



ПЛОВДИВСКИ УНИВЕРСИТЕТ
“ПАИСИЙ ХИЛЕНДАРСКИ”
БИОЛОГИЧЕСКИ ФАКУЛТЕТ
Катедра “Биология на развитието”



Елеонора Тенчева Ковачева

„ОЦЕНКА НА ЗАМЪРСЯВАНЕ НА ВОДНИ ЕКОСИСТЕМИ
С ПРИОРИТЕТНИ ОРГАНИЧНИ ЗАМЪРСИТЕЛИ ЧРЕЗ
ИЗПОЛЗВАНЕ НА МОРФОФУНКЦИОНАЛНИ
БИОМАРКЕРИ ПРИ *CYPRINUS CARPIO* (LINNAEUS 1785)“

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд
за придобиване на образователна и научна степен „доктор“

Област на висше образование: **4. Природни науки, математика и информатика**

Професионално направление: **4.3. Биологически науки**

Докторска програма: **Морфология**

Научен ръководител:
проф. д-р Еленка Стоилова Георгиева

Пловдив, 2024

Дисертационният труд съдържа 183 страници, 20 таблици и 34 фигури. Цитирани са 519 литературни източника, от които 10 на кирилица.

Експерименталната работа по дисертационния труд е проведена във вивариума на Биологически факултет, научната лаборатория по Ембриология и хистология към катедра „Биология на развитието“ и лабораторията по Биохимия към катедра „Биохимия и микробиология“ на Пловдивски университет „Паисий Хилендарски“.

Дисертационният труд е обсъден и предложен за защита на заседание на катедра „Биология на развитието“, Биологически факултет, ПУ „Паисий Хилендарски“, проведено на 12.02.2024 г. (Протокол № 388/12.02.2024 г.).

Защитата на дисертационния труд ще се състои на 17.05.2024 г. от 11 ч. в Биологически факултет, ПУ „Паисий Хилендарски“, ул. „Тодор Самодумов“ №2 на открито заседание на научното жури.

Материалите по защитата са на разположение на интересуващите се в Деканата на Биологически факултет, ПУ „Паисий Хилендарски“, ул. „Тодор Самодумов“ №2.

Научно жури:

Проф. дбн Мима Иванова Николова

Доц. д-р Атанас Кръстев Бочуков

Проф. дмн Пепя Косева Атанасова-Христчева, дм

Доц. д-р Цветелина Георгиева Бацалова

Доц. дбн Дилиян Георгиев Георгиев

Автор:

Елеонора Генчева Ковачева

Заглавие:

Оценка на замърсяване на водни екосистеми с приоритетни органични замърсители чрез използване на морфофункционални биомаркери при *Cyprinus carpio* (Linnaeus 1785)

УВОД

Глобалната употреба на пестициди, свързана с нарастващ риск от излагане на всички организми и околната среда, се е увеличила многократно през последните десетилетия (Tang et al., 2021; Zaller, 2020). Съвременното земеделие е силно зависимо от използването на пестициди, предимно за защита на културите и повишаване на добивите (Sharma et al., 2019; Sjerps et al., 2019; Rizzo et al., 2021; Syafrudin et al., 2021). Ползата от прилагането им е неоспорима, но от друга страна, налице са ясни доказателства, че широкото внасяне на пестицидни субстанции причинява необратими увреждания на екосистемите и техните обитатели, включително и хората (Богоева, 2014). Използването на пестициди причинява загуба на биоразнообразието и има значително въздействие върху водните екосистеми (Pérez-Parada et al., 2018; Sharma et al., 2019; de Souza et al., 2020). Всяко замърсяване на водните басейни засяга и организмите, живеещи в тях (Agrawal et al., 2010). В екотоксикологичните изследвания биомаркерите представляват полезни инструменти, използвани в мониторинга на водните екосистеми. Включването на комплексни биомаркери на различни нива на биологична организация е подходящ подход за откриване на реакции, предизвикани от замърсители (Souza-Bastos et al., 2017). Във водните екосистеми едни от често използваните органи за проследяване на комплексни биомаркери за екотоксикологична оценка са хрилете на рибите. Те са чувствителни към попаднали химикали във водната среда поради голяма им площ, влизаща в контакт с нея. Това ги прави ефикасни инструменти за биомониторинг на потенциалните въздействия на различни токсиканти. Друг често използван целеви орган е черният дроб на хидробионтите, тъй като излагането на въздействието на пестициди може да причини хистологични промени в органа, които представляват важни биомаркери за оценка на замърсяване на водни екосистеми (Yön et al., 2014). Бъбрекът на рибите също е често използван орган в екотоксикологичните изследвания. Функцията на този орган и установените изменения в хистоструктурата му под влияние на токсиканти, попаднали във водата, се свързват с нарушение в поддържането на хомеостазата (Iqbal et al., 2004). На тази база, провеждането на изследвания, свързани с установяване на морфологични и биохимични промени на клетъчно и тъканно ниво, могат да покажат състоянието на проучвания орган в резултат действието на определен замърсител на околната среда, а това да се отрази и на здравословното състояние на целия организъм (Sachi et al., 2021). Настоящите разпоредби, регулиращи употребата на пестициди, все още са фокусирани върху екологични оценки на риска за отделни активни съставки. Важна стъпка е изграждането на концептуален модел на състава на използваните препарати за растителна защита (ПРЗ), тяхната съдба във водната среда и потенциалът за токсичност към нецелеви организми (Scholz et al., 2012). В настоящия дисертационен труд са използвани пестициди от различни групи – инсектициди, хербициди и фунгициди – влизащи в състава на широко приложими в селскостопанската практика ПРЗ. Като се има предвид актуалността на проблема, изследвания в тази област са важни, както за водните екосистеми, така и за подобряване законодателството в национален и световен план.

I. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Целта на настоящото изследване е оценка на замърсяване на водни екосистеми с приоритетни органични замърсители чрез използване на морфофункционални биомаркери при обикновен шаран *Cyprinus carpio* (Linnaeus 1785).

За постигането на целта на настоящото изследване се поставиха следните задачи:

1. Провеждане на краткосрочен 96-часов тест за токсичност с пестицидите пиримифос-метил, пропамокарб хидрохлорид и 2,4-дихлорофеноксиоцетна киселина (2,4-D), включващ:

1.1. Адаптация на тестовите групи индивиди шаран (*Cyprinus carpio* L.).

1.2. Провеждане на 96-часова експозиция с приложени различни концентрации от пестицидите.

1.3. Вземане и обработка на материал от хриле, черен дроб и бъбрек на опитните групи шаран (*Cyprinus carpio* L.) за хистологично, хистохимично и биохимично изследване.

1.4. Хистопатологичен анализ на хриле, черен дроб и бъбрек от обикновен шаран (*Cyprinus carpio* L.) под действието на приложените концентрации пестициди.

1.5. Хистохимичен анализ на черен дроб от *Cyprinus carpio* L. под действието на опитните концентрации пестициди.

1.6. Биохимичен анализ на черен дроб от *Cyprinus carpio* L. под действието на тестовите концентрации пестициди.

1.7. Сравнителен анализ на настъпилите изменения под действие на опитните пестициди.

2. Оценка на настъпилите хистопатологични, хистохимични и биохимични изменения в целевите органи от обикновен шаран (*Cyprinus carpio* L.) под въздействие на приложените пестициди, и тяхното приложение като биомаркери на замърсяване на водни екосистеми с пестициди.

II. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

1. Материали

1.1. Характеристика на обикновен шаран (*Cyprinus carpio* L.) и приложените пестициди

Обект на настоящото изследване е обикновен шаран (*Cyprinus carpio* L.), който в световен мащаб притежава висока търговска стойност и се използва широко като биоиндикатор за токсичност във водна среда (Ahmad et al., 2015). Той обитава сладководни среди, особено езера и реки, рядко солена вода (Barus et al., 2001).

Използваните в проучването ПРЗ са Актелик 50 ЕК, Ривал и Аминопиелик, съответно с активни съставки пиримифос-метил, пропамокарб хидрохлорид и 2,4-D. *Пиримифос-метил* е органофосфорен инсектицид, който е отговорен за фосфорилирането на ацетилхолинестераза (AChE), регулираща хидролизата на ацетилхолин в синаптичната цепнатина на нервната система при насекомите (Donarski et al., 1989; Eleršek & Filipic, 2011; Khan, 2021). *Пропамокарб хидрохлорид* е въведен за първи път за контрол на оомицетни патогени в декоративни култури и някои зеленчуци (Pieroh et al., 1978),

използван за борба с *Pythium spp.* и *Phytophthora spp.* (USEPA, 1995) и принадлежащ към семейството на карбаматните пестициди (Wang et al., 2016; Li et al., 2020). 2,4-D е синтетичен ауксинов хербицид, който поради своята ефективност, селективност, ниска цена и широк спектър в контрола на вредителите, се превръща в един от най-често използваните хербициди в земеделски и градски райони по света (Dehnert et al., 2018).

2. Методи

2.1. Опитна постановка

Рибите, използвани в настоящия експеримент, са доставени от „Института по Рибарство и Аквакултури“, гр. Пловдив. Опитните индивиди са от една и съща размерно-възрастова група, без външни патологични промени. За експеримента са използвани 7 аквариума (100 L.), с $n=10$ за всяка опитна концентрация и за контролната група, която е без добавен токсикант. За всеки пестицид са използвани по две концентрации: пиримифос-метил – 10 $\mu\text{g/L}$ и 60 $\mu\text{g/L}$, пропамокарб хидрохлорид – 40 $\mu\text{g/L}$ и 80 $\mu\text{g/L}$ и 2,4-D – 50 $\mu\text{g/L}$ и 100 $\mu\text{g/L}$. Продължителността на експериментите е 96 часа. Параметрите на водата ($t^{\circ}\text{C}$, pH, разтворен кислород, електропроводимост) са отчитани всеки ден от експеримента (APHA, 2005).

2.2. Хистопатологичен анализ на хриле, черен дроб и бъбрек от *Cyprinus carpio L.*

Дисекцията на рибите е извършена по Rosseland et al. (2003), като са спазени изискванията за хуманно отношение на опитни животни по Directive 2010/63/EU. Хистологичната обработка на материала е проведена по стандартната методика на Romeis (1989) в научната лаборатория по „Хистология и ембриология“ към катедра „Биология на развитието“, Биологически факултет. Оценката на хистопатологичните изменения в хрилете, черния дроб и бъбрека е извършена спрямо скала на Bernet et al. (1999) за групите изменения и модифицирана спрямо Saraiva et al. (2015). Съгласно Bernet et al. (1999) е определен и Фактор на значимост (W), който е константна величина и е категоризиран в три степени. Според Saraiva et al. (2015), е използвана 5-степенна скала за определяне тежестта на всяко изменение в хистологичната структура на органа, както следва: (0) – липса на изменения (до 10%); (1) – много лека степен на изменения (от 10% до 20%); (2) – лека степен на изменения (от 20% до 30%); (3) – умерена степен на изменения (от 30% до 50%); (4) – тежка степен на изменения (от 50% до 80%); (5) – много тежка степен на изменения (над 80%).

Индексите на установените хистопатологични промени за всяка група изменения са произведение от степента на конкретното нарушение в групата и W. Обобщаването на тези крайни стойности определя Индекс (I) за съответната група изменения. Сумата от всички индекси определя и Индекс на органа (I_0) за патологична промяна. I_0 се отнася към клас, съгласно Zimmerli et al. (2007), както следва: Клас I (Index ≤ 10) – нормална хистологична структура с леки патологични промени (обратими); Клас II (Index 11–20) – нормална хистологична структура с умерени патологични промени (обратими); Клас III (Index 21–30) – умерена степен на промяна на хистологичната структура (обратими); Клас IV (Index 31–40) – тежка степен на промяна на хистологичната структура (необратими);

Клас V (Index > 40) – много тежка степен на промяна на хистологичната структура (необратими).

2.3. Хистохимичен анализ на черен дроб от *Cyprinus carpio* L.

Хистохимичното изследване е проведено в научната лаборатория по „Хистология и ембриология“ към Биологически факултет на ПУ „Паисий Хилендарски“. Криостатните срези от отделения черен дроб са оцветени за доказване на липиди със Sudan Black B (Culling, 1974; Sheehan & Hrapchak, 1980) (Scy Tek Laboratories) и PAS-реакция (McManus, 1948) (Carl Roth GmbH + Co. KG) за доказване на гликоген, описани от Pearse (1972). Хистохимичните изменения в черния дроб на опитните индивиди са представени по полуколичествена скала, описана от Mishra & Mohanty (2008).

2.4. Биохимичен анализ на черен дроб от *Cyprinus carpio* L.

Биохимичното изследване на чернодробните ензими лактат дехидрогеназа (LDH), аспартат аминотрансфераза (ASAT), аланин аминотрансфераза (ALAT), холинестераза (ChE) и каталаза (CAT) е проведено в Технологичен център към Пловдивски университет. Измерването на активността на LDH е проведено съгласно метода на Vassault (1983). Активността на ALAT и ASAT е измерена съгласно метод, разработен паралелно от Henley & Pollard (1955) и Wroblewski & Ladue (1956), модифициран от Reitman & Frankel (1957). Активността на ChE е измерена съгласно Burtis-Ashwood (1994), а на CAT – съгласно Beers & Sizer (1952). Количеството общ белтък е определено по метода на Bradford (1976) чрез измерване на абсорбцията при 595 nm. Активността на изследваните ензими е представена като специфична ензимна активност (U/mg белтък).

2.5. Статистическа обработка на данните

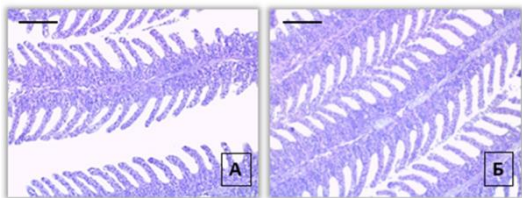
Извършена е чрез GraphPad Prism v.9.2.0. Различията между концентрациите и контролата са тествани за достоверни чрез Student's t-test за независими извадки, при равнище на значимост ($p < 0.05$), при данни с нормално разпределение.

III. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ

1. Хистопатологични изменения в хриле от обикновен шаран (*Cyprinus carpio* L.) след краткосрочна експозиция с опитните пестициди

1.1. Контролна група

Резултатите показват нормална морфология на хистологичната структура на хрилете в контролната група (Таблица 1 и Фигура 1).



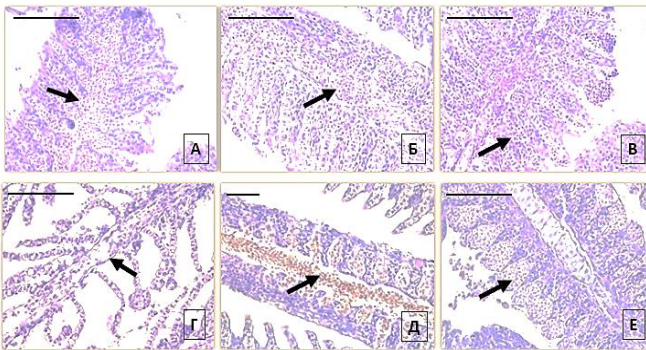
Фигура 1. Нормална хистологична структура на хриле от *Cyprinus carpio* L. (А, Б) - контролна група, x200, H&E

1.2. Хистопатологични изменения в хриле от обикновен шаран (*Cyprinus carpio* L.) след експозиция с пиримифос-метил

Таблица 1. Хистопатологични промени в хриле от обикновен шаран (*Cyprinus carpio* L.) след остро (96-h) излагане на пиримифос-метил

Класификация на хистопатологичните изменения	Функционална единица	Изменения	Фактор на значимост	Степен на хистопатологичните изменения		
				Контрола	Пиримифос-метил	
					10 µg/L	60 µg/L
Изменения в кръвоносната система	Филамент	Вазодилатация	$W_{GC1} = 1$	0	2*	2*
	Вторични ламели	Вазодилатация	$W_{GC2} = 2$	0	3*	4*
	Вторични ламели	Аневризми	$W_{GC3} = 2$	0	0	2*
Индекс на изменения в кръвоносната система				$I_{GC}=0$	$I_{GC}=8$	$I_{GC}=14$
Дегенеративни промени	Епителна тъкан - филамент	Некроза	$W_{GR1} = 3$	0	0	1
	Епителна тъкан - вторични ламели	Некроза	$W_{GR2} = 3$	0	1	1
Индекс на дегенеративни промени				$I_{GR} = 0$	$I_{GR} = 3$	$I_{GR}=6$
Пролиферативни промени	Епителна тъкан-филамент	Оток (Едем)	$W_{GP1} = 1$	0	1	1
		Пролиферация на покривния епител	$W_{GP2} = 2$	0	3*	2*
		Пролиферация на жлезистите клетки	$W_{GP3} = 1$	0	1	0
		Фузия	$W_{GP4} = 3$	0	3*	3*
	Епителна тъкан-вторични ламели	Ламеларен лифтинг	$W_{GP5} = 1$	0	1	2*
		Пролиферация на покривния епител	$W_{GP6} = 2$	0	2*	2*
Индекс на пролиферативни промени				$I_{GP} = 0$	$I_{GP}=22$	$I_{GP}=20$
Индекс орган I_G				$I_G = 0$	$I_G=33$	$I_G=40$

* $p < 0.05$



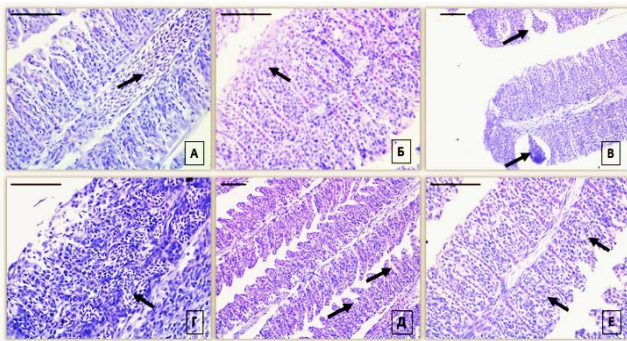
Фигура 2. Хистопатологични изменения в хриле от *Cyprinus carpio* L. под действие на пиримифос-метил (H&E): А, Б – вазодилатация в кръвоносен съд на филамента (10 µg/L), x 400; В – фузия на вторичните ламели (10 µg/L), x 400; Г – дегенеративни промени (60 µg/L), x 400; Д – вазодилатация в кръвоносен съд на филамента (60 µg/L), x 200; Е – аневризми на вторичните ламели (60 µg/L), x 400.

1.3. Хистопатологични изменения в хриле от обикновен шаран (*Cyprinus carpio* L.) след експозиция с пропамокарб хидрохлорид

Таблица 2. Хистопатологични промени в хриле от обикновен шаран (*Cyprinus carpio* L.) след остро (96-h) излагане на пропамокарб хидрохлорид

Класификация на хистопатологичните изменения	Функционална единица	Изменения	Фактор на значимост	Степен на хистопатологичните изменения		
				Контрола	Пропамокарб хидрохлорид	
					40 µg/L	80 µg/L
Изменения в кръвоносната система	Филамент	Вазодилатация	W _{GC1} = 1	0	2*	2*
	Вторични ламели	Вазодилатация	W _{GC2} = 2	0	2*	2*
	Вторични ламели	Аневризми	W _{GC3} = 2	0	1	0
Индекс на изменения в кръвоносната система				I_{GC}=0	I_{GC}=8	I_{GC}= 6
Дегенеративни промени	Епителна тъкан-филамент	Некроза	W _{GR1} = 3	0	0	0
	Епителна тъкан-вторични ламели	Некроза	W _{GR2} = 3	0	0	0
Индекс на дегенеративни промени				I_{GR}=0	I_{GR}=0	I_{GR}=0
Пролиферативни промени	Епителна тъкан - филамент	Едем	W _{GP1} = 1	0	3*	2*
		Пролиферация на покривния епител	W _{GP2} = 2	0	5*	4*
		Пролиферация на железистите клетки	W _{GP3} = 1	0	1	0
		Фузия	W _{GP4} = 3	0	4*	4*
	Епителна тъкан - вторични ламели	Ламеларен лифтинг	W _{GP5} = 1	0	2*	2*
		Пролиферация на покривния епител	W _{GP6} = 2	0	4*	3*
Индекс на пролиферативни промени				I_{GP}=0	I_{GP}=36	I_{GP}=30
Индекс орган I_G				I_G=0	I_G=44	I_G=36

* p<0.05



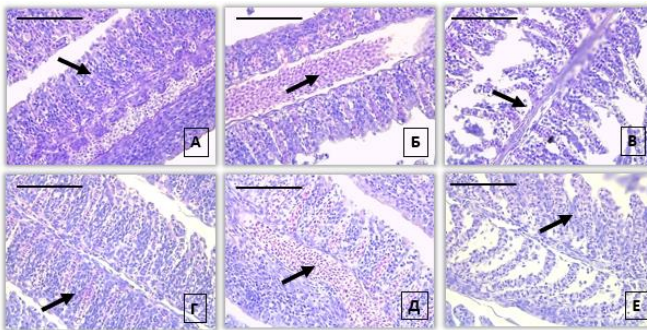
Фигура 3. Хистопатологични изменения в хриле от *Cyprinus carpio* L. под действие на пропамокарб хидрохлорид (H&E): А – вазодилатация при филамента (40 µg/L), x400; Б – фузия на вторичните ламели (40 µg/L), x400; В – аневризми на вторичните ламели (40 µg/L), x200; Г – вазодилатация на вторичните ламели (80 µg/L), x400; Д – ламеларен лифтинг (80 µg/L), x200; Е – пролиферация на покривния епител на филамента (80 µg/L), x400.

1.4. Хистопатологични изменения в хриле от обикновен шаран (*Cyprinus carpio* L.) след експозиция с 2,4-D

Таблица 3. Хистопатологични промени в хриле от обикновен шаран (*Cyprinus carpio* L.) след остро (96-h) излагане на 2,4-D

Класификация на хистопатологичните изменения	Функционална единица	Изменения	Фактор на значимост	Степен на хистопатологичните изменения		
				Кон-трола	2, 4 - D	
					50 µg/L	100 µg/L
Изменения в кръвоносната система	Филамент	Вазодилатация	$W_{GC1} = 1$	0	2*	3*
	Вторични ламели	Вазодилатация	$W_{GC2} = 2$	0	2*	3*
	Вторични ламели	Аневризми	$W_{GC3} = 2$	0	0	0
Индекс на изменения в кръвоносната система				$I_{GC}=0$	$I_{GC}=6$	$I_{GC}=9$
Дегенеративни промени	Епителна тъкан филамент	Некроза	$W_{GR1} = 3$	0	1	0
	Епителна тъкан вторични ламели	Некроза	$W_{GR2} = 3$	0	0	1
Индекс на дегенеративни промени				$I_{GR}=0$	$I_{GR}=3$	$I_{GR}=3$
Пролiferативни промени	Епителна тъкан филамент	Едем	$W_{GP1} = 1$	0	2*	2*
		Пролiferация на покривния епител	$W_{GP2} = 2$	0	3*	4*
		Пролiferация на жлезистите клетки	$W_{GP3} = 1$	0	1	0
		Фузия	$W_{GP4} = 3$	0	3*	3*
	Епителна тъкан вторични ламели	Ламеларен лифтинг	$W_{GP5} = 1$	0	2*	3*
		Пролiferация на покривния епител	$W_{GP6} = 2$	0	2*	2*
Индекс на пролиферативни промени				$I_{GP}=0$	$I_{GP}=24$	$I_{GP}=26$
Индекс орган I_G				$I_G=0$	$I_G=33$	$I_G=38$

* $p < 0.05$

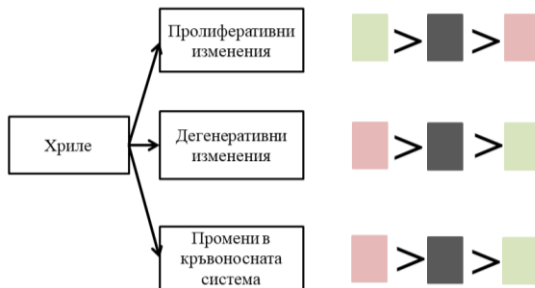


Фигура 4. Хистопатологични изменения в хриле от *Cyprinus carpio* L. под действие на 2,4-D (H&E, x400: А – пролиферация на покривния епител при филамента (50 µg/L); Б – вазодилатация на кръвоносния съд при филамента (50 µg/L); В – дегенеративни промени (50 µg/L); Г – фузия на вторичните ламели (100 µg/L); Д – вазодилатация на кръвоносния съд при филамента (100 µg/L); Е – пролиферация на покривния епител (100 µg/L).

Въз основа на получените резултати и схемата за класификация, хрилният индекс (I_G) при пиримифос-метил с концентрация 10 $\mu\text{g/L}$ е 33, а при 60 $\mu\text{g/L}$ е 40. Стойностите попадат в клас IV - тежка степен на промяна с необратим характер (Таблица 1, Фигура 2). За пропамокарб хидрохлорид I_G е със стойност 44 (при 40 $\mu\text{g/L}$) и попада в клас V - много тежки хистопатологични необратими промени в хрилната тъкан. При 80 $\mu\text{g/L}$ I_G е 36 и попада в клас IV - тежка степен на хистопатологични изменения, също с необратим характер (Таблица 2, Фигура 3). След излагане на 2,4-D, изчисленият I_G е със стойност 33 при 50 $\mu\text{g/L}$ от приложението хербицид, а при 100 $\mu\text{g/L}$ е 38. И двете концентрации попадат в клас IV, което показва наличие на тежки необратими хистопатологични промени (Таблица 3, Фигура 4).

Нашите резултати са подобни на тези, докладвани от Xing et al. (2012), Al-Mamoori et al. (2014), Devi & Mishra (2013), Kunjamma et al. (2008), Makinde et al. (2015), Vigarío & Saboia-Morais (2014), Ortiz et al. (2003), Rocha et al. (2015) и други. За разлика от авторите, настоящото проучване установява степента на хистологичните изменения и индекса на патологични промени в органа. Това позволява, въз основа на получените резултати, да се определи степента на негативното въздействие на токсиканта и да се направи обективна сравнителна оценка.

На базата на проведените сравнителен анализ степента на токсичност на опитните пестициди може да бъде обобщена в следния низходящ ред (Фигура 5):



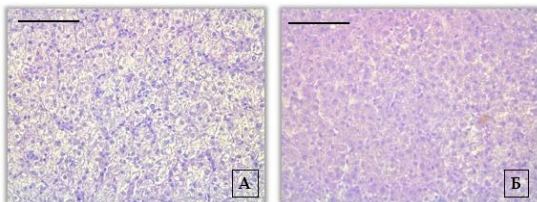
Фигура 5. Сравнителен анализ на токсичното въздействие на използваните пестициди върху хистологичната структура на хриле от обикновен шаран (*Cyprinus carpio* L.)

■ пиримифос-метил ■ пропамокарб хидрохлорид ■ 2,4-D

2. Хистопатологични изменения в черен дроб от обикновен шаран (*Cyprinus carpio* L.) след краткосрочна експозиция с опитните пестициди

2.1. Контролна група

Резултатите от проведените хистологичен анализ показват нормална морфология на черния дроб в контролната група (Таблица 4 и Фигура 6).



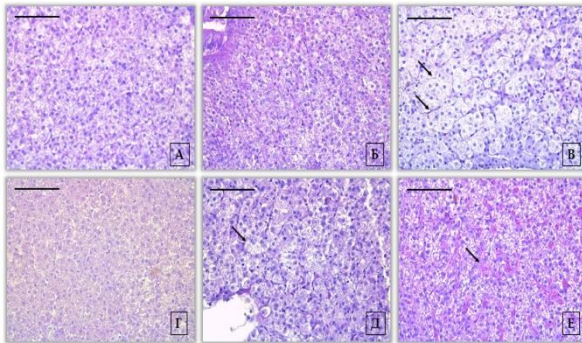
Фигура 6. Нормална хистологична структура на черен дроб от *Cyprinus carpio* L. (А, Б) - контролна група, x400, H&E

2.2. Хистопатологични изменения в черен дроб от обикновен шаран (*Cyprinus carpio* L.) след експозиция с пиримифос-метил

Таблица 4. Хистопатологични промени в черен дроб от обикновен шаран (*Cyprinus carpio* L.) след остро (96-h) излагане на пиримифос-метил

Класификация на хистопатологичните изменения	Функционална единица	Изменения	Фактор на значимост	Степен на хистопатологичните изменения		
				Контрола	Пиримифос-метил	
					10 µg/L	60 µg/L
Изменения в кръвоносната система	Черен дроб	Хиперемия	$W_{LC1} = 1$	0	3*	3*
		Вътреклетъчен оток	$W_{LC2} = 1$	0	0	0
Индекс на изменения в кръвоносната система				$I_{LC} = 0$	$I_{LC} = 3$	$I_{LC} = 3$
Дегенеративни промени	Черен дроб	Зърнеста дегенерация	$W_{LR1} = 1$	0	5*	4*
		Вакуолна дегенерация	$W_{LR2} = 2$	0	4*	4*
		Некробиоза	$W_{LR3} = 2$	0	1	1
		Некроза	$W_{LR4} = 3$	0	1	2*
		Мастна дегенерация	$W_{LR2} = 1$	0	2*	3*
Индекс на дегенеративни промени				$I_{LR} = 0$	$I_{LR} = 20$	$I_{LR} = 23$
Пролиферативни промени	Черен дроб	Хипертрофия	$W_{LP1} = 1$	0	0	0
Индекс на пролиферативни промени				$I_{LP} = 0$	$I_{LP} = 0$	$I_{LP} = 0$
Възпаление	Черен дроб	Активиране на ретикулоендотелна система	$W_{LI1} = 1$	0	0	0
		Лимфоцитна инфилтрация	$W_{LI2} = 2$	0	0	0
Индекс на възпалителни процеси				$I_{LI} = 0$	$I_{LI} = 0$	$I_{LI} = 0$
Индекс орган I_L				$I_L = 0$	$I_L = 23$	$I_L = 26$

* $p < 0.05$



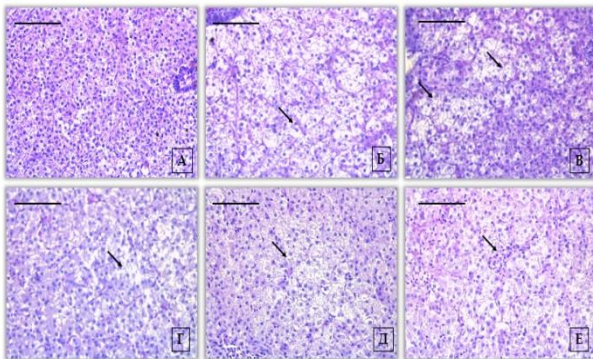
Фигура 7. Хистопатологични изменения в черен дроб от *Cyprinus carpio* L. под действие на пиримифос-метил (H&E), x400: А, Б – зърнеста дегенерация (10 µg/L); В – вакуолна дегенерация (10 µg/L); Г – зърнеста дегенерация (60 µg/L); Д – некробиоза с изява на кариолиза (60 µg/L); Е – хиперемия (60 µg/L)

2.3. Хистопатологични изменения в черен дроб от обикновен шаран (*C. carpio L.*) след експозиция с пропамокарб хидрохлорид

Таблица 5. Хистопатологични промени в черен дроб от обикновен шаран (*Cyprinus carpio L.*) след остро (96-h) излагане на пропамокарб хидрохлорид

Класификация на хистопатологичните изменения	Функционална единица	Изменения	Фактор на значимост	Степен на хистопатологичните изменения		
				Контрола	Пропамокарб хидрохлорид	
					40 µg/L	80 µg/L
Изменения в кръвоносната система	Черен дроб	Хиперемия	$W_{LC1} = 1$	0	4*	4*
		Вътреклетъчен оток	$W_{LC2} = 1$	0	0	0
Индекс на изменения в кръвоносната система				$I_{LC} = 0$	$I_{LC} = 4$	$I_{LC} = 4$
Дегенеративни промени	Черен дроб	Зърнеста дегенерация	$W_{LR1} = 1$	0	5*	5*
		Вакуолна дегенерация	$W_{LR2} = 2$	0	4*	5*
		Некробиоза	$W_{LR3} = 2$	0	1	1
		Некроза	$W_{LR4} = 3$	0	2*	2*
		Масна дегенерация	$W_{LR2} = 1$	0	2*	4*
Индекс на дегенеративни промени				$I_{LR} = 0$	$I_{LR} = 23$	$I_{LR} = 27$
Пролиферативни промени	Черен дроб	Хипертрофия	$W_{LP1} = 1$	0	0	0
Индекс на пролиферативни промени				$I_{LP} = 0$	$I_{LP} = 0$	$I_{LP} = 0$
Възпаление	Черен дроб	Активиране на ретикулоендотелна система	$W_{LI1} = 1$	0	0	0
		Лимфоцитна инфилтрация	$W_{LI2} = 2$	0	1	1
Индекс на възпалителни процеси				$I_{LI} = 0$	$I_{LI} = 2$	$I_{LI} = 2$
Индекс орган I_L				$I_L = 0$	$I_L = 29$	$I_L = 33$

* $p < 0.05$



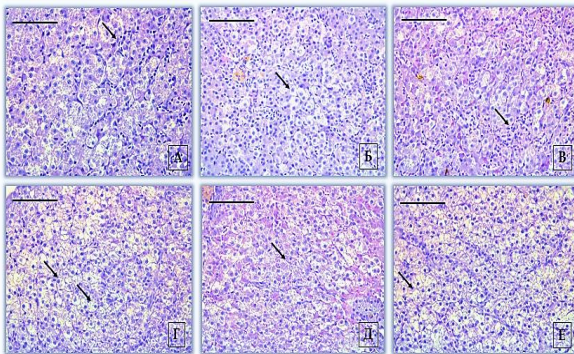
Фигура 8. Хистопатологични изменения в черен дроб от *Cyprinus carpio L.* под действие на пропамокарб хидрохлорид (H&E), x400: А – зърнеста дегенерация (40 µg/L); Б, В – вакуолна дегенерация (40 µg/L); Г – некробиоза с изява на кариолиза (80 µg/L); Д – масна дегенерация (80 µg/L); Е – хиперемия (80 µg/L)

2.4. Хистопатологични изменения в черен дроб от обикновен шаран (*Cyprinus carpio* L.) след експозиция с 2,4-D

Таблица 6. Хистопатологични промени в черен дроб от обикновен шаран (*Cyprinus carpio* L.) след остро (96-h) излагане на 2,4-D

Класификация на хистопатологичните изменения	Функционална единица	Изменения	Фактор на значимост	Степен на хистопатологичните изменения		
				Контрола	2, 4 - D	
					50 µg/L	100 µg/L
Изменения в кръвоносната система	Черен дроб	Хиперемия	$W_{LC1} = 1$	0	4*	4*
		Вътресклетъчен оток	$W_{LC2} = 1$	0	0	0
Индекс на изменения в кръвоносната система				$I_{LC}=0$	$I_{LC}=4$	$I_{LC}=4$
Дегенеративни промени	Черен дроб	Зърнеста дегенерация	$W_{LR1} = 1$	0	4*	5*
		Вакуолна дегенерация	$W_{LR2} = 2$	0	4*	5*
		Некробиоза	$W_{LR3} = 2$	0	1	1
		Некроза	$W_{LR4} = 3$	0	2*	2*
		Мастна дегенерация	$W_{LR2} = 1$	0	2*	5*
Индекс на дегенеративни промени				$I_{LR}=0$	$I_{LR}=22$	$I_{LR}=28$
Пролиферативни промени	Черен дроб	Хипертрофия	$W_{LP1} = 1$	0	0	0
Индекс на пролиферативни промени				$I_{LP} = 0$	$I_{LP}=0$	$I_{LP}=0$
Възпаление	Черен дроб	Активиране на ретикулоендотелна система	$W_{LI1} = 1$	0	0	0
		Лимфоцитна инфилтрация	$W_{LI2} = 2$	0	1	1
Индекс на възпалителни процеси				$I_{LI} = 0$	$I_{LI}=2$	$I_{LI}=2$
Индекс орган I_L				$I_L = 0$	$I_L=28$	$I_L=34$

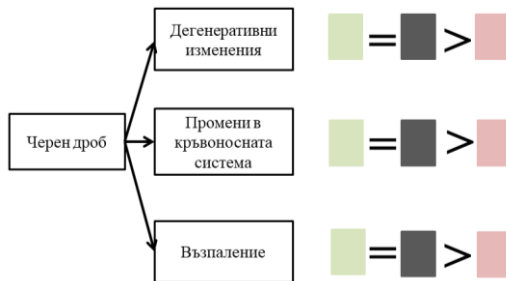
p<0.05



Фигура 9. Хистопатологични изменения в черен дроб от *Cyprinus carpio* L. под действие на 2,4-D (H&E), x400: А – хиперемия (50 µg/L); Б – вакуолна дегенерация (50 µg/L); В – хиперемия (50 µg/L); Г – мастна дегенерация (100 µg/L); Д – хиперемия (100 µg/L); Е – вакуолна дегенерация (100 µg/L)

Въз основа на получените резултати чернодробният индекс (I_L) при пиримифос-метил попада в клас III и за двете концентрации, което показва умерена степен на промяна на хистологичната структура, като процесите са обратими (Таблица 4, Фигура 7). При пропамокарб хидрохлорид I_L при 40 $\mu\text{g/L}$ е 29 и попада в клас III с умерена степен на обратими изменения. I_L при 80 $\mu\text{g/L}$ е със стойност 33 и попада в клас IV, с тежка степен на промяна на хистологичната структура, като процесите са необратими (Таблица 5, Фигура 8). При 2,4-D I_L при 50 $\mu\text{g/L}$ попада в клас III, което показва, че има умерена степен на хистологична промяна. I_L при 100 $\mu\text{g/L}$ попада в клас IV, с тежка степен на необратими хистологични промени. (Таблица 6, Фигура 9).

Редица автори откриват подобни хистопатологични изменения в черен дроб на третиран с токсиканти риби (Subburaj et al., 2020; Farhan et al., 2021; Ezemonye & Ogbomida, 2010; Al-Otaibi et al., 2019; Nagaraju & Rathnamma, 2014; Babatunde et al., 2014; Cattaneo et al., 2008, Vigario et al., 2014 и други). Заедно с това, констатираните резултати относно I_L за степен на токсичност при трите приложени пестицида позволяват установяване на обективна сравнителна оценка. Според получените резултати спрямо установените нарушения при четирите категории изменения в черния дроб, степента на токсичност на опитните пестициди може да бъде обобщена в следния низходящ ред (Фигура 10):



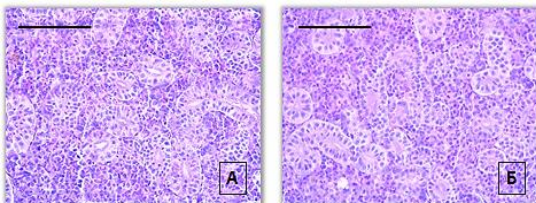
Фигура 10. Сравнителен анализ на токсичното въздействие на приложените пестициди върху хистологичната структура на черен дроб от обикновен шаран (*Cyprinus carpio* L.)

■ пиримифос-метил ■ пропамокарб хидрохлорид ■ 2,4-D

3. Хистопатологични изменения в бъбрек от обикновен шаран (*Cyprinus carpio* L.) след краткосрочна експозиция с опитните пестициди

3.1. Контролна група

Резултатите показват нормална морфология на хистологичната структура на бъбрека в контролната група риби (Таблица 7 и Фигура 11).



Фигура 11. Нормална хистологична структура на бъбрек от *Cyprinus carpio* L. (А, Б) - контролна група, x400, H&E

3.2. Хистопатологични изменения в бъбрек от обикновен шаран (*Cyprinus carpio* L.) след експозиция с пиримифос-метил

Таблица 7. Хистопатологични промени в бъбрек от обикновен шаран (*Cyprinus carpio* L.) след остро (96-h) излагане на пиримифос-метил

Класификация на хистопатологичните изменения	Функционална единица	Изменения	Фактор на значимост	Степен на хистопатологичните изменения		
				Контрола	Пиримифос-метил	
					10 µg/L	60 µg/L
Изменения в кръвоносната система	Бъбрек	Кръвоизлив	W _{KC1} = 1	0	0	0
		Хиперемия	W _{KC2} = 1	0	0	0
		Аневризми	W _{KC3} = 1	0	0	0
Индекс на изменения в кръвоносната система				I_{KC}=0	I_{KC}=0	I_{KC}=0
Дегенеративни промени	Бъбречно каналче	Вакуолна дегенерация	W _{KR1} = 1	0	2*	2*
		Хилинно-капчеста дегенерация	W _{KR2} = 1	0	0	1
		Некробиоза	W _{KR3} = 2	0	0	1
		Некроза	W _{KR4} = 3	0	0	1
	Гломерул	Дилатация на капсулата на Бауман	W _{KR5} = 1	0	2*	3*
		Свиване на бъбречните телца	W _{KR6} = 1	0	1	1
		Некробиоза	W _{KR7} = 2	0	0	0
	Интерстициална тъкан	Некроза	W _{KR8} = 3	0	0	0
		Некроза	W _{KR9} = 3	0	0	0
Индекс на дегенеративни промени				I_{KR} = 0	I_{KR}=5	I_{KR}=12
Пролиферативни промени	Бъбречно каналче	Хипертрофия	W _{KP1} = 1	0	2*	2*
		Хиперплазия	W _{KP2} = 2	0	0	0
	Гломерул	Хипертрофия	W _{KP3} = 1	0	0	0
		Хиперплазия	W _{KP4} = 2	0	0	0
		Задебеляване на мембраната на капсулата на Бауман	W _{KP5} = 2	0	0	1
	Интерстициална тъкан	Хипертрофия	W _{KP6} = 1	0	3*	3*
		Едем	W _{KP7} = 2	0	1	1
Индекс на пролиферативни промени				I_{KP} = 0	I_{KP} = 7	I_{KP} = 9
Възпаление	Бъбрек	Инфилтрация	W _{KI1} = 2	0	0	0
		Активиране на меланомакрофаги	W _{KI2} = 2	0	3*	3*
Индекс на възпалителни процеси				I_{KI} = 0	I_{KI}=6	I_{KI}=6
Индекс орган I_K				I_K = 0	I_K=18	I_K=27

* p<0.05

3.3. Хистопатологични изменения в бъбрек от обикновен шаран (*Cyprinus carpio* L.) след експозиция с пропамокарб хидрохлорид

Таблица 8. Хистопатологични промени в бъбрек от обикновен шаран (*Cyprinus carpio* L.) след остро (96-h) излагане на пропамокарб хидрохлорид

Класификация на хистопатологичните изменения	Функционална единица	Изменения	Фактор на значимост	Степен на хистопатологичните изменения		
				Контрола	Пропамокарб хидрохлорид	
					40 µg/L	80 µg/L
Изменения в кръвоносната система	Бъбрек	Кръвоизлив	W _{KC1} = 1	0	0	0
		Хиперемия	W _{KC2} = 1	0	0	0
		Аневризми	W _{KC3} = 1	0	0	0
Индекс на изменения в кръвоносната система				I_{KC}=0	I_{KC}=0	I_{KC}=0
Дегенеративни промени	Бъбречно каналче	Вакуолна дегенерация	W _{KR1} = 1	0	1	3*
		Хиалинно-капчеста дегенерация	W _{KR2} = 1	0	1	2*
		Некробиоза	W _{KR3} = 2	0	0	0
		Некроза	W _{KR4} = 3	0	0	0
	Гломерул	Дилатация на капсулата на Бауман	W _{KR5} = 1	0	2*	2*
		Свиване на бъбречните телца	W _{KR6} = 1	0	0	0
		Некробиоза	W _{KR7} = 2	0	0	0
	Интерстициална тъкан	Некроза	W _{KR8} = 3	0	0	0
		Некроза	W _{KR9} = 3	0	0	0
Индекс на дегенеративни промени				I_{KR} = 0	I_{KR}=4	I_{KR}=7
Пролиферативни промени	Бъбречно каналче	Хипертрофия	W _{KP1} = 1	0	1	1
		Хиперплазия	W _{KP2} = 2	0	0	0
	Гломерул	Хипертрофия	W _{KP3} = 1	0	1	1
		Хиперплазия	W _{KP4} = 2	0	0	0
		Задебеляване на мембраната на капсулата на Бауман	W _{KP5} = 2	0	0	1
	Интерстициална тъкан	Хипертрофия	W _{KP6} = 1	0	0	0
		Едем	W _{KP7} = 2	0	0	0
Индекс на пролиферативни промени				I_{KP} = 0	I_{KP}=2	I_{KP}=4
Възпаление	Бъбрек	Инфилтрация	W _{KI1} = 2	0	0	0
		Активиране на меланомакрофаги	W _{KI2} = 2	0	1	2*
Индекс на възпалителни процеси				I_{KI} = 0	I_{KI}=2	I_{KI}=4
Индекс орган I_K				I_K = 0	I_K=8	I_K=15

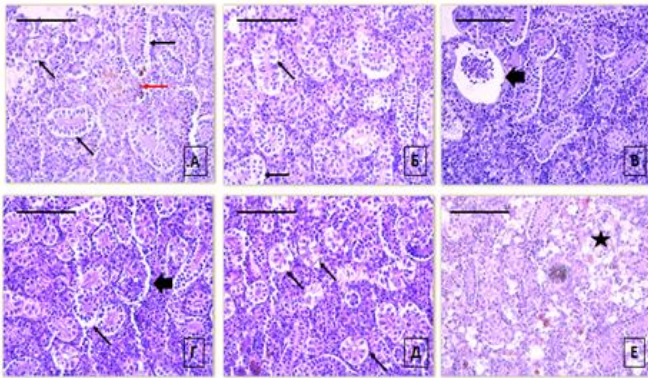
* p<0.05

3.4. Хистопатологични изменения в бъбрек от обикновен шаран (*Cyprinus carpio* L.) след експозиция с 2,4-D

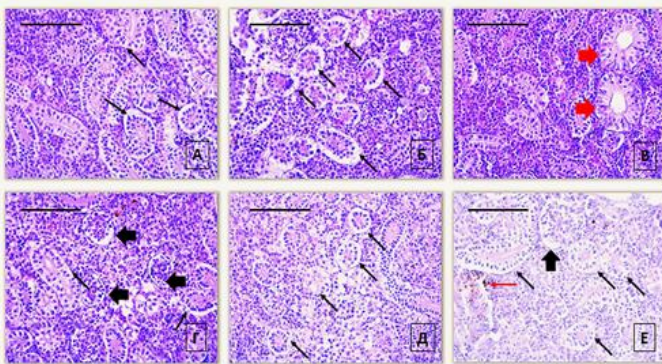
Таблица 9. Хистопатологични промени в бъбрек от обикновен шаран (*Cyprinus carpio* L.) след остро (96-h) излагане на 2,4-D

Класификация на хистопатологичните изменения	Функционална единица	Изменения	Фактор на значимост	Степен на хистопатологичните изменения		
				Контрола	2, 4 - D	
					50 µg/L	100 µg/L
Изменения в кръвоносната система	Бъбрек	Кръвоизлив	W _{KC1} = 1	0	0	0
		Хиперемия	W _{KC2} = 1	0	0	0
		Аневризми	W _{KC3} = 1	0	0	0
Индекс на изменения в кръвоносната система				I_{KC}=0	I_{KC}=0	I_{KC}=0
Дегенеративни промени	Бъбречно каналче	Вакуолна дегенерация	W _{KR1} = 1	0	2*	4*
		Хиалинно-капчеста дегенерация	W _{KR2} = 1	0	0	0
		Некробиоза	W _{KR3} = 2	0	0	0
		Некроза	W _{KR4} = 3	0	0	0
	Гломерул	Дилатация на капсулата на Бауман	W _{KR5} = 1	0	1	2*
		Свиване на бъбречните телца	W _{KR6} = 1	0	0	1
		Некробиоза	W _{KR7} = 2	0	1	1
		Некроза	W _{KR8} = 3	0	1	1
	Интерстициална тъкан	Некроза	W _{KR9} = 3	0	0	1
Индекс на дегенеративни промени				I_{KR} = 0	I_{KR}=5	I_{KR}=15
Пролиферативни промени	Бъбречно каналче	Хипертрофия	W _{KP1} = 1	0	0	1
		Хиперплазия	W _{KP2} = 2	0	0	0
	Гломерул	Хипертрофия	W _{KP3} = 1	0	1	3*
		Хиперплазия	W _{KP4} = 2	0	0	1
		Задебеляване на мембраната на капсулата на Бауман	W _{KP5} = 2	0	0	0
	Интерстициална тъкан	Хипертрофия	W _{KP6} = 1	0	1	1
		Едем	W _{KP7} = 2	0	2*	4*
Индекс на пролиферативни промени				I_{KP} = 0	I_{KP}=6	I_{KP}=15
Възпаление	Бъбрек	Инфилтрация	W _{KI1} = 2	0	0	0
		Активиране на меланомакрофаги	W _{KI2} = 2	0	2*	2*
Индекс на възпалителни процеси				I_{KI} = 0	I_{KI}=4	I_{KI}=4
Индекс орган I_K				I_K = 0	I_K=15	I_K=34

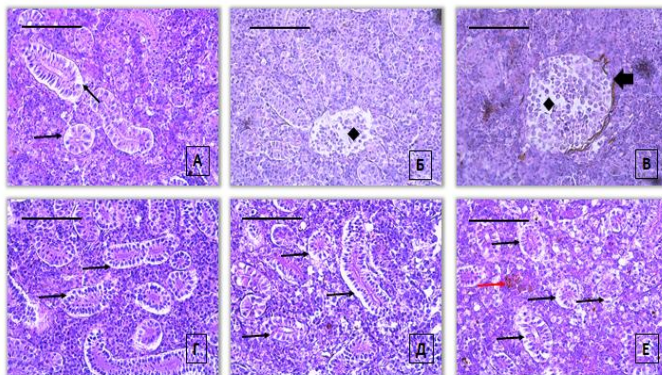
* p<0.05



Фигура 12. Хистопатологични изменения в бъбрек от шаран под действие на пиримифос-метил (H&E): А - активирани на меланомacroфаги (→) и вакуолна дегенерация (→) (10 µg/L, x400; Б - вакуолна дегенерация (→) (10 µg/L, x400; В - dilatация на капсулата на Бауман (→) (10 µg/L, x400; Г - dilatация на капсулата на Бауман (→) (60 µg/L, x400; Д - вакуолна дегенерация (→) (60 µg/L, x400; Е - хипертрофия на интерстициалната хемологична тъкан (★) (60 µg/L, x400



Фигура 13. Хистопатологични изменения в бъбрек от шаран под действие на пропамокарб хидрохлорид (H&E): А, Б - вакуолна дегенерация (→) при концентрации от 40 µg/L, x400; В - хипертрофия на бъбречното калаче (→) при концентрации от 40 µg/L, x400; Г - dilatация на капсулата на Бауман (→) и вакуолна дегенерация (→) при концентрация от 80 µg/L, x400; Д - вакуолна дегенерация (→) при концентрация от 80 µg/L, x400; Е - вакуолна дегенерация (→), dilatация на капсулата на Бауман (→) и активирани на меланомacroфаги (→) при концентрация от 80 µg/L, x400



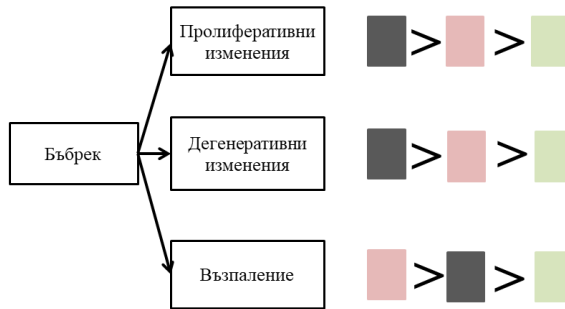
Фигура 14. Хистопатологични изменения в бъбрек от шаран под действие на 2,4 - D (H&E): А - вакуолна дегенерация (→) при концентрация от 50 µg/L, x400; Б - некроза на гломерул (◆) при концентрация от 50 µg/L, x400; В - некроза на гломерул (◆) и dilatация на капсулата на Бауман (→) при концентрация от 50 µg/L, x400; Г, Д - вакуолна дегенерация (→) при концентрация от 100 µg/L, x400; Е - вакуолна дегенерация (→) и активирани на меланомacroфаги (→) при концентрация от 100 µg/L, x400

Индексът на бъбрека (I_K) на рибите, третирани с пиримифос-метил с 10 µg/L е 18 и попада в клас II, а при тези, третирани с 60 µg/L, е 27 и попада в клас III. И при двата класа промените са обратими (Таблица 7, Фигура 12). При третиране с пропамокарб хидрохлорид I_K при 40 µg/L е 8 и попада в клас I, докато при 40 µg/L I_K е 15 и попада в

клас II. И при двата класа промените са обратими (Таблица 8, Фигура 13). При третиране с 2,4-D I_K при 50 µg/L е 15 и попада в клас II, където промените са обратими, а при 100 µg/L е 34 и попада в клас IV, с тежка степен на необратими хистологични промени (Таблица 9, Фигура 14).

Нашите резултати се потвърждават и в проучвания на Mostakim et al. (2015), Al-Otaibi et al. (2019), Boran et al. (2012), Sharmin et al. (2021), Okogwu et al. (2016) и други.

След провеждане на сравнителен анализ въз основа на получените резултати, степента на токсичност на опитните пестициди може да бъде обобщена в следния низходящ ред (Фигура 15):



Фигура 15. Сравнителен анализ на токсичното въздействие на приложените пестициди върху хистологичната структура на бъбрек от обикновен шаран (*Cyprinus carpio* L.)

■ пиримифос-метил ■ пропамокарб хидрохлорид ■ 2,4-D

4. Хистохимични изменения в черен дроб от обикновен шаран (*Cyprinus carpio* L.) под въздействие на изследваните пестициди

В Таблица 10 и 11 са представени резултатите от проведения хистохимичен анализ.

Таблица 10. Хистохимични промени в черен дроб от обикновен шаран (*Cyprinus carpio* L.) след остро (96-h) излагане на пиримифос-метил, пропамокарб хидрохлорид и 2,4-D, установени чрез PAS-реакция

Интензивност на PAS-реакцията	Пиримифос-метил			Пропамокарб хидрохлорид			2,4 - D		
	К	10 µg/L	60 µg/L	К	40 µg/L	80 µg/L	К	50 µg/L	100 µg/L
<i>Cyprinus carpio</i>	+/-	++	+	+/-	++	++	+/-	++	++

(-) – негативна реакция на хистохимичното оцветяване; (+/-) – много слабо позитивна хистохимична реакция; (+) – слабо позитивна хистохимична реакция; (++) – умерено позитивна реакция на хистохимичното оцветяване; (+++) – силно позитивна хистохимична реакция

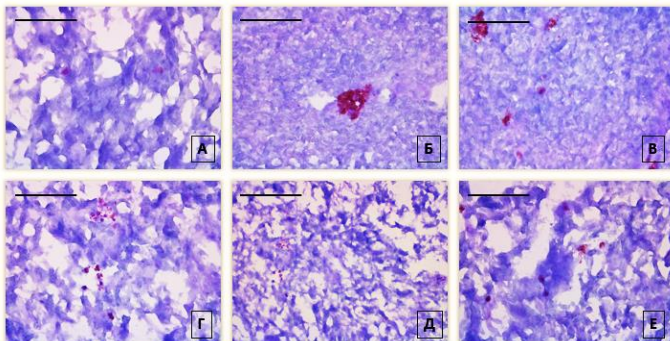
Таблица 11. Хистохимични промени в черен дроб от обикновен шаран (*Cyprinus carpio* L.) след остро (96-h) излагане на пиримифос-метил, пропамокарб хидрохлорид и 2,4-D, установени чрез оцветяване със Sudan Black B

Интензивност на Судан Black B в оцветяване	Пиримифос-метил			Пропамокарб хидрохлорид			2,4 - D		
	К	10 µg/L	60 µg/L	К	40 µg/L	80 µg/L	К	50 µg/L	100 µg/L
<i>Cyprinus carpio</i>	+/-	+++	+/-	+/-	++	++	+/-	+	+

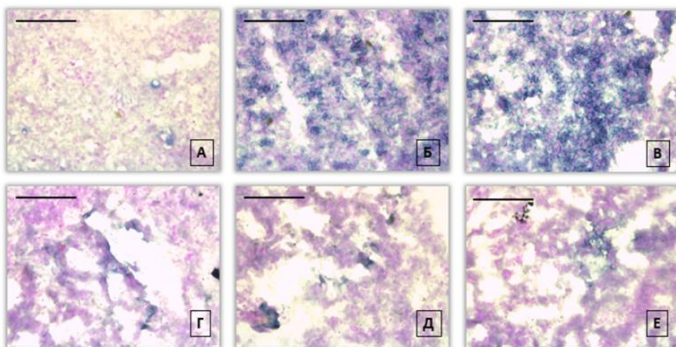
(-) – негативна реакция на хистохимичното оцветяване; (+/-) – много слабо позитивна хистохимична реакция; (+) – слабо позитивна хистохимична реакция; (++) – умерено позитивна реакция на хистохимичното оцветяване; (+++) – силно позитивна хистохимична реакция

4.1. Хистохимични промени в черен дроб от обикновен шаран (*Cyprinus carpio* L.) след експозиция с пиримифос-метил

При концентрация от 10 µg/L пиримифос-метил се наблюдава умерено повишаване на нивото на гликоген спрямо контролата. При концентрация 60 µg/L се установява слабо повишаване на нивото на гликоген спрямо контролата, но понижаване спрямо по-ниската концентрация приложен пестицид (Таблица 10, Фигура 16).



Фигура 16. Интензивност на PAS-реакцията в черен дроб от *Cyprinus carpio* L. при експозицията с пиримифос-метил: А – контрола, x400; Б, В – 10 µg/L, x400; Г, Д, Е – 60 µg/L, x400

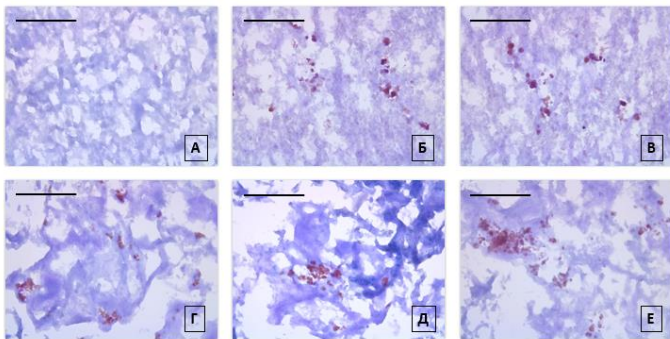


Фигура 17. Интензивност на Судан Black B оцветяване в черен дроб от *Cyprinus carpio* L. при експозиция с пиримифос-метил: А – контрола, x400; Б, В – 10 µg/L, x400; Г, Д, Е – 60 µg/L, x400

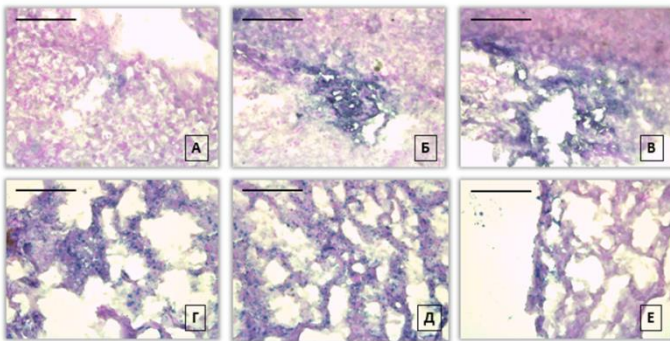
От друга страна, при концентрация 10 $\mu\text{g/L}$ се наблюдава силно повишаване на липидните запаси в черния дроб, докато при 60 $\mu\text{g/L}$ не се открива промяна в липидния профил спрямо контролата (Таблица 11, Фигура 17).

4.2. Хистохимични промени в черен дроб от обикновен шаран (*Cyprinus carpio* L.) след експозиция с пропамокарб хидрохлорид

При фунгицида пропамокарб хидрохлорид се установява повишаване на количеството на гликоген и липиди спрямо контролите в умерена степен, по сходен начин и при двете тествани концентрации (Таблица 10, Таблица 11, Фигура 18, Фигура 19).



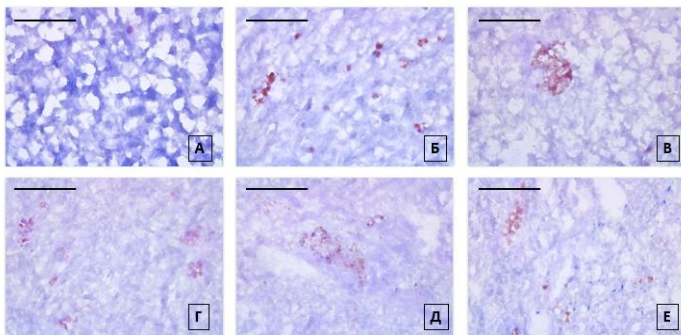
Фигура 18. Интензивност на PAS-реакцията в черен дроб от *Cyprinus carpio* L. при експозицията с пропамокарб хидрохлорид: А – контрола, $\times 400$; Б, В – 40 $\mu\text{g/L}$, $\times 400$; Г, Д, Е – 80 $\mu\text{g/L}$, $\times 400$



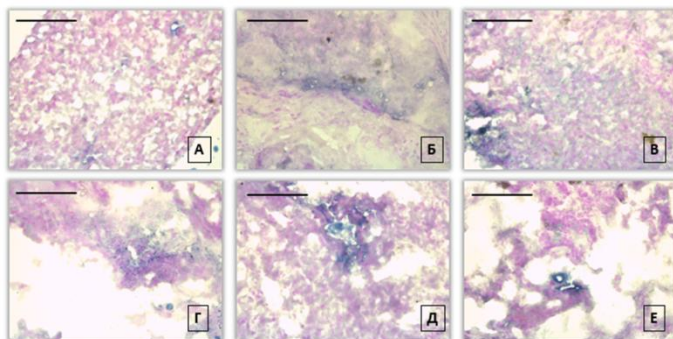
Фигура 19. Интензивност на Судан Black B оцветяване в черен дроб от *Cyprinus carpio* L. при експозиция с пропамокарб хидрохлорид: А – контрола, $\times 400$; Б, В – 40 $\mu\text{g/L}$, $\times 400$; Г, Д, Е – 80 $\mu\text{g/L}$, $\times 400$

4.3. Хистохимични промени в черен дроб от обикновен шаран (*Cyprinus carpio* L) след експозиция с 2,4-D

При хербицида 2,4-D се открива умерено натрупване на гликоген и слабо на липиди спрямо контролната група, по сходен начин и при двете концентрации (Таблица 10, Таблица 11, Фигура 20, Фигура 21).

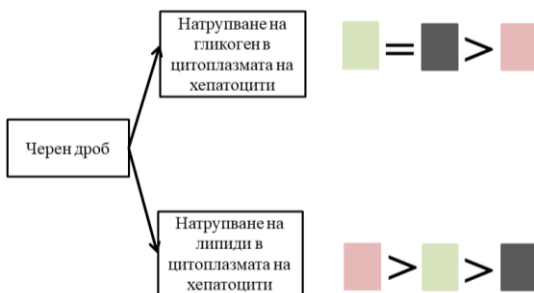


Фигура 20. Интензивност на PAS-реакцията в черен дроб от *Cyprinus carpio* L. при експозицията с 2,4-D: А – контрола, x400; Б, В – 50 µg/L, x400; Г, Д, Е – 100 µg/L, x400.



Фигура 21. Интензивност на Судан Блек В оцветяване в черен дроб от *Cyprinus carpio* L. при експозиция с 2,4-D: А – контрола, x400; Б, В – концентрация от 50 µg/L, x400; Г, Д, Е – концентрация от 100 µg/L, x400.

На база получените резултати и спрямо използваната полуколичествена скала, токсичността на опитните пестициди може да бъде обобщена в следния низходящ ред (Фигура 22):



Фигура 22. Сравнителен анализ на резултатите от проведения хистохимичен анализ на черен дроб от обикновен шаран (*Cyprinus carpio* L.) под действие на приложените пестициди

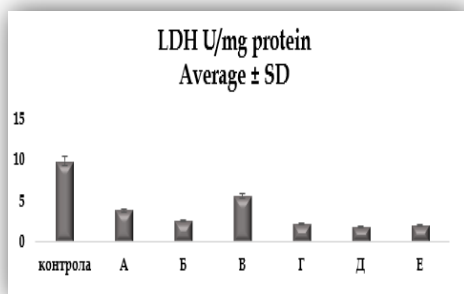
■ пиримифос-метил ■ пропамокарб хидрохлорид ■ 2,4-D

От проведения сравнителен анализ пропамокарб хидрохлорид проявява най-висока степен на натрупване на гликоген в хепатоцитите, докато за липиди - пиримифос-метил. Подобно на Ayoola (2008), считаме, че измененията свързани с промяна в количеството гликоген и липиди в черния дроб на опитните индивиди могат да се дължат на промяна в процесите на гликолиза, което от своя страна зависи от приложените концентрации на токсиканта, продължителността на действие или неговата химична природа.

5. Биохимични изменения в черен дроб от обикновен шаран (*Cyprinus carpio* L.) под въздействие на изследваните пестициди

5.1. LDH

Резултатите от анализите показват понижаване на активността на LDH при всички експозиции на приложените пестициди (Фигура 23). Спрямо контролата най-значително намаляване на специфичната ензимна активност на LDH е отчетено при 50 $\mu\text{g/L}$ 2,4-D, а най-слабо – при 40 $\mu\text{g/L}$ пропамокарб хидрохлорид.

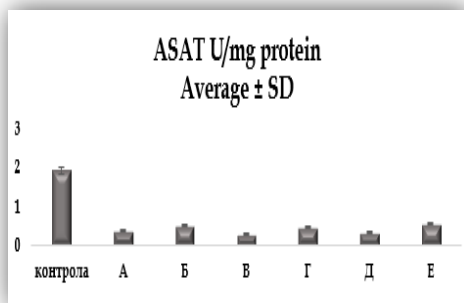


Фигура 23. Промяна в специфичната ензимна активност на LDH в черен дроб от *Cyprinus carpio* L. след 96 часова експозиция:

А – 10 $\mu\text{g/L}$ пиримифос-метил ($p < 0.05$); Б – 60 $\mu\text{g/L}$ пиримифос-метил ($p < 0.05$); В – 40 $\mu\text{g/L}$ пропамокарб хидрохлорид ($p < 0.05$); Г – 80 $\mu\text{g/L}$ пропамокарб хидрохлорид ($p < 0.05$); Д – 50 $\mu\text{g/L}$ 2,4-D ($p < 0.05$); Е – 100 $\mu\text{g/L}$ 2,4-D ($p < 0.05$)

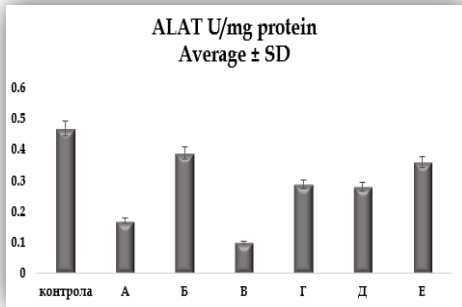
5.2. ASAT и ALAT

Спрямо контролата специфичната ензимна активност на ASAT е понижена най-значително при 40 $\mu\text{g/L}$ пропамокарб хидрохлорид, а най-слабо – при 100 $\mu\text{g/L}$ 2,4-D. Специфичната ензимна активност на ALAT е най-значително инхибирана при 40 $\mu\text{g/L}$ пропамокарб хидрохлорид, а най-слабо – при 60 $\mu\text{g/L}$ пиримифос-метил (Фигура 24, Фигура 25).



Фигура 24. Промяна в специфичната ензимна активност на ASAT в черен дроб от *Cyprinus carpio* L. след 96 часова експозиция:

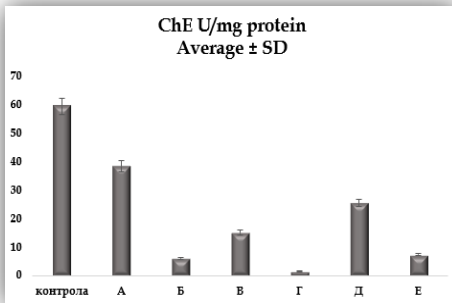
А – 10 $\mu\text{g/L}$ пиримифос-метил ($p < 0.05$); Б – 60 $\mu\text{g/L}$ пиримифос-метил ($p < 0.05$); В – 40 $\mu\text{g/L}$ пропамокарб хидрохлорид ($p < 0.05$); Г – 80 $\mu\text{g/L}$ пропамокарб хидрохлорид ($p < 0.05$); Д – 50 $\mu\text{g/L}$ 2,4-D ($p < 0.05$); Е – 100 $\mu\text{g/L}$ 2,4-D ($p < 0.05$)



Фигура 25. Промяна в специфичната ензимна активност на ALAT в черен дроб от *Cyprinus carpio* L. след 96 часова експозиция: А – 10 $\mu\text{g/L}$ пиримифос-метил ($p < 0.05$); Б – 60 $\mu\text{g/L}$ пиримифос-метил ($p < 0.05$); В – 40 $\mu\text{g/L}$ пропамокарб хидрохлорид ($p < 0.05$); Г – 80 $\mu\text{g/L}$ пропамокарб хидрохлорид ($p < 0.05$); Д – 50 $\mu\text{g/L}$ 2,4-D ($p < 0.05$); Е – 100 $\mu\text{g/L}$ 2,4-D ($p < 0.05$)

5.3. ChE

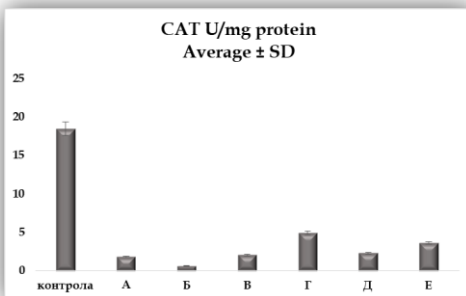
Най-силно понижение на специфичната ензимна активност се наблюдава при 80 $\mu\text{g/L}$ пропамокарб хидрохлорид, а най-слабо – при 10 $\mu\text{g/L}$ пиримифос-метил (Фигура 26).



Фигура 26. Промяна в специфичната ензимна активност на ChE в черен дроб от *Cyprinus carpio* L. след 96 часова експозиция: А – 10 $\mu\text{g/L}$ пиримифос-метил ($p < 0.05$); Б – 60 $\mu\text{g/L}$ пиримифос-метил ($p < 0.05$); В – 40 $\mu\text{g/L}$ пропамокарб хидрохлорид ($p < 0.05$); Г – 80 $\mu\text{g/L}$ пропамокарб хидрохлорид ($p < 0.05$); Д – 50 $\mu\text{g/L}$ 2,4-D ($p < 0.05$); Е – 100 $\mu\text{g/L}$ 2,4-D ($p < 0.05$)

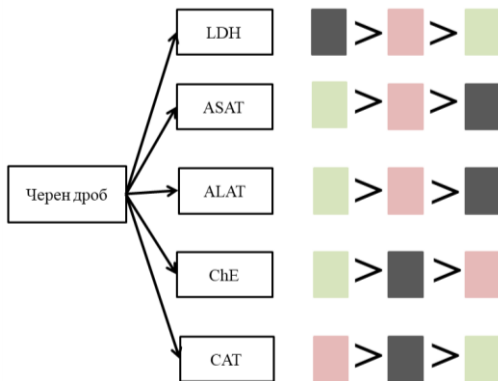
5.4. CAT

Най-силно понижение на специфичната ензимна активност се наблюдава при 60 $\mu\text{g/L}$ пиримифос-метил, а най-слабо – при 80 $\mu\text{g/L}$ пропамокарб хидрохлорид (Фигура 27).



Фигура 27. Промяна в специфичната ензимна активност на CAT в черен дроб от *Cyprinus carpio* L. след 96 часова експозиция: А – 10 $\mu\text{g/L}$ пиримифос-метил ($p < 0.05$); Б – 60 $\mu\text{g/L}$ пиримифос-метил ($p < 0.05$); В – 40 $\mu\text{g/L}$ пропамокарб хидрохлорид ($p < 0.05$); Г – 80 $\mu\text{g/L}$ пропамокарб хидрохлорид ($p < 0.05$); Д – 50 $\mu\text{g/L}$ 2,4-D ($p < 0.05$); Е – 100 $\mu\text{g/L}$ 2,4-D ($p < 0.05$)

Спрямо степента на инхибиране на специфичната ензимна активност, сравнителният анализ за степента за токсичност на опитните пестициди може да бъде обобщена в следния низходящ ред (**Фигура 28**):



Фигура 28. Сравнителен анализ на биохимичното изследване на черен дроб при обикновен шаран (*Cyprinus carpio* L.) под въздействие на приложените пестициди

■ пиримифос-метил ■ пропамокарб хидрохлорид ■ 2,4-D

Сходни на резултатите от настоящия експеримент, Abhijith et al. (2016) установяват при LDH, Rao (2006) при аминотрансферазите, Bonansea et al. (2016), Da Cunha et al. (2011), Tian et al. (2018) и Vieira et al. (2018) при ChE, Seidel et al. (2001) и Al-Ghanim et al. (2020) при CAT. В допълнение, е извършен сравнителен анализ, спрямо който е определена степента на токсичност на приложените пестициди върху специфичната ензимна активност.

IV. ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ИЗВОДИ

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В обобщение можем да заключим, че приложените пестициди пиримифос-метил, пропамокарб хидрохлорид и 2,4-D, всеки тестван с по две концентрации, които са в пъти по-ниски от LC_{50} , повлияват отрицателно на хистологичната структура на хрилете, черния дроб и бъбрека от изследваните индивиди обикновен шаран (*C. carpio* L.). Заедно с това се активират компенсаторно-адаптивни механизми в организма, което се отразява на функционалността на органите на шарана и неминуемо може да доведе до влошаване здравословното състояние на целия организъм. Наблюдава се тенденция към засилване на морфологичните изменения и степента на тяхното изявяване пропорционално на нарастващите концентрации на приложените пестициди. В допълнение, резултатите от проведеното хистохимично изследване показват, че всички тествани концентрации от приложените пестициди предизвикват промяна във въглехидратния и липидния профил на биоиндикаторния вид. Установява се намаляване на специфичната активност на проследените чернодробни ензими в различна степен, в зависимост от приложения пестицид и неговата концентрация. Измененията в активността на чернодробните ензими, подобно на другите приложени анализи, може да се използват като диагностичен маркер за въздействието на токсиканти във водни екосистеми. Спрямо данните от извършените изследвания са проведени и сравнителни анализи, осигуряващи обективна оценка за степента на проявената токсичност на пестицидите.

Резултатите от настоящото проучване за установяване на хистопатологични, хистохимични и биохимични биомаркери в *Cyprinus carpio* L. биха могли да се използват за определяне на максимално допустими концентрации на органични замърсители в биота, както и за целите на екологичния биомониторинг, прилагайки модел за оценка, базиран на корелационни зависимости между установените биомаркери.

ИЗВОДИ

1. След експозиция с пиримифос-метил, пропамокарб хидрохлорид и 2,4-D се установяват хистопатологични изменения, включващи пролиферативни и дегенеративни изменения, промени в кръвоносната система на органа и възпаление в изследваните хриле, черен дроб и бъбрек от обикновен шаран (*Cyprinus carpio L.*).

- ❖ Индексът на хистопатологични промени в хриле е най-висок при третиране с фунгицида пропамокарб хидрохлорид.
- ❖ Индексът на хистопатологични промени в черен дроб е най-висок при експозиция с хербицида 2,4-D.
- ❖ Индексът на хистопатологични изменения в бъбрек е най-висок при третиране с хербицида 2,4-D.
- ❖ При сравнение на индексите на хистопатологични промени на трите органа, се установява, че те са най-високи при хриле, следвани от черен дроб и най-ниски при бъбрек.
- ❖ Всички изменения варират по степен на изява спрямо приложените концентрации пестициди, като се наблюдава тенденция на завишаване степента на изява правопрпорционално с концентрацията на токсиканта.

2. След експозиция с пиримифос-метил, пропамокарб хидрохлорид и 2,4-D се установяват хистохимични изменения, включващи натрупване на гликоген и липиди в черен дроб от обикновен шаран (*Cyprinus carpio L.*).

- ❖ Количеството гликоген и липиди в черния дроб и при трите тествани пестицида се увеличава спрямо контролната група. Най-висока степен на натрупване на гликоген се установява при припамокарб хидрохлорид и 2,4-D, а на липиди - при инсектицида пиримифос-метил.

3. След експозиция с пиримифос-метил, пропамокарб хидрохлорид и 2,4-D се установяват биохимични изменения, включващи промяна в специфичната ензимна активност на LDH, ASAT, ALAT, ChE и CAT в черен дроб от обикновен шаран (*Cyprinus carpio L.*). Специфичната ензимна активност на LDH е най-силно инхибирана от 2,4-D, на ASAT, ALAT и ChE – от пропамокарб хидрохлорид, а на CAT – от пиримифос-метил.

4. Установените биохимични промени под влияние на опитните пестициди потвърждават наблюдаваните хистологични и хистохимични такива, което е показател за нарушение във функциите на черния дроб, свързано с процесите гликолиза, гликонеогенеза и липогенеза.

V. ПРИНОСИ

1. *С оригинален научен характер:*

1.1. Настоящото проучване за влияние на пиримифос-метил и пропамокарб хидрохлорид върху обикновен шаран (*Cyprinus carpio L.*) е първо по рода си.

1.2. Във връзка с приложените пестициди е проведено първото комплексно морфологично изследване в лабораторни условия, включващо хистопатологичен анализ на хриле, черен дроб и бъбрек, както и хистохимичен и биохимичен анализ на

черен дроб, за изясняване степента на токсичност на три активни съставки на ПРЗ върху обикновен шаран (*Cyprinus carpio* L.).

1.3. Проведеният хистохимичен анализ на черния дроб от обикновен шаран (*Cyprinus carpio* L.) за влияние на токсичността на хербицида 2,4-D е първи по рода си.

2. С потвърдителен характер:

2.1. Обикновеният шаран (*Cyprinus carpio* L.) може да бъде използван като добър биоиндикатор за замърсяване на водни екосистеми с пестициди.

2.2. Установени са хистопатологични изменения в хриле: пролиферативни – ламеларен лифтинг, едем, пролиферация на покривния епител и жлезистите клетки в него и фузия; дегенеративни в епителната тъкан на филамента и на вторичните ламели; в кръвоносната система – вазодилатация на филамента и вторичните ламели, и аневризми.

2.3. Установени са хистопатологични изменения в черен дроб: пролиферативни касаещи основно хепатоцитите – хипертрофия; дегенеративни – зърнеста, вакуолна и мастна дегенерация, некробиоза и некроза; в кръвоносната система – хиперемия; възпаление – лимфоцитна инфилтрация.

2.4. Установени са хистопатологични изменения в бъбрек: пролиферативни – хипертрофия и хиперплазия в епителните клетки на бъбречните каналчета и гломерула, задебеляване на мембраната на капсулата на Бауман, хипертрофия и едем на интерстициалната хемопоеична тъкан; дегенеративни – вакуолна и хиалинно-капчеста дегенерация на епителните клетки на бъбречните каналчета, некробиоза и некроза на бъбречните каналчета и гломерула, дилатация на капсулата на Бауман, свиване на бъбречните телца, некроза на интерстициалната тъкан; възпаление – активиране на меланомакрофаги.

2.5. Хистопатологичните и хистохимични изменения представляват компенсаторно-адаптивни механизми за преживяването на рибите в замърсена с пестициди вода.

2.6. В зависимост от концентрацията на приложените пестициди активността на чернодробните ензими в риби се променя (инхибира или активира).

3. С методичен и приложен характер:

3.1. Посочени са преимуществата на използваната скалата за определяне степента на настъпилите изменения в хистологичната структура на хрилете, черния дроб и бъбрека.

3.2. Хистопатологичният, хистохимичният и биохимичният анализи могат да послужат като инструменти за оценка на ефекта на различни токсични вещества върху биоиндикаторни видове.

3.3. Установените изменения в хриле, черен дроб и бъбрек могат да бъдат успешно приложени като биомаркери и включени в модел за оценка на замърсяване на водни екосистеми с пестициди, с цел изготвяне на адекватна нормативна база, касаеща наличието на органични замърсители във водни екосистеми.

Научни публикации:

I. Georgieva, E., Yancheva, V., Velcheva, I., Stoyanova, S., Iliev, I., Vasileva, T., Bivolarski, V., **Petkova, E.**, László, B., Nyeste, K., Antal, L. “Which one is more toxic? - Evaluation of

chlorpyrifos and cypermethrin toxic effects on selected biomarkers in common carp (*Cyprinus carpio*, Linnaeus 1758)". *Toxics*. 2021, May 31;9(6):125. doi: 10.3390/toxics9060125. IF=4.6, Q1.

2. **Kovacheva, E.**, Georgieva, E., Velcheva, I., Nikolova, M., Todorova, B., Todorova-Bambaldokova, D., Yancheva, V., Stoyanova, S., Tomov, S. „Acute histopathological changes in Common carp (*Cyprinus carpio* Linnaeus, 1785) gills: pirimiphos-methyl, 2, 4 - dichlorophenoxyacetic acid and propamocarb hydrochloride effects“. *Ecologia Balkanica*, 2022, Vol. 14, Issue 2, pp 143-159., Q4.

3. **Kovacheva, E.**, Georgieva, E., Velcheva, I., Nikolova, M., Todorova, B., Todorova-Bambaldokova, D., Yancheva, V., Stoyanova, S., Tomov, S. „Histochemical and biochemical changes in Common carp (*Cyprinus carpio* Linnaeus, 1785) liver after cypermethrin and chlorpyrifos treatment“. *Ecologia Balkanica*, 2022, Vol. 14, Issue 2, pp 123-141., Q4.

4. Georgieva, E., **Kovacheva, E.**, Yancheva, V., Velcheva, I., Hrishev, P., Atanassova, P., Tomov, S., Stoyanova, S. “Pesticides induce fatty degeneration in liver of *Cyprinus carpio* (Linnaeus 1758) after acute exposure”. *Ecologia Balkanica*, 2023, Vol. 15, Issue 2, pp 77-82., Q4.

Участие в конференции с доклад:

1. Histopathological measures in gills of Common carp, *Cyprinus carpio* (Linnaeus, 1875) after xenobiotics exposure, с автори **Eleonora Petkova**, Stela Stoyanova, Iliana Velcheva, Vesela Yancheva, Elenka Georgieva, в 5^{-та} Балканска научна конференция BalkanBio през периода 15-16 април 2021 г. в гр. Пловдив.

Участие в конференции с постери:

1. „Acute and chronic assessment of pesticide toxicity on histochemical and biochemical changes in the liver of common carp (*Cyprinus carpio* 1758, Linnaeus)“ с автори Georgieva E., Velcheva I., Yancheva V., Stoyanova S., Ivanova A., **Petkova E.**, Пиев I., Vasileva T., Bivolarski, V., представен на Международен семинар по Екология, София, 2021.

2. „Acute toxicity of pesticide exposure and histopathological changes in Common carp (*Cyprinus carpio* Linnaeus, 1785)“ с автори Elenka Georgieva, Iliana Velcheva, Vesela Yancheva, **Eleonora Petkova**, Dobrinka Todorova-Bambaldokova, Stela Stoyanova, представен на VIII Национална конференция с международно участие „Морфологични дни“, която се проведе от 10 до 12 юни 2022 г. в гр. София.

3. „Effects of microplastics (MPs) on common carp (*Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758)“ с автори Todorova-Bambaldokova, D., **Petkova, E.**, Yancheva, V., Stoyanova, S., Todorova, B., Velcheva, I., Georgieva, E., представен на Трета национална младежка конференция по Биология, проведена на 01.11.2022 г. в Пловдив, България.

4. „Histopathological effects in *Cyprinus carpio* L. gills caused by propamocarb hydrochloride fungicide“ с автори **Petkova, E.**, Todorova-Bambaldokova, D., Yancheva, V., Stoyanova, S., Todorova, B., Velcheva, I., Georgieva, E., представен на Трета национална младежка конференция по Биология, проведена на 01.11.2022 г. в Пловдив, България.

5. „Хистохимични промени в биоиндикаторния вид шаран (*Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758) под влияние на пестициди“ с автори **Ковачева, Е.**, Георгиева, Е., Стоянова, С., Янчева, В., Велчева, И., представен на XIV Национална

конференция по Медицинска биология, проведена на 02.06-04.06.2023 г. във Варна, България.

Участие в конференции с орални презентации:

1. „Multi-biomarker approach for PBDEs effects in Common carp (*Cyprinus carpio* Linnaeus, 1785)“ с автори Stoyanova, S, Velcheva, I., Yancheva, V., Todorova, B., **Petkova, E.**, Todorova-Vambaldokova, D., Georgieva, E., представена на Международен семинар по Екология, който се проведе в електронна среда в периода 29.09.-30.09. 2022г.
2. „Toxicological effects of commonly applied pesticides in Common carp (*Cyprinus carpio* Linnaeus, 1785)“ с автори Georgieva, E., Velcheva, I., Yancheva, V., Todorova, B., **Petkova, E.**, Todorova-Vambaldokova, D., Stoyanova, S., представена на Международен семинар по Екология, който се проведе в електронна среда в периода 29.09.-30.09. 2022г.

Участие в проекти:

1. **СП 19 БФ 010 (2019-2020)** Изследване *ex situ* ефекта на водно замърсяване с пестициди върху биологичния индикатор *Cyprinus carpio* (Linnaeus, 1785) чрез приложение на мулти-биомаркери. Финансиран от ФНИ при ПУ “П. Хилендарски”.
2. **МУ19-БФ-014 (2019-2020)** Оценка на въздействието на Ципеметрин и Хлопирифос върху зebroва мида (*Dressena polymorpha* Pallas, 1771) чрез приложение на комплексни биологични подходи съгласно DIRECTIVE 2013/39/EC. Финансиран от ФНИ при ПУ “П. Хилендарски”.
3. **ФП21-БФ-008 (2021-2022)** Оценка *ex situ* на замърсяване на водни екосистеми с ксенобиотици чрез прилагане на комплексни биомаркери в избрани биоиндикаторни видове. Финансиран от ФНИ при ПУ “П. Хилендарски”.

VI. ИЗПОЛЗВАНА ЛИТЕРАТУРА

- 1) Богоева, И. 2014. Пестицидите и техният увреждащ ефект върху човешкото здраве. Български медицински журнал, VIII, №2.
- 2) Abhijith, B.D., Ramesh, M., Poopal, R.K. 2016. Responses of metabolic and antioxidant enzymatic activities in gill, liver and plasma of *Catla catla* during methyl parathion exposure. J. Basic Appl. Zool., 77, 31-40.
- 3) Agrawal, A., Pandey, R. S., Sharma, B. 2010. Water pollution with special reference to pesticide. J. Water Resource Prot., 2, 432-448.
- 4) Ahmad H., Yousafzai A.M., Siraj M., Ahmad R., Ahmad I., Nadeem M.S., Ahmad W., Akbar N., Muhammad K. 2015. Pollution problem in river Kabul: accumulation estimates of heavy metals in native fish species. Biomed. Res. Int., 537368.
- 5) Al-Ghanim, K.A., Mahboob, S., Vijayaraghavan, P., Al-Misned, F.A., Kim, Y.O., Kim, H.J. 2020. Sub-lethal effect of synthetic pyrethroid pesticide on metabolic enzymes and protein profile of non-target Zebra fish, *Danio rerio*. Saudi J. Biol. Sci., 27(1), 441-447.
- 6) Al-Mamoori, A.M.J., Al-Zubaidy, F.M., Al-Rezzaq, A.J.A., Hadi, M.A., Yass, M.J. 2014. Biomarkers of Chlorfos toxicity in Common Carp *Cyprinus carpio*. J. Environ. Sci. Toxicol. Food Technol., 8(1), 109-112.
- 7) Al-Otaibi, A.M., Al-Balawi, H.F.A., Ahmad, Z., Suliman, E.M. 2019. Toxicity bioassay and sub-lethal effects of diazinon on blood profile and histology of liver, gills and kidney of catfish, *Clarias gariepinus*. Braz. J. Biol., 79(2), 326-336.
- 8) APHA. 2005. Standard methods for examination of water and wastewater, 21st Ed. Washington, American Public Health Association.
- 9) Ayoola, S.O. 2008. Histopathological effects of glyphosate on juvenile African catfish (*Clarias gariepinus*). Am. Eur. J. Agric. Environ. Sci., 4, 360-362.

- 10) Babatunde, M., Oladimeji, A.A, Rafindadi, A. 2014. Histopathological changes in the gills, livers and brains of *O. niloticus* (Trewavas) exposed to paraquat in chronic bioassay. Int. J. Sci. Technol., 4, 101-110.
- 11) Barus, V., Peaz, M., Kohlmann, K. 2001. *Cyprinus carpio* (Linnaeus, 1758). In Banarescu, P.M., Paepke, H.J., editor. The freshwater fishes of Europe, v. 5/III; *Cyprinidae* 2/III, and *Gasterosteidae*. Germany, AULA-G GmbH Wiebelsheim, 85-179.
- 12) Beers, Jr.R. and Sizer, I. 1952. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. J. Biol. Chem., 195(1), 133-140.
- 13) Bernet, D., Schmidt, H., Meier, W., Burkhardt-Holm, P., Wahli, T. 1999. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. J. Fish Dis., 22, 25-34.
- 14) Bonansea, R.I., Wunderlin, D.A., Amé, M.V. 2016. Behavioral swimming effects and acetylcholinesterase activity changes in *Jenynsia multidentata* exposed to chlorpyrifos and cypermethrin individually and in mixtures. Ecotoxicol. Environ. Saf., 129, 311-319.
- 15) Boran, H., Capkin, E., Altinok, I., Terzi, E. 2012. Assessment of acute toxicity and histopathology of the fungicide captan in rainbow trout, Exp. Toxicol. Pathol., 64, 175-179.
- 16) Bradford, M.M.A. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem., 72, 248-254.
- 17) Burtis, C.A. and Ashwood, E.R. 1994. Tietz Text-book of Clinical Chemistry. 2th Ed. W.B. Saunders Company, Philadelphia.
- 18) Cattaneo, R., Loro, V.L., Spavevello, R., Silveira, F.A., Luz, L., Miron, D.S., Fonseca, M.B., Moraes, B.S., Clasen, B. 2008. Metabolic and histological parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*) exposed to commercial formulation of 2,4- dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) herbicide, Pestic. Biochem. Physiol., 92, 133-137.
- 19) Culling, C.F.A. 1974. Handbook of histopathological and histochemical techniques, 2nd Ed. Butterworth, London, UK.
- 20) Da Cuña, R.H., Rey Vázquez, G., Piol, M.N., Guerrero, N.V., Maggese, M.C., Lo Nostro, F.L., 2011. Assessment of the acute toxicity of the organochlorine pesticide endosulfan in *Cichlasoma dimerus* (*Teleostei, Perciformes*). Ecotoxicol. Environ. Saf., 74, 1065-1073.
- 21) de Souza, R.M., Seibert, D., Quesada, H.B., de Jesus Bassetti, F., Fagundes-Klen, M.R., Bergamasco, R. 2020. Occurrence, impacts and general aspects of pesticides in surface water: a review. Process Saf. Environ. Prot., 135, 22-37.
- 22) Dehnert, G.K., Freitas, M.B., Dequattro, Z.A., Barry, T., Karasov, W.H. 2018. Effects of low, subchronic exposure of 2,4 - formulations on early life stages of fathead minnows (*Pimephales promelas*). Environ. Toxicol. Chemistry, 37, 2550-2559.
- 23) Devi, Y., Mishra, A. 2013. Histopathological alterations in gill and liver anatomy of fresh water, air breathing fish *Channa Punctatus* after pesticide Hilban® (Chlorpyrifos) treatment. Adv. Biores., 4(2), 57-62.
- 24) Donarski, W.J., Dumas, D.P., Heitmeyer, D.P., Lewis, V.E., Raushel, F.M. 1989. Structure activity relationships in the hydrolysis of substrates by the phosphotriesterase from pseudomonas-diminuta. Biochem., 28, 4650-4655.
- 25) Eleršek, T. and Filipic, M. 2011. Chapter 12: Organophosphorus pesticides - Mechanism of their toxicity. In: The Impacts of Pesticide Exposure, Stoytcheva, M. (Ed.). IntechOpen Limited, London, UK, 243-260 pp.
- 26) Ezemonye, L. and Ogbomida, T.E. 2010. Histopathological effects of Gammalin 20 on African catfish (*Clarias gariepinus*). Appl. Environ. Soil Sci., 138019.
- 27) Farhan, M., Wajid, A., Hussain, T., Jabeen, F., Ishaque, U., Iftikhar, M., Daim, M.A., Noureen, A. 2021. Investigation of oxidative stress enzymes and histological alterations in tilapia exposed to chlorpyrifos. Environ. Sci. Pollut. Res., 13105-13111.
- 28) Henley, K.S., Pollard, H.M. 1955. A new method for the determination of glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminase in plasma. J. Lab. Clin. Med., 46, 785.
- 29) Iqbal, F., Qureshi, I.Z., Ali, M. 2004. A Histopathological changes in the kidney of common carp, *Cyprinus carpio* following nitrate exposure. J. Sci. Res., 15, 411-418.
- 30) Khan, H.A.A. 2021. Variation in susceptibility to insecticides and synergistic effect of enzyme inhibitors in Pakistani strains of *Trogoderma granarium*. J. Stored Prod. Res., 91, 101775.

- 31) Kunjamma, K.P.A., Philip, B., Bhanu, S.V., Jose, J. 2008. Histopathological effects on *Oreochromis mossambicus* (Tilapia) exposed to chlorpyrifos. *J. Environ. Res. Dev.*, 2(4), 553-559.
- 32) Makinde, G.E.O., Olaifa, F.E., Banjo O.T. 2015. Acute toxicity and histopathological changes in gill and liver of catfish (*Clarias Gariepinus*) juvenile exposed to 2,4-D amine (Herbex D SI®). *J. Biol. Agr. Health.*, 5(4), 145-149.
- 33) Mishra, A.K. and Mohanty, B. 2008. Acute toxicity impacts of hexavalent chromium on behavior and histopathology of gill, kidney and liver of the freshwater fish, *Channa punctatus* (Bloch), *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 26, 136-141.
- 34) Mostakim, G.M., Zahangir, Md, M., Mishu, M.M., Rahman, Md K., Islam, M.S. 2015. Alteration of blood parameters and histoarchitecture of liver and kidney of silver barb after chronic exposure to Quinalphos. *J. Toxicol*, 415984.
- 35) Nagaraju, B. and Rathnamma, V. 2014. Histopathological changes in the gill and liver of freshwater fish *Labeo rohita* (Hamilton) exposed to Novaluron. *Innoriginal Int. J. Sci.*, 1(1), 16-18.
- 36) Okogwu, O., Anionwo, Q., Anoke, D.C., Ugwuezi, PO. 2016. Behavioural, haematological and histopathological changes in the african catfish, *Clarias gariepinus* exposed to 2,4- dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D). *Nigerian J. Biotechnol.*, 30, 26.
- 37) Ortiz Juan, B., Gonzalez de Canales, M.L., Sarasquete, C. 2003. Histopathological changes induced by lindane (γ -HCH) in various organs of fish. *Scientia Marina*, 67(1), 53-61.
- 38) Pearse, A.G.E. 1972. *Histochemistry: Theoretical and Applied*, 3rd Ed. Churchill Livingstone, London, 1518.
- 39) Pérez-Parada, A., Goyenola, G., de Mello, F.T., Heinzen, H. 2018. Recent advances and open questions around pesticide dynamics and effects on freshwater fishes. *Curr. Opin. Environ. Sci. Health*, 4, 38-44.
- 40) Pipkin, F.B. 1984. *Medical statistics made easy*. Churchill Livingstone, Edinburgh London Melpourne and New York, 137 pp.
- 41) Rao, V.J. 2006. Sublethal effects of an organophosphorus insecticide (RPR-II) on biochemical parameters of tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Comp. Biochem. Physiol. Part C*, 143(4), 492-498.
- 42) Reitman, S. and Frankel, S. 1957. A colorimetric method for determination of serum glutamic oxaloacetic and glutamic pyruvic transaminases. *Am. Clin. Pathol.*, 28, 56-63.
- 43) Rizzo, G., Monzon, J.P., Ernst, O. 2021. Cropping system-imposed yield gap: proof of concept on soybean cropping systems in Uruguay. *Field Crop Res.*, 260, 107944.
- 44) Rocha, T.L., Rezende dos Santos, A.P., Yamadab, A.T., de Almeida Soares, C.M., Borgesc, C. L., Bailão, A. M., Sabóia-Morais, S. M. T. 2015. Proteomic and histopathological response in the gills of *Poecilia reticulata* exposed to glyphosate-based herbicide. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 4, 175-186.
- 45) Romeis, B. 1989. *Mikroskopische technik*. München: Urban und Schwarzenberg, p. 697. Radic, Z., Taylor, P. 2006. Structure and function of cholinesterases. *Toxicol. Organophosphat. Carbamate Comp.*, 1, 161-186.
- 46) Rosseland, B.O., Massabuau, J.C., Grimalt, J., Hofer, R., Lackner, R., Raddum, G., Rognerud, S., Vives, I. 2003. Fish ecotoxicology: European mountain lake ecosystems regionalisation, diagnostic and socio-economic evaluation (EMERGE). *Fish sampling manual for live fish*. Norwegian Institute for Water Research (NIVA), Oslo, 8.
- 47) Sachi, T.C., Bonomo, M.M., Sakuragui, M.M., Modena, P.Z., Paulino, M.G., Carlos, R.M., Fernandes, J.B., Fernandes, M.N. 2021. Biochemical and morphological biomarker responses in the gills of a Neotropical fish exposed to a new flavonoid metal-insecticide. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 208, 111459.
- 48) Saraiva, A., Costa, J., Serrão, J., Cruz, C., Eiras, J.C. 2015. A histology-based fish health assessment of farmed seabass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Aquacult.*, 448, 375-381.
- 49) Scholz, N., Fleishman, E., Brooks, M., Mitchelmore, C., Werner, I., Johnson, M., Schlenk, D., Brown, L. 2012. A perspective on modern pesticides, pelagic fish declines, and unknown ecological resilience in highly managed ecosystems. *BioScience*, 62, 428-434.
- 50) Seidel, E.R., Ragan, V., Liu, L. 2001. Peroxynitrite inhibits the activity of ornithine decarboxylase. *Life Sci*, 68, 1477-1483.
- 51) Sharma, A., Kumar, V., Shahzad, B., Tanveer, M., Sidhu, G.P.S., Handa, N., Thukral, A.K. 2019. Worldwide pesticide usage and its impacts on ecosystem. *SN Appl.Sci.*, 11, 1-16.

- 52) Sharmin, S., Islam, T., Sadat, A., Jannat, R., Alam, R., Shahjahan, M. 2021. Sumithion induced structural erythrocyte alteration and damage to the liver and kidney of Nile tilapia. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 28, 36695-36706.
- 53) Sheehan, D.C. and Hrapcjak, B.B. 1980. *Theory and Practice Histotechnology*, 2nd Ed. CV Mosby, St. Louis, (MO), 52, 14-167.
- 54) Sjerps, R.M., Kooij, P.J., van Loon, A., Van Wezel, A.P. 2019. Occurrence of pesticides in Dutch drinking water sources. *Chemosphere*, 235, 510-518.
- 55) Souza-Bastos L.R., Bastos L.P., Carneiro P.C.F., Guiloski I.C., de Assis H.C.S., Padial, A.A., Freire, C.A. 2017. Evaluation of the water quality of the upper reaches of the main Southern Brazil river (Iguaçu river) through in situ exposure of the native siluriform *Rhamdia quelen* in cages. *Environ. Pollut.*, 231, 1245-1255.
- 56) Subburaj, A., Jawahar, P., Jayakumar, N., Srinivasan, A., Ahilan, B. 2020. Effects of acute toxicity of chlorpyrifos (EC 50%) and associated histological alterations in gills, liver and kidney of Mozambique tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Indian J. Anim. Res.*, 1-8.
- 57) Syafrudin, M., Kristanti, R.A., Yuniarto, A., Hadibarata, T., Rhee, J., Al-Onazi, W.A., AlMohaimed, A.M. 2021. Pesticides in drinking water-a review. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 18 (2), 468.
- 58) Tang, F.H.M., Lenzen, M., McBratney, A., Maggi, F. 2021. Risk of pesticide pollution at the global scale. *Nat. Geosci.*, 14, 206-210.
- 59) Tian, X., Yang, W., Wang, D., Zhao, Y., Yao, R., Ma, L., Ge, C., Li, X., Huang, Z., He, L., Jiao, W., Lin, A. 2018. Chronic brain toxicity response of juvenile Chinese rare minnows (*Gobiocypris rarus*) to the neonicotinoid insecticides imidacloprid and nitenpyram. *Chemosphere*, 210, 1006-1012.
- 60) USEPA. 1995. U.S. Environmental Protection Agency. Propamocarb Hydrochloride R.E.D. FACTS - Prevention, Pesticides and Toxic Substances (7508W).
- 61) Vassault, A. 1983. Lactate dehydrogenase, In: *Methods of Enzymatic Analysis, Enzymes: Oxidoreductases, Transferases*, Bergmeyer M.O. (Ed.). Academic Press, New York.
- 62) Vieira, C.E.D., Pérez, M.R., Acayaba, R.D., Raimundo, C.C.M., dos Reis Martinez, C.B. 2018. DNA damage and oxidative stress induced by imidacloprid exposure in different tissues of the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Chemosphere*, 195, 125-134.
- 63) Vigario, A.F., Saboia-Morais, S.M.T. 2014. Effects of the 2,4-D herbicide on gills epithelia and liver of the fish *Poecilia vivipara*. *Pesq. Vet. Bras.*, 34(6), 523-528.
- 64) Wroblewski, F., Ladue, J.S. 1956. Serum glutamic pyruvic transaminase in cardiac and hepatic disease. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 91, 569-571.
- 65) Xing, H., Li, S., Wang, Z., Gao, X., Xu, S., Wang, X. 2012. Oxidative stress response and histopathological changes due to atrazine and chlorpyrifos exposure in common carp. *Pest. Biochem. Physiol.*, 103, 74-80.
- 66) Yön, N.D., Akbulut, C., Abar, M., Kayhan, F.E., Kaymak, G. 2014. Histological changes in the liver of the Swordtail fish, *Xiphophorus helleri* (*Pisces: Poeciliidae*) after exposure to Deltamethrin. *Eur. Int. J. Appl. Sci. Technol.*, 1(3), 27-38.
- 67) Zaller, J.G. 2020. *Daily Poison. Pesticides - An Underestimated Danger*. Springer Nature, Cham, Switzerland.
- 68) Zimmerli, S., Bernet, D., Burkhardt-Holm, P., Schmidt-Posthaus, H., Vonlanthen, P., Wahli, T., Segner, H. 2007. Assessment of fish health status in four Swiss rivers showing a decline of brown trout catches. *Aquat. Sci.*, 69, 11-25.
- 69) Pieroh, E.A., Krass, W., Hemmen, C. 1978. Propamocarb, einneues Fungizid zur Abwehr von Oomyceten im Zierpflanzen- und Gemüsebau. *Meded. Fac. Landbouww. Rijksuniv. Gent*, 43, 933-942.
- 70) Wang, Z., Jiang, Y., Peng, X., Xu, S., Zhang, H., Gao, J., Xi, Z. 2016. Exogenous 24-epibrassinolide regulates antioxidant and pesticide detoxification systems in grapevine after chlorothalonil treatment. *Plant Growth Regul.*, 81, 455-466.
- 71) Li, C., Sun, H., Juhasz, A.L., Cui, X., Ma, L.Q. 2016. Predicting the relative bioavailability of DDT and its metabolites in historically contaminated soils using a tenaximproved physiologically based extraction test (TI-PBET). *Environ. Sci. Technol.*, 50, 1118-1125.
- 72) McManus, J.F.A. 1948. Histological and histochemical uses of periodic acid. *Stain Techn.*, 23, 99-108.