Thongbai, B., Rapior, S., Hyde, K. D., Wittstein, K., și Stadler, M. **2015**. *Herichium erinaceus*, an amazing medicinal mushroom. In *Mycological Progress* (Vol. 14, Issue 10, pp. 1–23).
 90. Tönnies, E., și Trushina, E. **2017**. Oxidative Stress, Synaptic Dysfunction, and Alzheimer's Disease. In *Journal of Alzheimer's Disease*, 57, 4: 1105–1121.
 91. Trang, A., și Khandhar, P. B. **2019**. Physiology, Acetylcholinesterase. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.
 92. Tung, B. T., Hai, N. T., și Thu, D. K. **2017**. Antioxidant and acetylcholinesterase inhibitory activities in vitro of different fraction of *Huperzia squarrosa* (Forst.) Trevis extract and attenuation of scopolamine-induced cognitive impairment in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 198, 24–32.
 93. Tzeng, T. T., Chen, C. C., Chen, C. C., Tsay, H. J., Lee, L. Y., Chen, W. P., Shen, C. C., și Shiao, Y. J. **2018**. The cyanthin diterpenoid and sesterterpene constituents of *herichium erinaceus* mycelium ameliorate Alzheimer's disease-related pathologies in APP/PS1 transgenic mice. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(2).
 94. Valu, M. V., Ducu, C., Moga, S., Negrea, D., Hritcu, L., Boiangiu, R. S., Vamanu, E., Balseanu, T. A., Carradori, S., și Soare, L. C. **2021**. Effects of the hydroethanolic extract of *lycopodium selago* l. On scopolamine-induced memory deficits in zebrafish. *Pharmaceuticals*, 14(6), 568.
 95. Valu, M. V., Soare, L. C., Ducu, C., Moga, S., Negrea, D., Vamanu, E., Balseanu, T. A., Carradori, S., Hritcu, L., și Boiangiu, R. S. **2021**. *Herichium erinaceus* (Bull.) pers. ethanolic extract with antioxidant properties on scopolamine-induced memory deficits in a zebrafish model of cognitive impairment. *Journal of Fungi*, 7(6), 477.
 96. Valverde, M. E., Hernández-Pérez, T., și Paredes-López, O. **2015**. Edible mushrooms: Improving human health and promoting quality life. In *International Journal of Microbiology* (Vol. 2015).
 97. Vaynman, S., și Gomez-Pinilla, F. **2006**. Revenge of the “sit”: How lifestyle impacts neuronal and cognitive health through molecular systems that interface energy metabolism with neuronal plasticity. In *Journal of Neuroscience Research*, 84, 4:699–715.

98. Vaz, R., Hofmeister, W., și Lindstrand, A. **2019**. Zebrafish models of neurodevelopmental disorders: Limitations and benefits of current tools and techniques. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 20, Issue 6, p. 1296).
99. Veeresham, P. (Dr. . C. **2012**. Natural products derived from plants as a source of drugs. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology și Research*, 3(4), 200.
100. Wallace, C. K., Bright, L. A., Marx, J. O., Andersen, R. P., Mullins, M. C., și Carty, A. J. **2018**. Effectiveness of Rapid Cooling as a Method of Euthanasia for Young Zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 57(1), 58–63.
101. Wang, B., Guan, C., și Fu, Q. **2021**. The traditional uses, secondary metabolites, and pharmacology of Lycopodium species. In *Phytochemistry Reviews* (pp. 1–79).
102. Wang, L., Tian, Y., Chen, Z., și Chen, J. **2021**. Effects of *Hericium erinaceus* powder on the digestion, gelatinization of starch, and quality characteristics of Chinese noodles. *Cereal Chemistry*, 98(3), 482–491.
103. Watts, M. E., Pocock, R., și Claudianos, C. **2018**. Brain energy and oxygen metabolism: Emerging role in normal function and disease. In *Frontiers in Molecular Neuroscience* (Vol. 11, p. 216).
104. Weremfo, A., Abassah-Oppong, S., Adulley, F., Dabie, K., și Seidu-Larry, S. **2023**. Response surface methodology as a tool to optimize the extraction of bioactive compounds from plant sources. In *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 103, 1:26–36.
105. Winterbourn, C. C., Hawkins, R. E., Brian, M., și Carrell, R. W. **1975**. *The estimation of red cell superoxide dismutase activity*. The Journal of Laboratory and Clinical Medicine.
106. Wong, K., Elegante, M., Bartels, B., Elkhayat, S., Tien, D., Roy, S., Goodspeed, J., Suci, C., Tan, J., Grimes, C., Chung, A., Rosenberg, M., Gaikwad, S., Denmark, A., Jackson, A., Kadri, F., Chung, K. M., Stewart, A., Gilder, T., ... Kalueff, A. V. **2010**. Analyzing habituation responses to novelty in zebrafish (*Danio rerio*). *Behavioural Brain Research*, 208(2), 450–457.
107. Xi-Can, T., Kindel, G. H., Kozikowski, A. P., și Hanin, I. **1994**. Comparison of the effects of natural and synthetic huperzine-A on rat brain cholinergic function in vitro and in vivo. *Journal of Ethnopharmacology*, 44(3), 147–155.
108. Yang, Q. P., Kou, X. L., Fugal, K. B., și McLaughlin, J. L. **2003**. Determination of huperzine A in formulated products by reversed-phase-liquid chromatography using diode

- array and electrospray ionization mass spectrometric detection. *Phytomedicine*, 10(2–3), 200–205.
109. Yang, Y. F., Qu, S. J., Xiao, K., Jiang, S. H., Tan, J. J., Tan, C. H., și Zhu, D. Y. **2010**. Lycopodium alkaloids from *Huperzia serrata*. *Journal of Asian Natural Products Research*, 12(11), 1005–1009.
110. Zhang, C. C., Yin, X., Cao, C. Y., Wei, J., Zhang, Q., și Gao, J. M. **2015**. Chemical constituents from *Herichium erinaceus* and their ability to stimulate NGF-mediated neurite outgrowth on PC12 cells. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 25(22), 5078–5082.
111. Zhang, X. Y., Yang, Z. L., Lu, G. M., Yang, G. F., și Zhang, L. J. **2017**. PET/MR imaging: New frontier in Alzheimer's disease and other dementias. In *Frontiers in Molecular Neuroscience* (Vol. 10, p. 343).
112. Zhu, Y., Carvey, P. M., și Ling, Z. **2006**. Age-related changes in glutathione and glutathione-related enzymes in rat brain. *Brain Research*, 1090(1), 35–44.

**Articole publicate in extenso din tema tezei de doctorat
în jurnale științifice cotate ISI in zona roșie (Q1)**

1. **Valu, M.V.**, Ducu, C., Moga, S., Negrea, D., Hritcu, L., Boiangiu, R.S., Vamanu, E., Balseanu, T.A., Carradori, S., și Soare, L.C. **2021**. Effects of the Hydroethanolic Extract of *Lycopodium selago* L. on Scopolamine-Induced Memory Deficits in Zebrafish. *Pharmaceuticals*, 14(6), p.568. **(IF = 5, 863)**;
2. **Valu, M.V.**, Soare, L.C., Ducu, C., Moga, S., Negrea, D., Vamanu, E., Balseanu, T.A., Carradori, S., Hritcu, L., și Boiangiu, R.S. **2021**. *Hericium erinaceus* (Bull.) Pers. Ethanolic Extract with Antioxidant Properties on Scopolamine-Induced Memory Deficits in a Zebrafish Model of Cognitive Impairment. *Journal of Fungi*, 7(6), p.477. **(IF = 6, 413)**;
3. **Valu, M.V.**, Soare, L.C., Sutan, N.A., Ducu, C., Moga, S., Hritcu, L., Boiangiu, R.S., Carradori, S. **2020**. Optimization of Ultrasonic Extraction to Obtain Erinacine A and Polyphenols with Antioxidant Activity from the Fungal Biomass of *Hericium erinaceus*. *Foods*, 9(12), 1889. **(IF = 5, 940)**.

A. Lucrări publicate în reviste indexate și cotate ISI

- Ionita, R., **Valu, M.V.**, Postu, P.A., Cioanca, O., Hritcu, L., și Mihasan, M. **2017**. 6-hydroxy-L-nicotine effects on anxiety and depression in a rat model of chlorisondamine. *Revista Farmacia*, 65(2), 237–240. **(IF 1, 433)**.

B. Lucrări publicate în reviste indexate BDI

- Hritcu, L., Ionita, R., Postu, P.A., **Valu, M.V.**, Stefan, M., și Mihasan, M. **2017**. Anxiolytic and antidepressant profile of the 6-hydroxy-L-nicotine in a rat model of chlorisondamine. *New Frontiers in Chemistry*, 26(2), pp.S3_OP3-S3_OP3.

- **Valu, M.V.,** și Ionita, R. **2019.** 6-hydroxy-L-nicotine effects on open field activity in the rat: implications for a model of anxiety with chlorisondamine. *Current Trends in Natural Sciences* Vol, 8(15), pp.23-28.

C. Participări la manifestări științifice - Lucrări susținute la conferințe internaționale și naționale

- **Valu, M.V.,** Ionita, R, Postu., P.A, Cioanca, O., Hritcu, L., Mihasan, M. **2017.** 6-hydroxy-L-nicotine effects on anxiety and depression in a rat model of chlorisondamine, *9th National Congress with International participation and 35th Annual Scientific Session of the Romanian Society for Cell Biology*, 7-11 iunie, Iași, România.
- **Valu, M.V.,** Hritcu, L., Ionita, R., Tiron, A., Cioanca, O. **2018.** Anxiolytic and antidepressant effects of nicotine by measuring the concentration of BDNF protein in the hippocampus of CHL-pretreated animals, *More than neurons: toward a less neuronocentric view of brain disorders, II Edition*, November 29-December 1, Torino, Italy.

PRESCURTĂRI ȘI ABREVIERI

- ✎ BA: Boala Alzheimer;
- ✎ EAU: Extracție asistată de ultrasunete;
- ✎ LS: *Lycopodium selago*;
- ✎ HE: *Hericium erinaceus*;
- ✎ MSR: Metodologia suprafeței de răspuns;
- ✎ β A: Plăci amiloidice;
- ✎ NFT: neurifibrilări intracelulare
- ✎ SUA: Statele Unite ale Americii;
- ✎ AVC: Accidentul vascular cerebral;
- ✎ nAChR: receptori nicotinici de acetilcolină;
- ✎ SNP: Simptome neuropsihiatrice;
- ✎ RMN: Imagistica prin rezonanță magnetică;
- ✎ CT: Tomografie computerizată;
- ✎ PET: Tomografie cu emisie de pozitroni;
- ✎ ROS: Speciile reactive de oxigen;
- ✎ SOD: Superoxid dismutaza;
- ✎ CAT: Catalaza;
- ✎ GSH: Glutathionul în formă redusă;
- ✎ GPx: Glutathion peroxidază;
- ✎ NADPH: Nicotinamid adenin dinucleotid fosfat;
- ✎ AChE: Acetilcolinesterază;
- ✎ ACh: Acetilcolină;
- ✎ BChE: Butirilcolinesterază;
- ✎ FDA: Administrația pentru alimente și medicamente;
- ✎ HupA: Huperzine A;
- ✎ ADN: Acidul dezoxiribonucleic;
- ✎ SCOP: Scopolamină;
- ✎ SNC: Sistemul Nervos Central;
- ✎ BBB: Bariera hematoencefalică;
- ✎ SFE: Extracția cu fluid supercritic;
- ✎ MAE: Extracția asistată de microunde;

- ✎ SIDA: Sindromul imunodeficienței umane dobândite;
- ✎ F.A.O: Organizația Alimentară și Agricolă;
- ✎ MDA: Malondialdehida;
- ✎ HPLC: Cromatografie lichidă de înaltă performanță;
- ✎ DAD: Detector cu șir de diode;
- ✎ NGF: Factori de creștere a neuronilor;
- ✎ NOR: Testul labirintului nou;
- ✎ OMS: Organizația Mondială a Sănătății;
- ✎ NMDA: Acidul N-metil-D-aspartic;
- ✎ BBD: Box-Behnken Design;
- ✎ DPPH: 2,2-difenil-1-picril-hidrazil;
- ✎ CTP: Conținutul total de polifenoli;
- ✎ CTF: Conținutul total de flavonoizi;
- ✎ FRAP: Metoda reducerii ionului ferric;
- ✎ ABTS: 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid);
- ✎ TEAC: Capacitatea antioxidantă a echivalentului Trolox;
- ✎ ORAC: Metoda capacității de absorbție a radicalilor de oxigen;
- ✎ $\pm$ DS: Deviație standard;
- ✎ BHT: Butilhidroxitoluen;
- ✎ TPTZ: 2,4,6-tris(2-piridil)-1,3,5-triazină;
- ✎ s.u: Substanță uscată;
- ✎ AAE: Echivalent acid ascorbic;
- ✎ AAPH: 2,2'-azobis(2-amidinopropan) dihidroclorură;
- ✎ TE: Echivalenți Trolox;
- ✎ AG: Acidul Galic;
- ✎ QE: Quercetină;
- ✎ Na_2CO_3 : Carbonat de sodiu;
- ✎ AlCl_3 : Clorură de aluminiu;
- ✎ NaOH: Hidroxid de sodiu;
- ✎ DTNB: 5,5'-Ditio-bis(acid 2-nitrobenzoic);
- ✎ MeOH: Metanol;
- ✎ TFA: Acid trifluoroacetic;
- ✎ NTT: Testul de scufundare în acvariul nou;
- ✎ NOR: Testul de recunoaștere a obiectului nou;

- ✍ NBT: Nitroblue Tetrazolium;
- ✍ EDTA: Acidul etilendiaminotetraacetic;
- ✍ NaN_3 : Azidă de sodiu;
- ✍ H_2O_2 : Apă oxigenată;
- ✍ $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$: Bicromat de potasiu;
- ✍ KH_2PO_4 : Fosfat monopotasice;
- ✍ KCl: Clorură de potasiu;
- ✍ PGH2: Prostaglandină H2;
- ✍ TBA: Acid tiobarbituric;
- ✍ HCl: Acid clorhidric;
- ✍ ATC: Acetiltilocolină;
- ✍ E.S.M: Eroare standard a mediei;
- ✍ EAG: Echivalent acid galic;
- ✍ FeSO_4 : Sulfatul de fier;
- ✍ IMP: Imipramină;
- ✍ GAL: Galantamină.

CUVINTE CHEIE

- ✿ Extracție asistată de ultrasunete;
- ✿ *Hericium erinaceus*;
- ✿ *Lycopodium selago*;
- ✿ Pești de tip zebră;
- ✿ Activitate antioxidantă și neuroprotecție;
- ✿ Boala Alzheimer.