



MINISTERUL EDUCAȚIEI NAȚIONALE

UNIVERSITATEA „OVIDIUS” CONSTANȚA
ȘCOALA DOCTORALĂ DE ȘTIINȚE APLICATE
DOMENIUL: BIOLOGIE



REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Cercetări privind efectul toxic al unor metale grele la păstruga de cultură (*Acipenser stellatus*, Pallas 1771)



Conducător de doctorat:

Prof.univ.dr. Dragomir Coprean

Doctorand:

Daniela Vasile

Constanța
2019

CUPRINS

INTRODUCERE	7
PARTEA I-A STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII.....	11
I. Statutul actual de protecție al sturionilor	12
II. Cauze ale declinului populațiilor de sturioni în Dunăre și posibile amenințări.....	13
III. Stadiul actual al cercetării efectelor metalelor grele asupra sturionilor din Dunăre	16
IV. Cuprul și Zincul - elemente chimice esențiale pentru organism dar cu un potențial toxic	19
IV.1. Cuprul.....	20
IV.1.1. Caracterizarea fizico-chimică a cuprului și funcțiile acestuia în organism	20
IV.1.2. Speciația chimică a cuprului	21
IV.1.3. Mecanisme ale preluării și excreției cuprului.....	22
IV.1.4. Bioacumularea cuprului în țesuturi	24
IV.1.5. Mecanismele toxicității	25
IV.2. Zincul	27
IV.2.1. Caracterizarea fizico-chimică a zincului și funcțiile acestuia în organism	27
IV.2.2. Speciația chimică a zincului	29
IV.2.3. Mecanismele preluării și excreției zincului.....	30
IV.2.4. Bioacumularea zincului în țesuturi.....	34
IV.2.5. Mecanismele toxicității	35
V. Factorii care influențează toxicitatea metalelor grele.....	36
VI. Histopatologia- biomarker esențial al toxicității metalelor grele	46
PARTEA A II-A CONTRIBUȚII PERSONALE	47
II.1. TEST DE TOXICITATE ACUTĂ	48
II.1.1. INTRODUCERE	49
II.1.2. MATERIALE ȘI METODE	50
II.1.3. REZULTATE ȘI DISCUȚII	57
II.1.4. CONCLUZII.....	68
II.2 TEST TOXICITATE CRONICĂ	71
II.2.1. INTRODUCERE	72
II.2.2. MATERIALE ȘI METODE	73

II.2.2.1 Determinarea bioacumulării metalelor grele din țesuturi prin spectrometrie de masă cu plasmă cuplată inductiv	76
II.2.2.2. Determinarea modificărilor histopatologice induse de intoxicația cu metale grele	80
II.2.2.2.1. Conservarea și prelucrarea țesuturilor pentru determinări histologice	80
II.2.2.2.2. Colorarea secțiunilor prin metoda Hemalaun Meyer-Eozină.....	81
II.2.2.2.3. Evaluări semi-cantitative ale modificărilor histopatologice	82
II.2.3. REZULTATE ȘI DISCUȚII	90
II.2.3.1 BIOACUMULAREA METALELELOR GRELE ȘI MODIFICĂRILE HISTOPATOLOGICE INDUSE DE ACESTEA LA NIVELUL FICATULUI	92
II.2.3.1.1 BIOACUMULAREA METALELOR GRELE LA NIVELUL FICATULUI	92
II.2.3.1.1.1. Bioacumularea cuprului și zincului în experimentele individuale .	92
II.2.3.1.1.2. Bioacumularea cuprului și zincului în amestecul binar.....	95
II.2.3.1.2. MODIFICĂRI HISTOPATOLOGICE INDUSE DE INTOXICAȚIA CU METALE GRELE LA NIVELUL FICATULUI	97
II.2.3.1.2.1 Structura histologică normală a ficatului.....	97
II.2.3.1.2.2 Modificări histopatologice induse de cupru și zinc în experimentele individuale.....	104
II.2.3.1.2.3 Modificări histopatologice induse de cupru și zinc în amestecul binar.....	106
II.2.3.1.2.4 Evaluări semi-cantitative ale modificărilor histopatologice	108
II.2.3.1.3 CONCLUZII PARȚIALE	111
II.2.3.2. BIOACUMULAREA METALELOR GRELE ȘI MODIFICĂRILE HISTOPATOLOGICE INDUSE DE ACESTEA LA NIVELUL BRANHIEI	126
II.2.3.2.1. BIOACUMULAREA METALELOR GRELE LA NIVELUL BRANHIEI	126
II.2.3.2.1.1 Bioacumularea cuprului și zincului în experimentele individuale	126
II.2.3.2.1.2 Bioacumularea cuprului și zincului în amestecul binar.....	128
II.2.3.2.2. MODIFICĂRI HISTOPATOLOGICE INDUSE DE METALELE GRELE LA NIVELUL BRANHIEI.....	132
II.2.3.2.2.1. Structura histologică normală a branhiei	132
II.2.3.2.2.2. Modificări histopatologice induse de cupru și zinc în experimentele individuale.....	134
II.2.3.2.2.3. Modificări histopatologice induse de cupru și zinc în amestecul binar.....	136
II.2.3.2.2.4. Evaluări semi-cantitative ale modificărilor histopatologice	143

II.2.3.2.3 CONCLUZII PARȚIALE	146
II.2.3.3 MODIFICĂRI HISTOPATOLOGICE INDUSE DE METALELE GRELE LA NIVELUL INTESTINULUI	163
II.2.3.3.1 Structura histologică normală a tubului digestiv și a glandelor anexe	163
II.2.3.3.2 Modificări histopatologice induse cupru și zinc în experimentele individuale	176
II.2.3.3.3 Modificări histopatologice induse cupru și zinc în amestecul binar	177
II.2.3.3.4. CONCLUZII PARȚIALE	182
II.2.4. CONCLUZII GENERALE ȘI DIRECȚII VIITOARE DE CERCETARE	193
BIBLIOGRAFIE	202

PLANȘE

PLANȘA I	114
PLANȘA II	120
PLANȘA III	124
PLANȘA IV	149
PLANȘA V	155
PLANȘA VI	160
PLANȘA VII	184
PLANȘA VIII	186
PLANȘA IX	189

INTRODUCERE

În prezent, toate speciile de sturioni din Dunăre sunt critic periclitate (cu excepția speciei *Acipenser ruthenus* considerată a fi vulnerabilă), multe dintre ele fiind aproape de extincție în pofida statutului lor de conservare și a măsurilor de protecție.

Specia *Acipenser stellatus* (păstrugă) aleasă ca subiect de cercetare pentru prezenta teză este una din cele cinci specii de sturioni încă prezente în bazinul Dunării, fiind critic periclitată, expusă poluării directe cu metalele grele atât din apă cât și din sediment.

Deși poluarea apei cu metale grele în Dunărea Inferioară este mare, nu există date disponibile privind impactul acestora asupra sturionilor (Bacalbasa-Dobrovici, 1997).

Atât cuprul cât și zincul sunt două dintre cele mai întâlnite metale la nivelul apei și sedimentelor Dunării (ICPDR, 2015) ceea ce justifică necesitatea determinării efectelor acestora asupra organismelor acvatice, în special a speciilor de acipenseride și necesitatea stabilirii criteriilor de calitate a apei. Deși ambele metale, sunt elemente esențiale pentru diferite procese biochimice și fiziologice, acestea pot deveni toxice la concentrații ridicate.

Studii realizate privind bioacumularea metalelor grele la sturionii din Dunărea Inferioară (Poleksic și colab., 2010; Onara și colab., 2013), au atras atenția asupra creșterii concentrației metalelor grele în diferite organe ale acestora.

Datorită importanței comerciale a sturionilor, accentul s-a pus în principal pe studiul bioacumulării și efectelor metalelor grele la nivelul icrelor și a mușchiului, numeroase studii fiind publicate în acest domeniu. Însă este știut faptul că mușchiul nu constituie întotdeauna un bun indicator al contaminării întregului organism (Jaric și colab., 2011). Astfel am considerat a fi esențială analiza altor țesuturi prelevate precum branhii, intestin și ficat (trei dintre cele mai importante organe în preluarea directă și respectiv metabolizarea xenobioticelor).

Studii histopatologice la sturioni, privind efectele metalelor grele asupra morfologiei normale a țesuturilor sunt foarte puține, accentul fiind pus pe aspectele care privesc histologia dezvoltării sistemului digestiv (Ostaszewska și colab., 2011) și efectele privării de hrană (Gisbert și Doroshov, 2003; Furne și colab., 2012), în special pentru îmbunătățirea condițiilor de creștere a sturionilor în acvacultură.

Analiza bibliometrică a articolelor ISI publicate în domeniul cercetării sturionilor de către Jaric și Gessner (2012), a arătat că domeniul Toxicologie este foarte puțin studiat, cu un procent de doar 2% din numărul total al articolelor publicate în perioada 1996-2010. Toate cele 27 de specii de sturioni au făcut obiectul studiului, dar speciile cel mai frecvent studiate au fost *Acipenser transmontanus*, *Acipenser baerii*, *Acipenser fulvescens*, *Polyodon*

spathula, lucru ce subliniază necesitatea studierii și a speciilor autohtone. Nu există informații suficiente cu privire la sensibilitatea speciei *Acipenser stellatus*, la metale grele.

Există numeroase informații în literatura de specialitate privind efectele metalelor grele, în special cupru și zinc asupra peștilor, însă informații privind toxicitatea acestor două metale, atât individual cât și în amestec asupra unui grup valoros precum sturionii (*Acipenseridae*) sunt foarte puține.

Astfel, **scopul** prezentei teze de doctorat a fost determinarea sensibilității juvenililor de păstrugă (*Acipenser stellatus*), la contaminarea cu metale grele.

Lucrarea este structurată pe **două categorii majore de obiective**, după cum urmează:

Prima parte a acestei teme de cercetare a avut ca obiectiv studiul toxicității acute a cuprului și zincului la juvenili de păstrugă (*Acipenser stellatus*). Datorită lipsei datelor bibliografice cu privire la concentrația letală a cuprului și zincului la păstrugă, am realizat un experiment de toxicitate acută, pentru determinarea concentrației letale CL50, după 96 de ore de expunere, respectiv concentrația ce omoară 50% din indivizi în 96 de ore.

A doua parte a lucrării a avut ca obiectiv îmbunătățirea stadiului cunoașterii toxicității cronice induse de cele două metale la păstrugă (*Acipenser stellatus*), respectiv expunerea pentru 7 și 14 zile a exemplarelor de păstrugă la două concentrații diferite ale celor două metale (10 și 25% din concentrația letală determinată anterior). Totodată exemplare de păstrugă au fost supuse în aceleași condiții de expunere la un amestec binar al metalelor, respectiv două concentrații diferite ale metalelor, pentru 7 zile.

Pentru îndeplinirea acestui obiectiv trei sub-obiective au fost stabilite, respectiv:

- Determinarea bioacumulării cuprului și zincului, atât în experimente individuale cât și în amestec binar, la nivelul ficatului și branhiei;
- Identificarea utilizând microscopia optică a modificărilor histopatologice induse de cele două metale, în experimentele individuale și în amestec asupra celor trei organe importante în preluarea și respectiv metabolizarea metalelor.
- Caracterizarea, din punct de vedere histologic a celor trei organe la specia *Acipenser stellatus*, ca urmare a creșterii exemplarelor în sistem recirculant. Întrucât aceste exemplare obținute prin reproducere artificială, pot fi utilizate pentru proiectele de repopulare a Dunării cu sturioni, se pune astfel problema capacității exemplarelor eliberate de a se adapta în sălbăticie.

Având în vedere importanța științifică și economică, dar și statutul de specie periclitată, o înțelegere a abilității speciei *Acipenser stellatus* de a face față substanțelor toxice din mediu, precum metale grele, este esențială.

Luând în considerare toate aceste aspecte, tema tezei de doctorat "Cercetări privind efectul toxic al unor metale grele la păstruga de cultură (*Acipenser stellatus*, Pallas 1771)", este o temă importantă și de actualitate, ce urmărește abordarea aspectelor histopatologice și de bioacumulare a metalelor grele în diferite organe ale păstrugii, confirmând sensibilitatea speciei *Acipenser stellatus* la intoxicația cu metale grele.

Caracterul de noutate al prezentei teze de doctorat, constă în utilizarea unei specii mai puțin studiate a Ordinului Acipenseriformes, și evidențierea modificărilor histopatologice. Gradul de noutate a ridicat o serie de probleme, în ceea ce privește lipsa literaturii de specialitate în domeniul histopatologiei la sturioni. Acest lucru, coroborat cu sensibilitatea speciei *Acipenser stellatus*, confirmă necesitatea efectuării unor cercetări amănunțite, în vederea obținerii de noi date privind impactul metalelor grele asupra populațiilor de sturioni în general, dar în special, asupra păstrugii (*Acipenser stellatus*).

PARTEA I-A STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

Unele dintre cele mai valoroase specii de pești din punct de vedere economic și științific sunt speciile de sturioni. Sturionii și poliodontidele aparțin clasei Actinopterygii, ordinului Acipenseriformes, cu două familii: Acipenseridae și Polyodontidae. Familia Acipenseridae prezintă două subfamilii Acipenserinae și Scaphirhynchinae, cu 4 genuri: *Acipenser*, *Huso*, *Scaphirhynchus*, *Pseudoscaphirhynchus*. Familia Polyodontidae cuprinde două genuri: *Polyodon* și *Psephurus* (Bemis și colab., 1997), fiecare cu câte o specie.

Unele dintre cele mai importante specii de sturioni din Europa, atât din punct de vedere științific cât și comercial, sunt speciile de sturioni întâlnite în bazinul hidrografic al fluviului Dunărea.

În cadrul primei părți a tezei de doctorat, am prezentat statutul actual de protecție al sturionilor, cauzele declinului populațiilor de sturioni în Dunăre, precum și posibilele amenințări.

Întrucât Fluviul Dunărea, este unul dintre cele mai importante fluvii ale Europei constituie o sursă de apă cu diferite utilizări, și astfel calitatea apei bazinului Dunării este sub o mare influență de la o mare varietate de activități antropice.

Cuprul și zincul sunt două dintre cele mai întâlnite metale în apele Dunării și sedimente (Poleksic și colab., 2010; Ilie și colab., 2014; ICPDR, 2015). Concentrații ridicate ale cuprului (de peste 0,2 mg/l) au fost înregistrate în apele Dunării în timp ce concentrații

ale zincului sunt în general mai mici de 0,1 mg/l (Tudor și colab., 2016). În mod accidental, concentrația ambelor metale poate crește ca rezultat al descărcărilor din zonele miniere, de-a lungul bazinului Dunării, unde concentrații de până la 5 mg/l pentru cupru și 156 mg/l pentru zinc au fost înregistrate (Bird și colab., 2010).

Foarte puține studii au fost realizate în ceea ce privește contaminarea sturionilor cu metale grele în Dunăre, acestea indicând bioacumularea metalelor grele în diferite țesuturi.

Peștii necesită atât cupru cât și zinc ca micronutrienți, putând obține aceste metale fie din apă, fie din hrană. Cerințele de cupru și zinc diferă între specii, chiar și pentru stadii diferite ale aceleași specii. Deși ambele metale constituie elemente esențiale pentru procesele metabolice, la concentrații ridicate, acestea pot deveni toxice. Studii realizate pe diferite specii de pești au arătat faptul că atât metalele esențiale cât și cele neesențiale pot produce diferite efecte toxice asupra peștilor

Am prezentat de asemenea în cadrul primei parti a tezei, caracterizarea fizico-chimică a cuprului și zincului, speciația chimică, funcțiile acestora în organism, mecanismele de preluare branhială și intestinală. Toxicitatea metalelor grele în apă, nu este doar o chestiune de concentrație în mediu, deoarece chimia apei influențează considerabil nu doar biodisponibilitatea metalului dar și fiziologia și astfel susceptibilitatea lui (Grosell, 2012). Biodisponibilitatea unei substanțe chimice poate fi influențată de un număr de parametrii abiotici precum temperatura și chimia apei, dar și de o serie de factori biologici, ce au fost prezentați.

PARTEA A II-A CONTRIBUȚII PERSONALE

II.1. TEST DE TOXICITATE ACUTĂ

II.1.1. INTRODUCERE

Testul de toxicitate acută constituie unul din multele instrumente disponibile în toxicologia acvatică, dar care însă constituie o metodă de bază pentru obținerea unei estimări rapide, și reproductibile a efectelor toxice ale unei substanțe test.

II.1.2. MATERIALE ȘI METODE

Indivizi aparținând speciei *Acipenser stellatus* (păstrugă), având o lungime de $19,83 \pm 3,17$ cm și o greutate de $21,52 \pm 4,54$ g (fig.II.1.1) au fost obținuți de la Ferma Piscicolă Brateș a Institutului de Cercetare-Dezvoltare pentru Ecologie Acvatică, Pescuit și Acvacultură (ICDEAPA) Galați și transportați în laboratorul institutului pentru aclimatizare.

Peștii au fost lăsați să se aclimatizeze la condițiile de laborator pentru 7 zile înainte de începerea experimentului, în bazinele institutului, în apa de la robinet, declorinată, cu o duritate de 19 grade germane, echivalentul a 340 mg/l CaCO_3 .

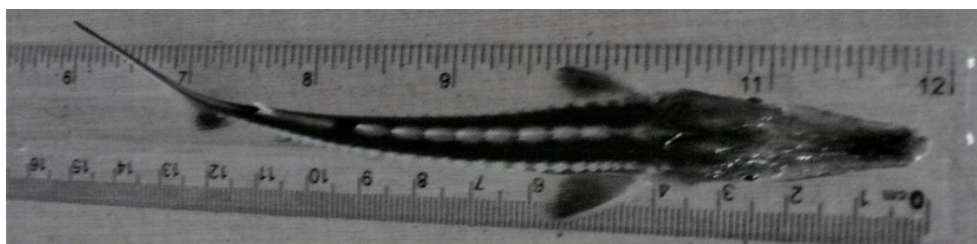


Fig. II.1.1 *Acipenser stellatus* (foto original)

Determinarea toxicității acute a cuprului și zincului la păstrugă, s-a făcut având în vedere ghidul Organizației pentru Cooperare și Dezvoltare Economică, privind testarea substanțelor chimice pe pești (OCDE 203), folosindu-se testul semi-static, cu schimbare a apei în proporție de 50% la fiecare 24 de ore.

Testul de toxicitate acută a fost realizat în duplicat ($n=20$) pentru fiecare metal, grupuri de câte 10 indivizi aleși aleatoriu au fost puși în fiecare bazin, fiind expuși substanțelor test pentru o perioadă de 96 de ore.

Mortalitățile au fost înregistrate la fiecare 24, 48, 72, 96 de ore iar concentrația care ucide 50% din numărul indivizilor (CL_{50}), după 96 de ore de expunere, a fost determinată. Nicio mortalitate nu a fost înregistrată la grupul martor, pe toată perioada experimentului. Peștii au fost colectați imediat ce s-a observat moartea acestora.

Analiza statistică

Analiza statistică, respectiv determinarea concentrației letale a fost realizată folosindu-se programul SPSS18 iar metoda PROBIT a fost utilizată ca procedură statistică în determinarea concentrației letale și a intervalului de încredere 95% asociat (Gerber și Finn, 2005).

II.1.3. REZULTATE ȘI DISCUȚII

În ceea ce privește testul de toxicitate acută, atât pentru cupru cât și pentru zinc, mortalitățile cele mai multe au fost înregistrate în primele 24 de ore. Nicio mortalitate nu a mai fost înregistrată după 72 de ore pentru cupru și 48 de ore pentru zinc. La concentrația cea mai mare a zincului (49,5 mg/l), toți peștii au murit în primele 24 de ore.

S-a observat că rata mortalității a crescut odată cu creșterea concentrației ionilor de cupru și zinc (fig.II.1.8, fig.II.1.9) dar și cu perioada de expunere. Nu au fost înregistrate mortalități în grupul martor. Testul de toxicitate acută a arătat faptul că mortalitatea este

direct proporțională cu concentrația metalelor grele, fără însă a se înregistra mortalități în rândul indivizilor din grupul martor.

Coeficientul de determinare (R^2) a fost estimat ca fiind 0.90 (fig.II.1.8) pentru cupru și respectiv 0,918 pentru zinc (fig.II.1.9), ceea ce indică faptul că 90% din variațiile în mortalitate determinate de cupru și 91,80% din variațiile în mortalitate determinate de zinc se datorează variației concentrației metalului.

Valoarea concentrației letale CL50 a cuprului după 96 de ore de expunere, a fost estimată ca fiind **547,22 $\mu\text{g/l}$** . Valoarea concentrației letale CL50 după 96 de ore de expunere, a fost estimată ca fiind **34.225 $\mu\text{g/l}$** .

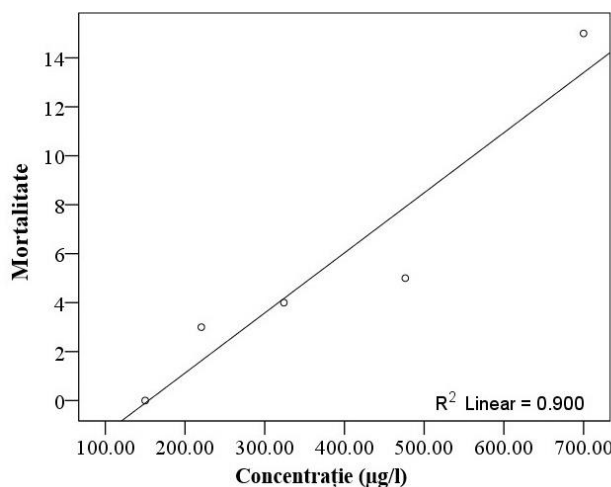


Fig. II.1.8 Mortalități ale juvenilor de păstrugă (*Acipenser stellatus*) (n=20) după expunerea la cupru (96 de ore)

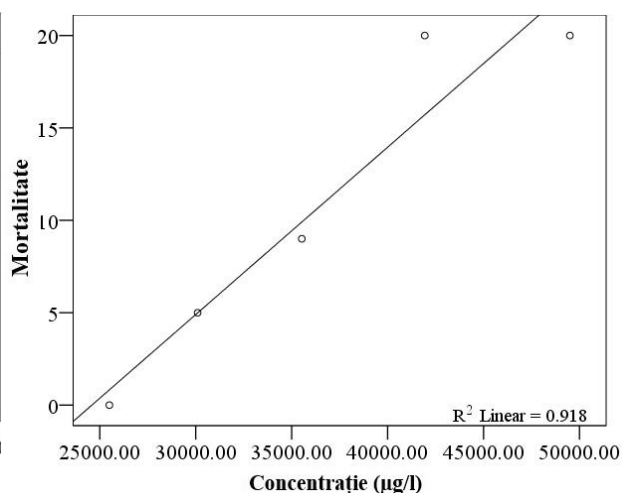


Fig.II.1.9 Mortalități ale juvenilor de păstrugă la (*Acipenser stellatus*) (n=20) după expunerea la zinc (96 de ore)

Utilizând metoda lui Awoyeni și colab., 2014 am calculat un factor al toxicității cuprului și zincului, în funcție de concentrația letală CL50 96h, reieșind un raport de toxicitate (T.F.) de 62.56:1, ceea ce indică faptul că ionii de cupru sunt mai toxici de 62,5 ori față de ionii de zinc.

II.1.4. CONCLUZII

Prezentul studiu este primul realizat în vederea determinării toxicității acute a cuprului și zincului la păstrugă (*Acipenser stellatus*), într-o apă cu duritate mare de 340 mg/l CaCO_3 . Valoarea concentrației letale a cuprului a fost estimată la 0,547 mg/l iar cea a zincului de 34,22 mg/l .

Calculând un factor al toxicității cuprului și zincului, în funcție de concentrația letală CL50 96h, a reieșit un raport de toxicitate (T.F.) de 62.56:1, ceea ce indică faptul că ionii de cupru sunt mai toxici de 62,5 ori față de ionii de zinc.

Deși calciul oferă o protecție clară împotriva toxicității cuprului și zincului, *Acipenser stellatus* rămâne o specie sensibilă la toxicitatea celor două metale, cu valori scăzute ale concentrației letale CL50 96 h, față de alte specii de pești, expuse metalelor grele la o duritate a apei apropiată prezentului studiu.

Ținând cont că foarte puține studii au fost publicate privind efectele cuprului și zincului asupra sturionilor, în special asupra păstrugii (*Acipenser stellatus*), prezentul studiu poate fi considerat un punct de pornire pentru viitoare cercetări în domeniu, fiind necesare studii suplimentare privind toxicitatea altor metale grele.

II.2. TEST DE TOXICITATE CRONICĂ

II.2.1. INTRODUCERE

În cea de-a doua parte a tezei de doctorat, mi-am propus evidențierea efectelor expunerii cronice a indivizilor de păstrugă, la cupru și zinc, atât în experimente individuale cât și în amestec binar. Studiul s-a realizat conform ghidului OECD 204 ”Fish, prolonged toxicity test:14 day study”, la concentrații subletale ale celor două metale (10% și 25% din concentrația letală CL50 96h determinată anterior), pentru o perioadă de 7 și 14 zile.

II.2.2. MATERIALE ȘI METODE

Testul de toxicitate cronică a fost realizat la Institutul de Cercetare Dezvoltare pentru Ecologie Acvatică, Pescuit și Acvacultură, Galați. Exemplare de păstrugă (*Acipenser stellatus*) au fost aduse de la ferma piscicolă Brateș, acestea provenind din același lot, precum cele din testul de toxicitate acută, respectiv din părinți capturați în fluviul Dunărea, la cotul Pisicii.

Peștii au fost repartizați în 12 grupuri a câte 10 indivizi. Peștii din primele două grupuri au fost ținuti în apă dechlorinată, ca și grupuri martor, în timp ce celelalte grupuri au fost supuse intoxicației. În vederea îndeplinirii obiectivelor, juvenalii de *Acipenser stellatus*, au fost expuși la două concentrații diferite ale cuprului și zincului. Juvenalii au fost expuși pentru 7 și 14 zile la 10% și 25% din concentrația letală (CL 50 -96 h) determinată anterior ca fiind 0,547 mg/l for Cu^{2+} și 34,225 mg/l Zn^{2+} , în teste individuale.

După 7 și 14 zile, juvenilii au fost capturați și aneșteziați prin imersie până la sedare în soluție de 2-fenoxietanol. Aceștia au fost sacrificați prin eviscerare, ficatul, branhia și intestinul fiind imediat prelevate.

Ficatul și branhia au fost împărțite în două subprobe: pentru determinări histopatologice, probele au fost fixate în formol 10% iar pentru determinarea bioacumulării, acestea au fost păstrate la -80°C până în momentul analizei lor.

II.2.2.1 Determinarea bioacumulării metalelor grele din țesuturi prin spectrometrie de masă cu plasmă cuplată inductiv

Probele de țesut au fost analizate în laboratorul de toxicologie-chimie din cadrul Institutului de Diagnostic și Sănătate Animală, București. Analiza probelor s-a realizat utilizându-se un spectrometru de masă cu plasmă cuplată inductiv (ICP-MS), model Elan DRC II, producător firma Perkin-Elmer – SUA.

II.2.2.2. Determinarea modificărilor histopatologice induse de intoxicația cu metale grele

II.2.2.2.1. Conservarea și prelucrarea țesuturilor pentru determinări histologice

Țesuturile prelevate au fost fixate în formol (10%) tamponat cu fosfat mono și disodic (Chemical Company Iasi), în vederea conservării materialului biologic și menținerii caracterelor morfologice ale celulelor și țesuturilor. După 24 de ore, probele au fost supuse deshidratării în băi succesive de alcool, clarificării în toluen. Piesele au fost apoi incluse în parafină, 2 băi de parafină la 60°, timp de 3 ore/baie, cu înlocuirea periodică a parafinei în scopul extragerii solventului din piese.

Piesele astfel prelucrate au fost secționare la microtom Lipshaw la grosimea de 7 μm.

Benzile de parafină cu secțiuni au fost întinse pe lame de sticlă bine spălate în prealabil și acoperite cu un strat fin de albumină glicerinată. În vederea întinderii secțiunilor s-a picurat pe marginea lor o soluție de gelatină, iar lamele au fost plasate pe o platină încălzită la 50°C. După întinderea fost scurs excesul de lichid, iar lamele au fost lăsate să se usuce la temperatura camerei într-un stativ, timp de 2 săptămâni.

II.2.2.2.2. Colorarea secțiunilor prin metoda Hemalaun Meyer-Eozină

Pentru colorarea secțiunilor, s-a utilizat metoda Hemalaun acid Mayer-Eozină ce determină colorarea nucleilor în albastru-violet și a citoplasmei în roșu.

II.2.2.2.3. Evaluări semi-cantitative ale modificărilor histopatologice

În cadrul prezentului studiu, am realizat și o evaluare semi-cantitativă a modificărilor histopatologice induse de metalele grele, la nivelul celor două organe studiate. În vederea atingerii acestui obiectiv, am utilizat două metode de evaluare: metoda propusă de Bernet și colab., 1999 și metoda propusă de Poleksic și Mitrovic-Tutundzic (1994), aplicabilă doar pentru branhie.

II.2.3. REZULTATE ȘI DISCUȚII

II.2.3.1 BIOACUMULAREA METALELELOR GRELE ȘI MODIFICĂRILE HISTOPATOLOGICE INDUSE DE ACESTEA LA NIVELUL FICATULUI

II.2.3.1.1 BIOACUMULAREA METALELOR GRELE LA NIVELUL FICATULUI

Nivele normale fiziologic ale cuprului și zincului, la nivelul ficatului, la indivizii din grupul martor au fost foarte apropiate, variind între $24,12 \pm 9,97$ mg/kg și $25,77 \pm 6,21$ mg/kg pentru cupru și $21,48 \pm 2,28$ mg/kg și $24,64 \pm 5,38$ mg/kg pentru zinc. Pentru speciile din familia Acipenseridae, un domeniu normal al concentrațiilor acestor două metale la nivelul ficatului nu a fost determinat până în prezent (Brucka-Jastrzebska și colab, 2009), astfel acest studiu aduce noi informații pentru completarea literaturii în domeniu.

II.2.3.1.1.1. Bioacumularea cuprului și zincului în experimentele individuale

Așa cum reiese din tabelul II.2.3.1.1, după 7 și 14 zile de expunere la concentrația cuprului de 0,054 mg/l, se poate observa o creștere semnificativă ($p < 0,05$) a concentrației metalului la nivelul ficatului.

În cazul zincului, după expunerea la 3,42 mg/l pentru 7 zile, concentrația acestuia a crescut cu 8,24% ($p > 0,05$), comparativ cu lotul martor, urmând ca după 14 zile, concentrația acestuia să crească semnificativ ($p < 0,05$), cu un procent de 49,63%.

La concentrația cea mai mare a zincului, de 8,55 mg/l, se poate observa o creștere semnificativă ($p < 0,05$) a concentrației metalului în țesut, cu un procent de 45,90%, urmând ca după 14 zile să aibă loc o scădere nesemnificativă ($p > 0,05$) comparativ cu perioada anterioară, concentrația zincului rămânând însă crescută față de lotul martor, creșterea fiind de doar 19,56%.

Tabel II.2.3.1.1. Concentrația totală a metalelor (medie $\pm$ deviație standard mg/kg greutate umedă) în ficatul juvenilor de *Acipenser stellatus* (diferențe semnificative între indivizii martor și cei expuși: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$) (n=5)

	Concentrație	Cupru		Zinc	
		7 zile	14 zile	7 zile	14 zile
Ficat	Martor	24,12 $\pm$ 9,97	25,77 $\pm$ 6,21	21,48 $\pm$ 2,28	24,64 $\pm$ 5,38
	Cupru	10% CL50	40,22 $\pm$ 9,01*	54,55 $\pm$ 5,13***	-
		25% CL50	44,63 $\pm$ 12,83*	53,22 $\pm$ 4,71***	-
	Zinc	10% CL50	-	23,25 $\pm$ 4,83	36,87 $\pm$ 6,38 *
		25% CL50	-	31,34 $\pm$ 7,67*	29,46 $\pm$ 5,05

II.2.3.1.1.2. Bioacumularea cuprului și zincului în amestecul binar

În ceea ce privește amestecul binar al cuprului și zincului (tabel II.2.3.1.2), după 7 zile de expunere, la concentrațiile mai mici (0,054 mg/l Cu și 3,42 mg/l Zn), se înregistrează o creștere semnificativă a concentrației ambelor metale ($p < 0,05$), cu un procent de 66,95% pentru cupru și respectiv 41,52 % pentru zinc, în comparație cu indivizii din lotul martor.

La amestecul binar cu valori ale cuprului de 0,136 mg/l și ale zincului de 8,55 mg/l, după 7 zile, s-a observat o creștere semnificativă ($p < 0,05$) a concentrației metalelor cu 45,5% în cazul cuprului, și 29% pentru zinc, în comparație cu indivizii din lotul martor.

Dacă privim creșterea concentrației metalelor din amestecul binar la concentrațiile mai mici (0,054 mg/l cupru și 3,42 mg/l zinc), în comparație cu experimentul individual, după 7 zile la aceleași concentrații, putem observa că aceasta a fost apropiată de concentrația cuprului în experimentul individual, în timp ce concentrația zincului a crescut cu 30,75% în prezența unor concentrații reduse ale cuprului din amestecul binar.

Însă, în amestecul binar, la concentrații crescute (0,136 mg/l Cu și 8,55 mg/l Zn), concentrația ambelor metale a fost redusă, nesemnificativă statistic ($p > 0,05$) în comparație cu concentrația metalelor în experimentele individuale (cu 21,36% pentru cupru și respectiv 11,59% pentru zinc) dar și față de amestecul binar cu concentrații scăzute ale celor două metale (cu 12,84% pentru cupru și 8,85% pentru zinc).

Tabel II.2.3.1.2 Concentrația totală a metalelor (medie $\pm$ deviație standard mg/kg greutate umedă) în ficatul juvenilor de *Acipenser stellatus* după 7 zile de expunere (diferențe semnificative între indivizii martor și cei expuși: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$) (n=5)

Ficat	Concentrație		Cupru	Zinc
	Martor		24,12 $\pm$ 9,97	21,48 $\pm$ 2,28
	Cupru și zinc			
	10%+10% CL50		40,27 $\pm$ 6,63*	30,4 $\pm$ 8,46*
	25% +25% CL50		35,10 $\pm$ 9,97*	27,71 $\pm$ 9,34*

Tendința de acumulare observată la concentrațiile mai mari în amestecul binar, indică faptul că ambele metale au fost într-o concentrație suficient de mare, pentru a determina o interacțiune competitivă semnificativă.

II.2.3.1.2. MODIFICĂRI HISTOPATOLOGICE INDUSE DE INTOXICAȚIA CU METALE GRELE LA NIVELUL FICATULUI

II.2.3.1.2.1 Structura histologică normală a ficatului

Ficatul sturionilor este învelit într-o capsulă conjunctivă, în general formată din fibre de collagen și fibroblaste (Muscalu și colab., 2011), fiind o glandă cu o formă neregulată.

În prezentul studiu, ficatul exemplarelor martor de păstrugă a prezentat un aspect macroscopic de ficat gras, fenomen adesea observat la exemplarele de sturioni, dar și la alte specii de pești datorită hranei bogate în lipide (Zaharia și Dumitrescu, 2010; Jalilpour și colab., 2016).

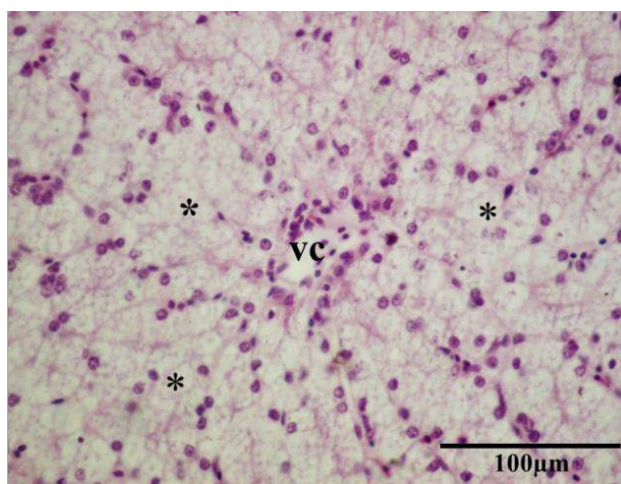


Fig.II.2.3.1.11 Aspect general al parenchimului hepatic la *Acipenser stellatus* (Martor), colorație H&E: vacuolizare (*), vena hepatică centrală (vc), x40 (foto original)

Histologia normală a ficatului exemplarelor de *Acipenser stellatus* din grupul martor, este prezentată în figura II.2.3.1.11. Parenchimul ficatului este structurat în formațiuni morfologice constituite din hepatocite. Hepatocitele, au prezentat un aspect poligonal, cu un diametru de aproximativ 11,13 $\pm$ 0,96 μ m, dispuse de-a lungul sinusoidelor, organizate în rânduri ce converg către vena centrală (fig. II.2.3.1.11).

Aspectul morfologic al hepatocitelor este ușor heterogen. Au fost observate predominant hepatocite cu un nucleu sferic exocentric. Nucleul a prezentat cu unul sau mai mulți nucleoli proeminenți împreună cu granule de heterocromatină, citoplasma prezentând numeroase vacuole lipidice.

Pe secțiunile histologice realizate la nivelul ficatului exemplarelor martor, a fost pusă în evidență prezența celulelor granulare eozinofile (CGE), cunoscute sub denumirea de mastocite. Din studiul literaturii, este pentru prima dată, când se evidențiază histologic prezența acestor celule la nivelul ficatului exemplarelor de păstrugă.

II.2.3.1.2.2 Modificări histopatologice induse de cupru și zinc în experimentele individuale

După expunerea la cupru, ficatul de păstrugă a prezentat alterări histopatologice marcante în comparație cu exemplarele aparținând grupului martor. Alterările observate au crescut odată cu doza dar și cu durata de expunere, după cum urmează:

După 7 și 14 zile de expunere, la indivizii intoxicați cu ioni de cupru, ambele concentrații, se observă schimbări morfologice proeminente în comparație cu indivizii din lotul martor. Astfel, modificările histologice au inclus modificări ale parenchimului hepatic precum necroza (modificări ale arhitecturii normale a țesutului) și dilatarea spațiului interhepatocitar, creșterea numărului de melanomacrofage dar și modificări circulatorii precum dilatarea spațiului sinusoidal și ușoare congestii ale vaselor de sânge.

Expunerea la o concentrație de 0,054 mg/l Cu^{2+} , pentru 7 zile a determinat și o creștere progresivă a numărului de mastocite în țesutul conjunctiv și în jurul vaselor de sânge, ceea ce demonstrează prezența la specia *Acipenser stellatus*, a două populații de mastocite: rezidente și circulante.

La nivelul ficatului, după 7 zile de la expunerea la cupru, s-a observat apariția infiltrării celulelor inflamatorii, respectiv a limfocitelor, acestea fiind adesea observate în agregate.

La aceeași concentrație (**0,054 mg/l Cu^{2+}**), dar după 14 zile de expunere, se observă necroza parenchimului hepatic și dilatarea spațiului interhepatocitar. Odată cu creșterea perioadei de expunere, se observă o agravare a modificărilor circulatorii, prin dilatarea spațiilor sinusoidale, congestia vaselor de sânge, și creșterea zonelor hemoragice

Infiltrarea celulelor inflamatorii (limfocite), este mai frecventă. Agregări masive de limfocite au fost adesea observate alături de melanomacrofage.

Analiza secțiunilor realizate pentru indivizii expuși la concentrația mai mare a cuprului, **de 25% CL₅₀ (0,136 mg/l), pentru 7 zile**, a arătat aceleași modificări ca și în cazul concentrației de 0,054 mg/l, respectiv modificări ale parenchimului hepatic – necroză, coridoare interhepatocitare dar și modificări circulatorii - dilatarea sinusoidelor și apariția zonelor hemoragice. Mastocitele au fost adesea observate alături de alte celule inflamatorii precum limfocite dar și melanomacrofage.

La concentrația cea mai **mare (0,136 mg/l Cu²⁺), după 14 zile**, se observă inducerea acelorași modificări precum necroza, dilatarea spațiului interhepatocitar dar și dilatarea spațiului sinusoidal și congestia vaselor de sânge.

Comparativ cu concentrația mai mică (0,054 mg/l), dar și cu perioada anterioară de experiment, se observă totodată o creștere pronunțată a numărului de limfocite, o dată cu creșterea perioadei de expunere, atât a limfocitelor mari dar și mici. Frecvent alături de limfocite au apărut mastocite.

În ficatul indivizilor expuși pentru 7 și 14 zile, **la o concentrație de 3,42 mg/l zinc** au apărut coridoare interhepatocitare și zone de necroză.

La nivelul ficatului, au putut fi observate de asemenea agregate de melanomacrofage, mastocite, limfocite atât mari cât și mici. Se poate observa că și ionii de zinc pot avea acțiune imunotoxică, însă acești ioni nu au putut induce o creștere accentuată a numărului de limfocite mari, așa cum s-a observat în cazul expunerii la cupru.

Dintre modificările circulatorii, au putut fi observate dilatări ale spațiului sinusoidal, congestia vaselor de sânge, dar și zone hemoragice.

La concentrația **cea mai mare a zincului (8,55 mg/l), după 7 zile de expunere**, se poate observa prezența necrozei și a spațiilor interhepatocitare, unii indivizi prezentând și vacuolizarea parenchimului hepatic.

Se observă o creștere accentuată a numărului de melanomacrofage și mastocite. Nu s-a observat o creștere a numărului de limfocite, ca în cazul expunerii la cupru.

După 14 zile de expunere la o **concentrație de 8,55 mg/l zinc**, indivizii de păstrugă au prezentat necroză, coridoare interhepatocitare, congestia vaselor. S-a înregistrat o creștere a incidenței melanomacrofagelor și rare limfocite.

Dintre alterările nucleare, la nivelul ficatului, pentru exemplarele expuse la ioni de zinc, s-a observat hipertrofia nucleară, la toate concentrațiile metalului și perioadele de expunere.

II.2.3.1.2.3 Modificări histopatologice induse de cupru și zinc în amestecul binar

Expunerea la amestecul de cupru și zinc (concentrații de 0,054 mg/l cupru și 3,42 mg/l zinc) a determinat necroza țesutului hepatic și apariția coridoarelor interhepatocitare, o creștere a dilatării capilarelor sinusoide, cu apariția zonelor hemoragice.

După 7 zile de expunere, s-a putut observa o creștere accentuată a numărului de melanomacrofage și mastocite.

S-a observat o creștere a numărului de limfocite comparativ cu lotul martor, dar mai puține comparativ cu indivizii intoxicați numai cu ioni de cupru (0,054 mg/l cupru, 7 zile), ceea ce poate sugera faptul că și în amestec cuprul continuă să aibă o influență puternică asupra sistemului imunitar.

La cele mai ridicate concentrații de metale (0,136 mg/l și 8,55 mg/l) se poate observa că modificările histopatologice sunt mai atenuate, aspect corelat cu cantitatea mult mai redusă de metale acumulate în acest amestec binar, comparativ cu experimentele individuale (capitol bioacumulare). S-a înregistrat frecvent vacuolizarea hepatocitelor.

Amestecul a determinat însă dilatarea capilarelor sinusoide și congestia vasculară. Se poate observa că amestecul binar nu a determinat o creștere pronunțată a numărului de melanomacrofage, observându-se în schimb o creștere a numărului de limfocite mici și mastocite. Limfocitele mari, au fost rar semnalate comparativ cu expunerea la un amestec binar anterior.

II.2.3.1.2.4 Evaluări semi-cantitative ale modificărilor histopatologice

Aplicarea indexului leziunilor la nivelul ficatului conform metodei lui Bernet și colab., 1999, asociat cu analiza imaginilor a permis o evaluare cu o mai mare acuratețe a evaluării efectelor histopatologice induse de cele două metale, atât în experimentele individuale cât și în cele binare. Stabilirea indexului a permis o comparare a nivelului leziunilor între cele două metale, concentrații ale acestora și perioadele de expunere.

Analiza semi-cantitativă conform metodei lui Bernet și colab., 1999, a indicat faptul că ambele metale atât în experimentele individuale, cât și în experimentele binare, pot determina modificări histopatologice semnificative la nivelul ficatului după expunerea pentru 7 și 14 zile.

Indexul histopatologic înregistrat pentru toate metalele, concentrațiile și perioadele de expunere este foarte mare, care conform clasificării realizate de Zimmerli și colab., 2007, indică: alterări severe ale arhitecturii și morfologiei normale a ficatului.

II.2.3.1.3 CONCLUZII PARȚIALE

Ambele concentrații ale cuprului și zincului, utilizate în prezentul studiu, au determinat după 7 și 14 zile de expunere, o creștere semnificativă a concentrației metalelor la nivelul ficatului. În cazul expunerii la cupru, s-a constatat o saturație a preluării metalului la nivelul ficatului, ceea ce reflectă natura esențială a metalului și capacitatea peștilor de a restabili controlul fiziologic.

Se poate observa că mecanismul de reglare al zincului este diferit, față de cel al cuprului. Astfel, în cazul expunerii la concentrația cea mai mare a zincului (8,55 mg/l), are loc o acumulare bifazică a acestuia, respectiv o creștere a bioacumulării în primele 7 zile, urmată de o scădere după 14 zile de expunere.

Modul de interacțiune al metalelor la concentrații mici în amestec a fost semnificativ diferit față de modul de interacțiune al metalelor la concentrații ridicate dar și de cel din timpul expunerilor individuale.

Tendința de acumulare observată la concentrațiile mai mari în amestecul binar, indică faptul că ambele metale au fost într-o concentrație suficient de mare, pentru a determina o interacțiune competitivă semnificativă.

Aspectul morfologic al hepatocitelor la exemplarele martor, este unul ușor heterogen, fiind observate predominant hepatocite cu un nucleu sferic exocentric, citoplasma prezentând numeroase vacuole lipidice.

Datorită vacuolizării accentuate, celulele se hipertrofiază, nucleul este împins spre periferie și în timp se instalează degenerescența hepatică sau steatoza.

Pe secțiunile histologice realizate la nivelul ficatului exemplarelor martor, a fost pusă în evidență pentru prima dată la indivizii de *Acipenser stellatus* prezența celulelor granulare eozinofile (CGE), cunoscute sub denumirea de mastocite.

După expunerea la cupru și zinc, ficatul păstrugii a prezentat alterări histopatologice marcante în comparație cu indivizii din lotul martor. Alterările observate în general au crescut o dată cu doza și durata de expunere.

II.2.3.2. BIOACUMULAREA METALELOR GRELE ȘI MODIFICĂRILE HISTOPATOLOGICE INDUSE DE ACESTE LA NIVELUL BRANHIEI

II.2.3.2.1. BIOACUMULAREA METALELOR GRELE LA NIVELUL BRANHIEI

Nivele normale ale cuprului, la branhiile indivizilor martor au prezentat valori cuprinse între $1,766 \pm 0,18$ mg/kg și $1,919 \pm 0,19$ mg/kg. În cazul zincului, acesta a avut

concentrații mai mari decât cele înregistrate pentru cupru, respectiv între 16,573±3,37 mg/kg și 21,317±3,75 mg/kg.

II.2.3.2.1.1 Bioacumularea cuprului și zincului în experimentele individuale

În cazul expunerii la cupru, se observă o creștere puternic semnificativă ($p < 0,01$) a concentrației cuprului, pe întreaga perioadă a experimentului, și la toate concentrațiile.

În cazul zincului, după 7 zile de expunere la o concentrație de 3,42 mg/l, concentrația acestuia a crescut puternic semnificativ ($p < 0,01$) cu 41,82% comparativ cu lotul martor, concentrația zincului la nivelul branhiei ajungând după 14 zile să fie de doar 15,96% ($p > 0,05$).

La concentrația de 8,55 mg/l, după 7 zile de expunere, are loc o creștere foarte puternic semnificativă ($p < 0,001$) a concentrației metalului, cu 65,64%, iar după 14 zile de expunere, concentrația a crescut cu 32,25% ($p > 0,05$).

Tabel II.2.3.2.1 Concentrația totală a metalelor (medie ± deviație standard mg/kg greutate umedă) la nivelul branhiei juvenilor de *Acipenser stellatus* (diferențe semnificative între indivizii martor și cei expuși: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$) (n=5)

	Concentrație	Cupru		Zinc	
		7 zile	14 zile	7 zile	14 zile
Branhie	Martor	1,766±0,18	1,919±0,19	16,573±3,37	21,317±3,75
	10% CL50	3,039±0,40**	3,118±0,44**	-	-
	25% CL50	3,161±0,57**	3,307±0,44***	-	-
	10% CL50	-	-	23,505±2,77**	24,721±7,21
	25% CL50	-	-	27,453±2,31***	28,192±6,81

După finalizarea experimentului, s-a putut constata că nu există acumulări semnificative ($p > 0,05$) ale zincului la nivelul branhiei indivizilor de păstrugă, după 14 zile de expunere, pentru ambele concentrații (3,42 mg/l și 8,55 mg/l). Lipsa unor acumulări semnificative comparativ cu lotul martor, se poate datora valorilor crescute de background ale zincului, observate la exemplarele martor, după 14 zile, comparativ cu 7 zile.

Pentru ambele concentrații ale zincului, se poate observa că nu există diferențe semnificative ($p > 0,05$) între concentrația zincului după 7 zile și 14 zile de expunere.

Reducerea acumulării zincului după 14 zile, se poate datora unui proces de aclimatizare, poate prin restaurarea influxului de calciu, și o reducere a influxului zincului (Olsson și colab.,1998) datorată scăderii afinității sistemului de transport $\text{Ca}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$.

II.2.3.2.1.2 Bioacumularea cuprului și zincului în amestecul binar

În ceea ce privește experimentele pe amestecul binar de metale (tabel II.2.3.2.2), după 7 zile de expunere, la concentrații mici ale celor două metale (0,054 mg/l Cu și 3,42 mg/l Zn), concentrațiile ambelor metale au crescut cu 74,57%% pentru cupru ($p<0,01$) și respectiv 22,94% pentru zinc ($p>0,05$), comparativ cu valorile înregistrate pentru exemplarele martor. La concentrațiile mai mari din amestecul binar (0,136 mg/l Cu și 8,55 mg/l Zn), după 7 zile s-a observat o creștere de doar 59.79%% pentru cupru ($p<0,01$) și 49,86% pentru zinc ($p<0,01$), comparativ cu lotul mator.

Tabel II.2.3.2.2 Concentrația totală a metalelor (medie $\pm$ deviație standard mg/kg greutate umedă) la nivelul branhiei la juvenalii de *Acipenser stellatus* după 7 zile de expunere (diferențe semnificative între indivizii martor și cei expuși: * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$) (n=5)

Branhie	Concentrație		Cupru	Zinc
	Martor		1,766 $\pm$ 0,18	16,573 $\pm$ 3,37
	10%+10% CL50		3,083 $\pm$ 0,46**	20,376 $\pm$ 1,91
Cupru și zinc	25% +25% CL50		2,822 $\pm$ 0,26**	24,837 $\pm$ 5,76**

Dacă comparăm gradul bioacumulării metalelor, în amestecul binar la concentrațiile reduse (0,054mg/l Cu și 3,42 mg/l Zn), în comparație cu experimentul individual, la 7 zile de expunere, se poate observa că valorile sunt aproximativ apropiate pentru cupru, în timp ce, concentrația zincului a fost mai mică, dar nesemnificativă din punct de vedere statistic ($p>0,05$).

Însă, în amestecul binar, la concentrații ridicate (0,136 mg/l Cu și 8,55 mg/l Zn), concentrația ambelor metale a fost redusă în comparație cu expunerea individuală a metalelor, cu doar 10,73% pentru cupru și respectiv 9,53% pentru zinc. Scăderea bioacumulării ambelor metale la nivelul branhiei, la concentrațiile mai mari ale metalelor (0,136 mg/l Cu și 8,55 mg/l Zn), comparativ cu expunerile individuale poate arăta faptul că

metalele sunt într-o concentrație suficient de mare pentru a determina o interacțiune de competiție puternică pentru siturile de legare ale celor două metale.

Scăderea semnificativă a concentrației zincului la nivelul branhiei, la concentrația mai mică a celor două metale, poate fi atribuită prin înlăturarea ionilor de zinc de la siturile de legare de către cupru, mult mai competitiv în amestecul celor două metale.

II.2.3.2.2. MODIFICĂRI HISTOPATOLOGICE INDUSE DE METALELE GRELE LA NIVELUL BRANHIEI

II.2.3.2.2.1. Structura histologică normală a branhiei

Aspectul morfologic normal al branhiei la specia *Acipenser stellatus*, este asemănător altor specii de pești. Branhiile sunt situate pe arcurile branhiale, constituite din filamente branhiale și lamele secundare.

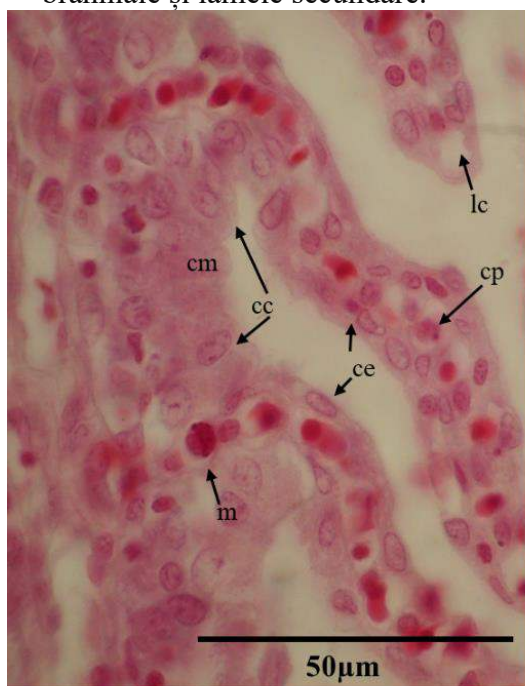


Fig.II.2.3.2.2.3 Structura normală a branhiei la specia *Acipenser stellatus* (martor), colorație H&E:

celule clorogene (cc), celule mucoase (cm), celule pilastru, celule epiteliale (ce), mastocite (m), lacuna capilară (lc), x100 (foto original)

Diferite tipuri de celule pot fi identificate pe lamina epitelială: celule pavimentoase superficiale, celule mucoase și celule clorogene (fig. II.2.3.2.2.3). Lamelele sunt căptușite de un epiteliu scuamos simplu constituit din celule epiteliale, ce acoperă sinusurile sangvine separate de celule pilastru.

În cadrul prezentului studiu au fost observate câteva modificări branhiale la indivizii din lotul martor, precum o ușoară hiperplazie și hipertrofie a celulelor clorogene și mucoase, edem și agregate de melanomacrofage. Nu au fost observate leziuni branhiale ireversibile care să afecteze funcționarea normală a epiteliului respirator.

II.2.3.2.2. Modificări histopatologice induse de cupru și zinc în experimentele individuale

Comparând aspectul histologic al branhiilor exemplarelor din lotul martor, cu cele ale indivizilor expuși intoxicației cu ioni de cupru și zinc, se observă modificări patologice marcante în arhitectura branhială.

Schimbările au inclus dilatarea spațiilor intercelulare și necroza țesutului după expunerea indivizilor de păstrugă la cupru. S-a mai observat hipertrofia și hiperplazia epitelului respirator atât în zona filamentului branhial cât și a zonei apicale, fără a fi observate hipertrofia și hiperplazia celulelor mucoase și clorogene. Tot la nivelul lamelelor secundare a putut fi pus în evidență și prezența edemului. Alte modificări observate au fost fuziunea vârfurilor lamelelor secundare, curbarea și scurtarea lamelelor secundare. Dintre modificările circulatorii s-a observat dilatarea vaselor de sânge și congestia sângelui la nivelul filamentelor branhiale. Dintre procesele inflamatorii s-au observat prezența limfocitelor și agregatelor de melanomacrofage.

Odată cu creșterea perioadei de expunere a fost semnalată creșterea incidenței hipertrofiei și hiperplaziei celulelor epiteliale, mucoase și clorogene. Tot în această perioadă se observă și prezența edemului. În continuare s-a observat dilatarea spațiilor intercelulare, dar și fuziunea vârfurilor lamelelor secundare. Se constată o creștere a numărului agregatelor de melanomacrofage la nivelul filamentelor branhiale. Dintre modificările circulatorii, se constată apariția lamelelor clavate.

La indivizii expuși pentru 7 și 14 zile la o concentrație a zincului de 3,42 mg/l s-au observat aceleași modificări ca și în cazul expunerii la cupru, respectiv dilatarea spațiilor intercelulare, curbarea lamelelor secundare, dar foarte rar și hiperplazia și hipertrofia celulelor epiteliale, hipertrofia și hiperplazia celulelor mucoase și clorogene. S-a observat de asemenea și ruperea epitelului lamelar.

La 7 zile după expunerea la o concentrație a zincului de 8,55 mg/l, s-a observat o puternică hiperplazie și hipertrofie a epitelului lamelar și a celulelor mucoase și clorogene, scurtarea dar și curbarea lamelelor secundare, ruperea epitelului lamelar. La această concentrație s-a observat și hipertrofia nucleară. Dintre modificările circulatorii s-a constatat apariția telangiectaziei și largirea și congestia vaselor de sânge.

Paradoxal, odată cu creșterea perioadei de expunere, la aceeași concentrație se constată o ușoară hipertrofie a celulelor clorogene și mucoase, și hiperplazie și hipertrofie a celulelor epiteliale. S-a observat în continuare prezența dilatării spațiilor intercelulare dar și

ruperea epiteliului lamelar. Modificări circulatorii au fost rar observate, acestea fiind aceleași ca la concentrațiile și perioadele de expunere anterioare.

II.2.3.2.2.3. Modificări histopatologice induse de cupru și zinc în amestecul binar

În cazul expunerii la un amestec binar al celor două metale, respectiv cupru 0,054 mg/l Cu și 3,42 mg/l zinc, s-a observat dilatarea spațiilor intercelulare, al necrozei. S-a constatat prezența edemului și a melanomacrofagelor. S-a observat doar fuziunea vârfurilor lamelor secundare. Modificările circulatorii au constat din telangiectazie și prezența lamelor clavate.

Trebuie menționat faptul că nu a fost observată hiperplazia și hipertrofia celulelor epiteliale, celulelor mucoase și clorogene, respectiv fuziunea lamelară completă.

O dată cu creșterea concentrației metalelor din amestec (0.136 mg/l cupru și 8.55 mg/l zinc) la finalul celor 7 zile de expunere s-a constatat dilatarea spațiilor intercelulare și necrozei, dar și hipertrofia și hiperplazia celulelor epiteliale, mucoase și clorogene. Aceste procese de hiperplazie și hipertrofie au dus la fuziunea vârfurilor lamelor secundare dar și fuziunea lamelară completă. Melanomacrofagele și infiltrările de limfocite au fost o prezență constantă.

Modificările circulatorii sunt constante, respectiv prezența lamelor și lărgirea și congestia vaselor de sânge.

Examinările histopatologice au indicat o paletă asemănătoare de modificări la nivel branhial ca urmare a expunerii la cupru și zinc, dar și după expunerea la un amestec al celor două metale, însă acest lucru era normal din moment ce modificările histopatologice induse de metalele grele dar și de alte substanțe toxice nu sunt specifice unui singur poluant, lucru confirmat și de alterări similare sub influența unei game variate de contaminanți (vezi Mallatt, 1985).

II.2.3.2.2.4. Evaluări semi-cantitative ale modificărilor histopatologice

Întrucât modificările histopatologice induse de cele două metale atât în experimente individuale cât și în experimentele binare au fost aceleași, am realizat o evaluare semi-cantitativă a acestor modificări prin care am putut evidenția faptul că există diferențe în loturile intoxicate, în funcție de gradul și extinderea leziunii, precum și în funcție de factorul de importanță al leziunii.

Au fost aplicate astfel două metode de stabilire a unui index histopatologic, primul conform metodei lui Bernet și colab., 1999, iar cea de-a doua conform metodei lui Poleksic și Tutundzic, 1994.

Valorile înregistrate pentru indexul histopatologic, confirmă încă o dată faptul că amestecul binar la concentrații ridicate, determină modificări semnificative la nivel branhial, însă la concentrații crescute ale celor două metale în amestec, cele două metale par a fi într-o concentrație suficientă, astfel încât între cele două să existe o competiție.

Conform metodei lui Poleksic și Mitrovic-Tutundzic (1994), pentru lotul martor s-a determinat un index histopatologic cu valoarea 8, acesta indicând branhiile normale din punct de vedere funcțional. Este evident așa cum reiese din valoarea indexului histopatologic calculat pentru ambele metale, toate concentrațiile și perioadele de că branhiile sunt afectate în mod ireparabil de expunerea la metale grele.

II.2.3.2.3 CONCLUZII PARȚIALE

În cadrul prezentului studiu s-a observat o creștere semnificativă a concentrației cuprului la nivel branhial o dată cu creșterea concentrației și perioadei de expunere. Mecanismul de reglare a zincului pare să fie diferit de cel al cuprului la nivel branhial, observându-se o reducere a preluării branhiale a zincului odată cu creșterea timpului de expunere.

Comparând bioacumularea cuprului și zincului, în experimentele individuale, s-a putut observa o bioacumulare mai mare a cuprului, decât a zincului la nivel branhial. Acest lucru era de așteptat, din moment ce cuprul are un indice covalent mult mai mare decât zincul, ceea ce îl face să fie mult mai competitiv pentru liganzii intracelulari, bogați în azot și sulf.

Comparând gradul bioacumulării metalelor, în amestecul binar la concentrațiile reduse (0,054 mg/l Cu și 3,42 mg/l Zn), în comparație cu experimentul individual, la 7 zile de expunere, s-a observat că valorile sunt aproximativ apropiate pentru cupru, în timp ce, concentrația zincului a fost mai mică, dar ne semnificativă din punct de vedere statistic.

Însă, în amestecul binar, la concentrații ridicate (0,136 mg/l Cu și 8,55 mg/l Zn), concentrația ambelor metale a fost redusă în comparație cu expunerea individuală a metalelor. Scăderea bioacumulării ambelor metale la nivelul branhiilor, la concentrațiile mai mari ale metalelor (0,136 mg/l Cu și 8,55 mg/l Zn), comparativ cu expunerile individuale poate arăta faptul că metalele sunt într-o concentrație suficient de mare pentru a determina o interacțiune de competiție puternică pentru siturile de legare ale celor două metale.

În urma analizelor histopatologice, s-a observat câteva modificări branhiale la indivizii din lotul martor, precum o ușoară hiperplazie și hipertrofie a celulelor clorogene și mucoase, edem și agregate de melanomacrofage. Nu au fost observate leziuni branhiale ireversibile care să afecteze funcționarea normală a epiteliului respirator.

Comparând aspectul histologic al branhiilor exemplarelor din lotul martor, cu cele ale indivizilor expuși intoxicației cu ioni de cupru și zinc, se observă modificări patologice marcante în arhitectura branhială.

Examinările histopatologice au pus în evidență o serie de modificări ale țesutului branhial precum hipertrofia și hiperplazia celulelor epiteliale, hipertrofia și hiperplazia celulelor mucoase și clorogene, edem, fuziune lamelară ce au ca și consecință creșterea distanței de difuzie dintre mediul extern și sânge. Toate aceste modificări au ca și consecință afectarea preluării oxigenului, dar și afectarea osmoreglării.

Rezultatele analizelor histopatologice indică faptul că leziunile identificate care afectează morfologia branhială, pot determina perturbarea proceselor fiziologice, dar și stres oxidativ.

II.2.3.3 MODIFICĂRI HISTOPATOLOGICE INDUSE DE METALELE GRELE LA NIVELUL INTESTINULUI

II.2.3.3.1 Structura histologică normală a tubului digestiv și a glandelor anexe

Sistemul digestiv la păstrugă (*Acipenser stellatus*) este tipic pentru un carnivor primitiv, atât morfologia cât și anatomia tubului digestiv fiind asemănătoare cu ale altor specii de sturioni. Tubul digestiv este constituit din cavitate bucală (o gura protractilă, precedată de un rostru), faringe, esofag, stomac, intestin cu apendice piloric, valvulă spirală, și anus.

Fiecare porțiune a tubului digestiv este constituită din patru straturi: mucoasa, submucosa, musculara, și adventicea (seroasa).

Faringele se distinge prin prezența papilelor mucoase piramidale dispuse în serii longitudinale pe suprafața sa interioară. În regiunea de tranziție dintre faringe și esofag papilele înalte sunt substituite de pliuri longitudinale de dimensiuni reduse (Dapra și colab., 2009).

Esofagul, la păstrugă, este relativ lung și îngust, comparativ cu alte specii de sturioni. (Vajhi și colab., 2013). Din punct de vedere histologic, esofagul prezintă două regiuni distincte. Porțiunea anterioară prezintă un epiteliu format din celule cilindrice cu microvili și numeroase celule mucoase, responsabile de producerea mucosubstanțelor neutre și acide. Epiteliul regiunii posterioare a esofagului prezintă un aspect pseudo-stratificat, conținând numeroase celule ciliate și celule mucoase. Mucoasa este înconjurată de un țesut conjunctiv și de un strat circular de musculatură (Martos și colab., 2015).

La păstrugă, asemenea altor specii de sturioni, în timpul dezvoltării embrionare, la aproximativ 7 zile după eclozare, se diferențiază **stomacul** cu cele două regiuni: stomacul glandular și stomacul non-glandular. Cele două regiuni sunt prevăzute, cu adaptări anatomice și histologice (Buddington și Doroshov, 1986) ce indică un grad ridicat de specializare.

Stomacul anterior-glandular (fig.II.2.3.3) se caracterizează prin prezența a numeroase glande gastrice tubulare ramificate ce ocupă cea mai mare parte a *laminei propria* a mucoasei. Epiteliul gastric este simplu, cilindric, alcătuit din celule ciliate și mucoase. Celulele mucosecretoare ale stomacului prezintă un aspect cilindric, cu un nucleu bazal de formă neregulată, suprafața apicală a acestora prezentând microvili.

Glandele gastrice sunt alcătuite dintr-un singur tip de celule - celule oxintic-peptice de formă piramidală sau cuboidală, lipsite de cili și microvilli.

Stomacul posterior (piloric) (fig. II.2.3.4) prezintă câteva glande mucosae, mucoasa având un aspect neted. Musculara netedă a stomacului piloric este bine dezvoltată, constituind aproximativ 80% din grosimea peretelui gastric. Epiteliul din această regiune este constituit predominant din celule secretoare de mucus, printre care sunt intercalate



Fig.II.2.3.3 Secțiune transversală prin stomacul glandular la *Acipenser stellatus*, coloratie H&E, x10 (foto original)

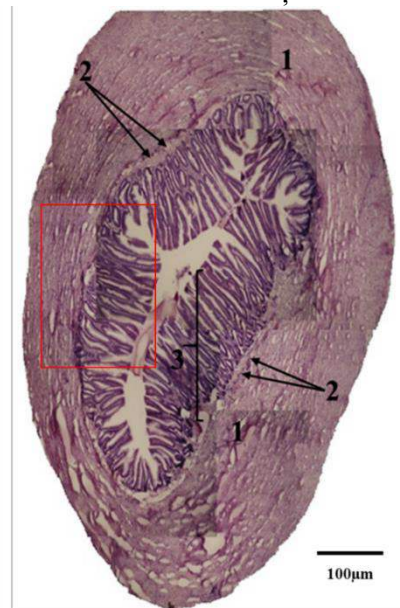


Fig.II.2.3.4 Secțiune transversală prin stomacul piloric la *Acipenser stellatus*, coloratie H&E: 1- musculara, 2- submucoasa, 3- mucoasa, x10 (foto original)

celule ciliate (fig.II.2.3.4a). Submucoasa conține numeroase fascicule alcătuite din fibre nervoase mielinizate și nemielinizate, precum și din corpi neuronali (Martos și colab., 2015).

Apendicele piloric (fig.II.2.3.5) format din mai multe cecumuri pilorice, este situat între intestin și stomac. Cecumurile sunt încapsulate într-o musculatură netedă circulară proeminentă, trabecule (musculatură) separând de asemenea cecumurile pilorice în lobuli de mărimi diferite. Fiecare lob este format din pliuri ale mucoasei (vili) constituite dintr-un epiteliu columnar bogat în celule mucoase.

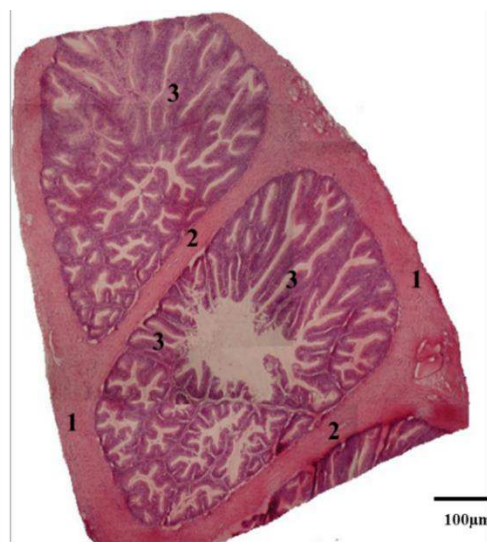


Fig.II.2.3.5 Secțiune transversală prin apendicele piloric la *Acipenser stellatus*, colorație H&E: 1- musculara, 2-trabecule, 3- vili, x10 (foto original)

Pe secțiunile analizate a putut fi pusă în evidență structura histologică, respectiv seroasa, musculara (musculatura netedă), submucoasa și mucoasa. Fiecare lob este format din pliuri ale mucoasei. Epiteliul vililor este constituit din celule columnare simple, cu un nucleu mare excentric. Au putut fi observate și câteva celule mucosae.

Intestinul la sturioni este constituit din trei porțiuni: intestinul anterior, valvula spirală și porțiunea terminală a intestinului sau rectul.

Analiza histologică a arătat faptul că organizarea peretelui intestinal este asemănătoare cu cea a altor vertebrate. La indivizii din grupurile martor se observă structura caracteristică a intestinului anterior, cuprinzând mucoasa cu epiteliu alcătuit din enterocite și celule mucoase, *lamina propria* de natură conjunctivă și musculara mucoasei. Sunt de asemenea vizibile submucoasa, musculara externă alcătuită din două straturi de celule musculare netede, iar la exterior seroasa (Fig.II.2.3.6).

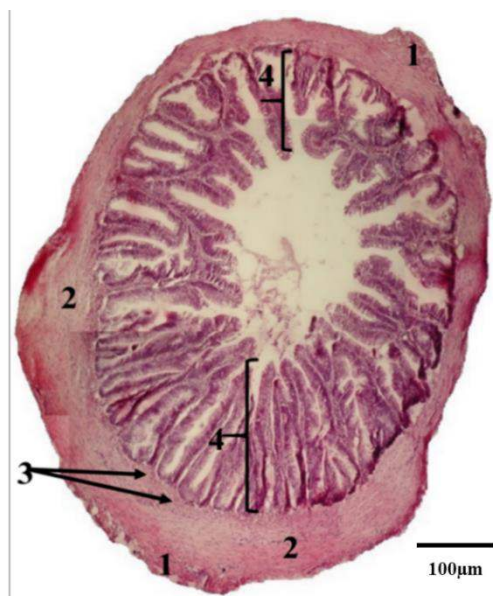


Fig.II.2.3.6 Secțiune transversală prin intestin la *Acipenser stellatus*, colorație H&E: 1-seroasa, 2-musculara, 3-submucoasa, 4-mucoasa, x10 (foto original)

La sturioni, o caracteristică apartine a tubului digestiv (trăsătură primitivă) o constituie prezența **valvulei spirale**, ce ocupă cea mai mare parte a lumenului intestinal (fig.II.2.3.7).

Sturionii compensează lungimea redusă a intestinului prin prezența **valvulei spirale**, respectiv creșterea suprafeței intestinale, prin pliarea mucoasei și submucoasei, numărul pliurilor depinzând de la specie la specie. Valvula spirală împreună cu intestinul anterior constituie până la 45-50% din lungimea totală a tubului digestiv (Martos și colab., 2015).

La nivelul valvulei spirale, prezentul studiu a evidențiat prezența țesutului limfoid (fig.II.2.3.7a), considerat de unii autori ca fiind implicat în apărarea imunitară împotriva paraziților și bacteriilor (Martos și colab., 2015).

Valvula spirală (fig.II.2.3.7) prezintă un perete muscular gros, mucoasa fiind însă mai subțire (fig.II.2.3.7.a). În această regiune *lamina propria* a peretelui intestinal conține un număr mare de limfocite, unele acumulate în structuri cu aspect folicular de forme și dimensiuni variabile.

Mucoasa este constituită dintr-un epiteliu simplu columnar, fiind observate și numeroase celule mucoase.

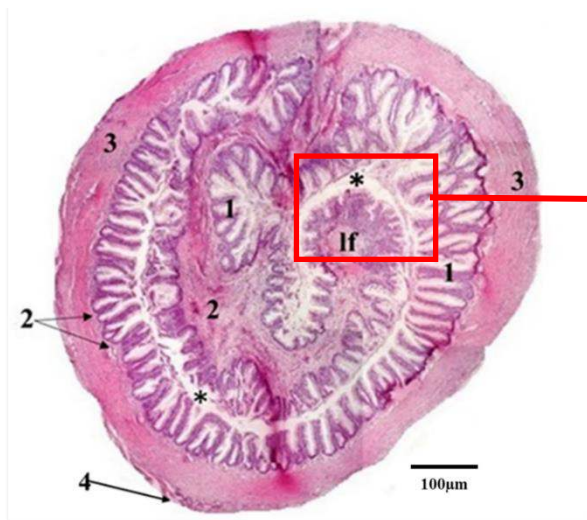


Fig.II.2.3.7 Secțiune transversală prin valvula spirală la *Acipenser stellatus*, colorație H&E: *lumen intestinal, 1-mucoasa, 2-submucoasa, 3-musculara, 4-seroasa, lf-structură limfoidă, x10 (foto original)

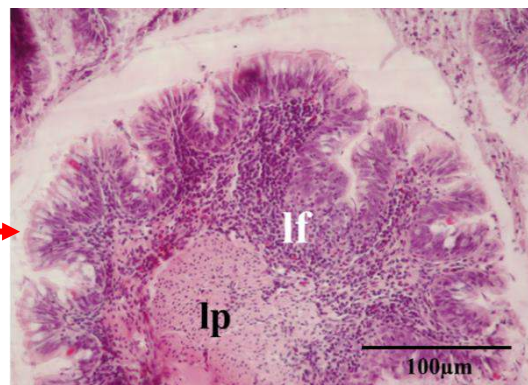


Fig.II.2.3.7a Aspect al structurii limfoide la *Acipenser stellatus*, colorație H&E: limfocite (lf), lamina propria (lp), x40 (foto original)

La nivelul intestinului, dar în special la nivelul valvulei spirale au putut fi observate celule granulare eozinofile, acestea fiind distribuite atât la nivelul mucoasei și *laminei propria*, dar și la nivelul musculareii. Prezența acestor celule la nivelul tubului digestiv la acipenseriforme, a fost evidențiată histologic și la alte specii de sturioni (*Acipenser transmontanus*, *Polyodon spathula*) de către Radaelli și colab. (2000), Petrie-Hanson și

Peterman (2005). Prezentul studiu este primul ce demonstrează prezența acestor celule la nivelul tubului digestiv, la păstrugă (*Acipenser stellatus*).

Rectul este scurt, prezentând o tunică musculară subțire comparativ cu celelalte componente ale tubului digestiv, în timp ce mucoasa aplatizată, prezintă pliuri largi. Analiza histologică a putut evidenția prezența celor patru tunici, în timp ce la nivelul mucoasei s-a putut observa un epiteliu stratificat, conținând glande mucoase și numeroase celule mucoase.

II.2.3.3.2 Modificări histopatologice induse de cupru și zinc în experimentele individuale

Modificări histopatologice induse de cupru la nivel intestinal

Concentrația redusă a cuprului (0,054 mg/l) după 7 zile de expunere a indus schimbări semnificative la nivelul intestinului indivizilor expuși.

Indivizii intoxicați cu 0,054 mg/l cupru timp de 7 zile și 14 zile prezintă modificări ale epiteliului intestinal – hipertrofie și apariția spațiilor intercelulare, ale *laminei propria* – retracția țesutului conjunctiv, hiperemia capilarelor, edeme și infiltrarea celulelor inflamatoare la nivelul submucoasei și muscularei externe.

La indivizii intoxicați cu 0.136 mg/l cupru timp de 7 zile, la nivel intestinal modificările histopatologice sunt evidente, incluzând dilatarea apicală și fuziunea vilozităților și hipertrofierea pronunțată a epiteliului. Se pot observa de asemenea celule inflamatoare infiltrate în stratul epitelial și țesutul conjunctiv subiacent.

Atât la indivizii expuși timp de 7 zile, cât și la cei expuși timp de 14 zile, doza ridicată de cupru a condus la apariția leziunilor necrotice la nivelul vilozităților intestinale.

Modificări histopatologice induse de zinc la nivel intestinal

Indivizii intoxicați 3,42 mg/l zinc timp de 7 zile prezintă frecvent hiperemia capilarelor de la nivelul vilozităților intestinale, asociată cu infiltrarea celulelor inflamatoare

Peștii intoxicați cu 8,55 mg/l zinc timp de 14 zile prezintă modificări pronunțate ale epiteliului intestinal. Acumularea de granule eozinofile în citoplasma celulelor epiteliale este frecvent întâlnită. Se observă de asemenea o vacuolizare mai intensă a citoplasmei enterocitelor iar celulele glandulare prezintă vacuole mari de mucus, precum și apariția spațiilor intercelulare, hipertrofia epiteliului și a nucleilor. La nivelul muscularei externe are loc infiltrarea celulelor inflamatoare, aceasta prezentând un aspect atipic, cu coridoare largi între fibrele musculare.

II.2.3.3.3 Modificări histopatologice induse cupru și zinc în amestecul binar

La indivizii expuși la un amestec 0,054 mg/l cupru și 3,42 mg/l zinc (10% CL50), s-au observat predominant modificări ale mucoasei intestinale: hipertrofia epiteliului intestinal și a celulelor mucoase, fuziunea vililor, retracția țesutului conjunctiv, apariția spațiilor intercelulare la nivelul epiteliului intestinal și creșterea stratificării. Dintre modificările circulatorii a fost observată hiperemia vaselor capilare. Unele porțiuni intestinale au prezentat necroza țesutului intestinal. Au fost observate și procese inflamatorii precum creșterea infiltrării limfocitelor în stratul epitelial sau la nivelul muscularei.

Indivizii expuși la un amestec de 0,136 mg/l cupru și 8,55 mg/l zinc au prezentat tot modificări la nivelul mucoasei intestinale, precum hipertrofia epiteliului intestinal și a celulelor mucoase, fuziunea vilozităților, retracția țesutului conjunctiv. Celule inflamatoare au fost observate la nivelul stratului epitelial și al țesutului conjunctiv adiacent. Dintre modificările circulatorii, apare hiperemia vaselor de sânge.

II.2.3.3.4. CONCLUZII PARȚIALE

Intestinul la pești, constituie alături de branhie, unul dintre organele importante în preluarea metalelor grele, fie prin apă sau prin intermediul hranei.

Analiza histopatologică a pus în evidență, existența la păstrugă a unui sistem digestiv caracteristic unui carnivor primitiv. La indivizii de păstrugă, ca și la celelalte specii de sturioni, tubul digestiv este alcătuit din faringe, esofag, stomac (care se diferențiază în două regiuni: stomacul glandular și stomacul non-glandular), apendicele piloric, intestinul, valvula spirală, și rectul. Toate aceste regiuni ale tubului digestiv, prezintă o structură histologică caracteristică, fiind specializate în grade diferite pentru procesele de digestie și absorbție.

Expunerea la metale grele are efecte marcante asupra organizării histologice a sistemului digestiv. Rezultatele prezentului studiu asupra intestinului la *Acipenser stellatus* arată faptul că metalele grele își exercită efectele toxice asupra diferitelor straturi intestinale.

Cele mai multe leziuni au fost observate la nivelul mucoasei intestinale, majoritatea dintre acestea constituind mecanisme de apărare împotriva toxicității metalelor grele.

Ambele metale, atât în experimentele individuale, cât și în amestec au determinat modificări la nivelul mucoasei intestinale, după doar 7 zile de expunere.

În cazul expunerii la cupru, se observă o corelație între concentrația metalului și severitatea leziunilor. Spre deosebire de cupru, expunerea la zinc nu a determinat modificări histopatologice majore la nivelul mucoasei intestinale.

În cazul amestecului de metale, la concentrații scăzute (0,054 mg/l cupru și 3,42 mg/l zinc (10% CL50), se constată numeroase modificări ale mucoasei intestinale. Au fost observate și modificări ca urmare a acțiunii directe a metalelor precum ruperea epiteliului intestinal și necroza.

În cazul expunerii la concentrații ridicate ale celor două metale, se observă modificări de apărare a epiteliului intestinal, fără să fie observate modificări precum necroza sau ruperea epiteliului.

Toate aceste observații indică faptul că în cazul amestecului de metale la concentrații scăzute, există un sinergism al celor două metale, cel mai probabil modificările fiind induse predominant de ioni de cupru, după cum s-a observat în experimentele individuale.

Întrucât majoritatea modificărilor intestinale au fost înregistrate la nivelul mucoasei, acest lucru indică faptul că bioacumularea metalelor are loc la nivelul mucoasei intestinale.

II.2.4. CONCLUZII GENERALE ȘI DIRECȚII VIITOARE DE CERCETARE

Prezentul studiu reprezintă prima încercare de evidențiere a sensibilității exemplarelor juvenile de păstrugă (*Acipenser stellatus*) la intoxicația cu metale grele atât în experimente individuale cât și în experimente binare.

Lucrarea a fost structurată pe două categorii majore de obiective: studiul toxicității acute a metalelor grele și studiul toxicității cronice induse de cele două metale la păstrugă (*Acipenser stellatus*) - respectiv determinarea bioacumulării metalelor grele și modificările histopatologice induse de acestea la nivelul diferitelor organe.

Astfel, în cadrul primei părți a tezei de doctorat, am subliniat aportul datelor obținute, la dezvoltarea studiului metalelor grele asupra sturionilor, în special asupra speciilor de sturioni din Dunăre. Caracterul de noutate constă în selectarea speciei de sturioni, respectiv *Acipenser stellatus*, specie mai puțin studiată, comparativ cu alte specii de sturioni, în ceea ce privește bioacumularea metalelor grele la nivelul diferitelor organe și modificările histopatologice induse de acestea.

Studiul literaturii de specialitate, realizat în cadrul primei părți a tezei de doctorat, a condus la concluzia generală că nu există suficiente date privind evaluarea toxicității acute și cronice a metalelor grele, asupra sturionilor, în special în domeniul histopatologiei.

În cadrul celei de-a doua părți a tezei au fost prezentate experimentele de laborator și rezultatele (bioacumulare, histologie) ce au dus în final la determinarea efectelor metalelor grele și la evidențierea sensibilității juvenilor de păstrugă. Astfel, în cadrul tezei, prin cercetarea experimentală am urmărit atât toxicitatea acută cât și cronică a două dintre metalele cu cele mai mari concentrații în apele și sedimentele Dunării (cupru și zinc), cu urmărirea bioacumulării acestora și a modificărilor histopatologice la nivelul a trei organe importante pentru preluarea și metabolizarea metalelor (branhie, intestin și ficat).

Primul obiectiv al tezei de doctorat a constat în realizarea unui test de toxicitate acută a cuprului și zincului, respectiv determinarea concentrației letale CL₅₀ 96 h la sturioni. Studiul literaturii în domeniul toxicității metalelor grele la sturioni, a permis evidențierea lipsei datelor privind toxicitatea acestor metale pentru sturioni în ape cu diferite durități.

Acesta este primul studiu este primul realizat în vederea determinării toxicității acute a cuprului și zincului la păstrugă (*Acipenser stellatus*), într-o apă cu duritate mare de 340 mg/l CaCO₃. Valoarea concentrației letale a cuprului a fost estimată la 0,547 mg/l iar cea a zincului de 34,225 mg/l. S-a constatat că rata mortalității crește odată cu creșterea concentrației ionilor de cupru și zinc dar și cu perioada de expunere.

Concentrația letală CL₅₀ a cuprului la 24 de ore de expunere a fost estimată la 1184 μg/l, cea de la 48 de ore la 623,75 μg/l, iar cea de la 72 și 96 de ore la 547,22 μg/l.

Concentrația letală a zincului CL₅₀ la 24 de ore de expunere a fost estimată la 34821,6 μg/l, în timp ce concentrația letală CL₅₀ la 48, 72 și 96 de ore este aceeași, respectiv 34225,04 μg/l. Se poate observa astfel în cazul ambelor metale, o reducere a concentrației letale CL₅₀ odată cu creșterea perioadei de expunere.

Calculul factorului de toxicitate a cuprului și zincului, în funcție de concentrația letală CL₅₀ 96h, a arătat un raport de toxicitate (T.F.) de 62.56:1, ceea ce indică faptul că **ionii de cupru sunt mai toxici de 62,5 ori față de ionii de zinc.**

Deși calciul oferă o protecție clară împotriva toxicității cuprului și zincului, ***Acipenser stellatus* rămâne o specie sensibilă la toxicitatea celor două metale, cu valori scăzute ale concentrației letale CL₅₀ 96 h, față de alte specii de pești**, expuse metalelor grele la o duritate a apei apropiată prezentului studiu.

Al doilea obiectiv al tezei de doctorat a constat în realizarea unui test de toxicitate cronică a cuprului și zincului. În cadrul acestor teste s-a urmărit bioacumularea metalelor la nivelul celor două organe principale, implicat în preluarea metalelor (branhie), dar și metabolizarea acestora (ficat).

Determinarea concentrației cuprului și zincului la nivelul ficatului indivizilor martor, a indicat că valorile normale din punct de vedere fiziologic sunt foarte apropiate. Astfel, valorile concentrației metalelor grele la nivelul ficatului, au variat între $24,12 \pm 9,97$ mg/kg și $25,77 \pm 6,21$ mg/kg pentru cupru și $21,48 \pm 2,28$ mg/kg și $24,64 \pm 5,38$ mg/kg pentru zinc.

Nivele normale ale cuprului, la nivelul branhiei, la indivizii martor au prezentat valori cuprinse între $1,766 \pm 0,18$ mg/kg și $1,919 \pm 0,19$ mg/kg. În cazul zincului, acesta a avut concentrații mai mari decât cele înregistrate pentru cupru, respectiv între $16,573 \pm 3,37$ mg/kg și $21,317 \pm 3,75$ mg/kg.

Pentru speciile din familia Acipenseridae, un domeniu normal al concentrațiilor acestor două metale la nivelul ficatului și branhiei nu a fost determinat până în prezent, astfel acest studiu aduce noi informații pentru completarea literaturii în domeniu.

Deși modelul general al acumulării pentru fiecare metal a fost studiat, pentru diferite specii de pești, prezentul studiu este primul care compară în mod direct modelul acumulării cronice a cuprului și zincului la păstrugă, atât într-un experiment individual cât și în amestecul binar al celor două metale, în condiții de expunere similare.

În cadrul prezentului studiu, acumularea metalelor la nivelul ficatului, la specia *Acipenser stellatus* s-a realizat în funcție de concentrația și perioada expunerii, precum și a interacțiunilor dintre amestecul binar.

Ambele concentrații ale cuprului și zincului, utilizate în prezentul studiu, au determinat după 7 și 14 zile de expunere, o creștere semnificativă a concentrației metalelor la nivelul ficatului.

În cazul expunerii la cupru, la o concentrație de 0,136 mg/l, s-a constatat o saturație a preluării metalului la nivelul ficatului, după 14 zile de expunere, ceea ce reflectă natura esențială a metalului și capacitatea peștilor de a restabili controlul fiziologic.

S-a constatat că mecanismul de reglare al zincului este diferit, față de cel al cuprului. Astfel, în cazul expunerii la concentrația cea mai mare a zincului (8,55 mg/l), are loc o acumulare bifazică a acestuia, respectiv o creștere a bioacumulării în primele 7 zile, urmată de o scădere după 14 zile de expunere.

În cadrul prezentului studiu s-a observat o creștere semnificativă a concentrației cuprului la nivel branhial o dată cu creșterea concentrației și perioadei de expunere. Ca și la nivelul ficatului, mecanismul de reglare a zincului la nivel branhial pare să fie diferit de cel al cuprului observându-se o reducere a preluării branhiale a zincului odată cu creșterea timpului de expunere (valorile concentrației metalului la nivel branhial, după 14 zile de expunere, au fost apropiate de valorile înregistrate după doar 7 zile de expunere).

Comparativ cu lotul martor, după 14 zile de expunere la zinc, nu s-au observat acumulări semnificative la nivel branhial. Lipsa acumulării semnificative comparativ cu lotul martor, se poate datora valorilor crescute de background ale zincului, observate la exemplarele martor, după 14 zile, comparativ cu 7 zile.

Comparând bioacumularea cuprului și zincului, în experimentele individuale, **s-a putut observa o bioacumulare mai mare a cuprului, decât a zincului atât la nivelul ficatului cât și la nivelul branhiei.** Acest lucru era de așteptat, din moment ce cuprul are un indice covalent mult mai mare decât zincul, ceea ce îl face să fie mult mai competitiv pentru liganzii intracelulari, bogați în azot și sulf.

Deși foarte multe studii privind acumularea metalelor au avut ca principală concluzie faptul că metalele în amestec se acumulează mai intens decât fiecare metal individual (efect sinergic), în prezentul studiu am arătat faptul că în amestecurile de cupru și zinc, efectul sinergic variază cu timpul de expunere și concentrația metalelor în amestec.

Modul de interacțiune al metalelor la concentrații mici în amestecul binar a fost semnificativ diferit față de modul de interacțiune al metalelor la concentrații ridicate dar și față de cel din timpul expunerilor individuale.

Dacă în cazul expunerii la concentrații reduse ale metalelor din amestecul binar, s-a constatat o creștere semnificativă a concentrației metalelor la nivelul ficatului, în cazul expunerii la concentrații ridicate ale celor două metale, s-a constatat o scădere a bioacumulării metalelor, la nivelul acestui organ, comparativ cu concentrațiile anterioare.

În ceea ce privește experimentele pe amestecul binar de metale la nivel branhial, la concentrații scăzute ale celor două metale s-au observat acumulări semnificative doar ale cuprului. Amestecul binar la concentrații ridicate ale celor două metale a determinat o bioacumulare semnificativă a celor două metale, comparativ cu lotul martor, dar scăzută față de valorile bioacumulării înregistrate în cadrul experimentelor individuale.

Această tendință de acumulare observată la concentrațiile mai mari în amestecul binar la nivel hepatic și branhial, indică faptul că ambele metale au fost într-o concentrație suficient de mare, pentru a determina o interacțiune competitivă semnificativă.

Studiul prezent arată că duritatea mare a apei (concentrație ridicată a ionilor de calciu și potasiu) nu oferă o protecție împotriva acumulării metalelor grele la nivel branhial

Expunerea la apă dură oferă o abundență a cationilor necesari (Ca^{2+} , Mg^{2+}) pentru a concura cu ionii de cupru și zinc pentru siturile de legare ale branhiilor. În prezentul studiu, parametrii fizico-chimici ai apei, respectiv un pH de 8,4 împreună cu o duritate ridicată a apei de 340 mg/l CaCO_3 , sugerează că o mare fracție a metalelor a fost prezentă ca și

complexe anorganice (în principal CuCO_3 și ZnCO_3). Deoarece a fost observată la nivel branhiar și hepatic, o creștere a bioacumulării în timpul expunerii la cele două metale, rezultatele prezentului studiu arată că și complexe cele două metale sunt biodisponibile pentru bioaccumulare de către juvenilii de păstrugă.

Este evident faptul că metalele se comportă diferit în amestec decât în timpul expunerilor individuale pentru diferite specii, și acestea nu pot fi explicate doar pe baza unor singure date privind bioaccumularea în amestec binar astfel sunt necesare studii suplimentare.

Studiul prezent constituie o primă încercare de determinare a efectelor histopatologice ale metalelor grele, simultan într-un experiment individual și binar, la o specie de sturioni. Am urmărit astfel evidențierea modificărilor histopatologice induse de intoxicația cu cele două metale, la nivelul ficatului, branhiiei și intestinului, ceea ce a relevat potențialul toxic al acestor metale.

Examinările histopatologice au arătat faptul că alterările principalelor organe țintă (ficat, branhie, și intestin) în general cresc în severitate odată cu creșterea concentrației metalelor și duratei de expunere.

Observarea structurii histologice normale a ficatului exemplarelor martor de păstrugă, a evidențiat vacuolizarea hepatocitelor cel mai adesea un proces reversibil, care poate avea consecințe pe termen lung, prin perturbări severe ale funcționării celulare.

Pe secțiunile histologice realizate la nivelul ficatului exemplarelor martor, a fost pusă în evidență pentru prima dată la indivizii de *Acipenser stellatus* prezența celulelor granulare eozinofile (CGE), cunoscute sub denumirea de mastocite, componentă esențială a sistemului imunitar.

După expunerea la cupru și zinc, ficatul păstrugii a prezentat alterări histopatologice marcante în comparație cu indivizii din lotul martor. Alterările observate în general au crescut o dată cu doza și durata de expunere.

În general paleta modificărilor histopatologice a fost asemănătoare. Astfel, în cazul expunerii la metale grele, atât în experimentele individuale cât și în experimentele binare, s-au observat atât modificări ale parenchimului hepatic, precum necroza, dilatarea spațiului interhepatociar, dar și modificări circulatorii precum dilatarea spațiului sinusoidal, apariția zonelor hemoragice și congestia vaselor de sânge.

S-au observat de asemenea modificări inflamatorii, precum creșterea numerică a mastocitelor și apariția infiltrării limfocitare, modificare semnalată preponderent la indivizii intoxicați cu ioni de cupru, și la concentrații ridicate ale acestui metal.

În ceea ce privește ponderea modificărilor structurale, datorate expunerii la metalele grele, se poate constata că aceasta este aproape aceeași, atât în cazul experimentelor individuale cât și a celor binare. Singura diferență marcantă constă în cazul expunerii la cupru, a creșterii proceselor inflamatorii (creșterea prezenței limfocitelor o dată cu creșterea concentrației metalului).

Aceste observații subliniază acțiunea imunotoxică puternică a ionilor de cupru, comparativ cu ionii de zinc. Toate aceste observații subliniază încă o dată faptul ca ionii de cupru sunt mult mai toxici la indivizii de păstrugă (*Acipenser stellatus*), comparativ cu ionii de zinc.

În urma analizelor histopatologice, s-au observat câteva modificări branhiale la indivizii din lotul martor, precum o ușoară hiperplazie și hipertrofie a celulelor clorogene și mucoase, și agregate de melanomacrofage. Nu au fost observate leziuni branhiale ireversibile care să afecteze funcționarea normală a epiteliului respirator.

Comparând aspectul histologic al branhiilor exemplarelor din lotul martor, cu cele ale indivizilor expuși intoxicației cu metale grele, atât în experimente individuale cât și binare, se observă modificări patologice marcante în arhitectura branhială.

În general paleta modificărilor histopatologice a fost asemănătoare. Examinările histopatologice au pus în evidență o serie de modificări de apărare ale țesutului branhial față de acțiunea toxică a metalelor grele precum hipertrofia și hiperplazia celulelor epiteliale, hipertrofia și hiperplazia celulelor mucoase și clorogene, edem, fuziune lamelară, ce au drept consecință creșterea distanței de difuzie dintre mediul extern și sânge, scăderea capacității de preluare a oxigenului, dar și afectarea osmoreglării.

Al doilea tip de leziuni întâlnite constă din modificări precum necroza, ruperea epiteliului branhial, ce reflectă efectele directe ale metalelor asupra celulelor branhiale.

Întrucât modificările histopatologice induse de cele doua metale atât în experimente individuale cât și în experimentele binare au fost asemănătoare, am realizat o evaluare semi-cantitativă a acestor modificări atât la nivel hepatic cât și branhial, prin care am putut evidenția faptul că există diferențe între loturile intoxicate, în funcție de gradul și extinderea leziunii, precum și în funcție de factorul de importanță al leziunii.

Aplicarea metodei lui Bernet si colab., 1999, a arătat că indexul histopatologic înregistrat pentru toate metalele, concentrațiile și perioadele de expunere a fost foarte ridicat, indicând alterări severe ale arhitecturii și morfologiei normale a ficatului.

La nivel branhial, același index a arătat faptul că branhiile sunt afectate în mod ireparabil de expunerea la metale grele, prin inducerea unor modificări histologice ireversibile, precum necroza, care duc la perturbări funcționale ale acestui organ.

La nivel hepatic și branhial, s-au observat creșteri semnificative ale indexului histopatologic, o dată cu creșterea concentrației metalelor atât în experimentele individuale și binare, și implicit a bioacumulării metalului în țesut. În cazul amestecului binar, se confirmă încă o dată faptul că amestecul binar la concentrații ridicate, determină modificări semnificative la nivel branhial, însă comparativ cu expunerile individuale, acestea par a fi într-o concentrație suficientă, astfel încât între cele două metale să existe o competiție.

În cazul amestecului binar, la nivel hepatic se constată o ușoară scădere a valorii indexului histopatologic la indivizii expuși concentrațiilor mari ale metalelor (25% CL50), comparativ cu indexul histopatologic înregistrat pentru indivizii expuși concentrațiilor scăzute (10% CL50). Acest lucru se corelează cu scăderea bioacumulării metalelor la nivelul ficatului, o dată cu creșterea concentrației metalelor în amestec, și subliniază încă o dată faptul că în amestecul binar metalele au fost într-o concentrație suficient de mare, pentru a determina o interacțiune competitivă.

În cadrul prezentului experiment, am urmărit structura histologică normală a tubului digestiv la păstrugă (*Acipenser stellatus*) dar și efectele pe care metalele grele le pot induce asupra structurii histologice normale a intestinului.

Analiza histopatologică a pus în evidență, existența la păstrugă a unui sistem digestiv caracteristic unui carnivor primitiv. La indivizii de păstrugă, ca și la celelalte specii de sturioni, tubul digestiv este alcătuit din faringe, esofag, stomac (care se diferențiază în două regiuni: stomacul glandular și stomacul non-glandular), apendice piloric, intestin, valvula spirală, și rectul. Toate aceste regiuni ale tubului digestiv, prezintă o structură histologică caracteristică, fiind specializate în grade diferite pentru procesele de digestie și absorbție.

La nivelul tubului digestiv al speciei *Acipenser stellatus*, am putut evidenția histologic, pentru prima dată prezența celulelor granulare eozinofile, elemente esențiale ale sistemului imunitar la sturioni.

Expunerea la metale grele are efecte marcante asupra organizării histologice a sistemului digestiv. Rezultatele prezentului studiu asupra intestinului la *Acipenser stellatus* arată faptul că metalele grele își exercită efectele toxice asupra diferitelor straturi intestinale.

Cele mai multe leziuni au fost observate la nivelul mucoasei intestinale, majoritatea dintre acestea constituind mecanisme de apărare împotriva toxicității metalelor grele.

În cazul expunerii la concentrații ridicate ale celor două metale, se observă modificări de apărare a epiteliului intestinal, fără să fie observate modificări precum necroza sau ruperea epiteliului.

Toate aceste observații indică faptul că în cazul amestecului de metale la concentrații scăzute, există un sinergism al celor două metale, cel mai probabil modificările fiind induse predominant de ioni de cupru, după cum s-a observat în experimentele individuale.

Dat fiind faptul că metalele grele la nivel intestinal, pot afecta și comunitățile bacteriene, alături de modificări induse asupra epiteliului intestinal, sugerează faptul că sturionii pot avea probleme în ceea ce privește procesele digestive normale de absorbție a substanțelor nutritive. În același timp având în vedere rolul intestinului în procesul de osmoreglare, metalele grele pot influența acest proces prin modificările histopatologice observate.

Ca o concluzie generală, se poate afirma că specia *Acipenser stellatus*, rămâne o specie sensibilă, în fața toxicității metalelor grele, chiar și în apa cu o duritate foarte mare.

Prezența unor modificări histopatologice ale nivelului ficatului exemplarelor crescute în captivitate pune problema eficienței programelor de reproducere. Datorită reducerii stocului sturionilor din Dunăre, în ultima perioadă s-a răspândit practica de repopulare a bazinelor naturale cu indivizi obținuți în mediu artificial și crescuți în condiții de acvacultură.

Studiul histopatologic la nivel branhial a indicat faptul că ambele metale grele pot induce o serie de modificări ar putea duce la perturbări de osmoreglare- ceea ce implicit afectează capacitatea de adaptare și supraviețuire a exemplarelor.

O înțelegere mai bună a toxicității metalelor grele la sturioni este necesară pentru o mai bună conservare a acestora. Rezultatele obținute în cadrul prezentului studiu sunt critice pentru eforturile de repopulare a Dunării cu sturioni, mult mai multe studii fiind necesare asupra toxicității acute dar și cronice a metalelor grele la sturioni, datorită efectelor calității apei asupra supraviețuirii juvenililor.

Direcții viitoare de cercetare

După analiza rezultatelor obținute și a dificultăților întâmpinate în găsirea unor studii/cercetări privind efectele histopatologice ale metalelor grele asupra populațiilor de sturioni din Dunăre, se prefigurează astfel noi direcții de cercetare pe marginea temei expuse în capitolele prezentei teze.

Subliniez necesitatea unor studii suplimentare aprofundate în vederea determinării susceptibilității speciilor de sturioni la intoxicația cu metale grele. Studii integrative care să

cuantifice răspunsul speciilor la o gamă largă de metale grele și concentrații ale acestora, în experimente individuale și în amestec, sunt necesare.

Dat fiind numărul limitat de studii în ceea ce privește bioacumularea metalelor grele la nivel intestinal, studii suplimentare sunt necesare pentru determinarea gradului de bioacumulare a metalelor grele și a preferinței pentru o anumită regiune a intestinului (apendice piloric, intestin, valvula spirală).

Studiul literaturii, a indicat lipsa unor indici de cuantificare semicantitativă a modificărilor histopatologice la nivel intestinal. Întrucât în cadrul prezentului studiu au fost observate modificări la nivel intestinal induse de expunerea la metale, consider a fi necesară stabilirea unor indici de cuantificare semicantitativă asemenea celor stabiliți la nivel hepatic și branhial.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. AWOYEMI O., BAWA-ALLAH K., OTITOLOJU A. 2014. Accumulation and anti-oxidant enzymes as biomarkers of heavy metals exposure in *Clarias gariepinus* and *Oreochromis niloticus*. Applied Ecology and Environmental Sciences, 2(5):114-122
2. BACALBASA-DOBROVICI N., 1997. Endangered migratory sturgeons of the lower Danube River and its delta. Environmental Biology of Fishes, 48:201-207
3. BEMIS W.E., FINDEIS E.K., GRANDE L., 1997. An overview of Acipenseriformes. Environmental Biology of Fishes, 48:25-71
4. BERNET D., SCHMIDT H., MEIER W., BURKHARDT-HOLM P., WAHLI T., 1999. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. Journal of Fish Diseases, 22:25-34
5. BIRD G., BREWER P., MACKLIN M., 2010. Management of the Danube drainage basin: implications of contaminant-metal dispersal for the implementation of the EU Water Framework Directive. International Journal of River Basin Management, 8(1):63-78
6. BUDDINGTON R. K., DOROSHOV S.I., 1986. Structural and Functional Relations of the White Sturgeon Alimentary Canal (*Acipenser transmontanus*). Journal of Morphology, volume 190 (2):201-213
7. DAPRA F., PALMEGIANO G., SICURO B., FALZONE M., CABIALE K., GALLONI M., 2009. Siberian sturgeon (*Acipenser baeri*, Bradt JF 1869) gut: anatomic description. International Aquatic Research, 1:45-60

8. FURNE M., MOREALES A.E., TREZADO C.E., GARCIA-GALLEGO M., HIDALGO M.C., DOMEZAIN A., RUS A.S., 2012. The metabolic effects of prolonged starvation and refeeding in sturgeon and rainbow trout. *Journal of Comparative Biology, Series B*, 182:63-76
9. GERBER S., FINN K., 2005. Using SPSS for Windows - Data analysis and graphics. Springer Science+Business Media Inc. New York, pp.139-162
10. GISBERT E., DOROSHOV S., 2003. Histology of the developing digestive system and the effect of food deprivation in larval green sturgeon (*Acipenser medirostris*). *Aquatic Living Resources*, 16:77-89
11. GROSELL M., 2012. Copper. In *Homeostasis and Toxicology of Essential Metals: Volume 31A Fish Physiology* (ed. Wood și colab.), Elsevier, pp.53-133
12. ILIE M., MARINESCU F., GHITA G., DEAK G., TANASE S., RAISCHI M., 2014. Assessment of heavy metal in water and sediments of the Danube River. *Journal of Environmental Protection and Ecology*, 15(3):825-833
13. ICPDR 2015. International Commission for the Protection of Danube River. Joint Danube Survey 3. A comprehensive Analysis of Danube Water Quality. International Commission for the Protection of the Danube River, Austria
14. JALILPOUR J., JOURDEHI A.Y., HALAJIAN A., HAGHIGHI B.Y., MASOUMZADEH M., MOGHADDAM S.B., ALIZADEH M., POURDEHGHANI M., SHENAVAR A., SHOJAEI M.F., POURSAFAR M., 2016. Histological evaluation of liver and some blood serum factors of farmed beluga (*Huso huso*) suspected fatty liver in sea cage. *International Conference on the Future of Sturgeon Aquaculture. Book of abstracts*. pp. 247-248
15. JARIC I., VISNJIC-JEFTIC Z., CVIJANOVIC G., GACIC Z., JOVANOVIĆ L., SKORIC S., LENHARDT M., 2011. Determination of differential heavy metal and trace element accumulation in liver, gills, intestine and muscle of sterlet (*Acipenser ruthenus*) from the Danube River in Serbia by ICP-OES. *Microchemical Journal*, 98:77-81
16. JARIC I., GESSNER J., 2012. Analysis of publications on sturgeon research between 1996 and 2010. *Scientometrics*, 90:715-735
17. JASTRZEBSKA-BRUCKA E., KAWCZUGA D., RAJKOWSKA M., PROTASOWICKI M., 2009. Levels of microelements (Cu, Zn, Fe) and microelements (Mg, 18. MALLAT J., 1985. Fish gill structural changes induced by toxicants and other irritants: a statistical review. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 42:630-648

19. MARTOS R. C., TREZADO R., RUS A. S., 2015. Morphology, Histology and Functional Structure of the Alimentary Canal of Sturgeon. In Phylogeny, anatomy and physiology of ancient fishes (ed. Zaccane, G., Dabrowski, K., Hedrick, M. S., Fernandes, J. M. O., Icardo, J. M.), CRC Press, pp. 233-259
20. MUSCALU C., MUSCALU R., DUMITRESCU G., 2011. Histological characterization of different organs in *Acipenser ruthenus* juveniles. Aquaculture, Aquarium, Conservation and Legislation. International Journal of Bioflux, 4(2): 199-208
21. OLSSON P.E., KILING P., HOGSTRAND C., 1998. Mechanisms of heavy metal accumulation and toxicity in fish. In Metal Metabolism in Aquatic Environments (ed. Langston si Bebianno), Chapman et Hall, London, pp.321-350
22. ONARA D.F., SUCIU R., HOLOSTENCO D., TUDOR D., 2013. Heavy metal bioaccumulation in tissues of sturgeon species of the Lower Danube River, Romania. Scientific Annals of the Danube Delta Institute, 19:87-94
23. OSTASZEWSKA T., KOLMAN R., KAMASZEWSKI M., WISZNIEWSKI G., ADAMEK D., DUDA A., 2011. Morphological changes in digestive tract of Atlantic sturgeon *Acipenser oxyrinchus* during organogenesis. International Aquatic Research, 3:101-105
24. PETRIE-HANSON L., PETERMAN A.E., 2005. American paddlefish leukocytes demonstrate mammalian-like cytochemical staining characteristics in lymphoid tissues. Journal of Fish Biology, 66:1101-1115
25. POLEKSIC V., MITROVIC T.V., 1994. Fish Gills as Monitor of Sublethal Chronic Effects of Pollution. In Sublethal and Chronic Effects of Pollutants on Freshwater Fish (ed. Muller and Lloyd), Fishing News Books Ltd., Farnham, pp.339-352
26. POLEKSIC V., LENHARDT M., JARIC I., DJORDJEVIC D., GACIC Z., CVIJANOVIC G., RASKOVIC B., 2010. Liver, gills and skin histopathology and heavy metal content of the Danube sterlet (*Acipenser ruthenus* Linnaeus, 1758). Environmental Toxicology and Chemistry, 29(3):515-521
27. RADAELLI G., DOMENEGHINI C., ARRIGHI S., FRANCOLINI M., MASCARELLO F., 2000. Ultrastructural features of the gut in the white sturgeon, *Acipenser transmontanus*. Histology and Histopathology, 15:429-439
28. TUDOR M., TEODOROF L., BURADA A., IBRAM O., DESPINA C., 2016. Long-term nutrients and heavy metals concentration dynamics in aquatic ecosystems of Danube Delta. Scientific Annals of the Danube Delta Institute, 22:149-156

29. VAJHI A., ZEHTABVAR O., MASOUDIFARD M., MOGHIM M., AKHTARZADE M., 2013. Digestive system anatomy of the *Acipenser stellatus*: new features. Iranian Journal of Fisheries Sciences, 12 (4):939-946
30. ZAHARIA T., DUMITRESCU E., 2010. Diseases detected at sturgeon reared in fresh and saltwater. Revista Cercetări Marine, 39: : 293-306
31. ZIMMERLI S., BERNET D., BURKHARDT-HOLM P., SCHMIDT-POSTHAUS H., VONLANTHEN P., WAHLI T., SEGNER H., 2007. Assessment of fish health status in four swiss rivers showing a decline of brown trout catches. Aquatic Sciences. 69:11-25