

**UNIVERSITATEA „OVIDIUS” DIN CONSTANȚA  
ȘCOALA DOCTORALĂ DE ȘTIINȚE APLICATE  
DOMENIUL DE DOCTORAT BIOLOGIE**

**REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT**  
**EFFECTUL UNOR MICOTOXINE (PATULINA**  
**ȘI ACIDUL KOJIC) ASUPRA PEȘTELOR**  
**ZEBRĂ (*DANIO RERIO*)**

Conducător de doctorat

Prof. univ. dr. **COPREAN DRAGOMIR**

Student-doctorand

**MANDALIAN TIGRAN-LUCIAN**

**CONSTANȚA, 2021**

# CUPRINS

|                                                                                                                                                                               | pagina |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| INTRODUCERE (Fungi și micotoxine).....                                                                                                                                        | 1      |
| PARTEA I. STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII.....                                                                                                                                  | 5      |
| I.1. Acidul kojic – date generale.....                                                                                                                                        | 5      |
| I.2. Patulina – date generale.....                                                                                                                                            | 6      |
| I.3. Efectele acidului kojic și ale patulinei asupra organismului.....                                                                                                        | 8      |
| I.3.1. Efecte asupra sistemului digestiv.....                                                                                                                                 | 8      |
| I.3.2. Efecte asupra sistemului circulator.....                                                                                                                               | 9      |
| I.3.3. Efecte asupra sistemului respirator .....                                                                                                                              | 10     |
| I.3.4. Efecte asupra sistemului excretor.....                                                                                                                                 | 10     |
| I.3.5. Efecte asupra sistemului imunitar.....                                                                                                                                 | 11     |
| I.3.6. Efecte asupra sistemului nervos.....                                                                                                                                   | 12     |
| I.3.7. Efecte asupra sistemului osos.....                                                                                                                                     | 13     |
| I.3.8. Efecte asupra sistemului muscular.....                                                                                                                                 | 13     |
| I.3.9. Efecte asupra sistemului reproducător.....                                                                                                                             | 14     |
| I.3.10. Efecte asupra sistemului endocrin.....                                                                                                                                | 14     |
| I.3.11. Efecte asupra țesutului dermic.....                                                                                                                                   | 15     |
| I.4. Stresul oxidativ indus de expunerea la micotoxine .....                                                                                                                  | 16     |
| I.5. Comportamentul peștilor: rol și fiziologie.....                                                                                                                          | 17     |
| I.6. Metoda informatică “Machine learning” de analiză a datelor .....                                                                                                         | 19     |
| I.6.1. Algoritmi utilizați.....                                                                                                                                               | 19     |
| I.6.2. Evaluarea performanței modelului și gestionarea datelor.....                                                                                                           | 20     |
| PARTEA A II-A. PARTEA DE CONTRIBUȚIE PERSONALĂ.....                                                                                                                           | 24     |
| II.1. Motivația alegerii temei de cercetare.....                                                                                                                              | 24     |
| II.2. Obiectivele propuse.....                                                                                                                                                | 28     |
| II.3. MATERIAL ȘI METODĂ.....                                                                                                                                                 | 30     |
| II.3.1. Materialul biologic utilizat.....                                                                                                                                     | 30     |
| II.3.1.1. Animalele folosite în experimente .....                                                                                                                             | 30     |
| II.3.1.2. Condițiile de captivitate.....                                                                                                                                      | 30     |
| II.3.1.3. Micotoxinele utilizate și administrate.....                                                                                                                         | 32     |
| II.3.2. Determinarea efectelor Patulinei și ale Acidului kojic asupra comportamentului<br>peștilor zebură ( <i>Danio rerio</i> ) .....                                        | 33     |
| II.3.2.1. Testul Novel tank (NTT) de evaluare a anxietății .....                                                                                                              | 33     |
| II.3.2.3. Analiza statistică .....                                                                                                                                            | 34     |
| II.3.3. Aplicarea analizei statistice și a unor metode informatice pentru a descoperi<br>existența unor corelații între starea de intoxicație și comportamentul peștilor..... | 34     |
| II.3.3.1. Analiza statistică .....                                                                                                                                            | 34     |

|                                                                                                                                                                                                                            |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| II.3.3.2. Analiza factorială .....                                                                                                                                                                                         | 36 |
| II.3.3.3. Algoritmi utilizați și gestionarea datelor .....                                                                                                                                                                 | 37 |
| II.3.4. Determinarea unor parametri biochimici ce măsoară stresul oxidativ indus de Patulină și Acidul kojic.....                                                                                                          | 40 |
| II.3.4.1. Determinarea nivelului catalazei .....                                                                                                                                                                           | 40 |
| II.3.4.2. Determinarea nivelului glutatation-peroxidazei .....                                                                                                                                                             | 41 |
| II.3.4.3. Determinarea nivelului malondialdehidei.....                                                                                                                                                                     | 41 |
| II.3.4.3. Analiza statistică .....                                                                                                                                                                                         | 42 |
| II.3.5. Determinarea efectelor histopatologice induse de Patulină și Acidul kojic.....                                                                                                                                     | 42 |
| II.3.5.1. Pregătirea și colorarea preparatelor histologice .....                                                                                                                                                           | 42 |
| II.3.6. Modele experimentale utilizate .....                                                                                                                                                                               | 43 |
| II.4. REZULTATE ȘI DISCUȚII .....                                                                                                                                                                                          | 45 |
| II.4.1. EFECTELE PATULINEI ȘI ALE ACIDULUI KOJIC ASUPRA ANXIETĂȚII. UTILIZAREA UNOR METODE INFORMATICE DE ANALIZĂ A DATELOR PENTRU IDENTIFICAREA EXISTENȚEI CORELAȚIILOR DINTRE STAREA DE INTOXICARE ȘI COMPORTAMENT ..... | 45 |
| II.4.1.1. Patulina.....                                                                                                                                                                                                    | 45 |
| II.4.1.1.1. Efectele asupra anxietății .....                                                                                                                                                                               | 45 |
| II.4.1.2. Acidul kojic .....                                                                                                                                                                                               | 48 |
| II.4.1.1.2. Efectele asupra anxietății .....                                                                                                                                                                               | 48 |
| II.4.1.3. Determinarea corelațiilor dintre starea de intoxicare și comportamentul peștilor zebură cu ajutorul metodelor statistice și informatice .....                                                                    | 52 |
| II.4.1.4. CONCLUZII PARȚIALE .....                                                                                                                                                                                         | 63 |
| II.4.2. DETERMINAREA STRESULUI OXIDATIV INDUS DE PATULINĂ ȘI ACIDUL KOJIC.....                                                                                                                                             | 65 |
| II.4.2.1. Patulina .....                                                                                                                                                                                                   | 65 |
| II.4.2.1.1. Efectele asupra catalazei .....                                                                                                                                                                                | 65 |
| II.4.2.1.2. Efectele asupra glutatation-peroxidazei .....                                                                                                                                                                  | 66 |
| II.4.2.1.3. Efectele asupra malondialdehidei .....                                                                                                                                                                         | 67 |
| II.4.2.2. Acidul kojic.....                                                                                                                                                                                                | 68 |
| II.4.2.2.1. Efectele asupra catalazei .....                                                                                                                                                                                | 68 |
| II.4.2.2.2. Efectele asupra glutatation-peroxidazei .....                                                                                                                                                                  | 69 |
| II.4.2.2.3. Efectele asupra malondialdehidei .....                                                                                                                                                                         | 70 |
| II.4.2.3. CONCLUZII PARȚIALE.....                                                                                                                                                                                          | 72 |
| II.4.3. EFECTELE PATULINEI ȘI ALE ACIDULUI KOJIC ASUPRA ORGANELOR INTERNE .....                                                                                                                                            | 74 |
| II.4.3.1. Patulina.....                                                                                                                                                                                                    | 74 |
| II.4.3.1.1. Efectele asupra ficatului.....                                                                                                                                                                                 | 74 |
| II.4.3.1.2. Efectele asupra țesutului renal .....                                                                                                                                                                          | 77 |
| II.4.3.1.3. Efectele asupra intestinului .....                                                                                                                                                                             | 82 |

|                                                   |     |
|---------------------------------------------------|-----|
| II.4.3.1.4. Efectele asupra pancreasului .....    | 83  |
| II.4.3.1.5. Efectele asupra inimii .....          | 84  |
| II.4.3.2. Acidul kojic .....                      | 86  |
| II.4.3.2.1. Efectele asupra encefalului .....     | 86  |
| II.4.3.2.2. Efectele asupra ficatului .....       | 87  |
| II.4.3.2.3. Efectele asupra intestinului .....    | 92  |
| II.4.3.2.4. Efectele asupra inimii .....          | 96  |
| II.4.3.2.5. Efectele asupra pancreasului .....    | 97  |
| II.4.3.2.6. Efectele asupra țesutului renal ..... | 101 |
| II.4.3.3. CONCLUZII PARȚIALE .....                | 106 |
| II.5. CONCLUZII GENERALE .....                    | 108 |
| ACTIVITATE ȘTIINȚIFICĂ.....                       | 112 |
| BIBLIOGRAFIE.....                                 | 113 |
| PLANȘE.....                                       | 129 |
| ANEXE .....                                       | 157 |

**Cuvinte cheie:** micotoxine, patulină, acid kojic, țânțarul tigru, *Aedes aegypti*, pești zebra, *Danio rerio*, comportament, anxietate, enzime, stres oxidativ, hepatotoxicitate, nefrotoxicitate, encefal, pancreas, intestin, miocard

## INTRODUCERE

Fungii microscopici reprezintă un grup divers de organisme (peste 100.000 specii) (Făgăraș, 2007), o multitudine de specii provocând alergii (An, 2004), micoze și **micotoxicoze**. Fungii prezintă interes datorită **metaboliților**, denumiți **micotoxine**. Aceste substanțe sunt omniprezente și cauzează simptome neplăcute animalelor și omului. Principalii producători de micotoxine aparțin genurilor *Aspergillus*, *Penicillium* și *Fusarium* (An, 2004).

*Aspergillus sp.* are o distribuție globală, cu precădere în zonele temperate calde și subtropicale. Contaminările apar datorită condițiilor improprie de depozitare dar și culturile pot fi atacate. *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger* produc aflatoxine și sunt responsabile de majoritatea infecțiilor la om: pneumonie, sinuzită, keratomicoză, abces pulmonar (Howard, Miller, 1996).

*Penicillium sp.*, abundent în zonele temperate, apare datorită condițiilor improprie de depozitare. Ochratoxina produsă de *P. expansum* este responsabilă de nefropatia endemică balcanică (CAST, 2003). *P. marneffei* provoacă infecții pacienților imunocompromiși (Howard, Miller, 1996).

*Fusarium sp.*, saprofit cu răspândire globală, atacă în special cerealele. Unele specii pot cauza infestări datorită condițiilor improprie de depozitare (CAST, 2003). Micotoxinele produse (Zearalenona, Fumonizina, Deoxinivalenol, toxina T-2) nu sunt ușor de eliminat (An, 2004).

Din cele peste 300 micotoxine identificate, doar o parte se găsesc frecvent în alimente, furaje. Principalele grupe de micotoxine contaminante sunt reprezentate de Aflatoxine, Trichotecene, Fumonizine, Zearalenona, Ochratoxina și Patulina (An, 2004). Lista micotoxinelor de importanță economică și clinică mai cuprinde: Acidul kojic, Acidul penicilic, Alternariol, Citrinina, Ergotamina, Gliotoxina, Moniliformina, Roquefortina (CAST, 2003).

Fungii prezintă o problemă medicală globală, micotoxicozele fiind des întâlnite în țările subdezvoltate (Bennett, Klitch, 2003) și se datorează pătrunderii micotoxinelor în organism pe cale digestivă, respiratorie sau dermică și nu se transmit de la un individ la altul (Carlson, Ensley, 2003). Simptomele depind de tipul micotoxinei, durata expunerii, vârsta, starea de sănătate, sex, factori genetici, de nutriție și interacțiunea cu alte toxine (Bennett, Klitch, 2003).

## PARTEA I – STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

### I.1. Acidul kojic – date generale

Această micotoxină, produsă de *Aspergillus sp.* și *Penicillium sp.*, este un contaminant al produselor alimentare: sake, sos de soia, cereale, nutrețuri, lactate (Burdock și colab., 2001).

Acidul kojic are rol antibacterian, antidiabetic (Rajamanikyam și colab., 2017), antifungic (Siddhardha și colab., 2010), antiparazitar (Rodrigues și colab., 2014), insecticid (Dobias și colab., 1977 citați de Mohamad și colab., 2010), antioxidant (Chen și colab., 1991 citați de Mohamad și colab., 2010), în depigmentarea pielii (Prignano și colab., 2007).

### I.2. Patulina – date generale

Această micotoxină este produsă de peste 60 specii de fungi, cele mai importante fiind ale genului *Penicillium sp.*, *Aspergillus sp.* și *Alternaria alternata* (Afssa, 2006). Patulina contaminează produse ce fac parte din alimentația oamenilor sau animalelor: fructe, sucuri, oleaginoase, băuturi alcoolice, cereale, produse lactate, mezeluri (Joshi și colab., 2013).

Reglementările Comisiei Europene din 2006, admit o concentrație maximă de 50 µg/L. Patulina a demonstrat activitate insecticidă (Cole și Rolinson, 1972), nematocidă (Mayer, 1995 citat de Li și colab., 2007), antiparazitară (Föller și colab., 2009), apoptotică (Lupescu și colab., 2013).

### **I.3. Efectele acidului kojic și ale patulinei asupra organismului**

Asupra **vertebratelor**, **acidul kojic** are ca efecte: scăderea ritmului cardiac al embrionilor de *Danio rerio* (Choi și colab., 2007); acțiune anxiogenică, scăderea activității unor enzime antioxidante și o creștere a peroxidării lipidelor din creier (Ciornea și colab., 2019); paloarea ficatului, rinichilor rozătoarelor (Kynoch, Lloyd, 1977 citat de Burnett și colab., 2010); creșterea masei ficatului, rinichilor (Kariya și colab., 1979 citat de Burnett și colab., 2010), adenom hepatocelular la rozătoare (Watanabe și colab., 2005 citat de Burnett și colab., 2010); canibalism la femelele de șobolan (Choudhary și colab., 1992 citat de Burnett și colab., 2010); hiperplazia tiroidei șobolanilor, reducerea nivelului de triiodotironină și tiroxină, creșterea nivelului TSH (Fujimoto și colab., 1999); letargie, ataxie, pierderea reflexelor, tremurături, convulsii la rozătoare (Kynoch, Lloyd, 1977 citat de Burnett și colab., 2010).

Asupra **vertebratelor**, **patulina** are ca efecte: nefrotoxicitate la embrionii de *Danio rerio* (Wu și colab., 2012); acțiune anxiogenică, scăderea activității unor enzime antioxidante și o creștere a peroxidării lipidelor din creier (Ciornea și colab., 2019); creșterea transaminazelor, vacuolizarea hepatocitelor, picnoza, cariomegalia/degenerarea nucleară la șobolani (El-Sawi și colab., 2012); creșterea nivelului lactat-dehidrogenazei la șoareci (Gashlan, 2008); creșterea fosfatazei alcaline la șoareci, degenerarea/necroza hepatocitelor, dilatarea sinusoidelor, creșterea concentrației ureei, acidului uric, a creatininei, procese inflamatorii și degenerative renale (Al-Hazmi, 2014); proliferarea celulelor Kupffer, infiltrații limfocitare, eozinofilie a mucoasei jejunale a rozătoarelor (Escoula și colab., 1977); procese inflamatorii gastro-intestinale și neutrofilie (McKinley și colab., 1982 citat de CAST, 2003); sedarea șobolanilor, pierderea reflexelor, convulsii (De Sarro și colab., 1984); creșterea nivelului de norepinefrină, dopamină, serotonină, a activității locomotorii și a agresivității la șoareci (Al-Hazmi, 2014).

### **I.4. Stresul oxidativ indus de expunerea la micotoxine**

Un efect major al expunerii la micotoxine îl reprezintă acumularea intracelulară a radicalilor liberi, stresul oxidativ, peroxidarea lipidelor, reducerea proliferării celulare (Abid-Esefi și colab., 2004; Omar, 2013). În condiții fiziologice normale, nivelul radicalilor liberi este ținut sub control prin intermediul antioxidantilor endogeni: superoxid dismutaza (SOD), catalaza (CAT), glutation peroxidaza (GPX), glutation redus (GSH) (Zhang și colab., 2015).

### **I.5. Comportamentul peștilor: rol și fiziologie**

În mediul acvatic, peștii utilizează diverse indicii (vizuale, olfactive, auditive, mișcarea apei, debitul mareelor, presiunea hidrostatică, poziția soarelui, unde electromagnetice) pentru determinarea localizării și orientării în spațiu (Brown și colab., 2011).

### **I.6. Metoda informatică de analiză a datelor “Machine learning”**

#### **I.6.1. Algoritmi utilizați**

Algoritmii informatici sunt grupați în trei tipuri: învățare supervizată, învățare fără supervizare și învățare prin armare. În învățarea supervizată, utilizată în prezentul experiment, datele sunt etichetate pentru a-i transmite calculatorului ce model să utilizeze.

### I.6.2. Evaluarea performanței modelului și gestionarea datelor

Evaluarea performanței modelului este foarte importantă, iar metrica de performanță cea mai frecvent utilizată este scorul de clasificare (accuracy). Receiver Operating Characteristic (ROC) este o reprezentare grafică. Performanța este determinată analizând aria de sub curbă ROC (sau AUC), cea mai bună valoare posibilă fiind 1, iar cea mai rea 0.5.

O *matrice de confuzie* descrie performanța unui model de clasificare pe un set de date de test. Există cazuri în care lipsește un element (date corupte, neîncărcare/extragere incompletă), fiind necesară gestionarea valorilor lipsă prin ștergerea rândurilor, înlocuirea cu valoarea medie, precizarea valorilor lipsă, utilizarea algoritmilor care susțin valorile lipsă.

## PARTEA A II-A. PARTEA DE CONTRIBUȚIE PERSONALĂ

### II.1. Motivația alegerii temei de cercetare

Femelele de *Aedes aegypti* au rol de vector al virusurilor ce provoacă febra galbenă, febra Dengue, Chikungunya (Service, 2012). Datorită răspândirii mari a acestor țânțari, se impune descoperirea unor măsuri de combatere față de care aceste insecte nu au dobândit rezistență.

Peștii zebra (*Danio rerio*), originari din Asia de Sud și Sud-Est, au ca habitat apele lent-curgătoare sau stătătoare (Spence și colab., 2008). Analiza microbiologică a apei unor bălți (Saju, 2011), lacuri (Bandh și colab., 2011), râuri (Kshirsagar și Gunale, 2013), a demonstrat prezența fungilor ce produc patulină și/sau acid kojic: *Penicillium sp.*, *Aspergillus sp.*, *Alternaria alternata*, multe specii de pești fiind expuse la acești fungi (Kumari și Kumar, 2015; Rao, 2017). Peștii din apele contaminate cu fungi ce produc patulină și/sau acid kojic, prezintă un nivel crescut al enzimelor hepatice, ceea ce indică leziuni ale ficatului (Atef și colab., 2016).

Acidul kojic, la o concentrație de 204-284 mg/L, s-a dovedit letal pentru 90-95 % din larvele de *A. aegypti* expuse (Rajamanikyam și colab., 2017). Embrionii de pește zebra au prezentat edem al pericardului în urma expunerii la 100 mg/L acid kojic (Veselinović și colab., 2017), ceea ce arată necesitatea testării acestei concentrații și asupra adulților.

Pornind de la aceste studii, am decis să investighez efectul acestor concentrații de acid kojic asupra peștilor zebra (*D. rerio*) (stadiul adult), specie ce coabitează și se hrănește cu larvele de *Aedes aegypti*. Majoritatea studiilor analizează efectele patulinei asupra embrionilor de *D. rerio*: nefrotoxicitate (Wu și colab., 2012), hiperactivitate (Sidebotham, 2015). Un experiment asupra adulților injectați cu patulină arată modificări ale activității locomotorii (Nguyen, 2014).

Am concluzionat că aceste studii trebuie completate cu investigații ale efectelor patulinei asupra adulților de *D. rerio*. Deși a fost demonstrat efectul neurotoxic al mai multor micotoxine (Zhang și colab., 2009, Osuchowski și colab., 2005), efectele comportamentale induse de către patulină și acidul kojic asupra peștilor nu sunt la fel de bine studiate, motiv pentru care am dorit să investighez și efectul acestor micotoxine asupra stării de anxietate a *D. rerio*.

Doza de patulină utilizată, 70 μg/L, depășește semnificativ limita de 50 μg/L impusă de Comisia Europeană și reprezintă: 0.38% din LD<sub>50</sub> a larvelor de *D. rerio* și 0.41% din LD<sub>50</sub> a șoarecilor adulți (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>).

## II.2. Obiectivele propuse

**Obiectivele** principale ale tezei sunt determinarea efectelor acidului kojic și ale patulinei asupra anxietății, stresului oxidativ, organelor interne și a existenței unor corelații între toxina administrată și comportamentul animalului.

## II.3. MATERIAL ȘI METODĂ

### II.3.1. Materialul biologic utilizat

#### II.3.1.1. Animalele folosite în experimente

Am utilizat pești zebură (*Danio rerio*, specie dulcicolă, omnivoră), procurați de la producători locali (Iași, România) cu masa corporală de 0.48 – 0.74 g.

Creșterea și utilizarea animalelor de laborator s-au desfășurat conform recomandărilor Federației Europene a Asociațiilor pentru Știința Animalelor de Laborator (FELASA).

#### II.3.1.2. Condițiile de captivitate

Peștii au fost ținuti în acvarii cu volum de 70 L, temperatura apei a fost constantă (24°C), ciclul zi-noapte: 12 h lumină, 12 h întuneric. Hrana s-a administrat la 8:00 și 20:00. Apa a fost schimbată la 3 zile (1/3 din volumul de apă). Perioada de aclimatizare a peștilor a fost de 7 zile.

#### II.3.1.3. Micotoxinele utilizate și administrare

Acidul kojic a fost procurat de la Carl Roth GmbH + Co KG (Karlsruhe, Germania). Patulina a fost procurată de la Romer Labs Diagnostic GmbH (Tulln, Austria).

Peștii au fost împărțiți în 5 grupuri a câte 20 indivizi: martor (nu s-a administrat nimic timp de 7 zile); patulină (administrare zilnică 70 μg/L patulină, 7 zile); acid kojic I (administrare zilnică 100 mg/L acid kojic, 7 zile); acid kojic II (administrare zilnică 204 mg/L acid kojic, 7 zile); acid kojic III (administrare zilnică 284 mg/L acid kojic, 7 zile).

Pentru administrarea cantității dorite de toxină am folosit o balanță analitică AND HR-202 (precizie de 4 zecimale). Administrarea patulinei și a acidului kojic s-a făcut prin imersie.

### II.3.2. Determinarea efectelor Patulinei și ale Acidului kojic asupra comportamentului peștilor zebură (*Danio rerio*)

Testul comportamental Novel Tank (Fig. 1) a fost efectuat în a 8-a zi de la începerea experimentului.



Fig. 1 - Acvariul folosit pentru testul comportamental Novel Tank

#### II.3.2.1. Testul Novel tank (NTT) de evaluare a anxietății

**Testul Novel Tank** are rol în evaluarea anxietății peștilor.

Fiecare pește din cei 60 implicați în test, a fost introdus într-un acvariu dreptunghiular și lăsat să se miște liber. Localizarea peștelui în zona inferioară/superioară a acvariului reprezintă un indicator al anxietății (Bencan și colab., 2009).

Durata observațiilor a fost de 6 minute, folosind o cameră web Logitech HD.

Folosind ANY-maze®software, pentru fiecare individ s-a înregistrat: numărul de intrări în zona superioară a acvariului, distanța parcursă (m), durata imobilității (s), durata mobilității (s), latența de a intra în zona superioară a acvariului (s), timpul petrecut în zona inferioară a acvariului (s), timpul petrecut în zona superioară a acvariului (s).

#### **II.3.2.3. Analiza statistică**

**Analiza statistică** a fost realizată folosind analiza variației ANOVA (two-way ANOVA). Toate rezultatele sunt exprimate ca media  $\pm$  eroarea standard a mediei. Valorile indicelui general F pentru care  $p < 0.05$  au fost considerate ca fiind semnificative statistic.

### **II.3.3. Aplicarea analizei statistice și a unor metode informatice pentru a descoperi existența unor corelații între starea de intoxicare și comportamentul peștilor**

#### **II.3.3.1. Analiza statistică**

S-au utilizat cele 5 loturi de pești zebură (Martor, Patulina 70  $\mu$ g/L, Acid kojic 100 mg/L, 204 mg/L și 284 mg/L) supuse la testul comportamental Novel Tank.

În cadrul analizei NTT am obținut 60 de înregistrări valide de la 60 de indivizi, monitorizându-se variabilele înregistrate de ANY-maze®software.

S-a început cu o analiză statistică pentru testul NTT, utilizând testul One Way ANOVA și tehnica Principal Component Analysis (PCA) de reducere a dimensionalității sistemului la componentele principale, utilizând software-ul AnalyseIt.

Testul ANOVA - este un test de comparare a mediilor, ipotezele pentru acest test fiind:

- $H_0$ : Mediile populațiilor din care provin loturile sunt egale
  - $H_1$ : Cel puțin una dintre mediile populațiilor din care provin loturile diferă față de celelalte
- Rezultatul  $p$  al testului, are aceeași interpretare ca și în cazul celorlalte teste statistice:
- $p > 0.05$  nu se respinge  $H_0$ , diferența este nesemnificativă la pragul de semnificație de 95%
  - $p < 0.05$  se respinge  $H_0$  cu pragul de semnificație de 95%. Cel puțin 2 medii diferă semnificativ
  - $p < 0.01$  se respinge  $H_0$  cu pragul de semnificație de 99%. Cel puțin 2 medii diferă semnificativ
  - $p < 0.001$  se respinge  $H_0$  (prag semnificație 99.9%). Cel puțin 2 medii diferă înalt semnificativ
- Dorim să aflăm dacă testul NTT conține seturi de variabile care indică existența unor corelații între toxina administrată și comportamentul animalului.

#### **II.3.3.2. Analiza factorială**

Analiza factorială (analiza componentelor principale - PCA) are ca scop reducerea complexității datelor, evidențierea corelațiilor dintre variabile. Datele sunt reprezentate într-un spațiu  $n$ -dimensional, iar analiza factorială identifică un subspațiu  $k$ -dimensional al datelor ( $k < n$ ) ([https://profs.info.uaic.ro/~val/statistica/StatWork\\_11.pdf](https://profs.info.uaic.ro/~val/statistica/StatWork_11.pdf)).

Varianțele fiecărei componente principale arată cât din variația inițială a setului de date este reprezentată de componenta principală (<https://analyse-it.com>).

Un monoplote bidimensional reprezintă informațiile conținute în 2 dintre componentele principale, fiind o aproximare a spațiului multidimensional original (<https://analyse-it.com>).

Pentru a evalua dacă o variabilă este bine reprezentată în grafic, vom analiza lungimea vectorului și apropierea vârfului acestuia de raza cercului: un vector de lungime mare indică faptul că

variabila este bine reprezentată; lungimea redusă a vectorilor indică o slabă reprezentare; nu se recomandă formularea unor concluzii ce implică aceste variabile (<https://analyse-it.com>).

Unghiul dintre vectori reprezintă o aproximație a corelației dintre variabile: un unghi sub 90° indică o corelație pozitivă; un unghi de 90° indică lipsa unei corelații între variabile; un unghi de aprox. 180° indică o corelație negativă (<https://analyse-it.com>)

#### **II.3.3.2. Algoritmi utilizați și gestionarea datelor**

Am utilizat algoritmi de învățare automată supervizată („Support Vector Machine” (SVM), KNN, XGBoost, Decision tree, Random Forest) în limbajul de programare Python și accesând mediul Google Colaboratory ce oferă acces la GPU-urile Tesla K80. Fișierele .ipynb pe care le creăm se vor salva în contul Google Drive.

Am creat un program pentru a testa algoritmi de învățare automată pe problemele de clasificare din cazul testului comportamental NTT. Am început cu scanarea datelor, importurile de bază și apoi am acoperit algoritmi de clasificare: am calculat precizia modelului (accuracy) pentru setul de date de test și pentru cel de antrenare (pentru a descoperi un eventual overfitting), am calculat Matricea de Confuzie și Aria de sub curbă (AUC). Am folosit notebook-ul [<https://www.kaggle.com/mgabrielkerr/visualizing-knn-svm-and-xgboost-on-iris-dataset>].

Am refăcut aceeași analiză pentru situația în care tratamentul administrat loturilor de pești a fost redus la 2 componente, de control - 0 și cu toxină administrată –1.

Setul de date din această analiză are 8 dimensiuni. Am utilizat PCA pentru a-l reduce la 2 dimensiuni, pentru a putea parcurge și înțelege mai bine datele. Am folosit acest notebook [<https://towardsdatascience.com/pca-using-python-scikit-learn-e653f8989e60>].

Aceeași analiză s-a refăcut pentru situația în care tratamentul administrat loturilor de pești s-a redus la 2 componente (analiză binară), de control - 0 și cu toxină administrată – 1.

Situația claselor dezechilibrate apare în seturile de date cu un raport disproporționat de observații pentru fiecare clasă. Acuratețea standard nu mai măsoară în mod fiabil performanța.

Cazul reducerii tratamentului administrat loturilor de pești la 2 componente, de control - 0 și cu toxină administrată - 1 se înscrie în situația de clase dezechilibrate. Pentru clasele dezechilibrate întâlnite în analiza NTT, am explorat 5 moduri de gestionare a situației: supra-eșantionarea clasei minoritare, sub-eșantionarea clasei majoritare, modificarea evaluării performanței, utilizarea algoritmilor de penalizare, utilizarea de algoritmi pe bază de arbori de decizie. Am folosit notebook-ul [<https://elitedatascience.com/imbalanced-classes>].

Bazele de date NTT conțin valori lipsă. Pentru simplificare, am înlocuit toate valorile lipsă cu valoarea medie a coloanei corespunzătoare.

#### **II.3.4. Determinarea unor parametri biochimici ce măsoară stresul oxidativ indus de Patulină și Acidul kojic**

După efectuarea testului comportamental, câte 4 pești din fiecare lot au fost anesteziați, decapitați. Encefalul a fost spălat cu soluție salină, omogenizat în soluție tampon și centrifugat (Maheswari și colab., 2014; Dumitru și colab., 2018). Supernatantul obținut a fost folosit la determinarea activității catalazei, glutatation-peroxidazei și a concentrației malondialdehidei.

#### **II.3.4.1. Determinarea nivelului catalazei (CAT)**

Activitatea **CAT** a fost determinată prin metoda spectrofotometrică Sinha (1972) adaptată în conformitate cu Maheswari și colab. (2014), Dumitru și colab. (2018) și citită la 570 nm cu ajutorul unui spectrofotometru. Activitatea enzimatică este măsurată în U/mg proteină.

#### **II.3.4.2. Determinarea nivelului glutation-peroxidazei (GPX)**

Activitatea **GPX** a fost determinată prin metoda Fukuzawa și Tokumura de dozare spectrofotometrică, adaptată în conformitate cu Dumitru și colab. (2018).

O unitate de glutation peroxidază reprezintă cantitatea de enzimă necesară pentru a oxida 1 nmol GSH/min. Activitatea enzimatică este măsurată în U/mg proteină.

#### **II.3.4.3. Determinarea nivelului malondialdehidei (MDA)**

Concentrația **MDA** a fost determinată spectrofotometric folosind metoda acidului tiobarbituric, adaptată în conformitate cu Dobrian și colab. (2001), Dumitru și colab. (2018). Citirea probelor s-a făcut la 532 nm cu ajutorul spectrofotometrului. Concentrația MDA este măsurată în nmol/ mg proteină.

#### **II.3.4.4. Analiza statistică**

Pentru analiza biochimică, probele de țesut cerebral au fost prelevate de la 4 indivizi din fiecare grup. Apoi, am realizat calculul statistic cu pachete statistice standard (Microsoft Excel). Rezultatele au fost exprimate ca media  $\pm$  eroarea standard.

### **II.3.5. Determinarea efectelor histopatologice induse de Patulină și Acidul kojic**

#### **II.3.5.1. Pregătirea și colorarea preparatelor histologice**

După eutanasiere, 8 pești din fiecare lot au fost fixați 48 h în formaldehidă 10%, apoi au fost imersați 24 h în soluție Bouin. Pregătirea preparatelor histologice s-a făcut prin includerea în parafină, secționarea longitudinală (grosime 5  $\mu$ m), colorarea tricromică Masson (Hematoxilină-eozină-albastru de metilen) prezentată de Diaconiță și colab. (1953), Șincai (2000).

Examinarea histologică s-a realizat cu un microscop AmScope B120, imaginile au fost captate cu o cameră digitală MicroQ Pro de 5 mp.

S-au urmărit comparativ modificările histologice ale ficatului, pancreasului, intestinului, rinichiului, miocardului, encefalului la loturile expuse la patulină, acid kojic și lotul martor.

### **II.3.6. Modele experimentale utilizate**

Efectele patulinei au fost studiate în principal pe embrioni/larve de pești zebură (Wu și colab., 2012; Yuan și colab., 2014; Sidebotham, 2015; Muthulakshmi și colab., 2018). Durata expunerii a variat între 24-90 ore, urmărindu-se apariția malformațiilor, a efectelor cardiovasculare, histologice, comportamentale, nivelul unor antioxidanți, doar experimentul unui student (Nguyen, 2014) urmărește efectele toxinei asupra activității locomotorii.

Studiul lui Gashlan (2008), în care unul dintre loturile de șoareci a fost expus o săptămână la patulină pentru a determina modificările histopatologice ale ficatului și cantitatea de antioxidanți, a constituit un punct de plecare în alegerea duratei expunerii peștilor.

Efectul acidului kojic asupra peștilor zebură a fost studiat în principal pe stadiul embrionar: Chen și colab. (2015), Hsu și colab. (2016), Veselinovic' și colab. (2017), Lajis și colab. (2017), Thach

și colab. (2017). Durata expunerii a fost de 48-72 ore, urmărindu-se rata mortalității, apariția malformațiilor cardio-vasculare, modificările ritmului cardiac, efectul asupra neutrofilelor.

## II.4. REZULTATE ȘI DISCUȚII

### II.4.1. EFECTELE PATULINEI ȘI ALE ACIDULUI KOJIC ASUPRA ANXIETĂȚII. UTILIZAREA UNOR METODE INFORMATICE DE ANALIZĂ A DATELOR PENTRU IDENTIFICAREA EXISTENȚEI CORELAȚIILOR DINTRE STAREA DE INTOXICARE ȘI COMPORTAMENT

#### II.4.1.1. Patulina

##### II.4.1.1.1. Efectele asupra anxietății

Activitatea locomotorie a indivizilor expuși la patulină s-a desfășurat predominant în partea inferioară a acvariului (Fig. 2) spre deosebire de cei din grupul martor care au inotat uniform în acvariu.

Comparativ cu lotul martor, la peștii lotului expus la patulină distanța parcursă este ușor scăzută. Aceasta se datorează unei perioade mobile mai scurte și unui număr semnificativ redus (cu 27%) de intrări în zona superioară a acvariului (Fig. 2 a, b, c).

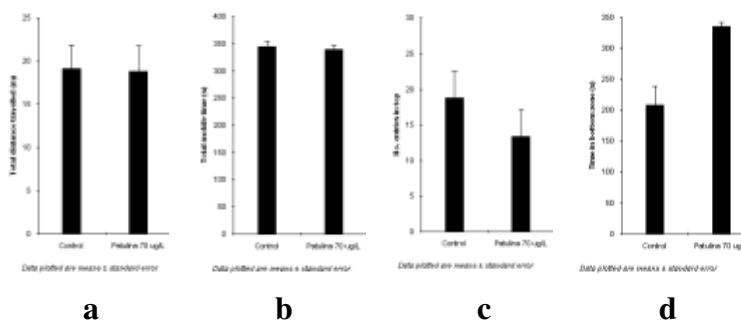


Fig. 2 - Efectele patulinei asupra parametrilor comportamentali (testul Novel Tank): a – distanța parcursă (m); b - durata mobilității (s); c – nr. de intrări în zona superioară; d – timpul petrecut în zona inferioară (s)

Numărul redus al intrărilor în zona superioară a acvariului arată ca peștii intoxicați s-au deplasat în principal în zona inferioară a acvariului. Timpul petrecut în zona inferioară a acvariului este mult crescut (cu aprox. 61%) la indivizii intoxicați cu patulină (Fig. 2 d).

Valorile tuturor acestor parametri demonstrează apariția unei stări de anxietate datorate efectelor toxice ale patulinei.

#### II.4.1.2. Acidul kojic

##### II.4.1.2.1. Efectele asupra anxietății

Activitatea locomotorie a indivizilor expuși la acid kojic s-a desfășurat predominant în partea inferioară a acvariului (Fig. 3) spre deosebire de cei din grupul martor care au inotat uniform în acvariu.

La peștii intoxicați cu acid kojic distanța parcursă este redusă (Fig. 3 a). Aceasta se datorează unei perioade mobile mai scurte (cu 25-27 % în cazul peștilor expuși la 204 mg/L și 284 mg/L acid kojic) și unui număr semnificativ redus de intrări în zona superioară a acvariului (cu aprox. 50 % în cazul peștilor expuși la 100 mg/L și 204 mg/L acid kojic) (Fig. 3 b, c).

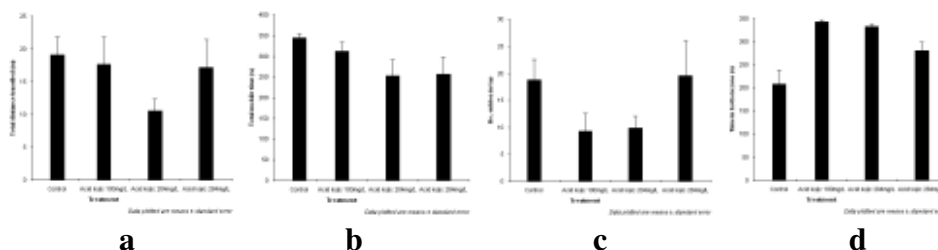


Fig. 3 - Efectele acidului kojic asupra parametrilor comportamentali (testul Novel Tank): a – distanța parcursă (m); b - durata mobilității (s); c – nr. de intrări în zona superioară; d – timpul petrecut în zona inferioară (s)

Distanța foarte redusă parcursă de indivizii expuși la 204 mg/L acid kojic (cu 45% mai redusă față de lotul martor) este corelată cu cea mai redusă durată a mobilității (cu 27% mai redusă) și cu un număr semnificativ redus al intrărilor în zona superioară a acvariului (cu 48% mai redus). Menținerea indivizilor în zona inferioară a acvariului și reducerea activității locomotorii arată că doza de 204 mg/L dovedește puternice efecte anxiogenice.

La 100 mg/L acid kojic, indivizii înregistrează numărul minim de intrări în zona superioară a acvariului. Activitatea locomotorie preponderentă în zona inferioară a acvariului, distanța parcursă și durata mobilității, arată un efect anxiogenic.

La 284 mg/L acid kojic, numărul de intrări în zona superioară este ușor crescut, iar distanța parcursă este apropiată de cea înregistrată la indivizii neintoxicați. Starea de anxietate se manifestă prin durata redusă a mobilității (cu 25%). Aceste valori demonstrează o activitate locomotorie intensă, însemnând că peștii au înotat rapid încercând să părăsească mediul toxic. Timpul petrecut în zona inferioară a acvariului este mult crescut la indivizii intoxicați (Fig. d).

La 100 mg/L și 204 mg/L acid kojic, perioadele de timp petrecute în zona inferioară a acvariului sunt cu peste 60% mai crescute față de lotul martor. Aceste 2 loturi înregistrează cel mai redus număr de intrări în zona superioară a acvariului, dovedind o anxietate accentuată.

La 284 mg/L acid kojic s-a produs o creștere cu 34% a timpului petrecut în zona inferioară a acvariului. Această variabilă este maximă în cazul dozei minime de acid kojic, și scade odată cu mărirea dozei, dar crește mobilitatea în restul acvariului, efect al stării de neliniște induse de cele două doze mari de acid kojic.

Creșterea timpului petrecut în zona inferioară a acvariului, durata redusă a mobilității dovedesc starea de anxietate a peștilor.

Efectul anxiogenic al acidului kojic reduce abilitatea peștilor de a explora mediul, de a se orienta pentru a găsi hrană, parteneri și locuri pentru depunerea pondei, toate acestea fiind esențiale pentru supraviețuirea indivizilor și a speciei.

#### II.4.1.3. Determinarea corelațiilor dintre starea de intoxicare și comportamentul peștilor zebură cu ajutorul metodelor statistice și informatice

Pentru majoritatea loturilor de variabile s-a obținut “Nu se respinge  $H_0$ , diferența este ne semnificativă la pragul de semnificație de 95%”. Excepție au făcut variabilele „Timpul petrecut în zona superioară” și “Timpul petrecut în zona inferioară” pentru care s-a obținut “Se respinge  $H_0$  cu pragul de semnificație de 99.9% - Cel puțin 2 medii diferă înalt semnificativ”.

Astfel, am aflat că testul NTT conține variabile ce variază în funcție de toxina/doza administrată, ceea ce indică o corelație între comportamentul peștilor zebură și micotoxina/doza utilizată.

Deși primele 2 componente principale reprezintă 62.1% din varianța setului de 8 variabile originale (Fig. 4 b), acestea oferă o aproximare utilă a relațiilor dintre variabile. Relațiile dintre variabile sunt mai ușor de vizualizat în monoplote (Fig. 4 a):

- corelația negativă dintre timpul petrecut în zona superioară și timpul petrecut în zona inferioară (vectorii se află la aprox. 180°), corelația negativă dintre durata imobilității și durata mobilității peștilor (vectorii se află la aprox. 180°)

Numărul intrărilor în zona superioară, distanța parcursă, latența de a intra în zona superioară și doza de toxină administrată nu sunt bine reprezentate (lungime redusă a vectorilor); nu se recomandă formularea unor concluzii legate de relațiile dintre/cu aceste variabile.

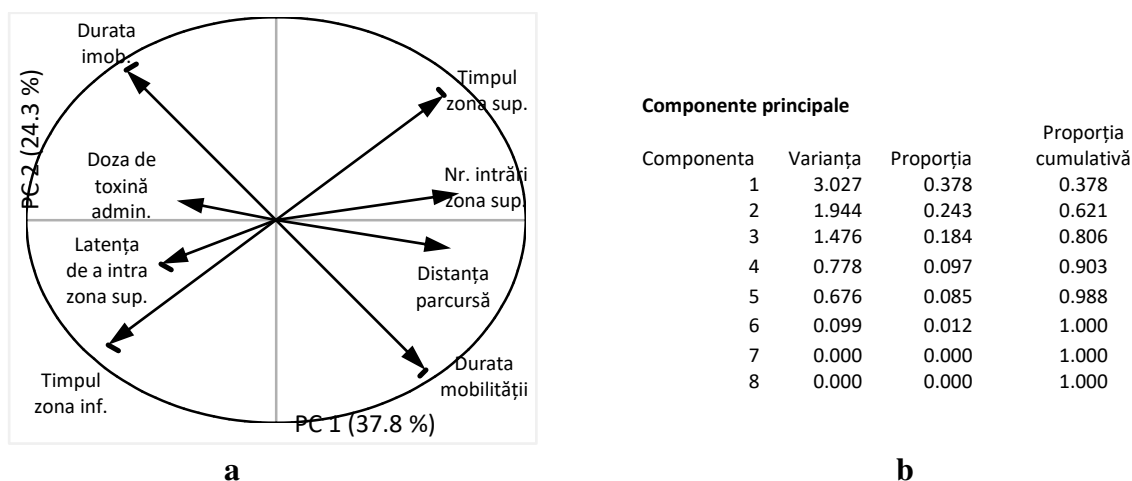


Fig. 4 - Testul NTT: a - monoplote al corelației primelor 2 componente principale (62.1%); b - tabelul cu varianțe

Cel mai redus over-fitting (diferența dintre precizia pe datele de antrenare și cele de testare) s-a înregistrat în cazul algoritmului KNN (20%) iar cele mai mari valori ale acurateții pentru XGBoost, Decision Tree și Random Forest rulate pe datele de antrenare, de aprox. 100%, doar că valorile over-fittingului rezultat sunt mari (peste 70%) (Tabelul 1).

Tabelul 1 NTT. Precizia algoritmilor de învățare automată

| Algoritm      | Precizie date antrenare | Precizie date test |
|---------------|-------------------------|--------------------|
| SVM           | 0.62                    | 0.11               |
| KNN           | 0.48                    | 0.28               |
| XGBoost       | 1.00                    | 0.17               |
| Decision Tree | 1.00                    | 0.22               |
| Random Forest | 0.98                    | 0.28               |

Pe setul de date reduse (Tabelul 2) s-au înregistrat rezultate mai bune ale acurateții algoritmilor de clasificare. SVM, KNN înregistrează cel mai redus overfitting (1%), o acuratețe înaltă (90%) iar valoarea AUC este 0.75. Random Forest, Decision Tree au dat rezultate bune: acuratețe 100%, overfitting 30% și AUC de 0.6. XGBoost a obținut cea mai înaltă acuratețe de

clasificare (95 %), o rată de overfitting redusă (6 %) și o valoare AUC înaltă (0.75). Matricea de confuzie prezintă cele mai multe erori în cazul clasei minoritare, dar mult reduse.

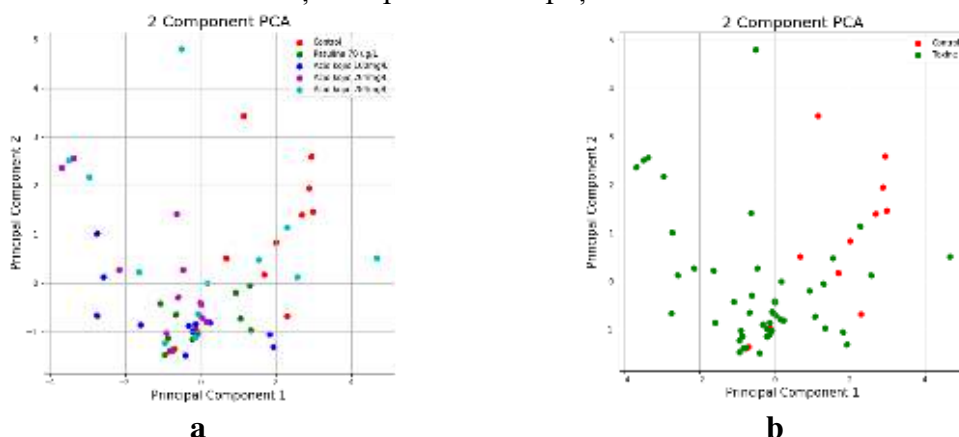
**Tabelul 2 NTT. Precizia algoritmilor de învățare automată pe date reduse**

| Algoritm      | Precizie date antrenare | Precizie date test | Matrice de confuzie | Aria de sub curbă |
|---------------|-------------------------|--------------------|---------------------|-------------------|
| SVM           | 0.90                    | 0.89               | [0 1]               | 0.75              |
| KNN           | 0.88                    | 0.89               | [0 1]               | 0.75              |
| XGBoost       | 0.95                    | 0.89               | [0 1]               | 0.75              |
| Decision Tree | 1.00                    | 0.67               | [0 1]               | 0.6071428         |
| Random Forest | 1.00                    | 0.78               | [0 1]               | 0.5892857         |

Acuratețea înaltă, valoarea crescută a AUC și cel mai redus overfitting arată că SVM și XGBoost sunt cei mai performanți algoritmi de clasificare pentru modelul nostru în date reduse.

Codul din limbajul de programare Python proiectează datele originale (8 dimensiuni) în 2 dimensiuni. Noile componente sunt doar cele 2 dimensiuni principale ale varianței. În timp ce convertim spațiul 8 dimensional în spațiul 2 dimensional, pierdem o parte din varianță (informație). Prima componentă principală conține 43.44% din varianță și a 2-a componentă conține 26.79% (70.23 % împreună): array ([0.43440277, 0.26793531])

În setul de date original, majoritatea claselor nu sunt bine separate între ele, doar clasa „Control” pare a fi ușor separată de celelalte (Fig. 5 a). În cazul setului de date reduse observăm o mai clară separare a clasei „Control” de clasa „Toxine” (Fig. 5 b). Astfel, este demonstrată existența unei corelații între starea de intoxicație și comportamentul peștilor zebră.



**Fig. 5 - PCA aplicată testului NTT: a – pe setul de date original; b – pe setul de date reduse**

Valoarea de 70% a varianței din acest caz este apropiată de valoarea calculată cu ajutorul algoritmilor statistici.

În urma reducerii tratamentului administrat loturilor de pești la 2 valori (0- neintoxicat, 1- intoxicat), precizia generală a modelului nostru (obținută prin lansarea programului P3 din Anexa 4) este de aproximativ 88% : [0 1] 0.883333333 (**acuratețe**)  
Modelul prezice ambele clase (minoritară și majoritară).

Explorând mai multe moduri de gestionare eficientă a situației claselor dezechilibrate am obținut:

1. supra-eșantionarea clasei minoritare: [0 1] 0.854166666 (**acuratețe**)

Modelul nu prezice doar o singură clasă și acuratețea este mai înaltă.

2. sub-eșantionarea clasei majoritare: [0 1] 0.791666666 (**acuratețe**)

Modelul nu prezice doar o singură clasă, iar precizia rezultată pare mai mică (dar nu cu mult).

3. modificarea evaluării performanței:

Modelul instruit pe setul de date sub-eșantionate are 0.909722222 (**AUC**)

Modelul original instruit pe setul de date dezechilibrate are 0.909722222 (**AUC**)

Modelul original instruit pe setul de date dezechilibrate a avut o precizie de 88%, mult mai mare decât cea de 79% a modelului instruit pe setul de date sub-eșantionate.

Cu toate acestea, ultimul model are o valoare AUC de 91%, la fel cu valoarea modelul inițial.

4. utilizarea algoritmilor de penalizare:

[0 1] 0.883333333 (**acuratețe**) 0.918402777 (**AUC**)

5. utilizarea algoritmi pe bază de arbori de decizie:

[0 1] 1.0 (**acuratețe**) 1.0 (**AUC**)

Rezultate uluitoare, 100% precizie și 100% AUC.

În cazul modelului nostru, cele mai eficiente moduri de gestionare a situației claselor dezechilibrate s-au dovedit a fi utilizarea algoritmilor pe bază de arbori de decizie, structura lor ierarhică permițându-le să învețe semnale din ambele clase (majoritară și minoritară).

#### II.4.1.4. CONCLUZII PARȚIALE

1. Activitatea locomotorie a indivizilor expuși la **patulină** s-a desfășurat predominant în partea inferioară a acvariului, spre deosebire de indivizii neintoxicați ce au înotat uniform.
2. Numărul redus al intrărilor în zona superioară a acvariului, corelat cu valorile distanței parcurse și a duratei mobilității peștilor, arată că indivizii expuși la **patulină** au manifestat o stare accentuată de anxietate datorată toxicității micotoxinei.
3. Indivizii intoxicați cu **patulină** prezintă un comportament caracteristic indivizilor beta (subordonați).
4. Efectul anxiogenic al **patulinei** reduce explorarea mediului pentru a găsi hrană, parteneri și locuri pentru depunerea pontei, alterând și relațiile dintre indivizi, toate aceste efecte scăzând șansele de supraviețuire a indivizilor și a speciei.
5. Activitatea locomotorie a indivizilor expuși la **acid kojic** s-a desfășurat predominant în partea inferioară a acvariului, spre deosebire de indivizii neintoxicați ce au înotat uniform.
6. Din menținerea îndelungată a indivizilor în zona inferioară a acvariului și reducerea activității locomotorii rezultă că doza de **204 mg/L acid kojic** dovedește puternice efecte anxiogenice.
7. La doza de **100 mg/L acid kojic**, anxietatea indivizilor se manifestă prin numărul minim de intrări în zona superioară a acvariului și prin activitatea locomotorie desfășurată preponderent în zona inferioară a acvariului.

8. La **doza maximă de acid kojic (284 mg/L)**, se înregistrează o activitate locomotorie intensă, însemnând că peștii au înotat rapid, încercând să părăsească mediul toxic. Starea de anxietate se manifestă prin durată redusă a mobilității.
9. Anxietatea este prezentă la toate dozele de **acid kojic**, iar mobilitatea mai mare la doza maximă este datorată agitației induse de această micotoxină.
10. Indivizii intoxicați cu **acid kojic** prezintă o stare accentuată de anxietate și un comportament caracteristic indivizilor beta (subordonați).
11. Efectul anxiogenic al **acidului kojic** reduce explorarea mediului pentru a găsi hrană, parteneri și locuri pentru depunerea pontei, alterând și relațiile dintre indivizi, toate aceste efecte scăzând șansele de supraviețuire a indivizilor și a speciei.
12. Inducerea unei stări accentuate de anxietate și a unui comportament specific indivizilor subordonați, demonstrează efectele semnificative ale intoxicației cu **patulină** sau **acid kojic** la nivel encefalului peștilor zebra.
13. În urma testului ANOVA am aflat că testul Novel Tank conține variabile care se corelează cu toxina administrată.
14. Testul Novel Tank s-a dovedit a fi concludent în analiza comportamentală a peștilor, dovedind că peștii intoxicați au avut probleme de anxietate.
15. Am decelat un algoritm din categoria arborilor de decizie, care, prin analiza variabilelor măsurate în cadrul testului Novel Tank, poate fi antrenat să clasifice comportamentul peștilor cărora li s-a administrat o toxină din categoria celor utilizate în experiment.
16. Am antrenat și salvat un model Support Vector Machine (SVM) pentru estimări ulterioare a stării de intoxicare a unui animal în funcție de cele 8 variabile analizate în cadrul testului Novel Tank.

## II.4.2. DETERMINAREA STRESULUI OXIDATIV INDUS DE PATULINĂ ȘI ACIDUL KOJIC

### II.4.2.1. Patulina

#### II.4.2.1.1. Efectele asupra catalazei

În cazul lotului tratat cu patulină, activitatea CAT a scăzut cu peste 50% ( $7.226 \pm 0.423$  U/mg prot.) (Fig. 6 a).

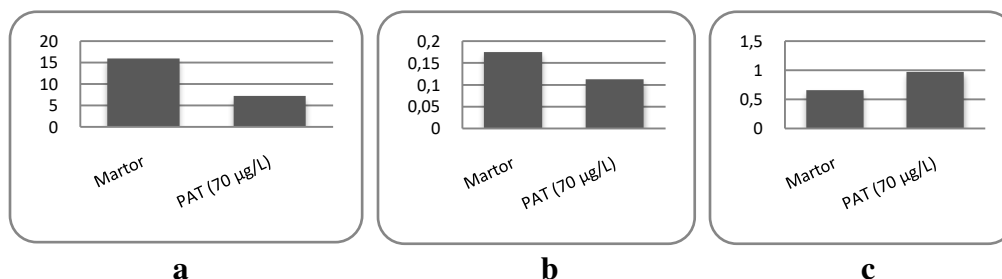


Fig. 6 - Nivelul enzimelor lotului expus la patulină: a - concentrația catalazei (CAT), b - concentrația glutatation-peroxidazei (GPX), c - concentrația malondialdehidei (MDA)

#### II.4.2.1.2. Efectele asupra glutation-peroxidazei

În cazul lotului tratat cu patulină activitatea GPX a scăzut cu 35% ( $0.113 \pm 0.009$  U/mg prot.) (Fig. 6 b).

#### II.4.2.1.3. Efectele asupra malondialdehidei

Patulina a dus la creșterea valorii MDA cu aprox. 48% ( $0.973 \pm 0.044$  nmol/mg prot) (Fig. 6 c).

#### II.4.2.2. Acidul kojic

##### II.4.2.2.1. Efectele asupra catalazei

La 100 mg/L acid kojic, activitatea CAT (Fig. 7 a) a înregistrat o valoare de  $12.258 \pm 0.658$  U/mg prot. (76% din valoarea lotului martor). La 204 mg/L și 284 mg/L s-au înregistrat creșteri ale activității CAT cu 15% ( $18.357 \pm 0.981$  U/mg prot.), respectiv 2% ( $16.258 \pm 1.002$  U/mg prot.).

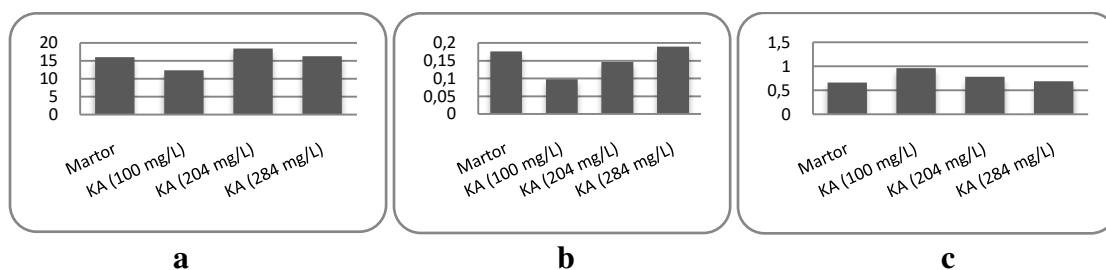


Fig. 7 - Nivelul enzimelor loturilor expuse la acid kojic: a - concentrația catalazei (CAT), b - concentrația glutation-peroxidazei (GPX), c - concentrația malondialdehidei (MDA)

La dozele mari de acid kojic, creșterea activității CAT se explică prin necesitatea înlăturării nivelului crescut al peroxidului de hidrogen și a radicalilor liberi sintetizați pe baza acestuia.

##### II.4.2.2.2. Efectele asupra glutation-peroxidazei

La 100 mg/L și 204 mg/L acid kojic s-au înregistrat scăderi ale activității GPX (Fig. 7 b), valoarea atinsă fiind 55% ( $0.097 \pm 0.0084$  U/mg prot.), respectiv 83% ( $0.146 \pm 0.0076$  U/mg prot.) din valoarea lotului martor. La 284 mg/L acid kojic, GPX a avut cele mai ridicate valori ( $0.189 \pm 0.0081$  U/mg prot.), depășindu-le și pe cele ale peștilor neintoxicați.

Comparând valorile celor 3 loturi intoxicate, constatăm că activitatea GPX crește pe măsură ce crește și concentrația toxinei. Prin aceasta, enzima contribuie la protecția țesutului față de radicalii liberi, al căror nivel este crescut datorită acțiunii toxice a acidului kojic.

##### II.4.2.2.3. Efectele asupra malondialdehidei

Valorile MDA (Fig. 7 c) au fost minime în cazul lotului martor ( $0.6598 \pm 0.023$  nmol/mg prot.). La 100 mg/L acid kojic, concentrația MDA ( $0.956 \pm 0.042$  nmol/mg prot.) a crescut cu 45%. La 204 mg/L și 284 mg/L acid kojic, concentrația MDA a crescut cu 18%, respectiv 4% ( $0.778 \pm 0.029$  nmol/mg prot., respectiv  $0.684 \pm 0.038$  nmol/mg prot.).

Creșterea concentrației MDA este o consecință a concentrației crescute de radicali liberi, pe fondul intoxicației cu dozele de micotoxină, aceste creșteri corelându-se cu, creșterea activității celor două enzime implicate în procesul de detoxifiere (CAT și GPX).

### II.4.2.3. CONCLUZII PARȚIALE

1. Intoxicația cu patulină determină scăderea activității CAT. Prin aceasta scade capacitatea de apărare a țesutului encefalic al peștilor zebură împotriva acțiunii radicalilor liberi ai oxigenului și sunt favorizate condițiile instalării stresului oxidativ.

2. În urma expunerii la acid kojic, activitatea CAT nu s-a modificat semnificativ comparativ cu lotul martor. Astfel, putem afirma că dozele de acid kojic utilizate (100 mg/L, 204 mg/L și 284 mg/L) nu afectează CAT, așa încât aceasta își poate exercita funcția de apărare a țesutului encefalic de acțiunea toxică a radicalilor liberi ai oxigenului. Din efectul celor două micotoxine asupra CAT rezultă că patulina este mai toxică decât acidul kojic pentru țesutul cerebral.

3. Ca și în cazul CAT, activitatea GPx în țesutul cerebral, scade în urma intoxicației peștilor zebură cu patulină, comparativ cu lotul martor. Putem afirma că prin afectarea a două enzime esențiale ale sistemului antioxidant tisular cerebral (CAT și GPx), patulina favorizează instalarea stresului oxidativ în acest țesut. Este posibil ca stresul oxidativ instalat în țesutul cerebral al peștilor zebură să se coreleze cu anxietatea constatată la acești pești în experimentul comportamental efectuat de noi în această lucrare.

4. Prin intoxicația cu acid kojic, activitatea GPx se modifică în funcție de doza de micotoxină utilizată (100 mg/L, 204 mg/L ori 284 mg/L), dar modificările sunt nesemnificative comparativ cu lotul martor. Pe baza datelor noastre experimentale, putem spune că activitatea CAT și a GPx, rămâne în limite fiziologice normale, așa încât sistemul antioxidant al țesutului cerebral al peștilor zebură rămâne funcțional.

5. În cazul intoxicației cu patulină, nivelul tisular cerebral de MDA crește, comparativ cu martorul, indicând că în acest țesut s-a instalat stresul oxidativ. De fapt, MDA este indicatorul procesului de peroxidare al lipidelor prin activitatea toxică a radicalilor liberi ai oxigenului.

6. Dacă micotoxina utilizată a fost acidul kojic, pentru toate cele trei doze (100mg/L, 204mg/L și 284mg/L), nivelul tisular al MDA se încadrează în limite fiziologice normale. Putem afirma că în țesutul cerebral al peștilor zebură, pe fondul intoxicației cu acid kojic, nu s-a instalat stresul oxidativ, pentru că cele două enzime antioxidante, CAT și GPx, rămân funcționale.

### II.4.3. EFECTELE PATULINEI ȘI ALE ACIDULUI KOJIC ASUPRA ORGANELOR INTERNE

#### II.4.3.1. Patulina

##### II.4.3.1.1. Efectele asupra ficatului

În urma examinării peștilor din grupul Martor, nu au fost observate modificări histologice la nivelul ficatului, rinichilor, intestinului, pancreasului sau a miocardului.

Hepatocitele grupului expus la Patulină au suferit o alterare severă: tumefiere, vacuolizarea citoplasmei, încărcarea cu trigliceride (Fig. 8 a), hiperhidratarea nucleilor (Fig. 8 b), pierderea integrității celulare prin ruperea membranelor celulare și dezorganizarea citoplasmei.

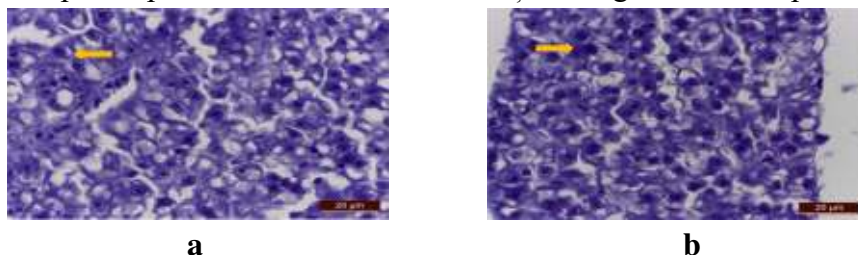


Fig. 8 - Alterare a hepatocitelor: a - încărcare cu trigliceride (→); b - hiperhidratare nucleară

#### II.4.3.1.2. Efectele asupra țesutului renal

Se observă prezența în nefrocite a unor bulgărași mari, sticloși, cu structură omogenă, acidofili (Fig. 9). Ruperea polului apical al celulelor este urmată de constituirea în lumenul tubilor a cilindrilor hialini. Incidența crescută a corpurilor hialini poate avea ca efect blocajul renal. Hialinoza nu reflectă leziunea nefrocitului, ci faptul că mecanismul fiziologic este saturat.

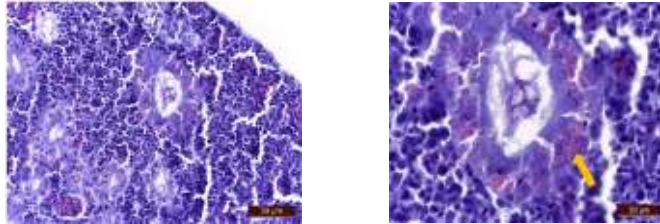


Fig. 9 - Hialinoza epiteliului tubular, bulgărași de hialin în citoplasma nefrocitelor (→).

Asupra rinichilor, patulina induce degenerarea medie-severă a epiteliului urinifer, tumefierea nefrocitelor, vacuolizarea citoplasmei, hiperhidratare nucleară (Fig. 8), pierderea integrității celulare, congestia capilarelor interstițiale, infiltrarea cu monocite a epiteliului urinar.

#### II.4.3.1.3. Efectele asupra intestinului

Hialinoza enterocitelor se manifestă prin prezența unor bulgărași sticloși în citoplasmă (Fig. 10), care reflectă un deficit de transport al nutrienților din conținutul intestinal și poate provoca apariția malabsorbției.

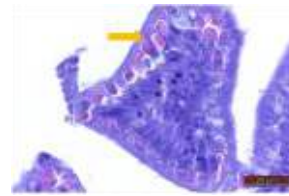


Fig. 10 - Hialinoza enterocitelor (→)

#### II.4.3.1.4. Efectele asupra pancreasului

La nivelul pancreasului endocrin, patulina produce necroza coagulativă parțială a insulelor Langerhans (Fig. 11). Acest efect va afecta producția de hormoni pancreatici endocrini și metabolismul.

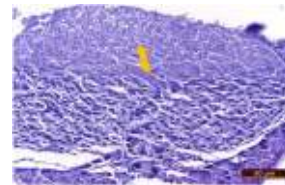


Fig. 11 - Necroza pancreasului endocrin (→)

#### II.4.3.1.5. Efectele asupra inimii

Edemul miocardic se remarcă prin apariția unor spații interfibrilare (Fig. 12), miocardocite tumefiate, hiperhidratate. Aceste efecte pot provoca scăderea ritmului cardiac și reducerea amplitudinii contracțiilor inimii.



Fig. 12 - Edem miocardic

### II.4.3.2. Acidul kojic

#### II.4.3.2.1. Efectele asupra encefalului

În urma expunerii la 100 mg/L acid kojic, peștii zebra au prezentat o ușoară congestie meningeală.

#### II.4.3.2.2. Efectele asupra ficatului

Degenerarea hepatică majoră din cazul loturilor expuse la 100 mg/L și 204 mg/L acid kojic, este caracterizată prin hiperhidratarea sau vacuolizarea hepatocitelor și pierderea integrității celulare (Fig. 13 a, b), unele hepatocite sunt goale (lipsite de nucleu și citoplasmă). La 284 mg/L acid kojic, apare alterarea severă și uniformă a ficatului, tumefierea, dezintegrarea hepatocitelor, fragmentarea membranelor celulare, karioliză/picnoză nucleară (Fig. 13 c). Componenta inflamatorie este absentă.

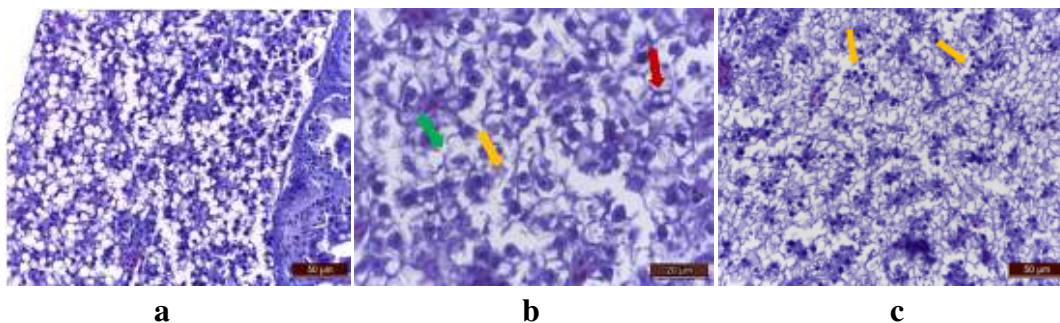


Fig. 13 - Efectele acidului kojic asupra ficatului: a – 100 mg/L; b – 204 mg/L; c – 284 mg/L  
Vacuolizare (→), fragmentarea membranelor celulare (→), karioliză/picnoză nucleară (→).

#### II.4.3.2.3. Efectele asupra intestinului

La 100 mg/L acid kojic, nu s-au înregistrat modificări semnificative ale dimensiunii vilozităților intestinale, dar la 204 mg/L și 284 mg/L, vilozitățile intestinale sunt subdimensionate, înregistrându-se o reducere cu 38%, respectiv 68% (Fig. 14 b, c). Atrofia vilozităților poate duce la apariția malabsorbției. Nu s-a constatat fuziunea vilozităților intestinale.

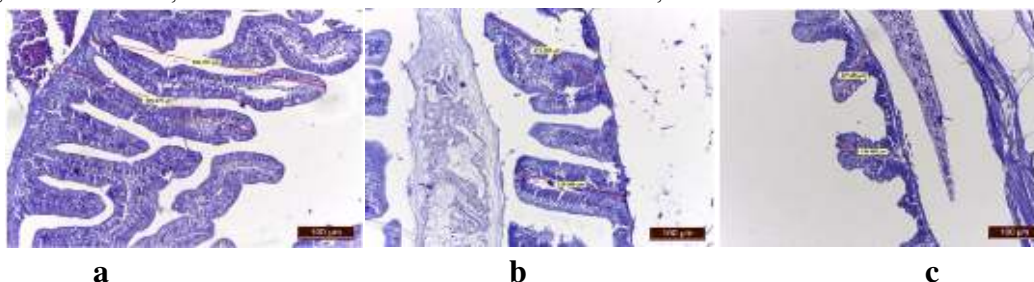


Fig. 14 - Efectele acidului kojic asupra intestinului: a – 100 mg/L; b – 204 mg/L; c – 284 mg/L

#### II.4.3.2.4. Efectele asupra inimii

Fibrele musculare cardiace sunt degenerate, cu sarcoplasma ușor vacuolizată (Fig. 15). Apare o congestie miocardică medie-severă, ectazia și supraîncărcarea cu eritrocite a capilarelor interstițiale. Aceste efecte pot provoca scăderea ritmului cardiac și reducerea amplitudinii contracțiilor inimii.

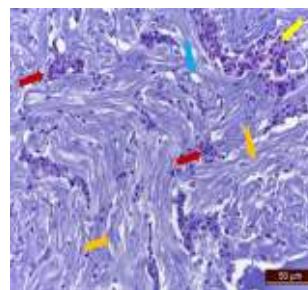


Fig. 15 - Miocardiocite degenerate (→), vacuolizare (→). Congestie (→), ectazia, supraîncărcarea capilarelor (→).

#### II.4.3.2.5. Efectele asupra pancreasului

Infiltrația lipidică interstițială a pancreasului exocrin și compresiunea acinilor sunt proporționale cu doza de acid kojic administrată.

La 100 mg/L acid kojic, infiltrația lipidică a pancreasului a condus la dezorganizarea arhitecturii acestuia, acinii pancreasului exocrin fiind comprimați de depozitele lipidice (Fig. 16 a).

La 204 mg/kg și 284 mg/L acid kojic, infiltrația lipidică severă are ca efect izolarea și comprimarea acinilor exocrini (Fig. 16 b, c), provocând atrofia pancreasului exocrin.

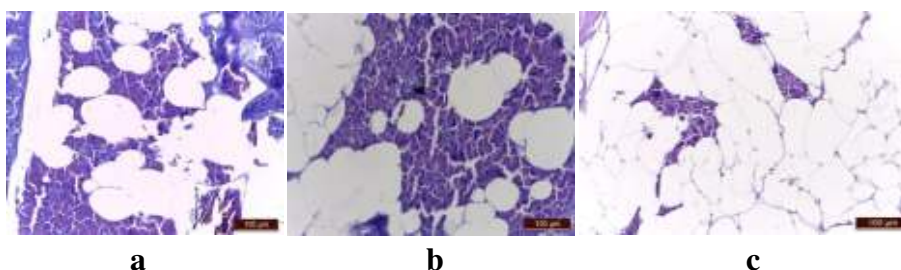


Fig. 16 - Efectele acidului kojic asupra pancreasului: a – 100 mg/L; b – 204 mg/L; c – 284 mg/L

Infiltrațiile lipidice și atrofia acinilor vor afecta negativ producția enzimelor digestive pancreatice. Digestia nutrienților va fi deficitară, contribuind la apariția malabsorbției.

#### II.4.3.2.6. Efectele asupra țesutului renal

La 100 mg/L acid kojic, degenerarea moderată a tubilor uriniferi este remarcată prin alterarea moderată a epiteliului (Fig. 17 a): tumefierea nefrocitelor, citoplasma granulară, hiperhidratarea nucleilor, reducerea lumenelor tubulare.

La 204 mg/L acid kojic, în tubii proximali, se remarcă și prezența sferulelor de hialin (Fig. 17 b). Hialinul denotă alterarea filtrării glomerulare, soldată cu proteinurie masivă.

La 284 mg/L acid kojic, se remarcă tumefierea epiteliului tubular, anularea lumenelor tubulare (Fig. 17 c). Nefrocitele sunt tumefiate, cu citoplasma abundentă, nucleii hipertrofiați și nucleolii proeminenți. În cazul unui singur individ a fost remarcată prezența unui chist renal.

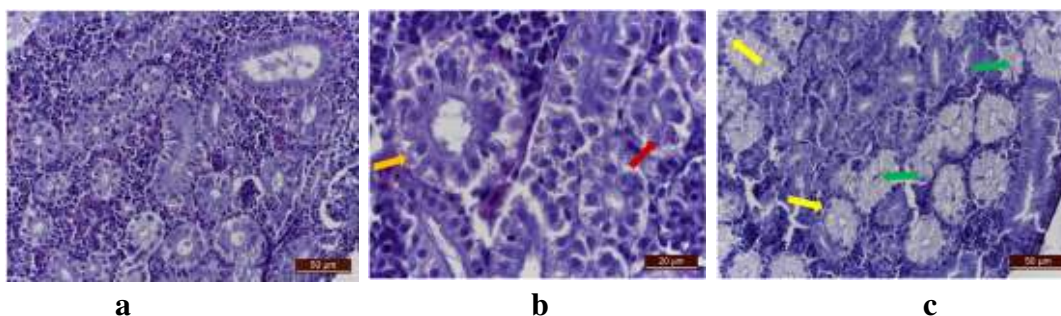


Fig. 17 - Efectele acidului kojic asupra rinichilor: a – 100 mg/L; b – 204 mg/L; c – 284 mg/L  
Citoplasmă granulară (→), sferule de hialin (→), tumefierea epiteliului tubular, cu anularea lumenelor tubulare (→), nucleoli proeminenți (→).

### II.4.3.3. CONCLUZII PARȚIALE

1. Lotul expus la **patulină** prezintă modificări histologice la nivelul ficatului, rinichilor, intestinului, pancreasului și a țesutului muscular miocardic.
2. La nivelul **ficatului**, patulina produce alterarea severă a hepatocitelor: tumefiere, vacuolizarea citoplasmei, hiperhidratarea nucleilor, încărcarea cu trigliceride, pierderea integrității celulare; afectarea ficatului va duce la alterarea metabolismului, a echilibrului acido-bazic, a termoreglării, a funcției antitoxice, a sintezei bilei și a unor enzime.
3. Asupra **rinichilor**, patulina induce o degenerare medie - severă a epiteliului urinifer (tumefiere, vacuolizare, hiperhidratare nucleară, pierderea integrității celulare, congestia capilarelor interstițiale, infiltrarea monocitară) și hialinoză (suprasaturarea mecanismului fiziologic); afectarea rinichilor are efecte negative asupra excreției, menținerii echilibrului acido-bazic al organismului, reabsorbției/secreției la nivelul tubilor uriniferi, formarea reninei și a eritropoietinei.
4. În cazul **intestinului**, patulina produce hialinoza enterocitelor, ceea ce poate provoca apariția malabsorbției și, implicit, scăderea rezervelor energetice ale organismului, afectarea structurii și funcțiilor celulare, a sintezei de hormoni, enzime și acizi nucleici.
5. La nivelul **pancreasului endocrin**, patulina produce necroza coagulativă parțială a insulelor Langerhans. Acest efect va avea repercusiuni asupra producției de hormoni pancreatici endocri și asupra metabolismului.
6. La nivelul **inimii**, patulina duce la apariția edemului miocardic, remarcat prin spații interfibrilare, tumefierea și hiperhidratarea miocardiocitelor. Aceste efecte pot provoca reducerea ritmului cardiac și a amplitudinii contracțiilor inimii.
7. În urma expunerii la **acid kojic**, alterările tisulare sunt progresive ca intensitate la cele trei loturi, corespunzând creșterii dozei de toxină administrată.
8. În cazul **sistemului nervos**, leziunile histologice ușoare produse de acidul kojic se corelează cu modificările ne semnificative ale enzimelor stresului oxidativ pe fondul intoxicației cu această micotoxină.
9. La nivelul **ficatului**, degenerarea toxică este graduală, dar severă încă de la doza minimă de acid kojic (100 mg/L) (hiperhidratarea, pierderea integrității hepatocitelor), dozele ridicate (204 mg/L și 284 mg/L) acid kojic, ducând la vacuolizarea hepatocitelor, fragmentarea membranelor celulare, karioliză/picnoză nucleară, ficatul având un aspect degenerativ uniform, dar componenta inflamatorie este absentă; în cazul tuturor dozelor de acid kojic, afectarea ficatului va duce la alterarea metabolismului, a echilibrului acido-bazic, a termoreglării, a funcției antitoxice, a sintezei bilei și a unor enzime.
10. La nivelul **intestinului** apare o scurtare a vilozităților pe măsură ce crește doza de acid kojic: la 100 mg/L, nu s-au înregistrat modificări ale dimensiunii vilozităților intestinale, la 204 mg/L acid kojic, vilozitățile intestinale apar scurtate, înregistrându-se o reducere cu aprox. 38 % a dimensiunii, iar la 284 mg/L acid kojic s-a remarcat atrofia și reducerea cu aprox. 68 % a dimensiunii vilozităților intestinale, dar nu și fuziunea acestora. În cazul dozelor ridicate de acid kojic, reducerea în dimensiune a vilozităților poate duce la malabsorbție, scăderea rezervelor

energetice ale organismului, afectarea structurii și funcțiilor celulare, a sintezei de hormoni, enzime și acizi nucleici.

**11.** La nivelul **pancreasului exocrin**, sever afectat, infiltrațiile lipidice sunt din ce în ce mai accentuate, pe măsură ce crește doza de acid kojic: la 100 mg/L, infiltrația lipidică a condus la dezorganizarea arhitecturii pancreasului, acinii fiind comprimați de depozitele lipidice, iar în cazul dozelor ridicate (204 mg/L, 284 mg/L), infiltrația lipidică severă a dus la izolarea, compresiunea și atrofia acinilor pancreatici. Depozitarea lipidelor în pancreas reflectă o tulburare a metabolismului lipidic; infiltrațiile lipidice și atrofia acinilor vor afecta negativ producția enzimelor digestive pancreatice, contribuind la apariția malabsorbției.

**12.** La nivelul **inimii**, acidul kojic provoacă o congestie miocardică, ectazia și supraîncărcarea capilarelor, vacuolizarea și degenerarea miocardiocitelor. Aceste efecte pot provoca reducerea ritmului cardiac și a amplitudinii contracțiilor inimii.

**13.** În cazul **rinichilor**, degenerarea epiteliului tubilor uriniferi crește progresiv pe măsură ce se mărește doza de acid kojic: la 100 mg/L, apare tumefierea ușoară a nefrocitelor, citoplasma granulară și hiperhidratarea nucleilor, lumenele tubulare fiind ușor reduse, în cazul dozei de 204 mg/L acid kojic, se mai observă prezența sferulelor de hialin ce denotă alterarea filtrării glomerulare, iar la 284 mg/L acid kojic, tumefierea epiteliului tubular (nefrocitele au citoplasma abundentă, nucleii hipertrofiați și nucleolii proeminenți) duce la anularea lumenelor tubulare; afectarea rinichilor are efecte negative asupra excreției, menținerii echilibrului acido-bazic al organismului, reabsorbției/secreției la nivelul tubilor uriniferi, formarea reninei și a eritropoietinei.

## II.5. CONCLUZII GENERALE

**1.** În cazul peștilor intoxicați cu **patulină** sau **acid kojic**, activitatea locomotorie redusă și desfășurată preponderent în partea inferioară a acvariului dovedește că atât patulina cât și acidul kojic induc o stare accentuată de anxietate; starea de anxietate, prezentă la toate dozele de acid kojic, se intensifică odată cu, creșterea dozei acestei micotoxine.

**2.** Mobilitatea ridicată a indivizilor expuși la doza maximă de **acid kojic** (284 mg/L) este datorată agitației induse de această micotoxină, peștii încercând să părăsească mediul toxic deplasându-se rapid în zona superioară a acvariului, dar durata redusă a mobilității demonstrează prezența unei stări de anxietate.

**3.** Prin intensificarea comportamentului anxios, atât **patulina** cât și **acidul kojic** au demonstrat efecte semnificative asupra sistemului nervos; efectul anxiogenic indus de aceste micotoxine va reduce șansele de supraviețuire a indivizilor și a speciei.

**4.** În cazul testului comportamental Novel Tank, „Timpul petrecut în zona superioară” și „Timpul petrecut în zona inferioară” se corelează cu toxina și doza administrată.

**5.** În cazul lotului expus la **patulină**, se înregistrează o scădere a activității **catalazei** și a **glutathion-peroxidazei** la nivelul encefalului, ceea ce reduce capacitatea de apărare a acestui țesut împotriva acțiunii radicalilor liberi ai oxigenului. Prin afectarea acestor două enzime esențiale ale sistemului antioxidant al țesutului cerebral, intoxicația cu patulină favorizează instalarea stresului oxidativ; este posibil ca stresul oxidativ să se coreleze cu anxietatea constatată la acești pești în cadrul testului comportamental.

6. În cazul loturilor expuse la **acid kojic**, activitatea **catalazei** și a **glutation-peroxidazei**, la nivelul encefalului, variază în funcție de doza de micotoxină utilizată (100 mg/L, 204 mg/L ori 284 mg/L), dar modificările sunt nesemnificative comparativ cu lotul martor. Astfel, activitatea acestor enzime rămâne în limite fiziologice normale, iar sistemul antioxidant al țesutului cerebral al peștilor zebură rămâne funcțional.
7. Comparând efectul celor două micotoxine asupra **catalazei**, putem afirma că, la nivelul țesutului cerebral, **patulina** este mai toxică decât **acidul kojic**.
8. În cazul lotului intoxicat cu **patulină**, nivelul **malondialdehidei** din encefalul peștilor zebură crește comparativ cu martorul, indicând că, datorită acțiunii toxice a radicalilor liberi ai oxigenului, în acest țesut s-a instalat stresul oxidativ.
9. În cazul celor 3 loturi expuse la **acid kojic**, nivelul tisular cerebral al **malondialdehidei** se încadrează în limite fiziologice normale; datorită faptului că cele două enzime antioxidante (CAT și GPx) rămân funcționale, putem afirma că la nivelul encefalului peștilor zebură intoxicați cu acid kojic, nu s-a instalat stresul oxidativ.
10. Indivizii din lotul Martor nu au prezentat modificări histologice la nivelul encefalului, ficatului, rinichilor, intestinului, pancreasului sau a miocardului.
11. Loturile expuse la patulină sau acid kojic prezintă modificări histologice la nivelul ficatului, rinichilor, intestinului, pancreasului și a țesutului muscular miocardic.
12. În cazul acidului kojic, alterările tisulare sunt progresive ca intensitate la cele trei loturi, corespunzând creșterii dozei de toxină administrată.
13. În cazul **sistemului nervos**, leziunile histologice ușoare produse de acidul kojic se corelează cu menținerea enzimelor stresului oxidativ (CAT, GPx, MDA) în limite fiziologice normale pe fondul intoxicației cu această micotoxină.
14. La nivelul **ficatului**, patulina a produs o alterare severă iar acidul kojic produce o degenerare hepatică graduală, dar severă încă de la doza minimă, la doza maximă ficatul prezentând un aspect degenerativ uniform. Ambele micotoxine provoacă tumefierea și pierderea integrității hepatocitelor, dar în cazul acidului kojic se constată și alterări ale structurii nucleului; la nivel hepatic, componenta inflamatorie este absentă în cazul ambelor micotoxine aplicate.
15. La nivelul **rinichilor**, atât patulina cât și doza maximă de acid kojic provoacă hialinoza epiteliului tubular, ceea ce poate avea ca efect blocajul renal. Patulina induce o degenerare medie-severă, congestia capilarelor interstițiale, fiind prezentă și o componentă inflamatorie: infiltrarea monocitară a epiteliului urinar. Acidul kojic induce degenerarea epiteliului tubilor uriniferi iar lumenele tubulare se reduc progresiv, până la dispariție, pe măsură ce se mărește doza de acid kojic; spre deosebire de lotul expus la patulină, componenta inflamatorie este absentă, dar apar alterări ale structurii nucleului celular.
16. La nivelul **intestinului**, efectele celor 2 micotoxine sunt diferite, dar ambele pot duce la apariția malabsorbției: patulina provoacă hialinoza enterocitelor, iar acidul kojic provoacă reducerea dimensiunii vilozităților intestinale. Doza minimă de acid kojic (100 mg/L) nu a provocat modificări semnificative ale dimensiunii vilozităților intestinale, dar în cazul dozelor ridicate (204 mg/L și 284 mg/L) se observă o reducere accentuată a dimensiunilor vilozităților

intestinale pe măsură ce crește doza de toxină; nu s-a constatat fuziunea vilozităților intestinale la niciunul dintre indivizii intoxicați.

**17.** La nivelul **pancreasului** se constată o delimitare a acțiunii celor 2 micotoxine: patulina afectează pancreasul endocrin (produce necroza parțială a insulelor Langerhans, ce va avea repercusiuni asupra producției de hormoni pancreatici endocrini și asupra metabolismului) iar acidul kojic afectează pancreasul exocrin: infiltrațiile lipidice sunt din ce în ce mai importante, pe măsură ce doza de toxină crește, constatându-se compresiunea, izolarea și atrofia acinilor pancreatici; depozitarea lipidelor în pancreas reflectă o tulburare a metabolismului lipidic, contribuind la apariția malabsorbției.

**18.** La nivelul **inimii**, se constată afectarea diferită a miocardiocitelor în funcție de toxina aplicată: patulina duce la tumefierea miocardiocitelor și apariția edemului miocardic, iar acidul kojic provoacă o congestie miocardică, ectazia capilarelor interstițiale și degenerarea miocardiocitelor; prin efectele produse, atât patulina cât și acidul kojic pot altera ritmul cardiac.

**19.** Prin efectele asupra comportamentului și a fiziologiei adulților de *Danio rerio*, **patulina** dovedește o toxicitate ridicată chiar și la o doză ce reprezintă doar 0.38 % din LD<sub>50</sub> a larvelor acestor pești, iar cele 3 doze de **acid kojic** dovedesc o toxicitate accentuată asupra peștilor zebură, alterând atât comportamentul cât și fiziologia întregului organism.

**20.** Specia *Danio rerio* este puternic afectată de expunerea la **patulină** sau **acid kojic**, efectele toxice manifestându-se la nivel comportamental, biochimic și histologic: prin inducerea stării de anxietate, apariția stresului oxidativ și a alterărilor tisulare la nivelul organelor interne, atât patulina cât și acidul kojic afectează calitatea vieții peștilor zebură, reducând șansele de supraviețuire ale indivizilor și a speciei.

### **Noutăți aduse în această lucrare pe plan național și internațional**

**1.** Am evaluat efectele a 2 micotoxine, patulina și acidul kojic, asupra peștilor zebură adulți (*Danio rerio*), efectele acestor micotoxine fiind studiate, în principal, pe rozătoare.

**2.** Am testat efectele unei doze de patulină (70 µg/L) ce nu a mai fost aplicată în studiile toxicologice ce implică peștii zebură.

**3.** Am testat, în premieră, efectele a 3 doze de acid kojic asupra peștilor zebură adulți. Doza de 100 mg/L a fost testată doar pe embrionii de *Danio rerio*, iar efectul dozelor de 204 mg/L și 284 mg/L nu a mai fost studiat.

**4.** Am investigat efectul acestor micotoxine asupra comportamentului peștilor zebură, elementul de noutate fiind analiza stării de anxietate, aceasta având un rol extrem de important în supraviețuirea indivizilor și a speciei.

**5.** Am investigat, pentru prima dată, stresul oxidativ indus de aceste micotoxine la nivelul encefalului peștilor zebură, determinând activitatea a 2 enzime antioxidante (catalaza, glutatión-peroxidaza) și stabilirea nivelului tisular al malondialdehidei, markerul de peroxidare al lipidelor.

**6.** Am investigat efectul acestor micotoxine asupra organelor interne ale peștilor zebură, urmărind modificările histopatologice apărute la nivelul encefalului, inimii, ficatului, rinichilor, pancreasului și al intestinului. Studiul histopatologic al pancreasului și al intestinului constituie un element nou în analiza efectelor micotoxinelor asupra peștilor zebură.

7. Prin studierea efectelor produse de dozele de acid kojic am evaluat impactul ecologic asupra peștilor (șansele de supraviețuire a indivizilor și a speciei). Rezultatele obținute au dovedit că acidul kojic produce efecte negative asupra ihtiofaunei, implicit asupra echilibrului întregului habitat.
8. Am decelat, pentru prima dată, un algoritm (Decision Tree), ce poate fi antrenat să clasifice comportamentul peștilor cărora li s-a administrat o toxină din cele utilizate în experiment, doar prin analiza trăsăturilor caracteristice din testul Novel Tank.
9. Am antrenat și salvat un model de algoritm Support Vector Machine în directorul nostru local de lucru, pentru estimări ulterioare a stării de intoxicare a unui animal în funcție de caracteristicile unor variabile analizate în cadrul testului Novel Tank.

## BIBLIOGRAFIE

1. Afssa, 2006. Évaluation des risques liés à la présence de mycotoxines dans les chaînes alimentaires humaine et animale. *Rapport synthétique*, pp. 57.
2. CAST, 2003. Mycotoxins — risks in plant, animal and human systems, Task Force Report, No. 139. Council for Agricultural Science and Technology, Ames, Iowa, pp. 15 - 18, 21 - 27, 29, 31, 34, 38, 39, 44, 45, 49-51, 53, 61, 64-68, 71, 72, 74, 75, 78-80
3. Abid-Essefi, S., Ouanes, Z., Hassen, W., Baudrimont, I., Creppy, E., Bacha, H., 2004. Cytotoxicity, inhibition of DNA and protein syntheses and oxidative damage in cultured cells exposed to zearalenone. *Toxicology in vitro*, 18(4), pp.467-474.
4. Al-Hazmi, M.A., 2014. Patulin in apple juice and its risk assessments on albino mice. *Toxicology and industrial health*, 30(6), pp.534-545.
5. An, Z. ed., 2004. *Handbook of industrial mycology*. CRC Press, pag. 689, 690.
6. Atef, H.A., Howayda, M., El, S., Mogda, K., Mansour, S., Snosy, A.M., Abo-Zaid, K.F., 2016. Effect of microbiological contamination and pollution of water on the health status of fish. *European Journal of Academic Essays*, 3(5), pp.178-192.
7. Bandh, S.A., Kamili, A.N., Ganai, B.A., Saleem, S., 2011. Isolation, identification and seasonal distribution of Penicillium and Aspergillus species in Dal Lake, Kashmir. *Int. J. Curr. Res*, 3(10), pp.038-042.
8. Bencan, Z., Sledge, D., Levin, E.D., 2009. Buspirone, chlordiazepoxide and diazepam effects in a zebrafish model of anxiety. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 94(1), pp.75-80.
9. Bennett, J. W., Klich, M., 2003. Mycotoxins, *Clinical Microbiology Reviews*, July 2003, p. 497–516
10. Brown, C., Laland, K. and Krause, J., 2011. Fish cognition and behavior (Vol. 21). John Wiley & Sons, pp. 166-169, 171-174.
11. Burdock, G.A., Soni, M.G., Carabin, I.G., 2001. Evaluation of health aspects of kojic acid in food. *Regulatory toxicology and pharmacology*, 33(1), pp.80-101.
12. Burnett, C.L., Bergfeld, W.F., Belsito, D.V., Hill, R.A., Klaassen, C.D., Liebler, D.C., Marks, J.G., Shank, R.C., Slaga, T.J., Snyder, P.W., Andersen, F.A., 2010. Final report of the safety assessment of kojic acid as used in cosmetics. *International journal of toxicology*, 29(6\_suppl), pp.244S-273S.
13. Carlson M. P., Ensley S. M., 2003. Understanding Fungal (Mold) Toxins (Mycotoxins), University of Nebraska – Lincoln Extension, NebGuide G1513, <http://extension.unl.edu/publications>

14. Chen, W.C., Tseng, T.S., Hsiao, N.W., Lin, Y.L., Wen, Z.H., Tsai, C.C., Lee, Y.C., Lin, H.H. and Tsai, K.C., 2015. Discovery of highly potent tyrosinase inhibitor, T1, with significant anti-melanogenesis ability by zebrafish in vivo assay and computational molecular modeling. *Scientific reports*, 5, p.7995.
15. Choi, T.Y., Kim, J.H., Ko, D.H., Kim, C.H., Hwang, J.S., Ahn, S., Kim, S.Y., Kim, C.D., Lee, J.H., Yoon, T.J., 2007. Zebrafish as a new model for phenotype-based screening of melanogenic regulatory compounds. *Pigment cell research*, 20(2), pp.120-127.
16. Ciornea, E.T., Dumitru, G., Coprean, D., Mandalian, T. L., Boiangiu, R.S., Sandu, I. and Hrițcu, L., 2019. Effect of Micotoxins Treatment on Oxidative Stress, Memory and Anxious Behavior in Zebrafish (*Danio rerio*). *Revista de Chimie*, (Vol. 70, no. 3, March, 2019, pp. 776-780)
17. Cole, M., Rolinson, G.N., 1972. Microbial metabolites with insecticidal properties. *Appl. Environ. Microbiol.*, 24(4), pp.660-662.
18. Diaconiță, Gh., Eskenasy, Al., Hagi - Paraschiu, A., Iliescu, G., Mureșan, Aug., Nicolescu, P., Repciuc, E., Roșca, V., Teitel, A., 1953 - Tehnica histopatologică, Editura de Stat pentru Literatura Științifică, București.
19. De Sarro, G.B., Donato, A., Bagetta, G., Pujia, A., Nisticò, G., 1984. Behavioural and electrocortical spectrum power changes after intraventricular injection of patulin in rats. In *Disease, Metabolism and Reproduction in the Toxic Response to Drugs and Other Chemicals* (pp. 420-424). Springer Berlin Heidelberg.
20. Dobrian, A.D., Davies, M.J., Schriver, S.D., Lauterio, T.J., Prewitt, R.L., 2001. Oxidative stress in a rat model of obesity-induced hypertension. *Hypertension*, 37(2), pp.554-560.
21. Dumitru, G., CIORNEA, E.T., Hrițcu, L., Sandu, I.G., 2018. Studies of Some Morphological and Biochemical Parameters Concerning the Health Condition of Some Fish Species from Prut River, Romania. *REVISTA DE CHIMIE*, 69(5), pp.1194-1199.
22. Dumitru, G., Dirvariu, L., Barbacariu, C.A., Miron, I., Sandu, I., Ciornea, E.T., 2018. The Effect of Wheatgrass Juice Administration on Physiological State and Oxidative Stress in Carp. *REVISTA DE CHIMIE*, 69(11), pp.4046-4051.
23. Dumitru, G., Abidar, S., Nhiri, M., Hrițcu, L., Boiangiu, R.S., Sandu, I., Todirascu-Ciornea, E.L.E.N.A., 2018. Effect of *Ceratonía siliqua* Methanolic Extract and 6-hydroxydopamine on Memory Impairment and Oxidative Stress in Zebrafish (*Danio rerio*) Model. *Revista Chim-Bucharest*, 69(121), pp.3545-3548.
24. El-Sawi, N.M., Gashlan, H.M., Younes, S.H., Al-Massabi, R.F., Shaker, S., 2012. Biochemical and histological studies on the effect of the Patulin mycotoxin on male rats' liver and treatment by crude venom extracted from jelly fish. *Life Science Journal*, 9(4), pp.1143-1153.
25. Escoula, L., More, J., Baradat, C., Henry, G., Brunel-Dubech, N., 1977. The toxins of *Byssoschlamys nivea* westling. i. acute toxicity of patulin in adult rats and mice. In *Annales de recherches veterinaires* (Vol. 8, No. 1, pp. 41-49).
26. Făgăraș, M., 2007. Botanică sistematică I (Thallobionta et Bryobionta), Ovidius University Press, Constanța, pp. 89.
27. Föller, M., Bobbala, D., Koka, S., Huber, S.M., Gulbins, E., Lang, F., 2009. Suicide for survival-death of infected erythrocytes as a host mechanism to survive malaria. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 24(3-4), pp.133-140.

28. Fujimoto, N., Onodera, H., Mitsumori, K., Tamura, T., Maruyama, S., Ito, A., 1999. Changes in thyroid function during development of thyroid hyperplasia induced by kojic acid in F344 rats. *Carcinogenesis*, 20(8), pp.1567-1572.
29. Gashlan, H. M., 2008. Biochemical studies of patulin on liver functions in male albino mice. *Journal of Applied Animal Research*, 34(1), pp.93-96.
30. Howard, D. H., Miller, J. D., 1996. The Mycota. Human and Animal Relationships. Berlin, Springer, Vol. 6., pag. 142, 143, 147, 148, 153
31. Hsu, K.D., Chen, H.J., Wang, C.S., Lum, C.C., Wu, S.P., Lin, S.P., Cheng, K.C., 2016. Extract of *Ganoderma formosanum* mycelium as a highly potent tyrosinase inhibitor. *Scientific reports*, 6, p.32854.
32. Joshi, V.K., Lakhanpal, P., Kumar, V., 2013. Occurrence of patulin its dietary intake through consumption of apple and apple products and methods of its removal. *International Journal of Food and Fermentation Technology*, 3(1), p.15.
33. Kshirsagar, A. D., Gunale, V.R., 2013. Diversity of aquatic fungi from Mula River at Pune city. *International Journal of Advanced Life Sciences (IJALS)*, 6(3), pp.174-184.
34. Kumari, R., Kumar, C., 2015. Fungal infection in some economically important fresh water fishes in Gandak river near Muzaffarpur region of Bihar. *Life*, 50, pp.1.
35. Lajis, A. F. B., Hamid, M., Ahmad, S., Ariff, A. B., 2017. Lipase-catalyzed synthesis of kojic acid derivative in bioreactors and the analysis of its depigmenting and antioxidant activities. *Cosmetics*, 4(3), p.22.
36. Lupescu, A., Jilani, K., Zbidah, M., Lang, F., 2013. Patulin-induced suicidal erythrocyte death. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 32(2), pp.291-299.
37. Maheswari, S.L., Venkatakrishna Murali, R., Balaji, R., 2014. Aluminium induced cholinotoxicity in zebra fish brain-A sequel of oxidative stress. *Int J Adv Res*, 2, pp.322-335.
38. Mohamad, R., Mohamed, M.S., Suhaili, N., Salleh, M.M., Ariff, A.B., 2010. Kojic acid: Applications and development of fermentation process for production. *Biotechnology and Molecular Biology Reviews*, 5(2), pp.24-37.
39. Muthulakshmi, S., Maharajan, K., Habibi, H.R., Kadirvelu, K., Venkataramana, M., 2018. Zearalenone induced embryo and neurotoxicity in zebrafish model (*Danio rerio*): role of oxidative stress revealed by a multi biomarker study. *Chemosphere*, 198, pp.111-121.
40. Nguyen, Q., 2014. Examination of Patulin Toxicity in Adult Zebrafish. *Duke University Medical Center*, Durham NC. Advisor: Jordan Cocchiaro.
41. Omar, H.E.M., 2013. Mycotoxins-induced oxidative stress and disease. *Mycotoxin and Food Safety in Developing Countries. Rijeka, Croatia: InTech*, pp.63-92.
42. Osuchowski, M.F., Edwards, G.L., Sharma, R.P., 2005. Fumonisin B1-induced neurodegeneration in mice after intracerebroventricular infusion is concurrent with disruption of sphingolipid metabolism and activation of proinflammatory signaling. *Neurotoxicology*, 26(2), pp.211-221.
43. Sinha, A.K., 1972. Colorimetric assay of catalase. *Analytical biochemistry*, 47(2), pp.389-394.
44. Prignano, F., Ortonne, J.P., Buggiani, G., Lotti, T., 2007. Therapeutical approaches in melasma. *Dermatologic clinics*, 25(3), pp.337-342.
45. Rajamanikyam, M., Gade, S., Vadlapudi, V., Parvathaneni, S.P., Koude, D., Dommati, A.K., Tiwari, A.K., Misra, S., Sripathi, P., Amanchy, R., Upadhyayula, S.M., 2017. Biophysical and biochemical characterization of active secondary metabolites from *Aspergillus allahabadii*. *Process Biochemistry*, 56, pp.45-56.

46. Rao, P.K., 2017. The association of different fungal species caused epizootic ulcerative syndrome in fresh water fish of *Channa punctatus* found in Hasanparthy lake, Telangana, India. *international journal of pharmaceutical sciences and research*, 8(9), pp.3830-3836.
47. Rodrigues, A.P.D., Farias, L.H.S., Carvalho, A.S.C., Santos, A.S., do Nascimento, J.L.M., Silva, E.O., 2014. A novel function for kojic acid, a secondary metabolite from *Aspergillus* fungi, as antileishmanial agent. *PLoS One*, 9(3), p.e91259.
48. Saju, D.S., 2011. Occurrence of fungi in pond water (Dumaratarai Talab) of Raipur City, CG, India. *Journal of Phytology*.
49. Service, M., 2012. Medical Entomology for Students. Cambridge: Cambridge University Press, pp. 57, 58, 60, 67-72, 75.
50. Siddhardha, B., Murty, U.S.N., Narasimhulu, M., Venkateswarlu, Y., 2010. Isolation, Characterization and Biological evaluation of secondary metabolite from *Aspergillus funiculosus*. *Indian journal of microbiology*, 50(2), pp.225-228.
51. Sidebotham, N.A., 2015. Exposure to the Mycotoxin Zearalenone Impairs Embryonic Development in Zebrafish.
52. Spence, R., Gerlach, G., Lawrence, C., Smith, C., 2008. The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biological reviews*, 83(1), pp.13-34.
53. Şincai, M., 2000. Tehnici de citohistologie normală si patologică. Ghid practic, Ed. Mirton, Timisoara, pp. 6
54. Thach, B.Đ., Dao, V.Q., Giang, T.T.L., Linh, L.N.T., Ben, T.T., Uyen, N.P.A. and Dung, N.H., 2017. Inhibitor effect of flavonoid from *Blumea balsamifera* (L.) dc. leaves extract on melanin synthesis in cultured B16F10 cell line and zebrafish. *European Journal of Research in Medical Sciences Vol*, 5(2).
55. Veselinović, J.B., Veselinović, A.M., Ilic-Tomic, T., Davis, R., O'Connor, K., Pavic, A., Nikodinovic-Runic, J., 2017. Potent anti-melanogenic activity and favorable toxicity profile of selected 4-phenyl hydroxycoumarins in the zebrafish model and the computational molecular modeling studies. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 25(24), pp.6286-6296.
56. Yuan, G., Wang, Y., Yuan, X., Zhang, T., Zhao, J., Huang, L., Peng, S., 2014. T-2 toxin induces developmental toxicity and apoptosis in zebrafish embryos. *Journal of Environmental Sciences*, 26(4), pp.917-925.
57. Watanabe, T., Mori, T., Okamura, M., Kashida, Y., Mitsumori, K. Induction of hepatocellular proliferative lesions in CBA mice by a 26-week dietary administration of kojic acid. *J.Toxicol.Pathol.* 2005;18:159-165.
58. Wu, T.S., Yang, J.J., Yu, F.Y., Liu, B.H., 2012. Evaluation of nephrotoxic effects of mycotoxins, citrinin and patulin, on zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Food and chemical toxicology*, 50(12), pp.4398-4404.
59. Zhang, X., Boesch-Saadatmandi, C., Lou, Y., Wolfram, S., Huebbe, P., Rimbach, G., 2009. Ochratoxin A induces apoptosis in neuronal cells. *Genes & nutrition*, 4(1), p.41.
60. Zhang, B., Peng, X., Li, G., Xu, Y., Xia, X., Wang, Q., 2015. Oxidative stress is involved in Patulin induced apoptosis in HEK293 cells. *Toxicon*, 94, pp.1-7.
61. <https://www.kaggle.com>
62. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>
63. <https://elitedatascience.com/imbalanced-classes>
64. <https://towardsdatascience.com/pca-using-python-scikit-learn-e653f8989e60>