

UNIVERSITATEA “ALEXANDRU IOAN CUZA” DIN IAȘI

ȘCOALA DOCTORALĂ DE GEOȘTIINȚE

DOMENIUL ȘTIINȚA MEDIULUI

ȘCOALA DOCTORALĂ DE BIOLOGIE

DOMENIUL BIOLOGIE

***Studiu de risc în cazul poluării cu micro/nanoplastice în zona
costieră a României, prin modelare experimentală utilizând
specia Danio rerio***

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Conducători științifici:

Prof. univ. dr. habil. Mircea Nicușor NICOARĂ

CS I. dr. habil. Alin Stelian CIOBÎCĂ

Doctorand:

Alexandra SĂVUCĂ

IAȘI, 2024

MOTTO:

“Nu-i poate fi dat omului nimic mai presus și mai mareț decât cercetarea, în care frumusețea și importanța descoperirilor îl încurajează și-i dă o anumită desfătare.”

Mihail Lomonosov (1711-1765)

MULȚUMIRI

De-a lungul celor trei ani de doctorat, pașii către performanță mi-au fost îndrumați și susținuți de mai multe persoane care au contribuit la persoana care am devenit astăzi și la parcursul meu în lumea cercetării deopotrivă. Astfel, mi-aș dori să rezerv câteva cuvinte de mulțumire.

Fundamentarea științifică, precum și elaborarea acestei teze de doctorat, nu ar fi fost posibile fără ajutorul, sprijinul și îndrumarea unor oameni extraordinari ce au contribuit la formarea mea ca cercetător. Insuflându-mi curajul de a merge mai departe, oferindu-mi libertatea de a pune în aplicare fiecare idee, uneori destul de "nărăvașe" sau ce păreau imposibile, pentru sfaturile oferite, îndrumarea, dar și suportul moral la nevoie, aceste persoane au fost în primul rând conducătorii de doctorat, teza realizându-se în cotutelă, iar pe această cale le mulțumesc în mod egal domnilor prof. univ. dr. habil. Mircea Nicușor Nicoară și CS I. dr. habil. Alin Stelian Ciobîcă.

Datorită caracterului interdisciplinar al tezei, realizarea acestei lucrări a fost posibilă cu ajutorul unor specialiști din țară, dar și din străinătate. Pe această cale doresc să îmi arăt recunoștința și față de doamnele conf. dr. Luminița Diana Hrițcu și prof. univ. dr. Carmen Solcan, din cadrul Universității de Științe Vieții "Ion Ionescu de la Brad" din Iași, pentru ajutorul, timpul și îndrumarea oferite. În cadrul anilor de pregătire doctorală am realizat și un stagiul de cercetare la Universitatea din Aveiro, Portugalia, unde am realizat o parte din experimentele din cadrul tezei și unde am primit un suport excepțional și de înaltă calitate, ce a contribuit mult la formarea mea profesională, dar și personală. Mulțumesc mentorilor de la această universitate, care m-au coordonat și care mi-au fost ca o familie pe perioada stagiului, anume prof. dr. Isabel Lopes și dr. Cátia Venâncio.

Nu în ultimul rând, mulțumirile mele sunt îndreptate și spre prietenii și oamenii care m-au sprijinit, încurajat și ajutat la nevoie sau mi-au oferit un gând bun la momentul oportun, fiecare dintre persoanele dragi mie având o contribuție semnificativă la finalizarea tezei, dar și la ceea ce sunt astăzi, ca om.

În mod deosebit vreau să mulțumesc familiei mele pentru dragostea necondiționată, suportul moral, financiar, înțelegerea și încurajările oferite permanent pe tot parcursul acestor ani, în special mamei mele.

CUPRINS

Listă de abrevieri.....	5
INTRODUCERE.....	7
CAPITOLUL 1 - STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII.....	11
CAPITOLUL 2 - EVALUAREA CALITATIVĂ ȘI CANTITATIVĂ A MICROPLASTICELOR PREZENTE ÎN ZONA COSTIERĂ A ROMÂNIEI	17
CAPITOLUL 3 - TOXICITATEA DIFERITELOR MATERIALE POLIMERICE ASUPRA SPECIEI MODEL <i>DANIO RERIO</i>	28
3.1. Toxicitatea microplasticelor de Polietilenă și Polipropilenă în cazul adulților de pește zebură.....	28
3.2. Toxicitatea nanoparticulelor de Polimetil-metacrilat asupra primelor stadii de viață ale peștilor zebură.....	33
3.2.2. Rezultate privind toxicitatea pentru Polimetil-metacrilat 50 nm	34
3.2.3. Rezultate privind toxicitatea pentru Polimetil-metacrilat 100 nm	36
3.3. Toxicitatea nanoparticulelor de Polipropilenă asupra primelor stadii de viață ale peștilor zebură.....	38
3.4. Toxicitatea nanoparticulelor de bioplastic (acid polilactic) asupra primelor stadii de viață ale peștilor zebură.....	40
CAPITOLUL 4 - IMPLICAȚIILE TOXICOLOGICE ALE POLIPROPILENEI ÎN RELAȚIE CU SCHIZOFRENIA.....	44
CONCLUZII GENERALE.....	49
BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ.....	53
ANEXE.....	57

LISTĂ DE ABREVIERI

AChE = acetil colinesterază
ADHD = tulburare de deficit de atenție și hiperactivitate
ADN = acid dezoxiribonucleic
AQI = indice de calitate a aerului
ARN = acid ribonucleic
ATP = adenzin trifosfat
CAT = catalază
CBD = canabidiol
CRISPR = *clustered regularly interspaced short palindromic repeats* (eng)
(grupuri de repetări scurte palindromice interspațiate sistematic)
dpf = zile post fertilizare
FET = *Fish Embryo Acute Toxicity* (eng) (Toxicitate acută la embrioni de pește)
GPx = glutation peroxidază
GR = glutation reductază
GSH = glutation
H₂O₂ = peroxid de hidrogen
HDPE = polietilenă de înaltă densitate
hpf = ore post fertilizare
K = ketamină
LDPE = polietilenă de densitate scăzută
LSD = dietilamida acidului lisergic
M = metionină
MDA = malondialdehidă
MDMA = 3,4-metilendioxi-N-metilamfetamină
MDPE = polietilenă de densitate medie
MP/MPs = microplastic/e
NaCl = clorură de sodiu
NMDAR = receptor al N-metil-D-aspartat
NP/NPs = nanoplastic/e
OCDE/OECD = Organizația pentru Cooperare și Dezvoltare Economică
PA = poliamidă
PAN = poliacrilonitril
PC = policarbonat

PCP = fenciclidină
PE = polietilenă
PEC = Indice de concentrații ambientale prognozate
PET = polietilen tereftalat
PLA = acid polilactic
PLI = Indice de încărcătură poluantă
PM = particule de materie în suspensie
PMMA = polimetil metacrilat
PP = polipropilenă
PPSU = polifenilsulfonă
PS = polistiren
PTS = proteine totale solubile
PVC = policlorură de vinil
RCR = raport de caracterizare a riscului
ROS = specii reactive de oxigen
SAN = copolimer de stiren acrilonitril
SCI = situri de importanță comunitară
SD = deviația standard
SEM = eroarea standard a mediilor
SO = stres oxidativ
SOD = superoxid dismutază
SPA = zone de protecție specială avifaunistică
TBARS = substanțe reactive la acidul tiobarbituric
THC = tetrahidrocanabinol
TPU = termoplastic de poliuretanic
UV = ultraviolet

INTRODUCERE

„Plastic” este o denumire generală pentru o categorie de materiale pe bază de petrol, non-biodegradabile. Acestea sunt compuse din două subcategorii: termoplastice, cum ar fi polietilen tereftalat (PET), polipropilena (PP), polimetil metacrilat (PMMA), policlorura de vinil (PVC) și polietilena (PE); și termorezistente, cum ar fi rășini epoxidice, silicon, rășini acrilice și poliuretan (PUR). Acestea sunt o prezență permanentă în viața și mediul nostru. În ultimul timp, interesul pentru cercetarea acestor materiale a crescut considerabil, atât în ceea ce privește producția, cât și potențialul toxic pe care îl pot prezenta aceste materiale. Ecosistemele acvatice, în special ecosistemele marine, sunt destinațiile finale pentru diverse materiale plastice. Transportul și dispersia materialelor plastice ar putea fi rezultatul unor factori naturali, precum valurile sau vântul. Materialele plastice, degradate prin procese fizice și chimice, devin micro- și nanoplastice.

Marea Neagră este înconjurată de șapte țări riverane, prezentând o hidrodinamică deosebită și susține o multitudine de animale acvatice și terestre care pot fi afectate de acest tip de poluare. Pe lângă efectele directe și indirecte, prin consumul de fructe de mare, efectele poluării se pot răsfrânge asupra oamenilor. Marea Neagră prezintă o activitate antropică intensă, cu un impact proporțional (Micheli et al., 2013) și cu o încărcătură zilnică de materiale plastice estimată la 4,2 tone numai din Dunăre (Lechner et al., 2014). Microplasticele (MPs) sunt definite ca particule rezultate din macroplastice sub influența mai multor tipuri de degradare (radiații UV, degradare fizică prin acțiunea valurilor, degradare chimică etc.), cu o dimensiune maximă de până la 5 mm. Pe lângă aceste procese de degradare, microplasticele pot fi fabricate direct în dimensiuni foarte mici cu diverse utilizări, cum ar fi în industria cosmetică.

În ultimul timp, un număr mare de articole științifice indică prezența compușilor plastici cu dimensiuni cuprinse între 100 nm și 5 mm (cum ar fi fibre, fragmente, sfere), denumite microplastice (MPs) în diferite tipuri de medii la nivel mondial (Alimba & Faggio, 2019; Strungaru et al., 2019). De exemplu, în mediile terestre, cum ar fi solurile din agricultură, la o fermă agricolă din Germania a fost găsită o cantitate de $0,34 \pm 0,36$ particule de microplastic per kilogram de greutate uscată sol (Piehl et al., 2018). Un alt studiu a arătat că particulele de microplastic din coloana de sol pot migra cu ușurință și pot intra în apele subterane împreună

cu alți poluanți (Ren et al., 2021). Ecosistemele de apă dulce sunt, de asemenea, afectate de poluarea cu microplastice la nivel mondial, indiferent dacă vorbim de râuri cu o abundență medie de 46,63 particule/m³ în apele de suprafață din Hong Kong (Cheung et al., 2018), zone umede unde cele mai comune tipuri de MPs au fost polietilena (PE) și polistirenul (PS) (Qian et al., 2021) sau lacuri în care tipurile comune de MPs au fost polietilena de înaltă densitate (HDPE) și polietilena de densitate scăzută (LDPE) (Gopinath et al., 2020). Ecosistemele dulcicole pot acționa atât ca receptori/chiuvete, cât și ca purtători de microplastice, care ajung în cele din urmă în ecosistemul marin (Jambeck et al., 2015). Contaminarea cu MPs poate ajunge chiar și în regiuni îndepărtate, cum ar fi zăpada din Alpi și Arctica, unde majoritatea MPs detectate au fost sfere de dimensiuni foarte mici (11 μm) și cu o compoziție polimerică foarte variabilă (Bergmann et al., 2019). Brahney et al., 2020 au arătat că ratele medii de depunere a MPs-lor sub acțiunea vântului și a precipitațiilor a fost de 132 de particule/m³/zi în zonele naturale protejate din vestul SUA. Spre comparație, peste jumătate din zona Mării Negre este acoperită de zone protejate.

Poluarea cu microplastice este o problemă complexă, deoarece este larg răspândită și nu se cunosc exact efectele nocive ale expunerii de lungă sau scurtă durată; cu siguranță aceasta are consecințe considerabile asupra biotei, mediului și sănătății publice.

Prezența frecventă a microplasticelor ca poluanți în diferite tipuri de medii a făcut ca expunerea umană, în mare parte prin ingestie, inhalare și contact cu pielea, să fie inevitabilă. În diferite condiții de expunere la microplastice, acestea pot provoca leziuni inflamatorii corelate cu potențialul interacțiunii cu țesuturile. Incidența tot mai mare a bolilor neurodegenerative, a tulburărilor imunitare și a cancerelor la oameni poate fi, de asemenea, legată de această toxicitate (Lu et al., 2019; Prata et al., 2020a). Studiile in vitro în linii celulare cerebrale umane, au demonstrat că MPs de PS induc stres oxidativ (SO) (Schirinz et al., 2017), fenomen cauzat de un dezechilibru între producția de antioxidanți și acumularea de specii reactive de oxigen (ROS) în celule și țesuturi, reprezentând capacitatea unui sistem biologic de a detoxifica acești produși reactivi (Pizzino et al., 2017). SO este astăzi un marker extrem de important de analizat în vederea evaluării toxicității unor substanțe prin prisma sensibilității lui în cazul unor dezechilibre de natură biochimică, dar și datorită importanței și implicării în mai multe boli.

Alegerea modelului animal pentru acest studiu s-a bazat pe utilizarea frecventă a peștelui zebra în mai multe domenii de cercetare. Pe măsură ce a fost realizată caracterizarea sa genetică și fenotipică, a fost subliniat potențialul utilizării acestei specii pentru o gamă largă de aplicații în cercetare. Kalueff et al. (2014) explică că aptitudinea lor pentru studii neurologice rezidă în abilitățile cognitive ale peștilor zebra, tiparele de somn, morfologia celulară a țesuturilor creierului și macro-organizarea generală a creierului, care este foarte similară cu rozătoarele, în ciuda distanței evolutive mari dintre cele două grupe de animale. O altă caracteristică importantă a peștelui zebra este capacitatea, încă din stadiul larvar, de a oferi comportamente precise, descrise deja de literatura de specialitate, orice schimbare în acestea evidențiind neurotoxicitate sau dezechilibre realizate de intoxicarea controlată cu anumite substanțe (Kalueff et al., 2013; Orger și de Polavieja, 2017).

Având în vedere cele prezentate mai sus, monitorizarea concentrațiilor de microplastice în estuare este vitală în aceste timpuri. Evidențierea posibilelor efecte de natură comportamentală, digestivă și histologică ale acestor poluanți, atât ca acțiune individuală, cât și în legătură cu anumite afecțiuni generate pe modele animale de pești zebra (*Danio rerio*) prezintă un interes major și în creștere în vederea înțelegerii mai în detaliu a spectrului de toxicitate generat de micro/nanoplastice.

În esență este important să înțelegem că producția globală de materiale plastice va rămâne uriașă în viitorul apropiat, ceea ce, desigur, are repercusiuni asupra deșeurilor depozitate în gropile de gunoi, sau în vecinătatea zonelor acvatice, dar în special a omenirii, acest lucru servindu-mi drept motivație pentru tema aleasă.

Scopul studiului de față este să completeze cunoștințele limitate existente cu privire la situația poluării cu microplastice din zona costieră a României și să tragă un semnal de alarmă în viitor, în ceea ce privește adoptarea unor noi baze legale privind acest tip de poluare și încercarea de combatere a acesteia, concomitent cu determinarea posibilelor efecte toxice ale diferitelor materiale polimerice asupra diferitelor stadii de viață ale speciei model *Danio rerio*, precum și în cazul unei patologii de natură neuro-psihiatrică deja existente, anume schizofrenia.

Pentru îndeplinirea scopului acestui studiu, au fost formulate următoarele obiective specifice:

O1. Monitorizarea cantităților de microplastice din zona costieră a României.

O2. Analiza statistică a riscului și prognozarea acestuia în decurs de maxim 20 de ani.

O3. Evaluarea toxicității materialelor plastice prin modelare experimentală utilizând specia *Danio rerio*.

Teza de față prezintă un caracter interdisciplinar, motiv pentru care a fost realizată în cotutelă între Școala Doctorală de Geștiințe și Școala Doctorală de Biologie, ambele din cadrul Universității "Alexandru Ioan Cuza" din Iași. O parte dintre experimentele din cadrul tezei au fost realizate în Departamentul de cercetare (CESAM) al Universității Aveiro din Aveiro, Portugalia în cadrul unui stagiul Erasmus⁺.

1.1. Stadiul actual al poluării cu microplastice în zona costieră a Mării Negre

Pentru a oferi o perspectivă mai bună asupra producției și generării deșeurilor de materiale polimerice, conform statisticilor *Plastics Europe* pentru 2022, conform cărora producția globală totală de plastic a atins 390,7 milioane de tone în 2021, cu 22,7 milioane de tone mai mult decât în 2019, majoritatea fiind reprezentată de materiale pentru împachetat (44%) și materiale de construcții (18%). Mai mult decât atât, un raport recent realizat de către asociația de cercetare și consultanță pentru mediu *Environmental Action* (EA) în 2023 ne indică faptul că așteptările sunt ca, doar pentru anul 2023, România să fie responsabilă pentru eliminarea în mediu a 20.757 tone de microplastic, alături de 2.255 tone de aditivi chimici din producția materialelor plastice (Perreard et al., 2023). În prezent, una dintre cele mai mari probleme la nivel mondial este reciclarea, deoarece nu toate materialele plastice pot fi reutilizate, de exemplu PVC, PS și, în unele cazuri, LDPE.

O nouă problemă pentru mediul acvatic a apărut odată cu pandemia de COVID-19: de la debutul acesteia în 2019 și introducerea obligativității purtării măștilor medicale de unică folosință a apărut o nouă sursă de poluare. Anul 2020 a debutat cu o creștere fără precedent a producției globale de măști de protecție produse din materiale polimerice precum polipropilena, poliuretanul, polistirenul, policarbonatul, polietilena sau poliesterul (Potluri & Needham, 2005). Masca de protecție a feței, ca deșeu solid, va fi degradată de factori naturali precum vântul sau valurile și va duce la poluare cu microplastice și amenințări sporite pentru mediu. Shen și colegii săi au demonstrat într-un studiu recent că măștile de unică folosință acționează ca o sursă potențială importantă de fibre de microplastic în mediu, în special odată cu creșterea consumului global. În plus, odată cu creșterea timpilor de utilizare, eliberarea fibrelor microplastice a crescut și ea (Shen et al., 2021). O singură mască îmbătrânită eliberează miliarde de fibre de microplastic în mediul marin (Saliu et al., 2021).

Microplasticele au fost adesea găsite în coloana de apă a Mării Negre sau în apele de suprafață (Aytan et al., 2016; Berov & Klayn, 2020; Eryaşar et al., 2021; Oztekin & Bat, 2017; Pojar et al., 2021a). Particulele de microplastic au fost găsite și în sedimentele de pe plajă (Pojar et al., 2021b; Savuca et al., 2017), dar și în

sedimentele de adâncime (Cincinelli et al., 2021), de unde pot fi preluate cu ușurință de biotă.

Analizând abundența microplasticelor din sedimente (Figura I.2), se poate observa că acestea sunt prezente în cantități mai mari în nordul Mării Negre, în zona Ucrainei, dar și la gurile Dunării, în România. O abundență mai mare a fost găsită la Capul Midia și la Capul Kaliakra, iar acest lucru poate fi legat de hidrodinamica curenților verticali care forțează sedimentarea particulelor microplastice în aceste regiuni.

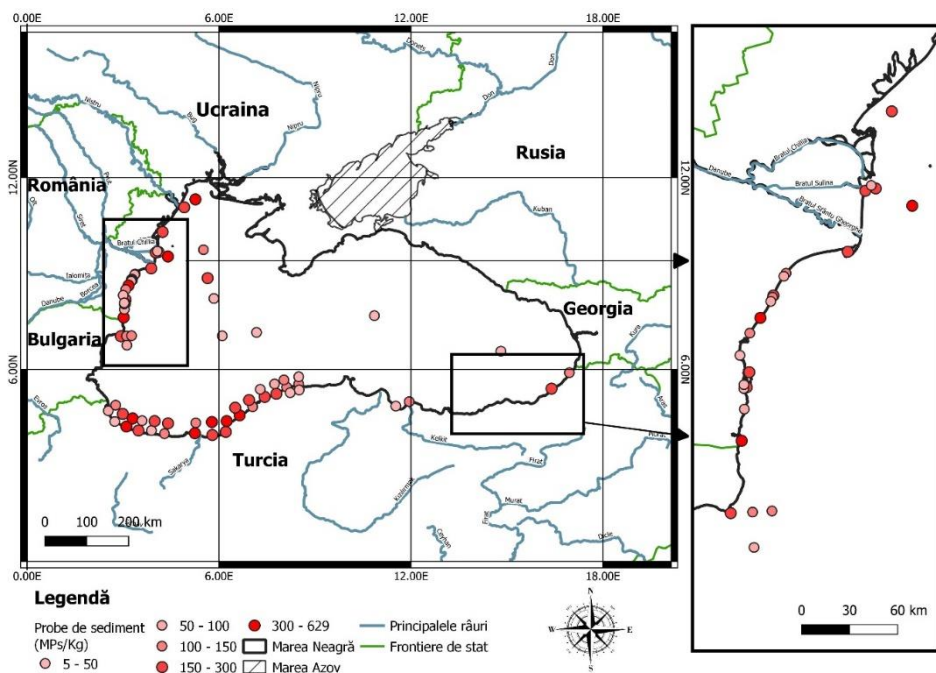


Figura I.2 - Harta punctelor de prelevare a probelor de sediment și abundența microplasticelor (image realizată personal în programul QGIS) (Savuca et al., 2022)

Este îngrijorător faptul că în unele zone de adâncime ale mării, în special în apropierea României, s-au găsit cantități mari de microplastice. Un posibil motiv ar putea fi sedimentarea particulelor în Dunăre și apoi transportul acestora prin curenți de adâncime în larg, creând astfel un „hotspot” pentru astfel de poluanți (Savuca et al., 2022).

Referitor la abundența MP în coloana de apă (Figura I.3), s-au observat concentrații mai mari la gurile Dunării, de-a lungul litoralului românesc, și mai ales în apropierea Capului Midia și a Capului Kaliakra, în Bulgaria. Pe lângă litoralul românesc și cele două puncte de mare acumulare deja menționate, cantități îngrijorătoare de microplastice sunt prezente de-a lungul țărmului turcesc. Acest lucru poate fi explicat prin deversarea râurilor mari din apropiere (râul Dunărea, râul Sakarya, râul Kızılırmak, râul Yeşilırmak), activitățile comerciale din Marea Neagră, cum ar fi navigația și pescuitul, dar și prin hidrodinamica curenților de suprafață. Mai mult, transportul particulelor de microplastic nu este foarte clar înțeles și mai mulți factori pot interfera, cum ar fi hidrodinamica curenților verticali și de suprafață, salinitatea, vântul, puterea valurilor sau temperatura.

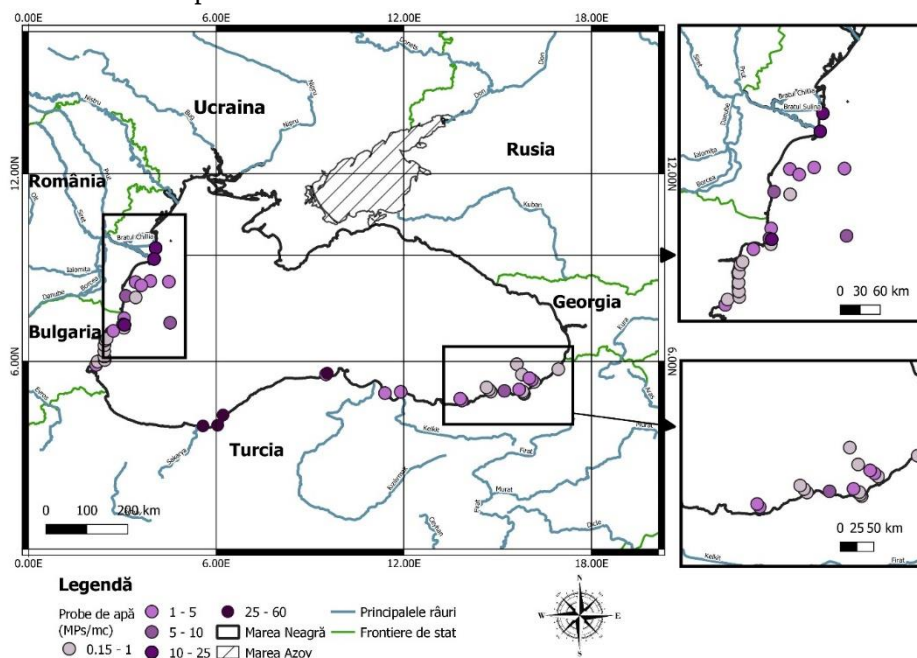


Figura I.3 - Harta punctelor de prelevare a probelor de apă și abundența microplasticelor (image realizată personal în programul QGis) (Savuca et al., 2022)

1.2. Toxicitatea materialelor plastice asupra speciei model *Danio rerio*

Efectele toxice ale NP/MP ar putea fi observate pe întreaga durată de dezvoltare a peștelui zebură, în strânsă corelație cu modificările legate de SO. Producția excesivă de ROS și scăderea apărării enzimactice antioxidante, datorită

expunerii și acumulării de NP/MP, sugerează efecte negative importante asupra neurodezvoltării (anomalii cognitive, întârziere a dezvoltării neurologice, tulburări comportamentale) și efecte extraneuronale, cum ar fi afectarea fiziologiei digestive sau afectarea de natură histopatologică (Curpan et al., 2020; Qiao et al., 2019a).

Din punct de vedere toxicologic, s-a raportat faptul că atât NP, cât și MP prezintă un comportament bioacumulator și coloidal în principal în țesuturile moi. Acestea stimulează mecanismul stresului oxidativ, fără a ține cont de stadiul de dezvoltare (Kögel et al., 2020).

Mai mult, Pitt și colab. au raportat că toxicitatea NP/MP s-ar putea extinde dincolo de efectele individuale, deoarece au arătat că particulele de plastic ar putea fi transmise descendenților prin transfer matern, dar și patern (Pitt et al., 2018a).

În ceea ce privește posibilele modele moleculare ale toxicității PS NP, Pedersen și colab. în 2020 au descris că comportamentul hiperactiv în timpul ciclurilor întunecate a fost corelată cu căile de semnalizare și modulare neurologice și neuromusculare dereglate, care apar în general în tulburările neuropsihiatrice. Modele similare au fost raportate la adulții de pește zebra, unde au fost observate comportamente anormale cum ar fi convulsii epileptice și mișcări neregulate în urma expunerii la micro-sfere de PE (Mak et al., 2019).

Efectele toxice asupra dezvoltării, dar și la nivel molecular ale acestor materiale, depind de mai mulți factori, cum ar fi dimensiunea, forma și dozele acestora. De asemenea, fiecare etapă de dezvoltare ar putea prezenta modele diferite de răspunsuri comportamentale și moleculare în urma expunerii la NP/MP. Tulburările de dezvoltare, cum ar fi defectele morfo-anatomice și ratele mai mici de ecloziune și răspunsul molecular al activității SOD, GPx și CAT crescut au fost întâlnite în mod obișnuit la embrionii expuși la plastic.

1.3. Implicațiile toxicologice ale polipropilenei în relație cu schizofrenia

Schizofrenia este o tulburare psihică severă, reprezentată de interpretarea realității în mod anormal. Această tulburare duce la o combinație de halucinații și iluzii care afectează funcționarea zilnică. Schizofrenia este caracterizată de două categorii de simptome: pozitive și negative, completate de deficite cognitive care duc în timp la un declin funcțional. Simptomele negative includ izolarea socială, lipsa de interes, probleme în vorbire și dorință redusă de atingere a unor țeluri, în timp ce simptomele pozitive sunt mult mai evidente și includ halucinații, iluzii și

paranoia, acestea putând fi prezente la pacienții schizofrenici (Andreasen & Olsen, 1982). De obicei, schizofrenia este diagnosticată la vârste cuprinse între 20 și 35 de ani, dar cu diferențe între sexe, astfel incidența sa atinge vârfuri între 10 și 25 de ani pentru bărbați și între 25 și 35 de ani pentru femei.

Cauzele exacte ale schizofreniei sunt încă necunoscute, însă cercetările în domeniu sugerează că o combinație de factori fizici, genetici, psihologici și factori de mediu pot face ca o persoană să dezvolte această afecțiune pe parcursul vieții (Jablensky, 2010). De altfel, un eveniment traumatizant sau emoțional din viață ar putea declanșa un episod psihotic (Okkels et al., 2017).

La fel ca în cazul altor boli sau anomalii și schizofrenia se află printre cele studiate prin modelare experimentală utilizând drept model specia *Danio rerio*, deoarece o medie de 83% din genele modulare ce sunt implicate în elucidarea mecanismelor schizofreniei în concordanță cu rolurile lor importante în funcția și comportamentul creierului sunt prezente și în peștele zebură, făcându-l astfel un model eligibil pentru studierea acestei patologii (Campbell & Granato, 2020; Curpan et al., 2023).

Referitor la implicațiile factorilor de mediu, o meta-analiză realizată de Polderman et al. (2015), prezintă faptul că efectele mediului înconjurător contribuie la un risc de 55% până la 66% pentru depresie majoră, 32% pentru tulburare bipolară și un risc de 23% pentru schizofrenie. Un alt studiu ne prezintă faptul că o calitate scăzută a aerului (un factor important de mediu), în primii ani de viață, crește riscul a 4 tulburări psihiatrice printre care tulburarea bipolară, schizofrenia, tulburarea de personalitate și tulburarea de depresie majoră (A. Khan et al., 2019). Cunoașterea sporită a factorilor de risc prezenți în mediu și interacțiunea acestora cu persoanele bolnave este, prin urmare, vitală pentru o înțelegere mai cuprinzătoare a cauzei bolii (Savuca et al., 2023b). Un studiu realizat în 2004, pe un eșantion de peste 7000 de persoane a evidențiat faptul că nașterea și perioada de copilărie avută în mediul urban cresc șansele de apariție a schizofreniei în perioada adultă. Astfel, riscul de apariție a bolii a crescut concomitent cu creșterea nivelului de noxe din aer, variabilele de poluare și densitatea traficului, semnificativ fiind în special pentru benzen, monoxid de carbon, prezența acestora în aer provenind de la trafic (Pedersen et al., 2004). Un alt studiu, mult mai recent, ne demonstrează faptul că PM10, dioxidul de azot și dioxidul de sulf, sunt strâns corelate cu apariția bolii la numai 4 zile de expunere cronică, cei mai afectați fiind muncitorii și fermierii de sex masculin, cu vârste

cuprinse între 20 și 50 de ani (Duan et al., 2018). Un alt exemplu sunt metalele grele, în special din categoria xenobioticelor interferează cu sistemul de neurodezvoltare încă din perioada fetală, crescând șansele de apariție a psihozei sau schizofreniei. Astfel, câteva studii menționează metalele precum plumbul, cadmiul, dar și manganul în exces, ca potențiali candidați în creșterea riscului de instalare a schizofreniei (Attademo et al., 2017; Guilarte et al., 2012; Orisakwe, 2014).

Cercetările actuale, în domeniu, ne prezintă faptul că mai ales în aer prezența microparticulelor de plastic este prezentă la un nivel îngrijorător, atât în interior, cât și în exterior. Aportul posibil de consum prin acumularea în mediul interior și exterior prin inhalare este mare, dar totuși există și căi de ingerare extrem de populare pentru aceste microplastice, astfel încât o cantitate estimativă de microplastice de $(0-7,3) \times 10^4$, $(0-4,7) \times 10^3$ și, respectiv, $(0-3,0) \times 10^7$ MPs/pers/an poate proveni chiar din sarea de masă, apa potabilă și, respectiv, din inhalare directă, conform unui studiu din 2020 (Zhang et al., 2020).

Prezența mare, dar și rata de depozitare extrem de mărită a acestor microparticule din materiale polimerice, nu mai fac ca prezența acestora în corpul uman să fie ceva de necrezut. Astfel studiile recente arată că au fost detectate particule de microplastic în 13 din cei 22 de plămâni umani studiați în urma autopsiei acestora, aceste particule fiind de dimensiuni mai mici de 5,5 μm , iar fibrele cu dimensiuni între 8,12 și 16,8 μm sunt, cu precădere, materiale din polietilenă (PE) și polipropilenă (PP) (Amato-Lourenço et al., 2021). De altfel, un alt studiu ne prezintă un fapt și mai îngrijorător: particule de microplastic cu dimensiuni între 5 și 10 μm au fost detectate în 6 placentele maternale, câte 12 particule de natură polimerică, în special de polipropilenă (PP) (Ragusa et al., 2021). Aceste studii ne demonstrează faptul că oamenii sunt foarte expuși la aceste materiale și la ingerarea acestora, indiferent dacă pe cale aeriană sau prin ingestie.

Toate aceste informații ne indică faptul că suntem predispuși, indiferent de mediul în care suntem, la acumulare, inhalare și ingerare de materiale polimerice ce prezintă efecte toxice dovedite în cazul culturilor celulare umane.

Se ridică astfel un semn de întrebare: dacă pentru oamenii sănătoși aceste materiale prezintă toxicitate, atunci care ar fi posibilele efecte toxicologice în cazul în care există o anumită patologie de natură neuropsihiatrică, având în vedere și capacitatea de adsorbție a multor poluanți pe suprafața acestor microplastice și influența asupra calității aerului.

CAPITOLUL 2 - EVALUAREA CALITATIVĂ ȘI CANTITATIVĂ A MICROPLASTICELOR PREZENTE ÎN ZONA COSTIERĂ A ROMÂNIEI

2.1. Materiale și metode de lucru

Zona de studiu a fost reprezentată de zona costieră a României, situată între orașele Cap Midia și Vama Veche (Figura II.1). Din cei 82 km de coastă incluși în zona de studiu, au fost prelevate probe de nisip din zona de țărm de la 20 de stații de prelevare, în aprilie 2022.



Figura II.1 – Harta cu zona de studiu și punctele de prelevare a probelor (Hartă realizată personal în programul QGis)

Pentru a cuantifica materialul plastic existent, probele de sedimente au fost prelevate din stratul superior de 1,5 cm într-o zonă de 50×50 cm cu ajutorul unei lopeți metalice (Figura II.2). Sedimentele au fost transferate în recipiente de sticlă sigilate pentru a preveni contaminarea și ulterior, au fost transportate la laborator pentru analize.



Figura II.2 – Metoda și materialele necesare pentru prelevarea probelor - 1 - cadran cu latura de 50 cm; 2 - spatulă; 3 - container pentru depozitare (foto original)

Ulterior probele au fost subeșantionate în cantități de 100 g, s-au adăugat 200 mL de soluție salină (NaCl , $1,2 \text{ g/cm}^3$, Merck Germania), pentru realizarea separării de densități. Conținutul a fost agitat timp de 20 de minute, după care probele au fost lăsate să se decanteze timp de 2 ore. S-a colectat supernatantul, apoi s-au adăugat 20 mL de peroxid de hidrogen (H_2O_2 30%, Merck Germania) pentru a digera materia organică. Probele au fost lăsate în întuneric și la temperatura camerei timp de 48 de ore, după care conținutul a fost filtrat cu ajutorul unei pompe de vid printr-un filtru din fibră de sticlă.

Filtrele au fost analizate cu ajutorul unui stereomicroscop Zeiss Discovery V.8 echipat cu o cameră digitală pentru cuantificare, măsurarea particulelor s-a realizat cu ajutorul software-ului ZEN. Clasificarea dimensiunilor microplasticelor (MPs) s-a realizat după dimensiune: microplastice mici ($1 \mu\text{m}$ până la $500 \mu\text{m}$), microplastice medii ($0,5$ până la 1 mm), microplastice mari (1 până la 5 mm), formă (fibre, filme, sfere, fragmente) și culoare.

Pentru a identifica compoziția polimerică a microplasticelor au fost selectate aleatoriu 10 stații, din care au fost analizate cel puțin 10 particule pentru fiecare, cu ajutorul spectrometrului Bruker μ FTIR. Procedura a fost efectuată în intervalul spectral 4000-600 cm^{-1} , cu 32 de scanări repetate (n) la rezoluții de 4 cm^{-1} .

Evaluarea riscului și prognozarea acestuia în următoarele decade

Indicele încărcăturii poluante (eng. *Pollution Load Index*) este considerat un model standard pentru monitorizarea gradului de poluare din estuare, propus de către Tomlinson et al. (1980). Evaluarea se va realiza după cum urmează:

$$CF_1 = C_1 / C_{OI}$$

$$PLI = \sqrt{CF_1}$$

$$PLI_{\text{zonă}} = \sqrt[n]{PLI_1 \cdot PLI_2 \cdot \dots \cdot PLI_n}$$

Indicele încărcăturii poluante pentru fiecare stație (PLI) este legat de factorul de concentrație a MP (CF_1). Acesta este câtul dintre concentrația de MPs la fiecare stație (C_1) și concentrația minimă de MPs (C_{OI}). C_{OI} este definit ca și concentrația medie minimă pe baza literaturii disponibile pentru a compara gradul de risc al poluării cu microplastice în zonele de studiu, C_{OI} i-a fost atribuită o valoare specifică de 0,05 particule per 100 L, neafectând astfel rezultatele comparației (Xu et al., 2018) pentru apa de suprafață, valoare ce transpusă pentru un kilogram va fi 5 particule per Kg. În funcție de valoarea indicelui PLI, există patru categorii de risc după cum urmează: $PLI < 10$ Categoria de risc I, PLI variază între 10 și 20 Categoria de risc II, PLI variază între 20 și 30 Categoria de risc III, iar valorile > 30 reprezintă categoria de risc IV, unde categoria I reprezintă un risc minim, iar categoria IV cel mai mare risc.

Cu ajutorul datelor obținute am calculat concentrația estimată în zona malului, de-a lungul întregii coaste litorale a României și, utilizând metodologia descrisă de Everaert et al., 2018, rezultatele au fost exprimate în particule per kg (part/kg).

Formula pentru calculul acestui indicator este:

$$PEC_{\text{mal}} = \frac{n_{\text{part}}}{L_{c/e} * L_{zd} * A_{zd} * D_{sed}}$$

Numărul total de particule de microplastic (n_{part}) reprezintă numărul de microplastice identificate în baza analizelor de laborator într-un anumit an t ,

Lungimea coastei sau a estuarului vizat ($L_{c/e}$) se va exprima în kilometri, la fel și lărgimea zonei de depozitare (L_{zd}). Adâncimea zonei de depozitare (A_{zd}), care va fi în acest caz de 1,5 cm, reprezintă adâncimea la care au fost prelevare probele. Densitatea sedimentului (D_{sed}) este recomandată de către Daly et al., 1966 ca fiind 1930 kg/m^3 .

Indicele PEC (eng. *Predicted Environmental Concentrations*) pentru estimarea cantității într-un timp t se va calcula, ulterior prin multiplicare.

Pasul final pentru aceasta analiză este caracterizarea riscului; pentru a face acest lucru, se calculează un raport de caracterizare a riscului (RCR), utilizând formula:

$$RCR = \frac{PEC}{PNEC}$$

unde, PNEC reprezintă cantitatea estimată ce nu prezintă efecte pentru sedimentele marine, calculată de Everaert et al., 2018, conform legislației în vigoare, ca fiind 540 particule per kg de sediment.

După realizarea calculului, dacă acest RCR este < 1 , atunci nu se percepe niciun risc imediat pentru mediu, deoarece concentrațiile din mediu sunt mai mici decât concentrația sub care cel mai probabil nu vor apărea efecte adverse (PNEC). Creșterea concentrațiilor din mediul înconjurător va duce ulterior la o creștere concomitentă a RCR. Astfel, un $RCR > 1$ indică faptul că, concentrațiile din mediu depășesc concentrația sigură definită de PNEC, în acest caz, nu poate fi exclus un risc pentru mediu. În plus, categoriile în cazul $RCR > 1$ au fost următoarele: dacă valorile RCR sunt cuprinse între 1-10, atunci este vorba de categoria de risc II (risc ecologic mic), dacă valorile sunt cuprinse între 10 și 100, atunci este vorba de categoria de risc III (risc ecologic moderat), iar valorile > 100 reprezintă cea mai înaltă categorie, și anume categoria de risc IV (risc ecologic ridicat) (An et al., 2022).

2.2. Rezultate

Un număr total de 2539 microplastice au fost identificate în cei 82 km de coastă analizați. MPs au fost identificate în toate punctele de prelevare a probelor, cu abundențe cuprinse între 122 și 536 MPs/kg, abundența medie fiind de 253,9 MPs/kg. În ceea ce privește formele particulelor identificate, nu au fost identificate sfere, ci numai fibre, fragmente și filme (Figura II.4). Datele complete privind abundența pentru toate stațiile sunt reprezentate în Figura II.5.

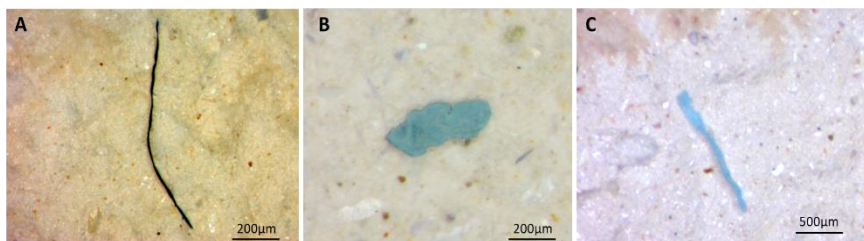


Figura II.1 – Forme de microplastice identificate: A - fibră, B - fragment, C- film (foto original)

În ceea ce privește compoziția polimerică a microplasticelor identificate, există o variație destul de mare între punctele de colectare, după cum se poate observa din graficele din Figura II.6 (A). Dacă ne uităm la imaginea de ansamblu a litoralului românesc, Figura II.6 (B), cel mai predominant tip de polimer este polietilena de densitate medie (MDPE), cu 38%. Termoplasticul de poliuretanul (TPU) și policlorura de vinil (PVC) sunt următorii doi polimeri cu același procent (17%).

Referitor la dimensiunile microplasticelor identificate, cele mai multe dintre acestea se încadrează în categoria microplasticelor mari, adică între 1 și 5 mm. Există o singură excepție de la regulă, și anume stația Năvodari. Aici, categoria de dimensiuni predominantă este cea medie, cu dimensiuni între 0,5 și 1 mm. O altă excepție este stația Mangalia, unde microplasticele mari și mici sunt distribuite în proporții egale. Toate datele sunt reprezentate grafic în Figura II.6.

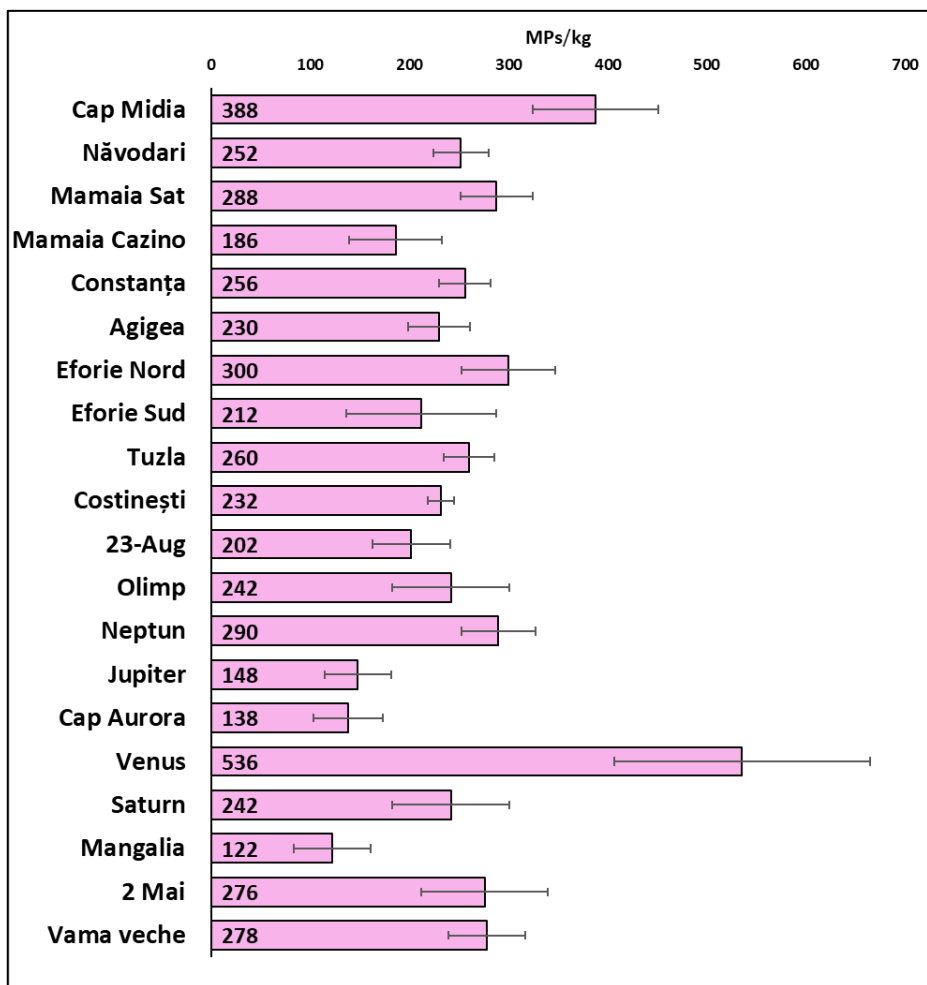


Figura II.2 - Reprezentare grafică a abundențelor de microplastice în fiecare stație de prelevare. Date reprezentate ca medie $\pm$ SD

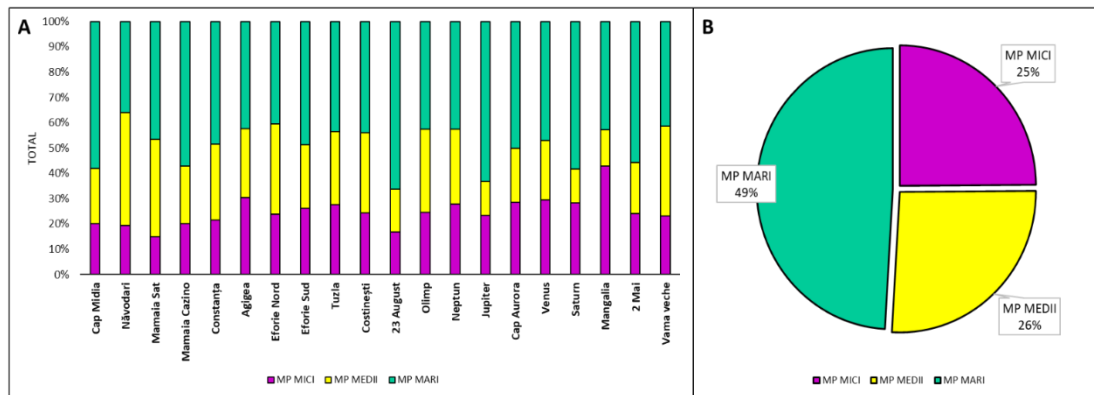


Figura II.4 - Reprezentarea grafică a ponderii procentuale a categoriilor de dimensiuni ale microplasticelor identificate în fiecare stație (A) și pe întreg litoralul românesc (B)

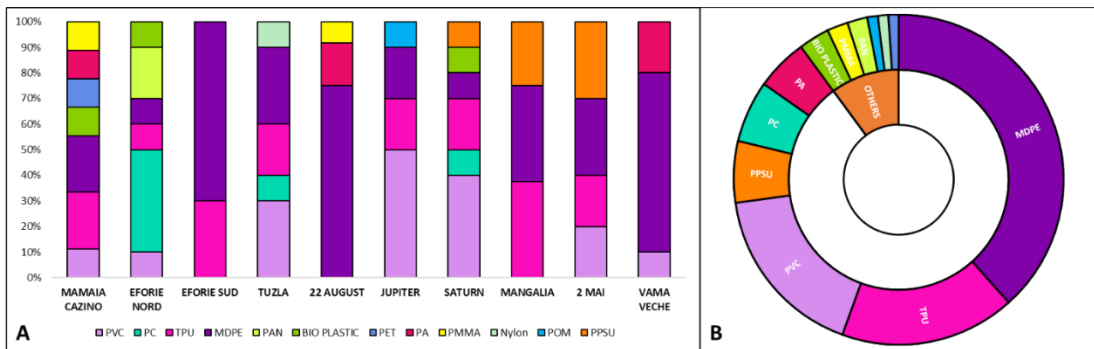


Figura II.3 - Reprezentarea grafică a ponderii procentuale a polimerilor identificați în fiecare stație (A) și pe întreg litoralul românesc (B)

În ceea ce privește tipul de formă a microplasticelor identificate în sedimentele din cele 20 de situri studiate, fibrele au fost cel mai frecvent identificate, urmate de filme și fragmente. Localizarea siturilor pe hartă și ponderea formelor identificate în fiecare stație sunt reprezentate în Figura II.9.



Figura II.9 – Ponderea categoriilor de formă identificate în fiecare stație de colectare.
 Imagine realizată personal în programul QGIS

În ceea ce privește culoarea microplasticelor identificate în sedimentele din cele 20 de stații analizate, culoarea albastră este predominantă în toate stațiile (47%). Ponderea culorilor identificate pentru fiecare stație individuală este reprezentată grafic în Figura II.11.

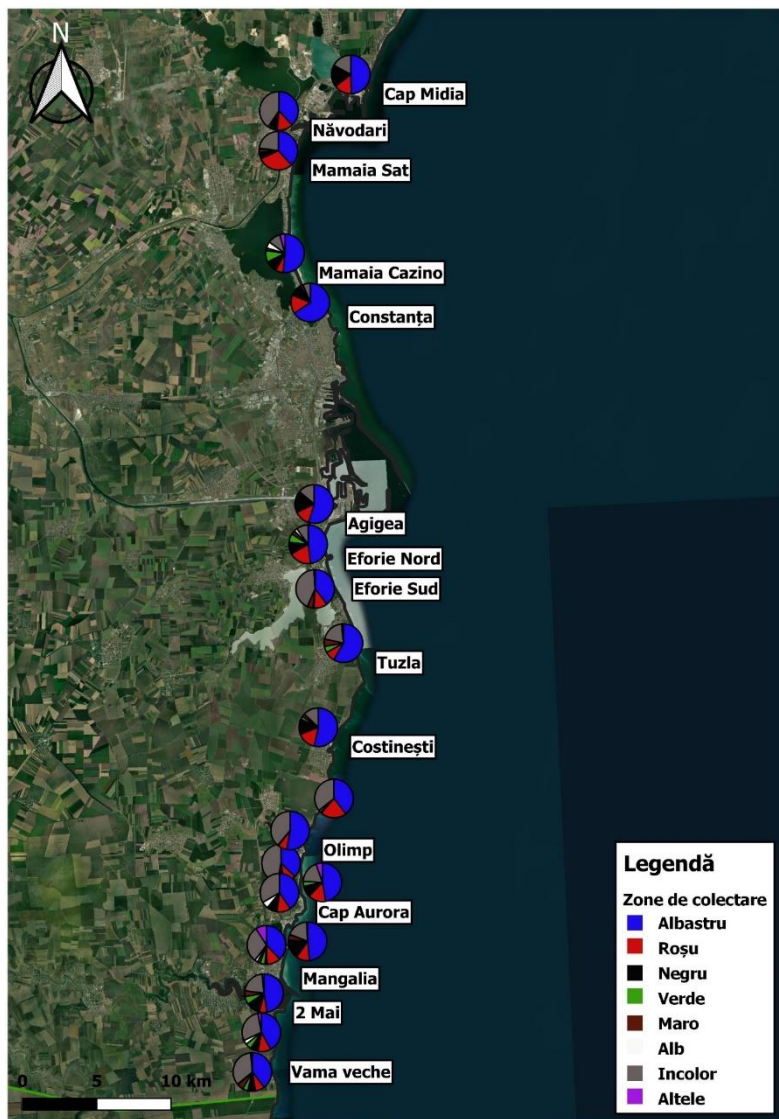


Figura II.11 - Ponderea categoriilor de culoare identificate în fiecare stație de colectare. Imagine realizată personal în programul QGIS

După cum se poate observa în Figura II.12. A, doar un singur punct de prelevare a depășit un $PLI > 10$, și anume stațiunea Venus, următoarea stațiune fiind Cap Midia. La polul opus, cele mai mici valori PLI au fost înregistrate în stațiunile Mangalia, Cap Aurora și Jupiter. În acest sens, 95% din stațiunile litorale românești prezintă un risc minim de poluare cu microplastice (Figura II.12. B).

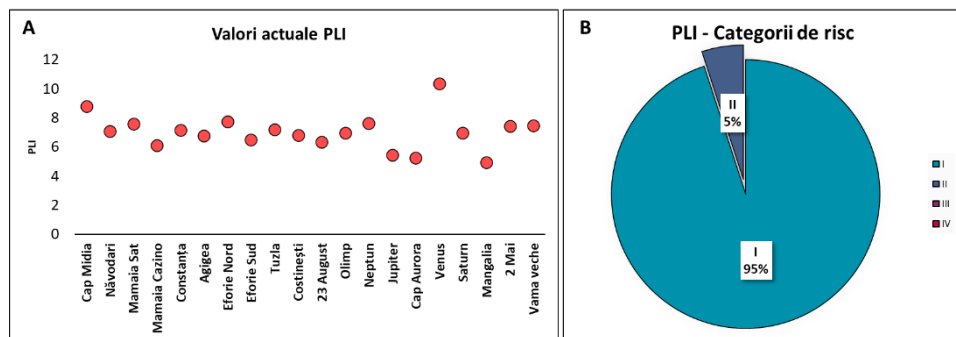


Figura II.12 – Reprezentarea grafică a valorilor PLI pentru fiecare stație (A); reprezentarea grafică a procentajului categoriilor de risc rezultate (B)

Valorile concentrațiilor ambientale prognozate (PEC) și ale ratelor de caracterizare a riscului (RCR) sunt în prezent relativ scăzute, indicând un risc minim, dar nu neglijabil, de poluare cu microplastice în sedimentele analizate. Conform calculelor, aceste valori vor crește strict în următorii ani, așa cum se arată în Figura II.13 A și B. Cea mai mică valoare PEC la nivel actual este pentru stațiunea Mamaia Casino, cea mai mare este pentru Cap Midia.

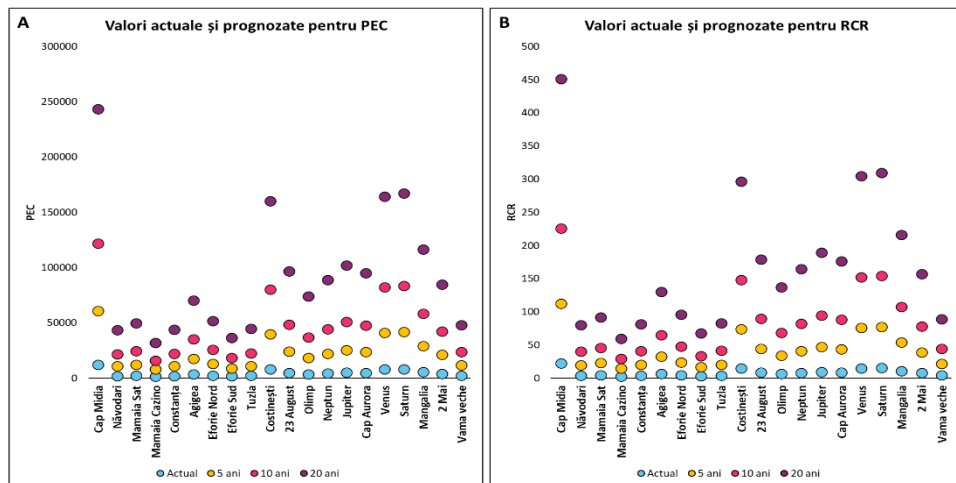


Figura II.5 - Reprezentarea grafică a valorilor actuale și prognozate pentru PEC (A); Reprezentarea grafică a valorilor actuale și prognozate pentru RCR (B)

În prezent, nicio stație de prelevare nu prezintă valori RCR <1. Astfel, 75% din siturile analizate prezintă valori RCR între 1 și 10, evidențiind un risc minim de poluare, deoarece concentrațiile de poluanți din mediu depășesc limita de siguranță stabilită de PNEC (Figura II.14 A). 25% din siturile analizate prezintă valori ale RCR>10, evidențiind un grad moderat de risc ecologic. Este vorba de Cap Midia, cea mai nordică stațiune, Costinești, în mijlocul litoralului, dar și Venus, Saturn și Mangalia, reprezentând partea sudică a litoralului. Dacă luăm în considerare situația pentru următoarea perioadă în ceea ce privește aceste categorii de risc, putem observa din graficele din Figura II.14 B că în 5 ani categoria de risc II nu va mai exista. Actuala categorie de risc III va crește cu 70%. Stațiunea care este vizată pentru o categorie de risc IV în 5 ani va fi Cap Midia. În plus, în următorii 10 ani, Figura II.14 C, la categoria de risc IV se vor adăuga stațiuni precum Costinești, Venus, Saturn și Mangalia. Situația cea mai gravă, cu siguranță critică, dacă nu se iau măsuri, se va produce peste 20 de ani, 60% din stațiunile de coastă vor fi încadrate în categoria de risc IV, Figura II.14 D

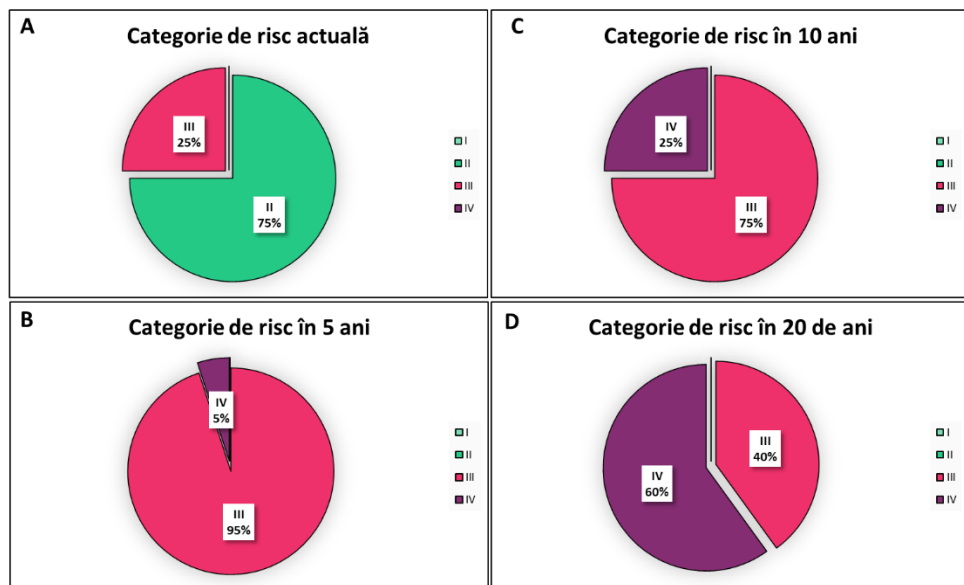


Figura II.6 - Reprezentarea grafică a procentajelor de categorii de risc actuale (A) și prognozate pentru următorii 5 ani (B), 10 ani (C) și 20 de ani (D)

CAPITOLUL 3 - TOXICITATEA DIFERITELOR MATERIALE POLIMERICE ASUPRA SPECIEI MODEL *DANIO RERIO*

3.1. Toxicitatea microplasticelor de Polietilenă și Polipropilenă în cazul adulților de pește zebură

3.1.1. Materiale și metode de lucru

Peștii zebură au fost expuși la microplastice de polipropilenă (PP) și polietilenă (PE) în concentrații de 2 mg/L, timp de 5 zile consecutiv, o dată la 24 de ore. Regimul alimentar a fost în conformitate cu cerințele de adăpostire, ceea ce înseamnă că li s-a administrat 8% din greutatea hranei, combinat cu cantitatea necesară de material polimeric. Răspunsul comportamental a fost analizat după 24 de ore de la fiecare doză administrată, cu ajutorul software-ului de urmărire video EthoVisionXT 14 (Noldus Information Technology, Țările de Jos). Pentru a observa efectele materialelor polimerice, au fost utilizate următoarele teste de comportament: Testul acvariului nou, Testul de preferință socială și Testul de agresivitate. La finalul experimentului, peștii au fost sacrificați în conformitate cu procedurile etice pentru analiza biomarkerilor de stres oxidativ, și anume super oxid dismutază (SOD), malondialdehidă (MDA), glutatión peroxidază (GPx) și proteine totale solubile (PTS).

3.1.2. Rezultate

3.1.2.1. Testul acvariului nou

Referitor la nivelul de anxietate, putem concluziona că PP are efect în funcție de doză, astfel la primele două doze (48 h) se evidențiază un efect anxiolitic față de control, dar pe parcursul următoarelor tratamente până la 120 h valorile se aliniază cu controlul (Figura III.4). Influența PE se constată în special la primele 96 h de administrare, evidențiind astfel un comportament anxios ușor diferit deoarece peștii petrec mai mult timp în partea superioară a acvariului, dar în special în vecinătatea pereților concomitent cu valori scăzute pentru parametrii de performanță de înot și crescătoare pentru timpul de inactivitate. La 120 h, toți parametrii urmăriți tind să se alinieze cu controlul (Figura III.5).

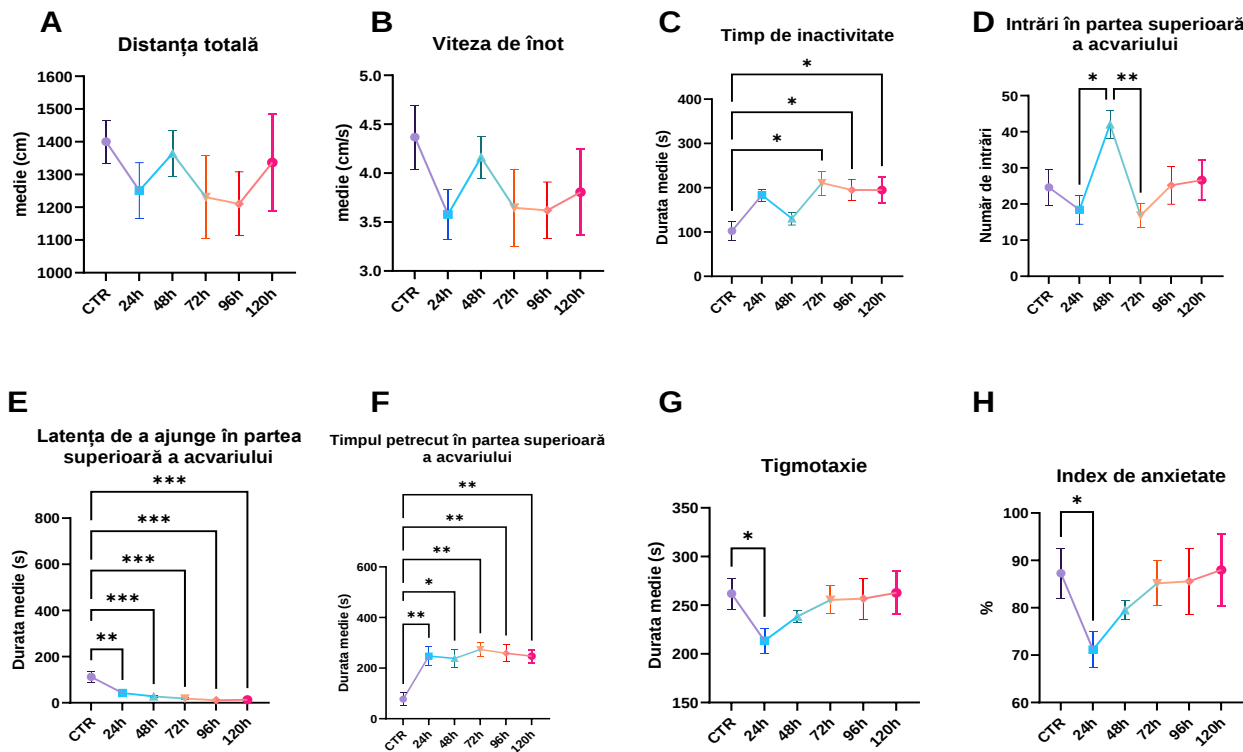


Figura III.4 - Modele comportamentale reprezentate grafic în cazul tratamentelor cu PP în Testul acvariului nou. Datele sunt exprimate ca medie $\pm$ SEM, iar un $p < 0,05$ a fost considerat semnificativ din punct de vedere statistic (*), în cazul testului unidirecțional ANOVA, urmat de un test posthoc Tukey

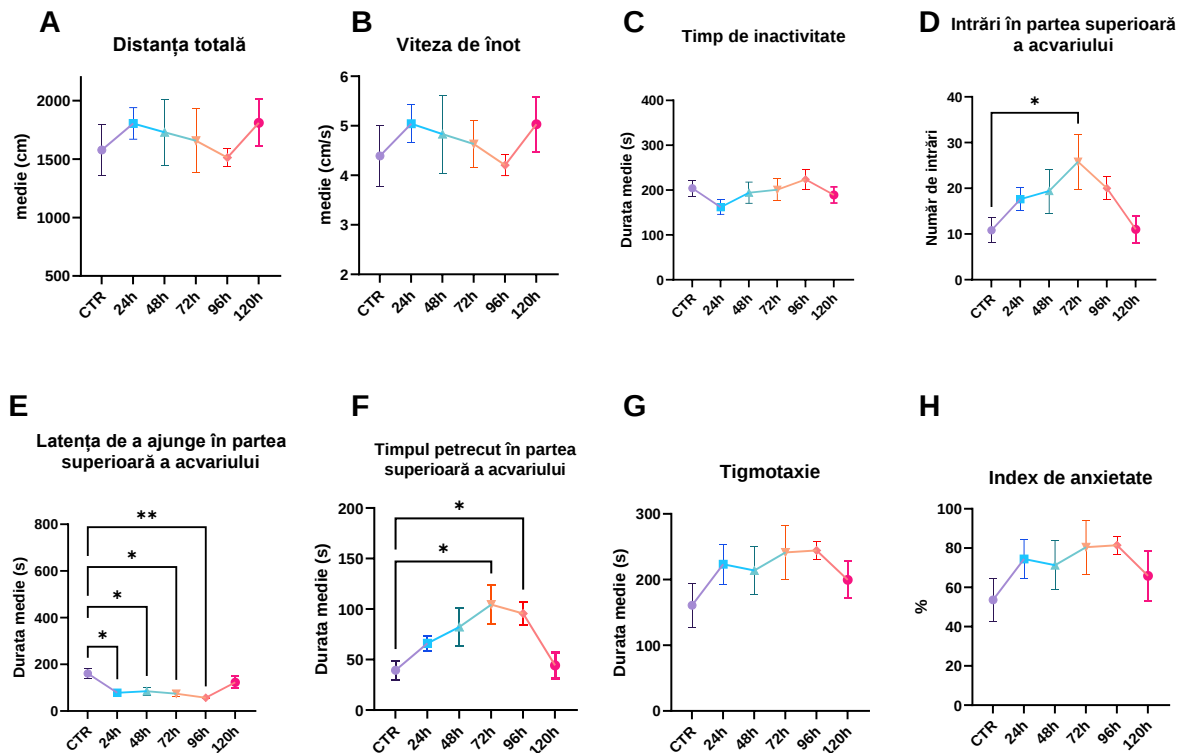


Figura III.7 - Modele comportamentale reprezentate grafic în cazul tratamentelor cu PE în Testul acvariului nou. Datele sunt exprimate ca medie $\pm$ SEM, iar un $p < 0,05$ a fost considerat semnificativ din punct de vedere statistic (*), în cazul testului unidirecțional ANOVA, urmat de un test posthoc Tukey

3.1.2.2. Testul de preferință socială

În ceea ce privește PP, distanța totală parcursă și viteza de înot prezintă aceeași tendință fluctuantă pe parcursul dozelor de tratament, fără semnificație statistică. Intoxicarea cu PP nu prezintă influențe clare asupra sociabilității, însă modifică parametrii de performanță de înot, indicând un comportament mai agitat și o incapacitate de luare a deciziei în legătură cu prezența sa în vecinătatea conspecificilor (Figura III.6).

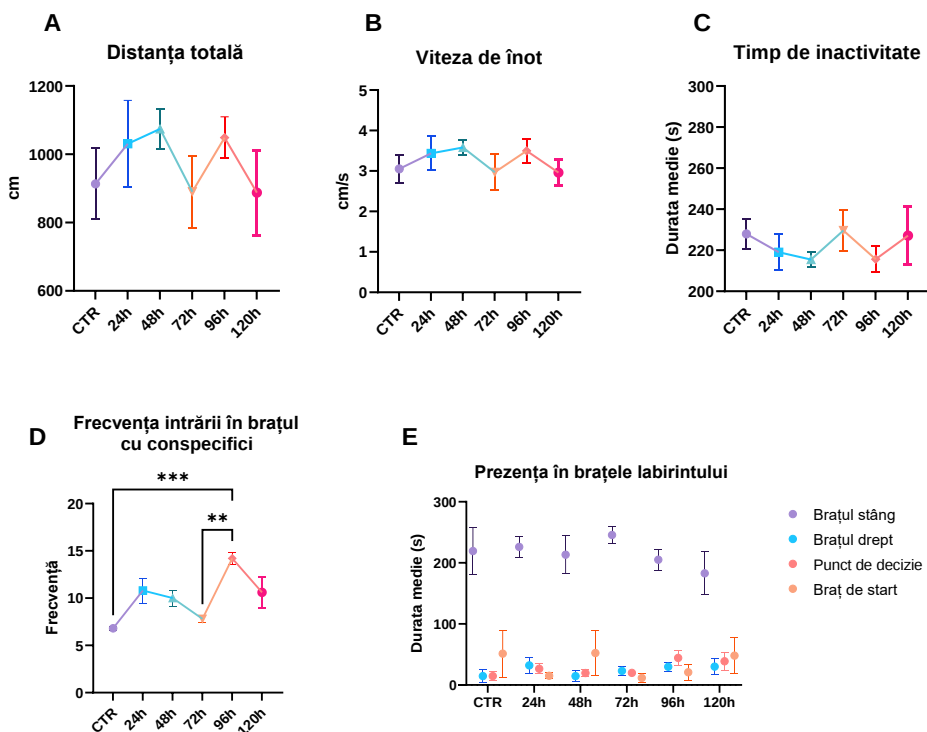


Figura III.8 - Modele comportamentale reprezentate grafic în cazul tratamentelor cu PP în Testul de preferință socială. Datele sunt exprimate ca medie $\pm$ SEM, iar un $p < 0,05$ a fost considerat semnificativ din punct de vedere statistic (*), în cazul testului unidirecțional ANOVA, urmat de un test posthoc Tukey

În cazul PE, distanța totală parcursă și viteza de înot prezintă aceeași tendință descendentă pe parcursul dozelor de tratament, cu diferențe semnificative între control și 120 h. În cele din urmă, intoxicarea cu PE pare a avea o capacitate de creștere a sociabilității, dar scade performanța de înot, concomitent cu creșterea timpului de inactivitate, generând mai mult un posibil mecanism de anxietate și frică (Figura III.7).

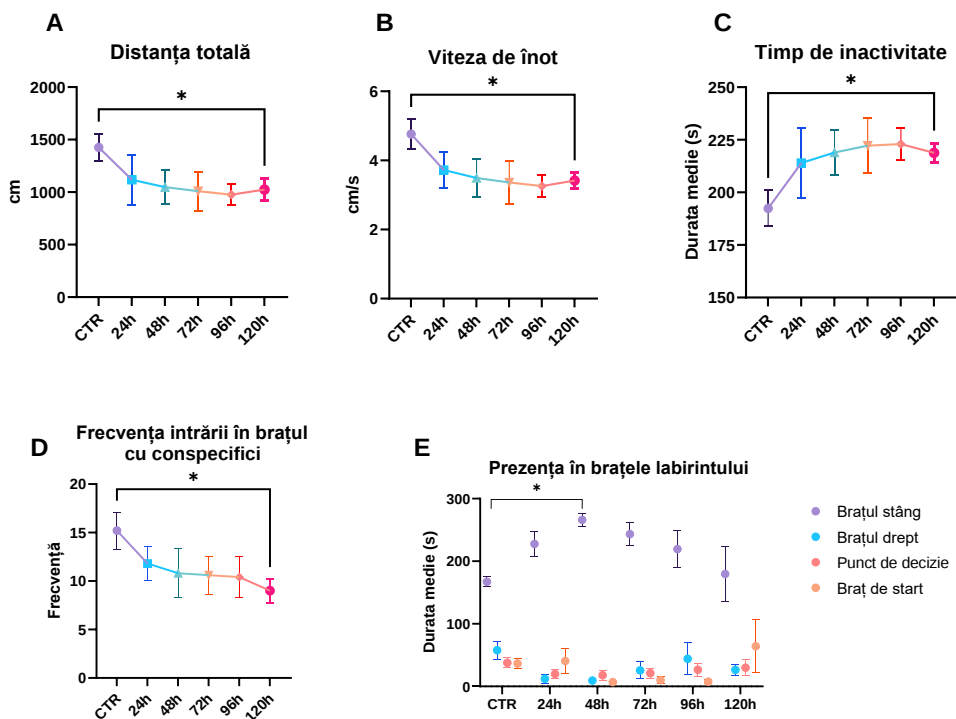


Figura III.7 - Modele comportamentale reprezentate grafic în cazul tratamentelor cu PE în Testul de preferință socială. Datele sunt exprimate ca medie $\pm$ SEM, iar un $p < 0,05$ a fost considerat semnificativ din punct de vedere statistic (*), în cazul testului unidirecțional ANOVA, urmat de un test posthoc Tukey

3.1.2.4. Analiza markerilor biochimici ai stresului oxidativ

În acest studiu am constatat o creștere sugestivă a activității specifice SOD în urma expunerii la PE în comparație cu grupul expus la PP ($p=0,041$; Figura III.10 A). Activitatea antioxidantă a GPx, a fost semnificativ mai mică în urma expunerii la PE, comparativ cu grupul de control ($p=0,003$; Figura III.10 B). În plus, nivelurile de MDA au crescut în urma ambelor expuneri, comparativ cu controlul. Modificări semnificative din punct de vedere statistic ale conținutului de MDA au fost identificate între control și PE ($p=0,045$; Figura III.10 C).

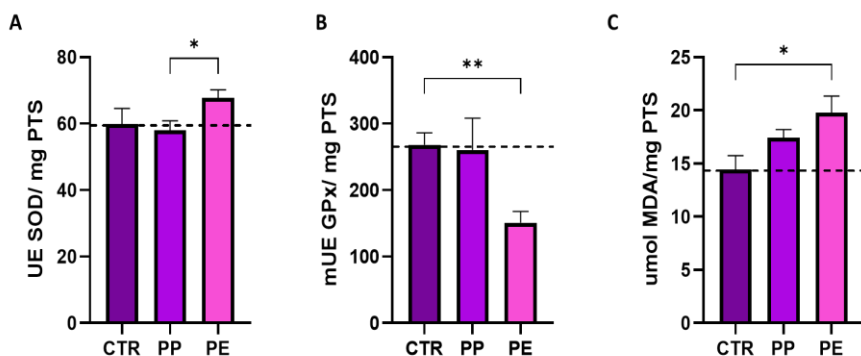


Figura III.90 - Reprezentarea grafică a nivelurilor markerilor de stres oxidativ: activitatea specifică SOD (UE SOD/ mg PTS) (A), activitatea specifică GPx (mUE GPx/ mg PTS) (B) și conținutul relativ de MDA (umol MDA/ mg PTS) (C). Datele au fost exprimate ca medie $\pm$ SEM ($n = 5$ / per grup, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ în testul Two tailed t). PTS = proteine totale solubile

3.2. Toxicitatea nanoparticulelor de Polimetil-metacrilat asupra primelor stadii de viață ale peștilor zebură

3.2.1. Materiale și metode de lucru

Experimentele au fost efectuate folosind specia *Danio rerio* la trei momente diferite ale fazei timpurii de viață, și anume: stadiul embrionar, stadiul larvar (72 hpf) și stadiul larvar cu gura deja formată (120 hpf). Toate procedurile de cultură și de depunere a icrelor au fost efectuate în conformitate cu liniile directoare OCDE (OECD TG 203; OECD TG 236) în Facilitățile Zebrafish de la Departamentul de Biologie, Universitatea din Aveiro. Pentru a evalua toxicitatea compușilor, am realizat un test de toxicitate FET în conformitate cu ghidul de testare elaborat de OCDE. Cele trei etape de viață au fost expuse, timp de cinci zile consecutiv, la concentrații relevante din punct de vedere ecologic: 0,0001, 0,001, 0,01, 0,1 și 1 mg/L de PMMA 50 și 100 nm în plăci cu 24 de godeuri timp

de 96 de ore în 2 ml de mediu E3 (OECD TG 236, 2013) și au fost urmărite obiective specifice, precum malformații/anomalii morfologice, mortalitate, frecvența cardiacă, rata de ecloziune. A urmat evaluarea comportamentală după 120 de ore de expunere, folosind protocolul de testare ”*Thigmotaxis*” (2 minute acomodare, 5 minute lumină, 5 minute întuneric). Numărul de indivizi utilizați a fost $n=10/\text{grup}$, și au fost evaluați markerii comportamentali pentru neurotoxicitate, folosind Zebrabox Chamber de la ViewPoint (Franța). După analiza comportamentală, larvele ($n=10/\text{grup}$) au fost anesteziate și fotografiate sub stereomicroscop pentru măsurători viitoare (lungimea totală, distanță interoculară, diametrul ochiului, lungimea retinei), utilizând software-ul *Image J*.

3.2.2. Rezultate privind toxicitatea pentru Polimetil-metacrilat 50 nm

3.2.2.2. Mortalitate și anomalii morfologice

Pentru toate testele, procentul de mortalitate și de anomalii morfologice între grupurile de tratament este mai mic de 20% în toate stadiile de viață ale peștilor zebură, cu mecanisme de acțiune diferite în funcție de stadiul de viață al peștilor zebură și de concentrație. Exemple reprezentative ale anomaliilor morfologice identificate sunt prezentate în Figura III.14.

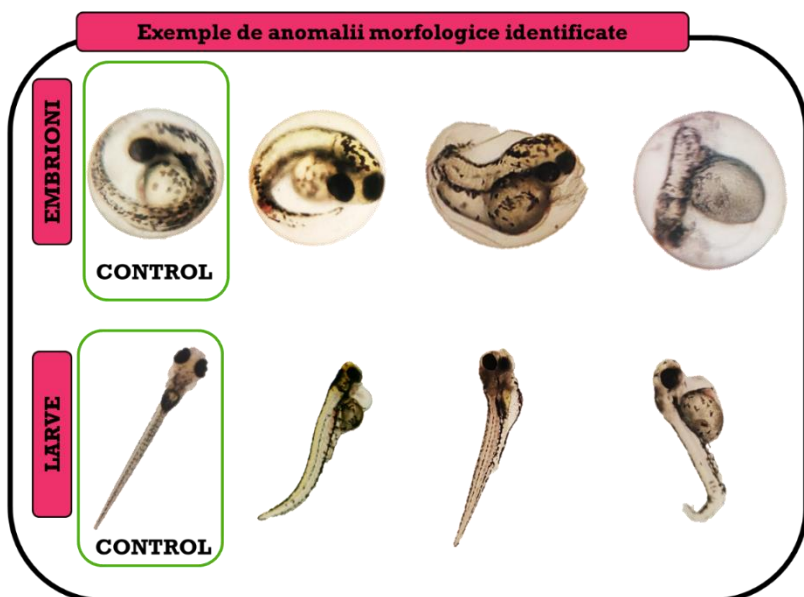


Figura III.104 - Exemple reprezentative de anomalii morfologice identificate la embrionii și larvele expuse la PMMA 50 nm (foto original)

3.2.2.3. Morfologie

3.2.2.3.1. Stadiul embrionar

Lungimea totală a embrionilor, a fost mai mică decât cea a grupului de control în cazul tuturor grupurilor de tratament. Referitor la distanța interoculară, grupurile de tratament au prezentat valori mai mari decât cea a grupului de control în trei grupuri de tratament, și anume 0,001 mg/L, 0,01 mg/L și 0,1 mg/L. Pentru diametrul ochiului, grupurile de tratament au prezentat valori mai mici decât cel al grupului de control, cu diferențe semnificative doar în cazul tratamentului cu cea mai mică concentrație, 0,0001 mg/L. Referitor la lungimea cristalinului, acesta a fost semnificativ mai mică doar în grupul tratament cu 0,01 mg/L în comparație cu grupul de control (Figura III.16).

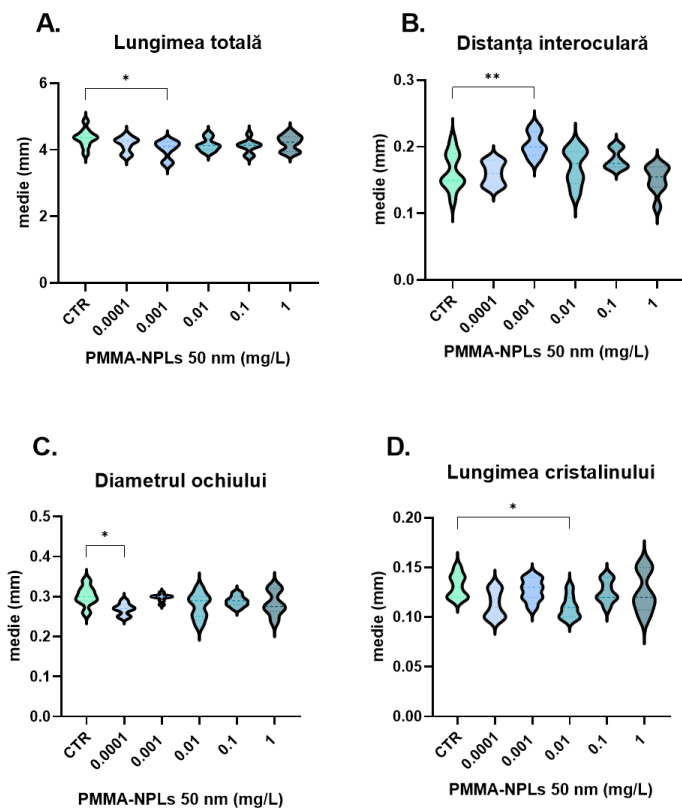


Figura III.116 - Reprezentarea grafică a morfologiilor înregistrate după administrarea de PMMA 50 nm în cazul embrionilor, unde * reprezintă semnificația statistică, pentru un $p < 0,05$, la testul uni-direcțional ANOVA

3.2.3. Rezultate privind toxicitatea pentru Polimetil-metacrilat 100 nm

3.2.3.2. Mortalitate și anomalii morfologice

În ceea ce privește mortalitatea și anomaliile morfologice, procentajul în rândul grupurilor de tratament este mai mic de 20% în toate stadiile de viață ale peștilor zebură, cu excepția stadiului embrionar la concentrația de 0,01 mg/L, unde a fost de 30%, cu mecanisme de acțiune diferite în funcție de stadiul de viață al peștilor zebură și de concentrație. Pentru stadiul larvar 120 hpf nu s-au înregistrat anomalii morfologice și/sau mortalitate în niciun grup. Exemple de anomalii morfologice sunt redată în Figura III.23.

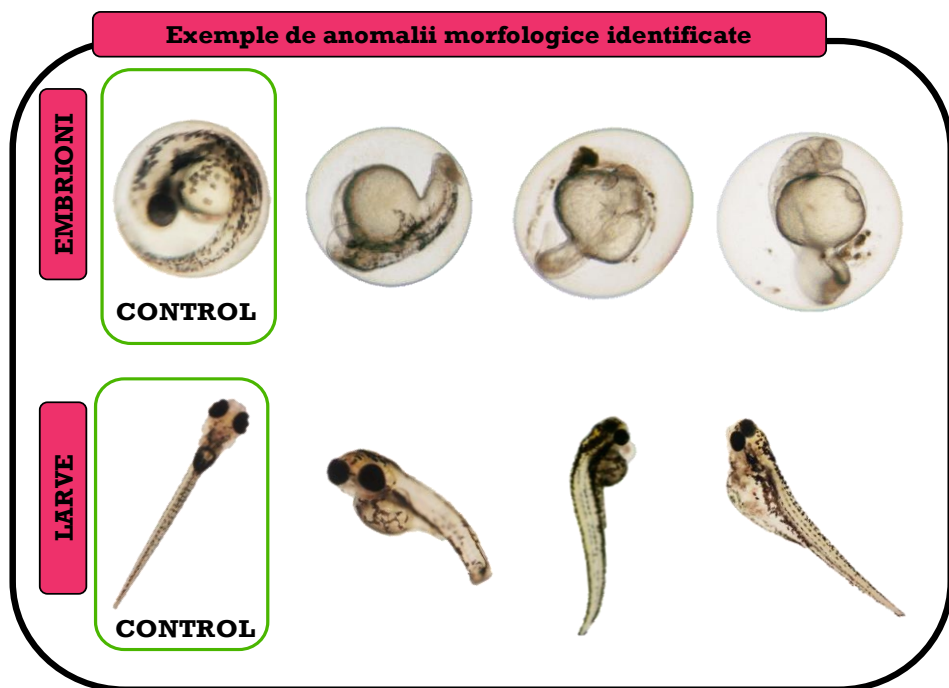


Figura III.12 - Exemple reprezentative de anomalii morfologice identificate la embrionii și larvele expuse la PMMA 100 nm (foto original)

3.2.3.3. Morfologie

3.2.3.3.1. Stadiul embrionar

Pentru stadiul embrionar, lungimea totală a fost semnificativ mai mică decât în cazul grupului de control doar în grupul de tratament 0,0001 mg/L. Referitor la distanță interoculară, s-au observat valori mai mici decât în grupul de control în trei grupuri de tratament, și anume 0,0001 mg/L, 0,001 mg/L și 1 mg/L. O distanță interoculară mai mare a fost observată în grupul de tratament cu 0,1 mg/L. În ceea ce privește diametrul ochiului, o valoare semnificativ mai mare a fost observată doar în cazul tratamentului cu cea mai mică concentrație, anume 0,0001 mg/L în comparație cu grupul de control. Nu au fost identificate diferențe semnificative în ceea ce privește lungimea cristalinului (Figura III.25).

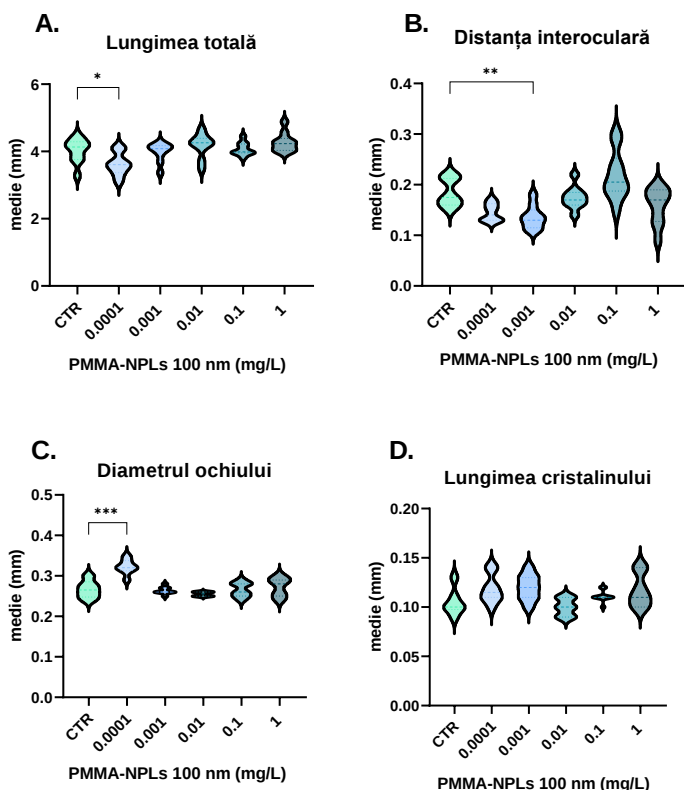


Figura III.13 - Reprezentarea grafică a morfologiilor înregistrate după administrarea de PMMA 100 nm în cazul embrionilor, unde * reprezintă semnificația statistică, pentru un $p < 0,05$, la testul uni-direcțional ANOVA

3.3. Toxicitatea nanoparticulelor de Polipropilenă asupra primelor stadii de viață ale peștilor zebură

3.3.1. Materiale și metode de lucru

Experimentele au fost efectuate folosind specia *Danio rerio* la două momente diferite ale fazei timpurii de viață, și anume: stadiul embrionar și stadiul larvar (72 hpf). Toate procedurile de cultură și de depunere a icrelor au fost efectuate în conformitate cu liniile directoare OCDE (OECD TG 203/236) în Facilitățile Zebrafish de la Departamentul de Biologie, Universitatea din Aveiro. Pentru a evalua toxicitatea compușilor, am realizat un test de toxicitate FET în conformitate cu ghidul de testare elaborat de OCDE. Cele două etape de viață au fost expuse, timp de cinci zile consecutiv, la concentrații relevante din punct de vedere ecologic cuprinse între 0,0001 și 1 mg/L nanoplastice de PP cu dimensiuni cuprinse între 25 și 103 nm, în plăci cu 24 de godeuri timp de 96 de ore în 2 ml de mediu E3 (OECD TG 236, 2013) și au fost urmărite obiective specifice, precum malformații/anomalii morfologice, mortalitate, frecvența cardiacă, rata de ecloziune. A urmat evaluarea comportamentală după 120 de ore de expunere, folosind protocolul de testare "Thigmotaxis" (2 minute acomodare, 5 minute lumină, 5 minute întuneric). Numărul de indivizi utilizați a fost $n=10/\text{grup}$, și au fost evaluați markerii comportamentali pentru neurotoxicitate, folosind Zebrafish Chamber de la ViewPoint (Franța). După analiza comportamentală, larvele au fost anesteziate și fotografiate sub stereomicroscop pentru măsurători viitoare (lungimea totală, distanță interoculară), utilizând software-ul *Image J*.

3.3.2. Rezultate

3.3.2.1. Mortalitate și malformații

În ceea ce privește embrionii, anomaliile morfologice au apărut după 48 de ore de expunere doar în cazul celei mai mici concentrații utilizate (0,0001 mg/L). Ulterior, începând cu 72 de ore de expunere acestea au fost identificate în toate grupurile de tratament, excepție făcând cea mai mare concentrație (1 mg/L), procentajul fiind în creștere până la finalul experimentului. În cazul larvelor, anomaliile morfologice și mortalitatea (10%) au fost înregistrate chiar de la 24 de ore expunere pentru grupul expus la 0,01 mg/L PP. La finalul experimentului 10% anomalii de dezvoltare au fost înregistrate în grupurile 0,0001 mg/L, 0,001 mg/L. Mortalitate de 10%, respectiv 20% a fost înregistrată în grupurile 0,01 mg/L și,

respectiv, 0.1 mg/L. Exemple reprezentative ale anomaliilor sunt prezentate în Figura III.34.

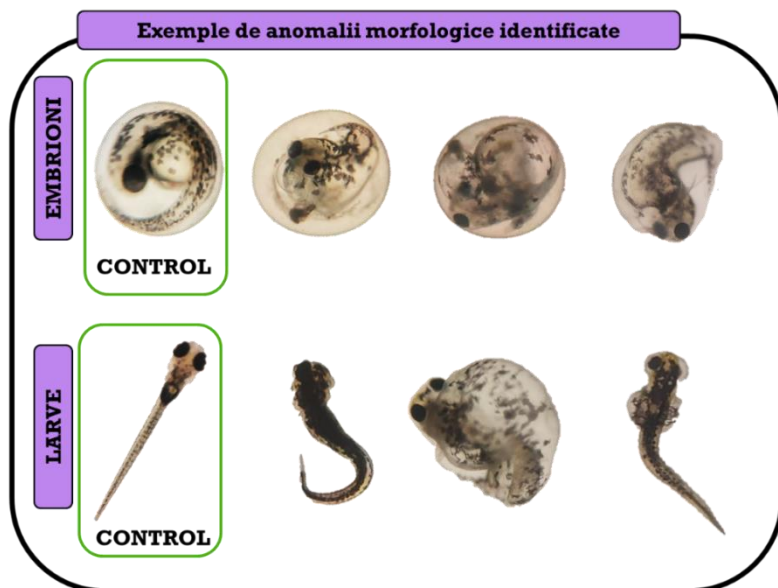


Figura III.14 - Exemple reprezentative de anomalii morfologice identificate la embrionii/larvele expuse la nanoparticule de PP (foto original)

3.3.2.2. Morfologie

În cazul embrionilor, concentrațiile de PP nu au afectat lungimea totală, cu toate că, în cazul distanței interoculare, cea mai mică concentrație utilizată a prezentat valori semnificativ mai mari decât grupul control (Figura III.36 A, B).

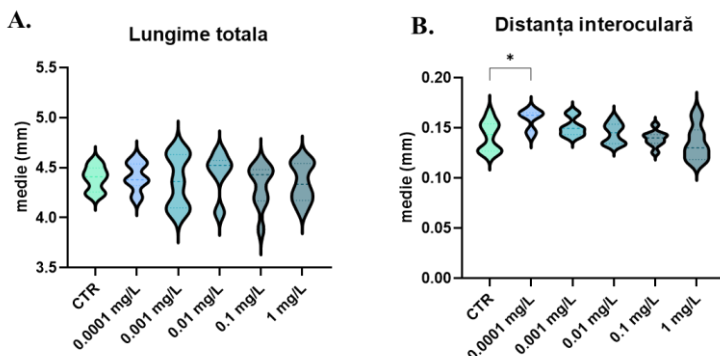


Figura III.36 - Reprezentare grafică a mediilor grupurilor testate pentru A. Lungime totală, B. Distanța interoculară a embrionilor expuși la PP, unde * reprezintă semnificația statistică, pentru un $p < 0,05$, la testul uni-direcțional ANOVA

În cazul larvelor, concentrațiile de PP au afectat lungimea totală a larvelor, cu diferențe semnificative statistic la două concentrații și anume: 0,0001 mg/L și 0,01 mg/L unde s-au înregistrat valori mai scăzute comparativ cu grupul control (Figura III.37 A). În cazul distanței interoculare, cea mai mică concentrație utilizată, anume 0,0001 mg/L a prezentat dimensiuni semnificativ mai mici decât grupul control (Figura III.37 B).

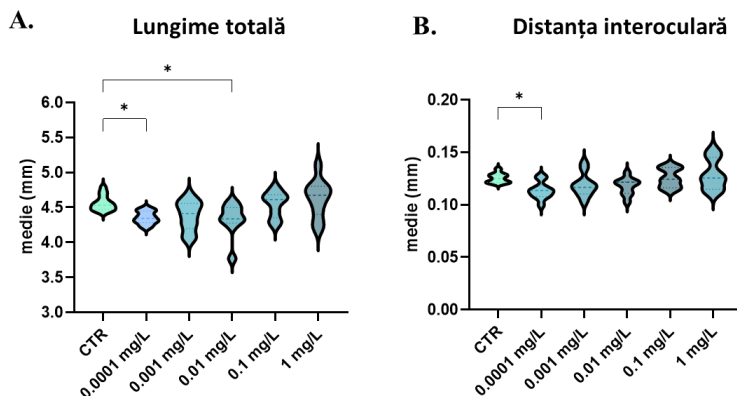


Figura III.37 - Reprezentare grafică a mediilor grupurilor testate pentru A. Lungime totală, B. Distanța interoculară a larvelor expuse la PP, unde * reprezintă semnificația statistică, pentru un $p < 0,05$, la testul uni-direcțional ANOVA

3.4. Toxicitatea nanoparticulelor de bioplastic (acid polilactic) asupra primelor stadii de viață ale peștilor zebură

3.4.1. Materiale și metode de lucru

Experimentele au fost efectuate folosind specia *Danio rerio* la două momente diferite ale fazei timpurii de viață, și anume: stadiul embrionar și stadiul larvar (72 hpf). Toate procedurile de cultură și de depunere a icrelor au fost efectuate în conformitate cu liniile directoare OCDE (OECD TG 203/236) în Facilitățile Zebrafish de la Departamentul de Biologie, Universitatea din Aveiro. Pentru a evalua toxicitatea compușilor, am realizat un test de toxicitate FET în conformitate cu ghidul de testare elaborat de OCDE. Cele două etape de viață au fost expuse, timp de cinci zile consecutiv, la concentrații relevante din punct de vedere ecologic 0,0001, 0,001 și 0,01 mg/L de acid polilactic în plăci cu 24 de godeuri timp de 96 de ore în 2 ml de mediu E3 (OECD TG 236, 2013) și au fost urmărite obiective specifice, precum malformații/anomalii morfologice, mortalitate, frecvența cardiacă, rata de ecloziune. A urmat evaluarea

comportamentală după 120 de ore de expunere, folosind protocolul de testare "Thigmotaxis". Numărul de indivizi utilizați a fost $n=10/\text{grup}$, și au fost evaluați markerii comportamentali pentru neurotoxicitate, folosind Zebrabox Chamber de la ViewPoint (Franța). După analiza comportamentală, larvele au fost anesteziate și fotografiate sub stereomicroscop pentru măsurători viitoare (lungimea totală, distanță interoculară), utilizând software-ul *Image J*.

3.4.2. Rezultate

3.4.2.1. Mortalitate și malformații

În ceea ce privește embrionii, anomaliile de dezvoltare/morfologice au apărut după 48 de ore de expunere doar în cazul celei mai mari concentrații utilizate (0,01 mg/L). La 120 de ore de expunere, mortalitate a fost înregistrată doar pentru grupul expus la 0,001 mg/L PLA, de 10%, concomitent cu 10% anomalii de dezvoltare pentru toate grupurile de expunere.

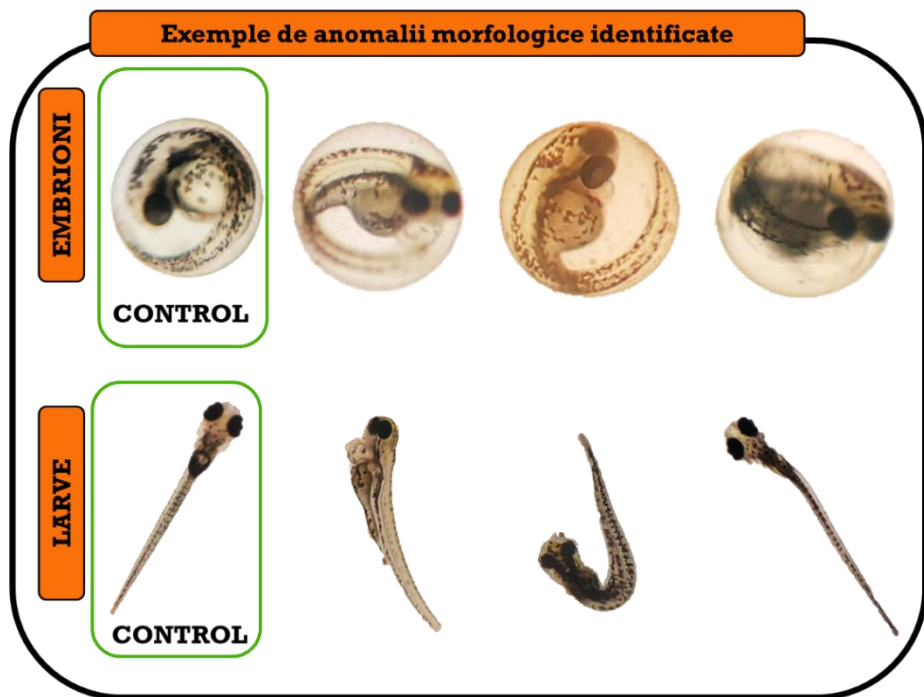


Figura III.44 - Exemple reprezentative de anomalii morfologice identificate la embrionii și larvele expuse la nanoplastice de PLA (foto original)

În cazul larvelor, anomalii de dezvoltare și morfologice (10%) au fost înregistrate chiar de la 24 de ore de expunere pentru grupul expus la 0,0001 mg/L PLA. La 96 de ore 10% din larvele expuse la concentrația intermediară (0,001 mg/L) prezentau anomalii de dezvoltare și 10% din larvele expuse la 0,0001 mg/L PLA au înregistrat decese, aceste valori menținându-se până la finalul experimentului. Imagini reprezentative ale anomaliilor morfologice sunt reprezentate în Figura III.44.

3.4.2.2. Morfologie

În cazul embrionilor, expunerea la aceste concentrații de PLA nu a afectat lungimea totală (Figura III.47 A). Cu toate că, în cazul distanței interoculare, aceleași concentrații au prezentat valori mult mai mici decât grupul control (0,14±0,008 mm), anume, 0,11±0,006 mm pentru grupul 0,0001 mg/L, 0,12±0,01 mm pentru 0,001 mg/L și 0,12±0,005 mm pentru 0,01 mg/L (Figura III.47 B).

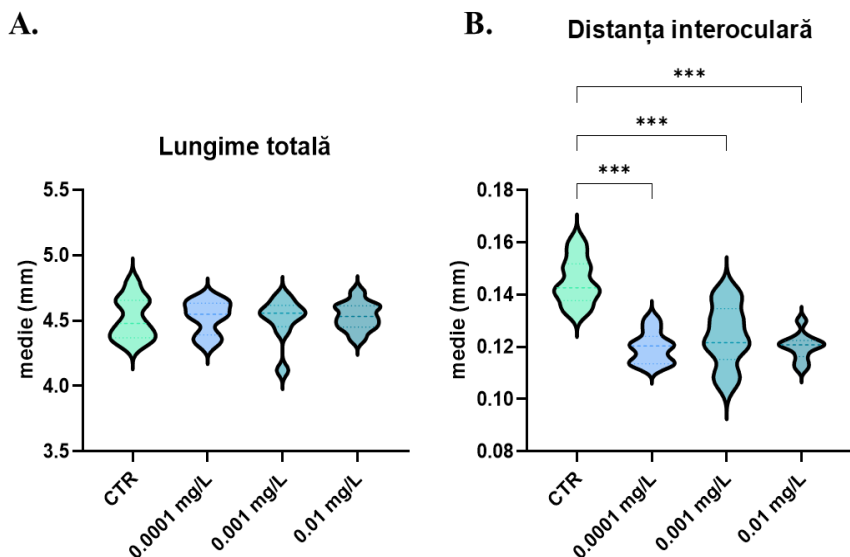


Figura III.47 - Reprezentarea grafică a mediilor grupurilor testate pentru A. Lungime totală, B. Distanța interoculară a embrionilor expuși la PLA, unde * reprezintă semnificația statistică, pentru un $p < 0,05$, la testul uni-direcțional ANOVA

În cazul larvelor, concentrațiile de PLA nu au afectat lungimea totală (Figura III.48 A), cu toate că, în cazul distanței interoculare, cea mai mare concentrație utilizată a prezentat valori semnificativ mai mici ($0,1105 \pm 0,07$ mm) decât grupul control ($0,1193 \pm 0,006$ mm; Figura III.48 B).

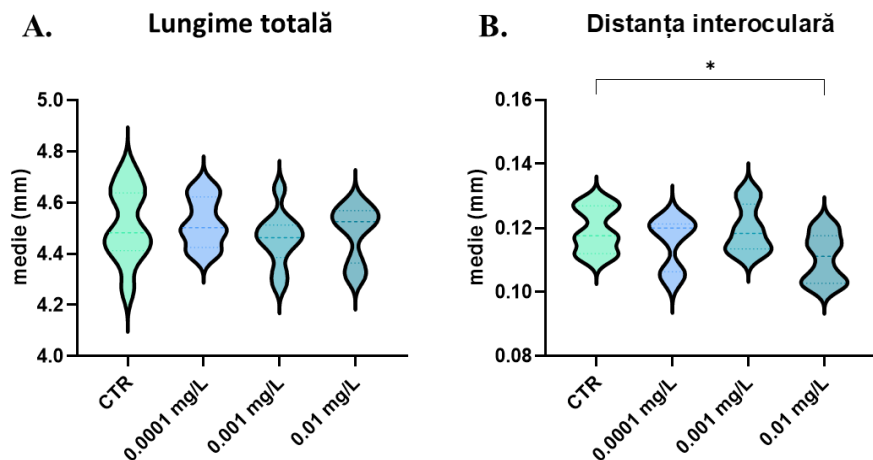


Figura III.48 Reprezentarea grafică a mediilor grupurilor testate pentru A. Lungime totală, B. Distanța interoculară a larvelor expuse la PLA, unde * reprezintă semnificația statistică, pentru un $p < 0,05$, la testul uni-direcțional ANOVA

CAPITOLUL 4 - IMPLICAȚIILE TOXICOLOGICE ALE POLIPROPILENEI ÎN RELAȚIE CU SCHIZOFRENIA

4.1. Materiale și metode de lucru

4.1.1.1. Administrarea substanțelor de testare

Pentru expunerea la microplastice, s-au utilizat fibre de polipropilenă cu dimensiuni mai mici de 2 mm, unul din cei mai frecvent identificați polimeri, în natură și în țesuturile umane (Amato-Lourenço et al., 2021; Ragusa et al., 2021, 2022), dar și în laptele praf pentru nou-născuți (Zhang et al., 2023). Expunerea la polipropilenă a fost realizată în mod dietetic, împreună cu mâncarea pentru o perioadă de 7 zile, iar concentrația de plastic a fost calculată ca 2 mg/L, adăugată la cantitatea de hrană necesară în funcție de greutatea peștilor (4% din greutatea acestora), conform studiului realizat de Avdesh et al., 2012a.

Modelarea schizofreniei prin administrarea de ketamină s-a realizat cronic, timp de 5 zile consecutiv. Contrar rezultatelor prezentate de literatura de specialitate, ce prezintă faptul că o concentrație de 0,8% este are efect anesteziec și o concentrație de 0,2% inducând simptomele pozitive asemănătoare schizofreniei (Carruthers et al., 2010), experimentele preliminare au constatat că o concentrație de 0,2% are un efect anesteziec puternic pentru peștii zebră; prin urmare, o concentrație de 0,1% a fost utilizată pentru acest experiment. La momentul administrării, peștii au fost plasați individual în acvarii mici, cu un volum de 200 mL, în soluție de ketamină 0,1% timp de 5 minute, ulterior reîntorși în acvariul inițial cu apă curată.

Modelarea schizofreniei prin administrarea de metionină s-a realizat în concordanță cu studiile din literatura de specialitate (Ved et al., 2023; L. Wang et al., 2016), pentru a evidenția cele mai substanțiale modificări comportamentale asociate cu tulburările negative și cognitive ale schizofreniei. Astfel o concentrație de 6,0 mM de metionină (Sigma-Aldrich, 98%, MM=149,21 g/mol) a fost utilizată pentru expunerea cronică a peștilor, timp de 7 zile consecutiv și permanent în apa acvariilor gazdă. Soluția a fost preparată *de novo* cu apă dechlorinată și apa de acvariu a fost înlocuită zilnic.

În ceea ce privește administrările în mixturi, grupurile corespunzătoare au fost expuse mai întâi la metionină 48 h înainte de a introduce ketamina, așa cum s-a descris anterior. În schimb, pentru grupurile MP, acestea au fost expuse atât la metionină, cât și la MP cu 48 h înainte de ketamină.

4.1.2. Analiza comportamentală

Răspunsul comportamental a fost analizat după finalizarea tratamentelor fiecărui grup în parte, cu ajutorul software-ului video EthoVisionXT 14 (Noldus Information Technology, Țările de Jos). Pentru a observa efectele, au fost utilizate două teste comportamentale și anume Testul acvariului nou (Săvucă et al., 2022) și o nouă abordare a unui test de memorie bazat pe lumini ambientale și recompense (Curpan et al., 2024).

4.2. Rezultate

4.2.2. Stabilirea nivelului de anxietate

Distanța totală parcursă în cazul tratamentelor singulare este semnificativ mai mică decât grupul control doar în cazul administrării de MP. În cazul expunerii concomitente cu microplastice distanța totală parcursă pentru modelele cu K (Figura IV.3 A) și M (Figura IV.3 B) nu a fost afectată.

Grupul ce a primit toate cele 3 tratamente MP+K+M, prezintă scăderi semnificative ale distanței parcurse față de toate celelalte grupuri experimentale. (Figura IV.3 C).

În ceea ce privește timpul de inactivitate, creșteri semnificative comparativ cu lotul control au fost evidențiate la administrarea de K (Figura IV.3 D), în cazul co-administrării de MP+M (Figura IV.3 E) și de MP+M+K (Figura IV.3 F),

Un alt parametru influențat de expunerea la microplastic a fost cazul rotirilor în sens orar, un parametru de toxicitate, și anume în cazul modelării cu M, unde grupul MP+M a înregistrat o scădere semnificativă față de MP (Figura IV.3 H).

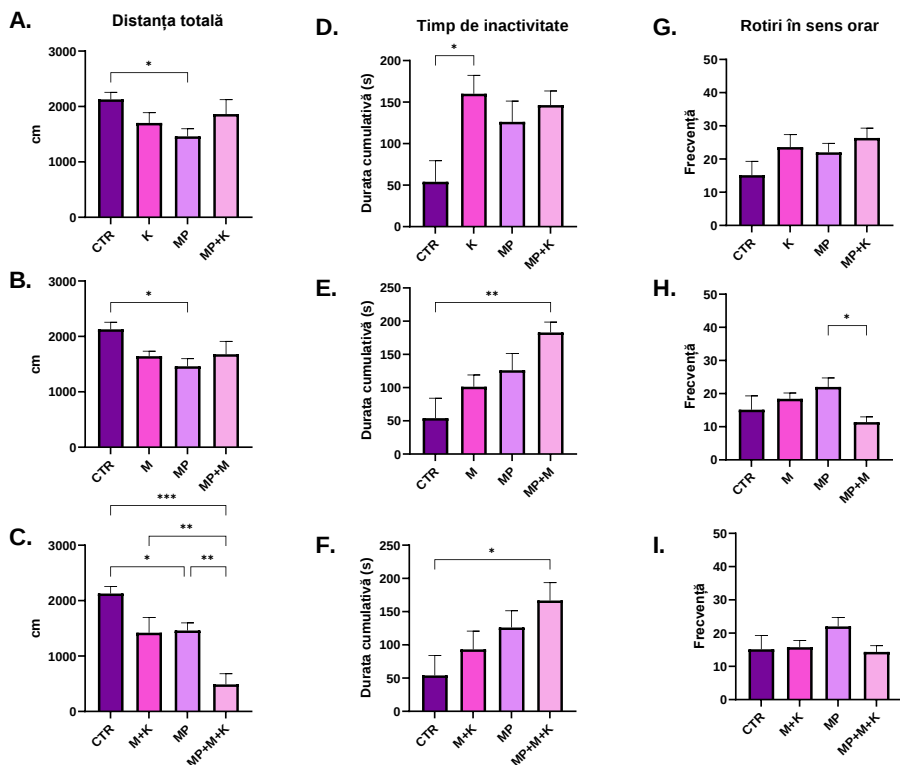


Figura IV.315 - Reprezentarea grafică a parametrilor distanța totală parcursă (A, B,C); timpul de inactivitate (D, E, F) și rotirile în sens orar (G, H, I) pentru fiecare model în parte, unde * reprezintă semnificația statistică, pentru un $p < 0,05$, la testul uni-direcțional ANOVA. Datele sunt exprimate ca medie $\pm$ SEM

4.2.3. Evaluarea memoriei și a capacității cognitive

În cazul frecvenței intrării în brațe poate fi observată influența fiecărui tip de tratament asupra memoriei, grupul control fiind singurul cu diferențe statistice între cele două frecvențe, principal fiind brațul roșu, evidențiind astfel capacitatea de memorare (Figura IV.7 A).

În ceea ce privește prima alegere (%), grupul de MP a ales brațul roșu mai mult decât grupul de control, iar cel mai mic procent referitor la prima alegere de roșu a fost în grupul K. O influență pozitivă asupra primei alegeri în cazul combinațiilor a existat doar pentru grupul de MP+K, în cazul grupurilor MP+M și MP+M+K, influența fiind una negativă (Figura IV.7 B).

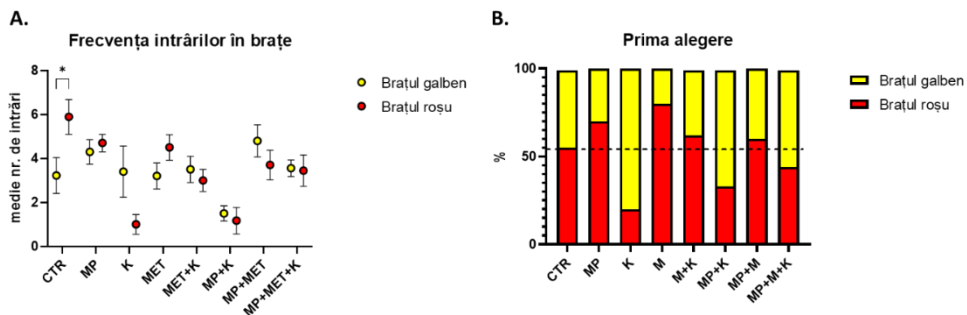


Figura IV.7 - Reprezentarea grafică a frecvenței intrării în brațul roșu (A) și procentul primei alegeri făcute (B) în cazul testului de memorie, unde * reprezintă semnificația statistică, pentru un $p < 0,05$, la testul bi-direcțional ANOVA, Datele sunt exprimate ca medie $\pm$ SEM

4.2.4. Evaluarea markerilor biochimici ai stresului oxidativ

În urma analizelor biochimice efectuate, efecte vizibile și semnificative au fost evidențiate în cazul tuturor markerilor analizați. Punctual, evoluția markerilor stresului oxidativ analizați comparativ cu grupul control, anume SOD, GPx și MDA este prezentată în Tabelul IV-2.

Tabel IV 2 - Evoluția markerilor SO comparativ cu grupul control în cazul tratamentelor

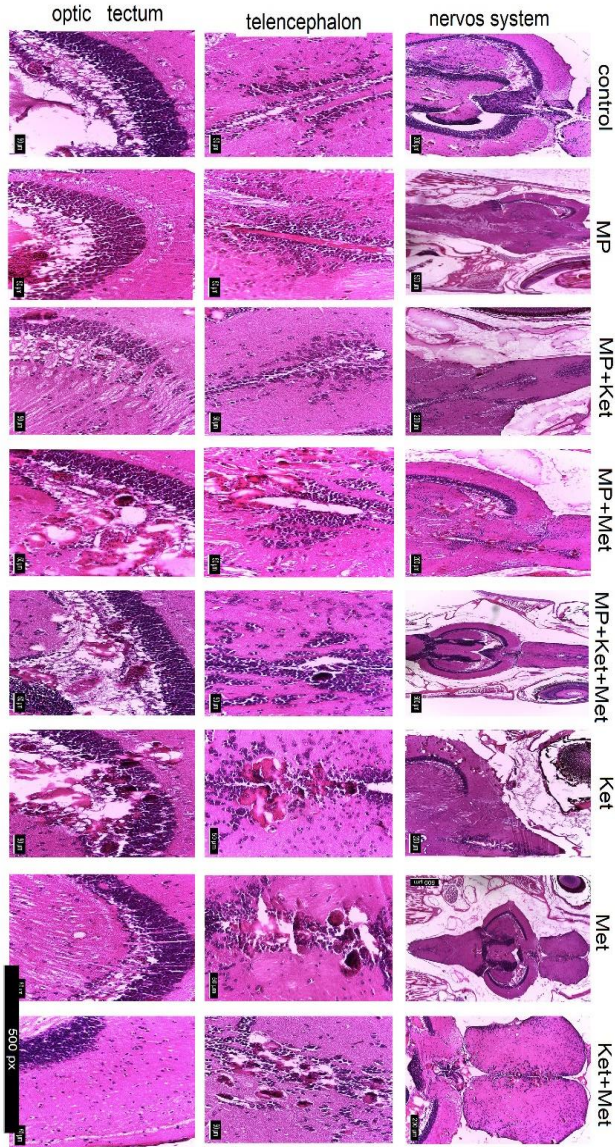
	SOD	MDA	GPx
MP	↓	↑	-
K	↑	↑	↑
M	↑	↑	↑
M+K	↑	↑	↑
MP+K	↓	↑	↓
MP+M	-	↑	↑
MP+M+K	-	-	↑

4.2.5. Evaluarea histologică

În urma analizelor histologice, cu precădere referindu-ne la sistemul nervos, telencefal și tectum optic s-au evidențiat următoarele aspecte de natură histologică: în cazul grupului control se observă o arhitectură normală a sistemului nervos și a tectumului optic. În urma expunerii la MP în telencefal, precum și în tectumul optic se pot observa mici zone de necroză sau capilare sanguine

ectaziate. La grupurile expuse la K, M si MP+M, M+K se observă atât în tectumul optic cât și în telencefal leziuni de necroză mai accentuate, capilare ectaziate cu conținut euzinofil intens și edem. La loturile MP+K, MP+M+K leziunile sunt mai diminuate comparativ cu celelalte loturi experimentale. Imagini reprezentative ale acestor leziuni provocate de cele opt tratamente sunt prezentate în Figura IV.9.

Figura IV.9 - Aspecte histologice de la nivelul sistemului nervos, telencefalului si tectumului optic la pestii zebră expusi la cele opt tratamente



CONCLUZII GENERALE

În baza tuturor rezultatelor prezentate pot fi trase mai multe concluzii printre care faptul că prezența microplasticelor a fost demonstrată de-a lungul întregii coaste litorale românești investigate. Cele mai mari abundențe de microplastic au fost identificate în sudul coastei litorale, anume în stațiunea Venus, urmată de cel mai nordic punct al coastei cercetate, anume stațiunea Cap Midia. Cea mai frecventă formă identificată a fost cea de fibră, cu mărimi mai mari de 1000 μm , în special de culoare albastră. De altfel, în partea de nord a coastei, pe locul doi sunt microplasticele de dimensiuni medii, în timp ce în partea de sud, microplasticele mici. O posibilă cauză ar putea fi degradarea microplasticelor de la nord la sud sub influența curenților marini și a valurilor. Categoria actuală de risc, luând drept referință indicele PLI este I. Doar un singur punct de prelevare a depășit un $\text{PLI} > 10$, și anume: stațiunea Venus, urmată de stațiunea Cap Midia. La polul opus, cele mai mici valori PLI au fost înregistrate în stațiunile Mangalia, Cap Aurora și Jupiter. În acest sens, 95% dintre stațiunile litorale românești prezintă un risc minim de poluare cu microplastice, ceea ce nu înseamnă că acest indicator ar putea fi neglijat în viitorul apropiat, cu atât mai mult dacă luăm în considerare faptul că niciuna dintre valorile PLI-urilor nu a fost mai mică de 5. Cea mai mică valoare pentru PEC, dar și pentru RCR, la momentul actual, este pentru stațiunea Mamaia Cazino, cea mai mare fiind pentru Cap Midia. Aceste două stațiuni își păstrează locul în clasament și în prognozele pentru următorii ani. Dacă ne referim la indicele RCR, în prezent, nicio stație de prelevare nu prezintă valori $\text{RCR} < 1$. Astfel, 75% din siturile analizate prezintă valori RCR între 1 și 10, evidențiind un risc minim de poluare, deoarece concentrațiile de poluanți din mediu depășesc limita de siguranță stabilită de PNEC. În plus, 25% dintre siturile analizate prezintă valori ale $\text{RCR} > 10$, evidențiind un grad moderat de risc ecologic, cu creșteri așteptate în următorii ani.

Studii viitoare în acest sens și monitorizarea continuă sunt necesare și esențiale, concomitent cu luarea de măsuri specifice de ameliorare a efectelor acestui tip de poluare, pentru a încetini procesul de creștere a riscului în perioada următoare. Prin urmare, acest studiu reprezintă o avertizare precoce referitoare la riscul la care zona litorală a României este expusă pentru următoarele decade, consolidarea legislației de mediu cu privire la poluarea cu materiale plastice fiind fundamentală în ceea ce privește normarea poluanților emergenți, precum și a altor micro-poluanți.

În ceea ce privește toxicitatea diferitelor materiale polimerice, rezultatele prezentate ne indică faptul că efectele sunt diferite de la un polimer la altul, cel mai probabil compuneri fiecărui tip de polimer reacționând diferit, fie că vorbim la nivel comportamental, fie la nivel biochimic. Efectele nu sunt dependente doar de materialul polimeric, ci și de dozele la care se face expunerea, aceste efecte nefiind întotdeauna direct proporționale cu dozele de tratament administrate. În urma analizei rezultatelor prezentate se concluzionează faptul că efectele materialelor polimerice sunt dependente de stadiul de viață al peștilor, dar și de ordinul de mărime al polimerilor, fiecare tip și dimensiune de polimer prezentând un mecanism de acțiune unic. Probabil, unul din cele mai importante aspecte, în contrast cu așteptările, este faptul că, indiferent de cât de mică este concentrația de expunere există efecte vizibile în special la nivel morfometric. Polipropilena, unul dintre cele mai utilizate materiale plastice, s-a dovedit a fi extrem de toxică în toate stadiile de dezvoltare ale peștilor zebură, atât la concentrații mari, cât și la concentrații mici. Expunerea peștilor zebură adulți la acest compus a generat tipare comportamentale asemănătoare efectelor substanțelor psihoactive, dar și modelelor animale de ADHD, descrise de literatură. Bioplastul (acidul polilactic) s-a dovedit la fel de toxic precum materialele polimerice non-biodegradabile, îndeosebi la concentrații mici de expunere; cu acțiune în special în spectrul morfometric a structurii cranio-faciale, ce este strâns legată de activitatea și dezvoltarea neuronală și hormonală, evidențiind totodată, și capacitatea lui de a penetra membrana corionară a embrionilor în timpul expunerii, fapt mult mai evident la acest tip de polimer comparativ cu cele convenționale. Polimetil-metacrilatul (PMMA), un compus polimeric utilizat îndeosebi în industria cosmetică, și-a demonstrat caracterul toxic chiar și la o dimensiune mică a particulei, dar și la o concentrație deosebit de redusă, acțiunea acestuia fiind în mare parte în spectrul morfometric și cel cardiac. Polietilena, un alt material plastic cu o scară largă de întrebuințări, prezintă un mecanism de toxicitate mai insidios, unde efectele ce induc un comportament anxios pot fi ușor confundate cu efecte benefice, precum creșterea sociabilității. De altfel, tiparele comportamentale prezintă asemănări cu cele ale substanțelor halucinogene, descrise de literatura de specialitate pe același model animal.

Și în acest caz, aprofundarea cunoștințelor este absolut esențială pentru înțelegerea pe deplin a mecanismelor de acțiune, în special la nivelul hormonilor, care par că ar fi punctul cheie de acțiune a expunerii la materialele polimerice, în

special pe termen lung, generându-se astfel efectele comportamentale sau de neurotoxicitate.

În ceea ce privește influența polipropilenei în relație cu schizofrenia, rezultatele prezintă clar faptul că există efecte și influențe datorate expunerii în cazul a trei modele animale diferite de schizofrenie, în special la nivel biochimic, ceea ce crește și mai mult îngrijorarea. Polipropilena tinde să aibă aceleași efecte cu ketamina, în special în cazul evaluării anxietății, provocând îngrijorări cu privire la expunerea îndelungată la acest poluant și posibila sa capacitate de a influența simptomele specifice schizofreniei, cu toate că rezultatele evidențiază un mecanism cu efect dependent de modelul ales și de testul efectuat. În unele situații, cum ar fi capacitatea cognitivă, în cazul modelării cu ketamină, administrarea de microplastice a adus un beneficiu. În cazul stabilirii nivelului de anxietate pentru modelarea cu metionină, administrarea de microplastice a avut un efect anxiolitic asupra peștilor, ușor benefic, dar memoria a fost mult mai afectată după această administrare.

Rezultatele anterior prezentate indică fără îndoială faptul că polipropilena prezintă efecte asupra modelelor de schizofrenie, atât toxice, cât și benefice. Cercetări ulterioare sunt esențiale, concentrate în special pe partea moleculară a acestei toxicități, asociate cu testarea mai multor tipuri de polimeri, administrați individual sau în mixturi.

Limitările studiilor:

Ca în cazul oricărei cercetări științifice, mai ales în cele interdisciplinare există anumite limitări.

Referitor la evaluarea cantitativă și calitativă a microplasticelor în zona costieră a României, un aspect important de remarcat este prezența anumitor limitări metodologice ce pot ridica dificultăți atunci când se compară studiile, deoarece în prezent nu există un protocol experimental standardizat pentru extragerea microplasticelor, lucru de asemenea, evidențiat în literatura de specialitate. Chiar și așa, am ales metoda cea mai des întâlnită, prietenoasă cu mediul, datorită reactivilor utilizați, și non-distructivă. Mai mult decât atât, datorită noutății subiectului în domeniu, la momentul actual nu există metodologie standard de evaluare a riscului asociat microplasticelor din mediu. Am ales să evaluăm doi indici ce au fost deja utilizați în literatura de specialitate și au rămas recomandați.

Cu privire la studiile realizate pe modele animale este esențial de menționat faptul că peștele zebură este un model standardizat și validat pentru astfel de cercetări. Cu toate că utilizarea unui număr redus de animale, conform recomandărilor oferite de principiul 3R ce stă la baza eticii în cercetare cu modele animale, poate fi considerată ca atare o limitare, am reușit finalizarea experimentelor și cu grupuri reduse numeric. O altă limitare este dată de modelele animale în sine, deoarece fiind ființe vii, rezultatele trebuie tratate cu atenție și precauție sporită, indiferent de tehnologia utilizată în cadrul studiului. Animalele din același lot reacționează diferit și pentru a reduce această limitare, în cadrul analizelor statistice a fost utilizat un calcul de excludere a valorilor aberante din grup. O altă limitare, preponderent întâlnită în cercetare, constă în fondurile necesare pentru realizarea experimentelor destul de costisitoare, datorită necesității achiziției de diferiți reactivi, materiale, software-uri specializate etc. Prin colaborările realizate pe parcursul celor trei ani de doctorat am reușit să gestionez eficient această limitare.

Indisponibilitatea aparaturii, condițiilor și experienței necesare lucrului cu peștii zebură în primele stadii de dezvoltare, mai precis embrioni și larve, pentru a completa tabloul efectelor toxice ale polimerilor a reprezentat de altfel, o limitare. Prin accesarea unei burse Erasmus⁺ în Aveiro, Portugalia, mi s-au oferit instrumentele necesare pentru a aprofunda studiul și a-l aduce la un nivel superior, și am depășit această limitare.

Direcții de viitor:

Îmi propun să aprofundez direcțiile de cercetare inițiate în cadrul tezei. În ceea ce privește identificarea micro/nanoplasticelor voi continua cercetarea pe probe de apă, alge și bivalve.

În ceea ce privește evaluarea toxicității materialelor polimerice îmi doresc să aprofundez mai mult aspectele prezentate, în special pe partea de biologie moleculară, pentru a înțelege pe deplin mecanismul de toxicitate și ținta specifică a acestuia, concomitent cu evaluarea toxicității și în cazul altor patologii de natură neuro-psihiatrică și nu numai. O nouă direcție de cercetare în viitor va fi renunțarea pe cât posibil la modelele animale și concentrarea pe studii *in vitro* pe culturi celulare umane.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

Alimba, C. G., & Faggio, C. (2019). Microplastics in the marine environment: Current trends in environmental pollution and mechanisms of toxicological profile. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 68, 61–74.

An, X., Li, W., Lan, J., & Adnan, M. (2022). Preliminary Study on the Distribution, Source, and Ecological Risk of Typical Microplastics in Karst Groundwater in Guizhou Province, China. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(22), 14751.

Auten, R. L., & Davis, J. M. (2009). Oxygen toxicity and Reactive Oxygen Species: The Devil is in the details. *Pediatric Research*, 66(2), 121–127.

Balmus, I. M., Ciobica, A., Antioch, I., Dobrin, R., & Timofte, D. (2016). Oxidative Stress implications in the affective disorders: main biomarkers, animal models relevance, genetic perspectives, and antioxidant approaches. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016.

Bergmann, M., Mützel, S., Primpke, S., Tekman, M. B., Trachsel, J., & Gerdt, G. (2019). White and wonderful? Microplastics prevail in snow from the Alps to the Arctic. *Science Advances*, 5(8).

Carruthers, H. R., Morris, J., Tarrier, N., & Whorwell, P. J. (2010). The Manchester Color Wheel: development of a novel way of identifying color choice and its validation in healthy, anxious and depressed individuals. *BMC Medical Research Methodology*, 10(1), 12.

Curpan, A.-S., **Savuca, A.**, & Ciobîcă, A. (2023). Behavioural analysis of potential new approach in modelling Schizophrenia using zebrafish. *Current Trends in Natural Sciences*, 12(24), 06-16

Curpan, A.-S., **Savuca, A.**, Hritcu, L. D., Solcan, C., Nicoara, M. N., Luca, A.-C., & Ciobica, A.-S. (2024). A new approach to explore the correlation between declarative memory and anxiety in animal models of schizophrenia and microplastic pollution. *Behavioural Brain Research*, 458, 114742.

Daly, R. A., Manger, G. E., & Clark, S. P. (1966). *Section 4: Density of Rocks* (pp. 19–26).

Everaert, G., Van Cauwenberghe, L., De Rijcke, M., Koelmans, A. A., Mees, J., Vandegehuchte, M., & Janssen, C. R. (2018). Risk assessment of microplastics in the ocean: Modelling approach and first conclusions. *Environmental Pollution*, 242, 1930–1938.

Jablensky, A. (2010). The diagnostic concept of schizophrenia: its history, evolution, and future prospects. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 12(3), 271–287.

Kalueff, A. V., Stewart, A. M., & Gerlai, R. (2014). Zebrafish as an emerging model for studying complex brain disorders. *Trends in Pharmacological Sciences*, 35(2), 63–75.

Lechner, A., Keckeis, H., Lumesberger-Loisl, F., Zens, B., Krusch, R., Tritthart, M., Glas, M., & Schludermann, E. (2014). The Danube so colourful: A potpourri of plastic litter outnumbers fish larvae in Europe's second largest river. *Environmental Pollution*, 188, 177–181.

Micheli, F., Halpern, B. S., Walbridge, S., Ciriaco, S., Ferretti, F., Frascchetti, S., Lewison, R., Nykjaer, L., & Rosenberg, A. A. (2013). Cumulative human impacts on Mediterranean and Black Sea Marine Ecosystems: Assessing current pressures and opportunities. *PLoS ONE*, 8(12), e79889.

Pedersen, C. B., Raaschou-Nielsen, O., Hertel, O., & Mortensen, P. B. (2004). Air pollution from traffic and schizophrenia risk. *Schizophrenia Research*, 66(1), 83–85.

Perreard, S., Li, F., Boucher, J., Gaboury, A., Voirin, N., Gallato Martina, & Puppi, R. (2023). Plastic Overshoot Day – Report 2023. In *EA – Environmental Action, Lausanne, Switzerland*.

Piehl, S., Leibner, A., Löder, M. G. J., Dris, R., Bogner, C., & Laforsch, C. (2018). Identification and quantification of macro- and microplastics on an agricultural farmland. *Scientific Reports*, 8(1), 17950.

Pizzino, G., Irrera, N., Cucinotta, M., Pallio, G., Mannino, F., Arcoraci, V., Squadrito, F., Altavilla, D., & Bitto, A. (2017). Oxidative Stress: harms and benefits for human health. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017.

Polderman, T. J. C., Benyamin, B., de Leeuw, C. A., Sullivan, P. F., van Bochoven, A., Visscher, P. M., & Posthuma, D. (2015). Meta-analysis of the heritability of human traits based on fifty years of twin studies. *Nature Genetics* 2015 47:7, 47(7), 702–709.

Ren, Z., Gui, X., Xu, X., Zhao, L., Qiu, H., & Cao, X. (2021). Microplastics in the soil-groundwater environment: Aging, migration, and co-transport of contaminants – A critical review. *Journal of Hazardous Materials*, 419, 126455.

Saliu, F., Veronelli, M., Raguso, C., Barana, D., Galli, P., & Lasagni, M. (2021). The release process of microfibers: from surgical face masks into the marine environment. *Environmental Advances*, 4, 100042.

Savuca, A., Chelaru, I.-A., Balmus, I.-M., Curpan, A.-S., Nicoara, M. N., & Ciobica, A. S. (2024). Toxicological response of zebrafish exposed to cocktails of polymeric materials and Valproic Acid. *Sustainability*, 16(5), 2057.

Savuca, A., Curpan, A. S., Nicoara, M. N., & Ciobica, A. S. (2023b). Possible relationship between environmental pollutants/microplastics and schizophrenia etiology and progression. *Proceedings of the Romanian Academy - Series B*, 25(1), 37–42.

Săvucă, A., Curpăn, A. Ștefania, Hrițcu, L. D., Ciobîcă, A. S., Plăvan, G., & Nicoară, M. N. (2022). Preliminary study on the behavioral response of zebrafish to the presence of methionine and polypropylene residues in water. *Annals of the "Dunarea de Jos" University of Galati Fascicle II Mathematics Physics Theoretical Mechanics*, 45(2), 89–96.

Savuca, A., Nicoara, M. N., & Faggio, C. (2022). Comprehensive review regarding the profile of the microplastic pollution in the coastal area of the Black Sea. *Sustainability*, 14(21), 14376.

Savuca, A., Nicoara, M. N., Ciobica, A., Gorgan, D. L., Ureche, D., & Balmus, I. M. (2023a). Current aspects on the plastic nano- and microparticles toxicity in Zebrafish—Focus on the correlation between oxidative stress responses and neurodevelopment. *Animals*, 13(11),

Savuca, A., Strungaru S. A., Nicoara, M., & Plavan, G. (2017). A study regarding the pollution of sediments from Romanian Black Sea coast with microplastic

fibers. *Analele Științifice Ale Universității „Alexandru Ioan Cuza” Din Iași, s. Biologie Animală*, 63, 85–90.

Schirinzì, G. F., Pérez-Pomeda, I., Sanchís, J., Rossini, C., Farré, M., & Barceló, D. (2017). Cytotoxic effects of commonly used nanomaterials and microplastics on cerebral and epithelial human cells. *Environmental Research*, 159, 579–587.

Strungaru, S.-A., Jijie, R., Nicoara, M., Plavan, G., & Faggio, C. (2019). Micro-(nano) plastics in freshwater ecosystems: Abundance, toxicological impact and quantification methodology. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 110, 116–128.

Tomlinson, D. L., Wilson, J. G., Harris, C. R., & Jeffrey, D. W. (1980). Problems in the assessment of heavy-metal levels in estuaries and the formation of a pollution index. *Helgoländer Meeresuntersuchungen*, 33(1–4), 566–575.

Ved, H., Doshi, G., Bhatia, N., & Kale, P. (2023). Metoclopramide as a Potential antipsychotic against long-term Methionine exposure in Zebrafish. *Zebrafish*, 20(1), 19–27.

Venâncio, C., **Savuca, A.**, Oliveira, M., Martins, M. A., & Lopes, I. (2021). Polymethylmethacrylate nanoplastics effects on the freshwater cnidarian *Hydra viridissima*. *Journal of Hazardous Materials*, 402.

Xu, P., Peng, G., Su, L., Gao, Y., Gao, L., & Li, D. (2018). Microplastic risk assessment in surface waters: A case study in the Changjiang Estuary, China. *Marine Pollution Bulletin*, 133, 647–654.

ANEXA 1 - Diseminarea rezultatelor

Lista lucrărilor publicate ce conțin rezultate ale tezei de doctorat

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

1. **A. Savuca**, I.-A. Chelaru, I.-M. Balmus, A.-S. Curpan, M.N. Nicoara, A.S. Ciobica. Toxicological Response of Zebrafish Exposed to Cocktails of Polymeric Materials and Valproic Acid. *Sustainability*. 2024; 16(5):2057. <https://doi.org/10.3390/su16052057> (F.I. = 3,9 (Q2); A.I.S. = 0,526 (Q3); S.J.R. = 0,672)
2. A.S. Curpan, **A. Savuca***, L.D. Hritcu, C. Solcan, M.N. Nicoara, A.C. Luca, A.S. Ciobica - A new approach to explore the correlation between declarative memory and anxiety in animal models of schizophrenia and microplastic pollution, *Behavioural Brain Research*, 2024, 458: 114742. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2023.114742> (F.I. = 2,7 (Q2); A.I.S. = 0,704 (Q3); S.J.R. = 0,897)
3. **A. Savuca**, M.N. Nicoara, A. Ciobica, D.L. Gorgan, D. Ureche, I.M. Balmus - Current Aspects on the Plastic Nano- and Microparticles Toxicity in Zebrafish - Focus on the Correlation between Oxidative Stress Responses and Neurodevelopment. *Animals*. 2023; 13(11):1810. <https://doi.org/10.3390/ani13111810> (F.I. = 3 (Q1); A.I.S. = 0,498 (Q1); S.J.R. = 0,698)
4. **A. Savuca**, M.N. Nicoara, C. Faggio. Comprehensive Review regarding the Profile of the Microplastic Pollution in the Coastal Area of the Black Sea. *Sustainability*. 2022; 14(21):14376. <https://doi.org/10.3390/su142114376> (F.I. = 3,9 (Q2); A.I.S. = 0,526 (Q3); S.J.R. = 0,672)

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

1. A. Curpăn, **A. Săvucă***, A. Ciobîcă - Behavioural analysis of potential new approach in modelling Schizophrenia using zebrafish - *Current Trends in Natural Sciences*, 2023, 12(24). <https://doi.org/10.47068/ctns.2023.v12i24.001>
2. **A. Savuca**, I.A. Chelaru, A.S. Curpan, A.S. Ciobica, M.N. Nicoara - Dose dependent effects of two polymeric materials and similarities with certain drugs. *Current Trends in Natural Sciences*, 2023, 12(23), 266-273. <https://doi.org/10.47068/ctns.2023.v12i23.031>

3. **A. Savuca**, A. Curpan, M.N. Nicoara, A. Ciobica - Possible relationship between environmental pollutants/microplastics and schizophrenia etiology and progression - *Proceedings of the Romanian Academy - Series B*, 2023, 25(1), p. 37–42.
4. **A. Săvucă**, A. Ș. Curpăn, L. D. Hrițcu, A.S. Ciobîcă, G. Plăvan, M. N. Nicoară - Preliminary study on the behavioral response of zebrafish to the presence of methionine and polypropylene residues in water, *Annals Of "Dunarea De Jos" University Of Galati Mathematics, Physics, Theoretical Mechanics, Fascicle II*, 2022, No. 2, <https://doi.org/10.35219/ann-ugal-math-physics-mec.2022.2.08>

Lista lucrărilor susținute la conferințe internaționale și naționale

Participări la simpozioane și conferințe naționale

1. "Ecology and Protection of Ecosystems" (EPE) XIV Edition, 2023, Bacau, Romania, **A. Savucă**, M. N. Nicoară – "Preliminary data regarding microplastic contamination in the southern area of the Romanian Black Sea coast", 2-4.11.2023, <https://epe.ub.ro/PDF/P2023N.pdf?v=2>
2. CONFERINȚA ȘTIINȚIFICĂ DE PRIMĂVARĂ a AOSR, 2023, BUCUREȘTI, Romania – **A. Savuca**, A.S. Ciobica, M.N. Nicoara -"Evaluarea comportamentului social în cazul intoxicației controlate cu două tipuri de polimeri la peștele zăbră (*Danio rerio*)"- 19-20 Mai 2023, <https://www.aosr.ro/conferinta-nationala-stiintifica-editia-de-primavara-transformarea-digitala-in-stiinte/>
3. SIMPOZIONUL NAȚIONAL STUDENȚESC "MIHAI DAVID" 2022 — EDIȚIA A XI-A – **Săvucă A.** – "Profilul poluării cu microplastice la Marea Neagră" – 04 Martie 2022, <https://enviromatica.ro/smd-martie-2022/>
4. SIMPOZIONUL NAȚIONAL STUDENȚESC "MIHAI DAVID" 2022 — EDIȚIA A XI-A – Maxim R.G., Rusu A., **Săvucă A.**, Ureche D. – "Ingestion of polystyrene-like microplastics can have harmful effects on fish growth, development, and reproduction" – 04 Martie 2022, <https://enviromatica.ro/smd-martie-2022/>
5. Workshop "Abordări moderne ale feedbackului între procese de mediu și schimbările climatice" - Universitatea Dunarea de Jos din Galați – **A. Săvucă**, A.Ș. Curpăn, L.D. Hrițcu, A.S. Ciobîcă, G. Plăvan, M. N. Nicoară- „Preliminary study on the behavioural response of zebrafish to the presence of methionine and polypropylene residues in water” - 6-9 iulie 2022, <https://www.rexdan.ugal.ro/index.php/ro/anunturi-si-evenimente/conferinte/workshop-abordari-moderne-ale-feedbackului-intre-procese-de-mediu-si-schimbarile-climatice/acasa-5>

6. Prezentare masa rotunda Sesiunea Științifică a Facultății de biologie – 29 octombrie 2021 – ”*Plasticul – Poluant emergent la Marea Neagră*”, <http://cercetare.bio.uaic.ro/ssbio/program.html>

Participări la simpozioane și conferințe internaționale

1. SETAC Europe 34th Annual Meeting, 2024, **A. Savuca**, C. Venâncio, I.-A. Chelaru, M. Almeida, M. Oliveira, M.N. Nicoara, I. Lopes - *Eye morphology as a relevant endpoint to assess the effects of different nanosized polymethylmethacrylate particles on zebrafish early life stages*, 5-9 mai 2024, Seville, Spania.
<https://setac.confex.com/setac/europe2024/meetingapp.cgi/Person/38398>
2. International Scientific Symposium ”CURRENT TRENDS IN NATURAL SCIENCES”, Pitesti, Romania – **A. Savuca**, I.-A. Chelaru, A.-S. Curpan, A.S. Ciobica, M.N. Nicoara -” *Dose dependent effects of two polymeric materials and some similarities with different types of drugs*” - 18 - 20 Mai 2023, <https://www.natsci.upit.ro/international-symposium/>
3. International Scientific Symposium ”CURRENT TRENDS IN NATURAL SCIENCES”, Pitesti, Romania – A.-S. Curpan, **A. Savuca**, A.S. Ciobica - ”*Behavioral analysis of potential new approach in modelling schizophrenia using zebrafish*” - 18 - 20 Mai 2023, <https://www.natsci.upit.ro/international-symposium/>

Participări la simpozioane și conferințe internaționale în afara subiectului tezei de doctorat dar în același domeniu de cercetare

1. SETAC Europe 34th Annual Meeting, 2024, I.-A. Chelaru, C. Venâncio, **A. Savuca**, M. Oliveira, M. Almeida, M.N. Nicoara, Isabel Lopes - *Joint effects of ketoprofen (Kp) and polypropylene (PP) nanoplastics on the morphology and physiology of zebrafish early life stages*, 5-9 mai 2024, Seville, Spania.
<https://setac.confex.com/setac/europe2024/meetingapp.cgi/Person/38399>
2. SETAC Europe 34th Annual Meeting, 2024, C. Venâncio, **A. Savuca**, A. Chelaru, J.P. da Costa, T.R Santos, I. Lopes- *Effects of Differently Aged Tire-Wear Particle Suspensions on Danio rerio*, 5-9 mai 2024, Seville, Spania.
<https://setac.confex.com/setac/europe2024/meetingapp.cgi/Person/3839>
3. 8th International ICONTECH CONGRESS on Innovative Surveys in Positive Sciences, 2024, *Preliminary data regarding some behavioural effects of acetic acid administration in a zebrafish animal model*, I.M. Balmus, R.M. Lefter, M.A. Robea, F. Lungu, **A. Savuca**, A. Ciobica, L. Gorgan, M.N. Nicoara, 14-16 martie 2024, Azerbaijan Cooperation University, Baku

4. Euro-Aliment 2023 –” Insights of Future Foods - from Concepts and Challenges to Technological Innovations”, M. Ene, R. Strungaru-Jijie, **A. Săvucă***, A. Chelaru, G. Plavan, M.N. Nicoară, A. Ciobică, *Preliminary results on the protective role of probiotics administration in case of zinc chloride intoxication in zebrafish behaviour*, Galati, 19-20 Octombrie 2023.
5. 9th International Electronic Conference on Medicinal Chemistry, 2023, C. Venâncio, A. Chelaru, **A. Savuca**, M. Nicoara, I. Lopes – “*Environmental Impact of Ketoprofen on Key Freshwater Species: Insights on intra and inter-species response variability*”, 01-30.11.2023, <https://sciforum.net/paper/view/15900> , <https://doi.org/10.3390/ECMC2023-15900>
6. 9th International Electronic Conference on Medicinal Chemistry, 2023, C. Venâncio, **A. Savuca**, A. Chelaru, J.P. da Costa, T.R. Santos, I. Lopes – “*Tire wear particles effects on the model species Danio rerio: influence of ageing*”, 01-30.11.2023, <https://sciforum.net/paper/view/15894>, <https://doi.org/10.3390/ECMC2023-15894>
7. International Scientific Symposium ”CURRENT TRENDS IN NATURAL SCIENCES”, Pitesti, Romania – I-A. Chelaru, **A. Savuca**, R. Jijie, A.S. Ciobica, M.N. Nicoara -” *Preliminary study on the behavioral response of zebrafish to the presence of ibuprofen and antiepileptic residues in water*” - 18 - 20 Mai 2023, <https://www.natsci.upit.ro/international-symposium/>
8. 6th Edition of the Integrated Management of Environmental Resources Conference, 2023, Suceava, Romania, I.-A. Chelaru, **A. Savucă**, A.S. Ciobică, D. Ureche, M.N. Nicoară – “*Co-exposure effects of polypropylene and ketoprofen treatments on zebrafish behavior*”, 23-24.11.2023, <http://silvic.usv.ro/imer2023/program.php>
9. International Conference on Environmental Engineering and Management (ICEEM), Iasi, Romania – **A. Savuca**, I.-A. Chelaru, D. Ureche, M. N. Nicoara, A. Ciobica - "*Behavioral studies on cumulative effects in acute intoxication with a cocktail of polypropylene and valproic acid, using the invasive species Percottus glenii*" - 13-19.09.2023, https://www.iceem.tuiasi.ro/wp-content/uploads/ICEEM12_Program-04.09.2023_f.pdf