



***Oreochromis niloticus*'un Dalak Dokusunda Diazinon'un Neden Olduğu Değişikliklerin Histopatolojik Olarak İncelenmesi**

Pelin UĞURLU^{1*}, Elif İpek SATAR² ve Tarık ÇİÇEK³

¹Dicle Ünivertesi Bilim ve Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi, 21280, Sur, Diyarbakır

²Eczacılık Fakültesi, Dicle Üniversitesi, 21280-Diyarbakır, Türkiye

³Biyoloji Bölümü, Fen Fakültesi, Dicle Üniversitesi, 21280-Diyarbakır, Türkiye

*(peлин.ugurlu@dicle.edu.tr) Başlıca yazarın mail adresi

Özet –Su ortamlarında, balıklar genellikle çevre kirliliğinin su ekosistemleri üzerindeki etkilerini değerlendirmek için tercih edilen organizmalar olarak kabul edilir. Histolojik inceleme; kirleticilere maruz kalmanın bir indikatörü olarak, özellikle subletal ve kronik etkiler için kirlilik derecesini değerlendirmede yararlı bir yöntemdir, çünkü pestisitlerin eser seviyeleri, verilen bir periyotta hayvanın ölümüne neden olmaz, fakat bu seviyeler, organlarda önemli zararlar meydana getirme etkisinde olabilirler. Fonksiyonlardaki değişiklikler hücresel seviye ve dokulardaki değişikliklerle başlatılır. Su ekosistemlerinde meydana gelen bir kirlenmeyi belirlemek için örnek canlılarda yapılacak histolojik incelemeler, o ekosistemin sağlığı açısından bize yararlı bilgiler sunabilir. Balık türlerinde dalak birincil lenfoid organlardan biridir ve ayrıca kan hücrelerinin oluşumu ve antijenlerin depolanması açısından en önemli organdır. Ayrıca balıklardaki hastalıklara ve kirleticilere karşı oluşan savunma mekanizmasıyla da bağlantılıdır. Bu çalışmada, ışık mikroskobu ile diazinon standardının subletal konsantrasyonuna maruz bırakılan *Oreochromis niloticus*'un dalak dokusunda maruziyet süresine bağlı olarak histopatolojik değişikliklerin belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışmanın ilk aşamasında balıklar 21 gün süreyle 280 µg/L (LC50/10) diazinona maruz bırakılmıştır. Daha sonra 7., 14. ve 21. günlerde dalak dokusunda meydana gelen histopatolojik değişiklikler ışık mikroskobu ile incelenmiştir. Histopatolojik inceleme sonucunda dalak dokusunda melanomakrofaj merkezleri, piknoz, hipertrofi ve nekroz saptanmıştır. Bu değişikliklerin şiddeti, maruz kalma süresiyle birlikte artmıştır. Bu sonuçlara göre, diazinon'un *Oreochromis niloticus*'un dalak dokusunda çevresel kontaminasyonun immünotoksik biyobelirteçleri olarak kullanılabilir histopatolojik değişikliklere neden olduğu varsayılabilir.

Anahtar Kelimeler – Histopatoloji, Dalak, *Oreochromis Niloticus*, Diazinon, İmmünotoksik Değişiklikler

I. GİRİŞ

Dünyada yaygın olarak kullanılan pestisitler, tarımsal verimliliğin artırılmasında önemli rol oynamaktadır. Ancak bilinçsiz pestisit kullanımı sonucunda insan, hava, su, toprak ve yaban hayatı olumsuz etkilenmekte, hedef organizmalarda direnç oluşmakta, faydalı organizmalar öldürülerek doğal denge bozulmakta ve bitkilerde fitotoksikite görülmektedir [1]. Tarımsal alanlarda kullanılan pestisitler, pestisit uygulanmış toprak yüzeylerinin

yağmur veya sulama suları ile yıkanması veya atmosferdeki kontamine katı ve sıvı partiküller yoluyla tatlı su kaynaklarına ulaşmaktadır [2]. Bu kirli su ortamlarında yaşayan organizmalar bu pestisitlere maruz kalmakta ve akut ya da kronik olarak etkilenmektedir [3]. Bu nedenle doğal ortamları kirleten bu kirleticilerin o ortamlarda yaşayan organizmalar üzerindeki olası etkilerini bilmeliyiz.

Organik fosforlu (OP) insektisitler, 1940'ların ortalarından beri kullanılan en önemli ve yaygın insektisit sınıfını oluşturmaktadır [4]. Bu insektisit grubunun organizmadaki birincil hedefi asetilkolin esteraz (AChE) enzimleridir [5], [6] ve AChE'yi geri dönüşümsüz olarak inhibe ederler [7]. Diazinon (DZN) [O,O-dietil-O-(2-izopropil-6-metilpirimidin-4-pirimidinil) fosforotioat] en yaygın kullanılan OP insektisitlerinden biridir ve birçok ekini çok çeşitli hymenopteran ve hemipteran böceklerden korumak için kullanılır [8]. Tarımsal uygulamadan sonra, DZN kolayca yıkanıp yüzey suyu rezervuarlarına ulaşabilir, böylece omurgasızlar ve balıklar dahil olmak üzere çok çeşitli hedef dışı akuatik canlıyı etkileyebilir [9]. *Oreochromis niloticus* için DZN'nin 96 saatlik LC₅₀ değeri, El-Sherif ve arkadaşları [10] tarafından 2800 µg/L olarak bildirilmiştir.

Balıklar, besin ağında önemli rol oynamaları, toksik bileşikler biriktirmeleri ve düşük dozlarda bile mutajenlere yanıt vermeleri nedeniyle ekotoksikolojik çalışmalarda ilk tercih edilen organizmalardan biridir [11]. *Oreochromis niloticus* (Linnaeus 1758), kültür koşullarında bakıma uygunlukları, yüksek üreme kapasiteleri, kirliliğe ve çeşitli hastalıklara karşı güçlü dirençleri nedeniyle iyi biyolojik modeller olarak bilinen en önemli balık gruplarından birine aittir [12].

Balıklarda bağışıklık sistemi organlar, hücresel yapılar ve hümorale (sıvı) faktörlerden oluşur. Bağışıklık sistemini oluşturan organlar lenfoid organlar olarak da bilinmektedir [13]. Balık türlerinde dalak birincil lenfoid organlardan biridir [14] ve ayrıca kan hücrelerinin oluşumu ve antijenlerin depolanması açısından en önemli organdır [15]. Ayrıca balıklardaki hastalıklara ve kirleticilere karşı oluşan savunma mekanizmasıyla da bağlantılıdır [16]. Literatürde pestisitlerin balık türlerinin dalaklarında toksikolojik değişikliklere neden olduğuna dair çalışmalar mevcuttur [17], [18], [19], [20].

Kirleticilere maruz kalmanın bir göstergesi olarak histolojik inceleme, özellikle subletal ve kronik etkiler açısından kirliliğin derecesini değerlendirmek için yararlı bir yöntemdir [21]. Ayrıca, bir organizmanın sağlık durumu hakkında bütünleştirici parametreler olarak, tek bir biyokimyasal tepkinin değerlendirilmesinden daha fazla bilgi sağlarlar [22].

Bu çalışmada, ışık mikroskobu ile DZN standardının belirli konsantrasyonuna maruz

bırakılan *O. niloticus* örneklerinin dalak yapısındaki subkronik olası histopatolojik ve değişikliklerin belirlenmesi amaçlanmıştır.

II. MATERYAL VE YÖNTEM

A. *O. niloticus* Örneklerinin Elde Edilmesi, Bakımı ve Deney Tasarımı

Sağlıklı ergin *O. niloticus* örnekleri Çukurova Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi üreme havuzlarından temin edilmiştir. Balıklar fenoksietanol (200 mg/l) ile uyuşturulmuş ve Dicle Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, Fen Fakültesi, Hidrobiyoloji ve Su Toksikolojisi Araştırma Laboratuvarına getirilmiştir.

O. niloticus örnekleri, içinde klorsuz musluk suyu bulunan ve balıklar için özel olarak yapılmış iklimlendirme kabininde merkezi havalandırma sistemi ile havalandırılan 6 adet cam akvaryuma (40×35×40 cm) alınmıştır. Akvaryumlar her akvaryumda 25 adet *O. niloticus* örneği olacak şekilde ayarlanmıştır. Balıklar, deneylerden önce 15 gün boyunca laboratuvar koşullarına alıştırmıştır. İklimlendirme süresi ve deneyler boyunca balıklar 26±1 °C sıcaklıkta suni ışık rejimi (14 saat aydınlık: 10 saat karanlık) altında tutulmuş ve günlük olarak ticari peletlerle beslenmiştir. Her akvaryum suyunun yaklaşık %50'si günlük olarak klorsuz musluk suyuyla değiştirilmiştir.

Çalışma için DZN'nin analitik standardı (SIGMA-ALDRICH®'den PESTANAL®, CAS Numarası: 333-41-5) kullanılmıştır. Balık ölümlerini önlemek ve aynı zamanda patolojik lezyonlara neden olmak için, *O. niloticus* için daha önce bildirilen DZN'nin [10] LC₅₀ değerinin 1/10'u subletal konsantrasyon olarak seçilmiş, asetonda çözüldükten sonra ve akvaryumdaki suyun litresine göre uygulanmıştır. Test tasarımı static-renewal olarak seçilmiştir. Grup başına üç tekrarı her birinden her iki cinsiyetten 15 sağlıklı yetişkin *O. niloticus* örneği kullanılmıştır. Test süresi 21 gündü. Test grupları kontrol (Grup I), aseton kontrol (Grup II) ve deney (280 µg/L DZN standardı) (Grup III) grupları olarak belirlenmiştir. Aseton kontrol grubu için, deney grubu çözültisindeki aseton konsantrasyonu litre başına uygulanmıştır. Çalışmamız Dicle Üniversitesi Deney Hayvanları Yerel Etik Kurulu tarafından onaylanmış (Protokol numarası: 2013/43) ve deneyler sırasında Avrupa Birliği Hayvan

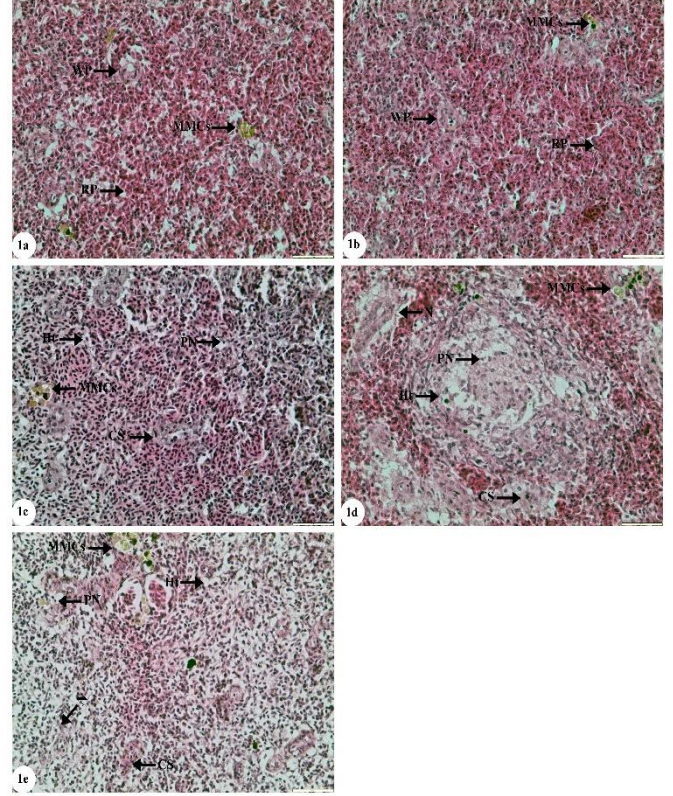
Deneylemi Direktifi 2010/63/EU yönergelerine uyulmuştur

B. Histopatolojik Analiz

Deneylemlerin 7., 14. ve 21. günlerinde 3 tekrarlı olarak her bir uygulama ve kontrol grubundan rastgele 5'er balık alınmıştır. Balıklar hemen dekapitasyon ile sakrifiye edilmiştir. Dalak örnekleri alınmış ve hemen +25 °C'de 24 saat süreyle %10 formalin solüsyonunda fikse edilmiştir. Fiksasyon sonrası fiksatifin dokudan uzaklaştırılması için örnekler 1 gece boyunca akan musluk suyu altında yıkanmıştır. Daha sonra örnekler artan etanol konsantrasyonunda (%30, 50, 70, 80, 90, 96 ve 100) dehidre edilmiştir. Daha sonra örnekler ksilen ile saydamlaştırılarak parafine gömüldü. Elde edilen parafin bloklardan mikrotom (LEICA) ile 5 µm kalınlığında kesitler alınmıştır. Kesitler alındıktan sonra preparatlar Hematoksilen-Eosin (Gurr 1972) ile boyanmış ve ışık mikroskopunda (Nikon NIS-Elements ECLIPS SE80i) incelenmiştir. Histopatolojik değişiklikler mikroskoba bağlı kamera (Nikon Digital SIGHT-DS2MV) ile fotoğraflanmıştır.

III. BULGULAR

Çalışmalar süresince kontrol ve deney grubunda balık ölümleri olmamıştır. 21 gün boyunca kontrol ve aseton kontrol gruplarında bulunan (Grup I ve II) *O. niloticus* örneklerinin dalak dokusunda herhangi bir histopatolojik değişikliğe rastlanmamıştır (Şekil 1a ve 1b). Ayrıca balıkların cinsiyetinin çalışmanın sonuçları üzerinde herhangi bir etkisi olmamıştır. 280 µg/L DZN konsantrasyonuna 7 gün maruz bırakılan balıkların dalak dokusunda hafif bulutlu şişme, piknoz ve hipertrofi kaydedilmiştir. Dokularda birkaç melanomakrofaj merkezi (MMC) tespit edilmiştir (Şekil 1c). Maruziyetin 14. gününde histopatolojik değişikliklerin şiddeti paralel olarak artmıştır. Bu dönemde balığın dalak dokusunda nekrotik alanlar görülmeye başlamıştır. Aynı zamanda piknotik çekirdekli hücre sayısı artmış ve bulanık şişme belirginleşmiştir (Şekil 1d). Hipertrofinin şiddeti ve MMC sayısı da artmıştır. 21 gün sonunda dalak dokusunda en belirgin histopatolojik değişiklikler doku boyunca yayılan nekroz ve bulutlu şişme olarak kaydedilmiştir. Bugünde piknotik çekirdeklerin ve MMC'lerin sayısı en yüksek olarak belirlenmiştir (Şekil 1e).



Şekil 1. *O. niloticus*'un dalak dokusunda 280 µg/L DZN'nin 21 gün süreyle oluşturduğu histopatolojik değişiklikler: a) Kontrol grubu (Grup I) 21. gün dalak dokusu: Beyaz pulpa (WP), Kırmızı pulpa (RP), Melanomakrofaj merkezleri (MMC'ler); b) Aseton kontrol grubunun (Grup II) 21. gün dalak dokusu: Beyaz pulpa (WP), Kırmızı pulpa (RP), Melanomakrofaj merkezleri (MMC'ler); c) 280 µg/L DZN'ye 7 gün maruz kalan *O. niloticus*'un dalak dokusundaki histopatolojik değişiklikler: Hipertrofi (Ht), Piknotik çekirdek (PN), Melanomakrofaj merkezleri (MMC'ler), Bulutlu şişme (CS); d) 280 µg/L DZN'ye 14 gün maruz kalan *O. niloticus*'un dalak dokusundaki histopatolojik değişiklikler: Hipertrofi (Ht), Piknotik çekirdek (PN), Melanomakrofaj merkezleri (MMC'ler), Bulutlu şişme (CS), Nekroz (N) e) 21. günde 280 µg/L DZN'ye maruz kalan *O. niloticus*'un dalak dokusundaki histopatolojik değişiklikler: Hipertrofi (Ht), Piknotik çekirdek (PN), Melanomakrofaj merkezleri (MMC'ler), Nekroz (N), H&E, x400

IV. TARTIŞMA

Çevre kirliliğinin etkisi altındaki balıklar, bağışıklık sistemi aktivitesi veya spesifik olmayan savunma sistemleri yoluyla bu kirliliğe uyum sağlamaya çalışır. Balıklarda bağışıklık sistemi organlar, hücresel yapılar ve hümorale (sıvı) faktörlerden oluşur. Bağışıklık sistemini oluşturan organlara lenfoid organlar da denir. Balıklardaki lenfoid organlar birincil ve ikincil olmak üzere iki gruba ayrılır. Birincil lenfoid organlar timus, böbrekler ve dalak iken, ikincil lenfoid organlar bağırsaklar, fiziksel bariyerler (deri, solungaç) ve karaciğerdir [22], [14], [24]. Son çalışmalar, bu

organların histolojik bulgularının, su kalitesi değişikliklerinin balıklarda neden olduğu fizyolojik stresi belirlemek için biyobelirteç parametreler olarak kullanılabileceğini göstermiştir [25], [26].

Balık dalağında beyaz pulpa proliferasyonu, lenfosit sayısında azalma, dalak boyutunda artış, hemosideroz ve melanomakrofaj merkezlerinde artış gibi patolojik değişikliklerin genellikle çevresel kontaminasyonun bir sonucu olduğu düşünülmektedir [27], [28]. Çalışmamızın 7. ve 14. Günlerinde DZN'ye maruz kalan dalak dokusunun boyutunun artmasına neden olabilecek bulutlu şişme ve hipertrofi (Şekil 1c ve 1d) görülmüştür. Balıklarda dalak hücrelerinin boyut-sayısındaki artış ve buna karşılık gelen dalak ağırlığındaki artış, genellikle bağışıklık sisteminde ksenobiyotik kaynaklı değişiklikleri ve ksenobiyotiklere proliferatif bir yanıtı yansıtır [29]. Akut hücre şişmesi, lipid peroksidasyonunun neden olduğu hücre zarı hasarına, ksenobiyotiklerin (pestisitler gibi) hücre zarına doğrudan bağlanmasına, iyon kanallarının hasar görmesine ve hücre zarına transmembran gözenek oluşturucu komplekslerin eklenmesine bir yanıt olarak kabul edilebilir [30]. Çalışmanın 21. gününde dalak dokusunda en belirgin histopatolojik değişiklik dokunun geneline yayılan nekroz olmuştur (Şekil 1e). Literatürde pestisitlerin balık türlerinin dalak dokularında nekrotik değişikliklere neden olduğuna dair çalışmalar bulunmaktadır [31], [32], [33]. Bu çalışmalar doğrultusunda çalışmamızın 21. gününde dalak dokusunda yaygın nekroz saptanmıştır. Çalışma süresine paralel olarak piknotik çekirdek sayısı da artış göstermiştir. Piknozis, hem apoptotik hem de nekrotik hücre ölümünde gözlenen kromatin ve çekirdeklerin geri dönüşümsüz yoğunlaşması olarak tanımlanabilir [34]. Bu bağlamda piknoz, pestisitler gibi çevresel toksik maddelere maruz kalan dokularda nekrotik hücre ölümünün erken bir belirtisi olarak değerlendirilebilir.

Bağışıklık sisteminin hücresel faktörlerinden biri olan makrofajlar, balık ve diğer omurgalılarda doğuştan gelen bağışıklığın indikatör hücreleridir [14]. Poikilotherm organizmalarındaki makrofajlar, pigmentli makrofajlar veya melanomakrofaj merkezleri (MMC'ler) olarak adlandırılan hücreler ile kümeler oluşturur. Pigmentasyonları nedeniyle histolojik incelemelerde makrofajlardan ayırt edilebilen MMA, poikilotherm omurgalıların birçok organında da yaygın olarak gözlenebilir [35], [36].

Balıkların kötü sağlık koşullarında, stres altında ve çevresel kirleticilere tepki olarak makrofajların sayısı, boyutu ve pigment içerikleri değişmektedir. MMC'lerin boyutu, sayısı ve histopatolojik görünümü ile kemotaksis, fagositoz, pinositoz ve kemilüminesans gibi makrofaj aktivitelerinin seviyeleri, özellikle çevresel kirleticilerin etkisinin belirlenmesinde ve bakteriyolojik enfeksiyonlarda immünolojik biyobelirteçler arasında önemli parametreler olarak kabul edilmektedir [37], [38], [39].

V. SONUÇLAR

Bu çalışmanın sonuçları, sub-letal DZN konsantrasyonunun *O. niloticus*'un dalak dokusunda histopatolojik değişikliklere neden olduğunu göstermiştir. Bu değişikliklerin şiddeti, maruz kalma süresiyle birlikte artmıştır. Balık dalağındaki değişikliklerin histopatolojik değerlendirmesi çevresel bir kirleticinin immünotoksikolojik etkisinin belirlenmesinde uygun biyobelirteç olarak önerilebilir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından desteklenmiştir [Proje No:114Z730].

KAYNAKLAR

- [1] Yıldırım E. (2008) Tarımsal Zararlılarla Mücadele Yöntemleri ve İlaçlar, Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Ofset Tesisi, Erzurum.
- [2] Cengiz EI (2006) Gill and kidney histopathology in the freshwater fish *Cyprinus carpio* after acute exposure to delamethrin. *Environ Toxicol Pharm* 22(2):200–204. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2006.03.006>.
- [3] Leight AK, Van Dolah RF (1999) Acute toxicity of the insecticides endosulfan, chlorpyrifos and malathion to the epibenthic estuarine amphipod *Gammarus palustris* (Bousfield). *Environ Toxicol Chem* 18(5):958-964. <https://doi.org/10.1002/etc.5620180521>.
- [4] Gültekin F, Delibas N, Yasar S, Kılınç I (2001) In vivo changes in antioxidant systems and protective role of melatonin and a combination of Vitamin C and Vitamin E on oxidative damage in erythrocytes induced by chlorpyrifos-ethyl in Rat. *Arch Toxicol* 75:88-96. <https://doi.org/10.1007/s002040100219>.
- [5] Hazarika A, Sankar AN, Hajare S, Kataria M, Malik JK (2003) Influence of malathion pretreatment on toxicity of anilofos in male rats: a biochemical interaction study. *Toxicology* 185:1-8. [https://doi.org/10.1016/s0300-483x\(02\)00574-7](https://doi.org/10.1016/s0300-483x(02)00574-7).
- [6] Kaur R, Sandhu HS (2008) In vivo changes in antioxidant system and protective role of selenium in chlorpyrifos-induced subchronic toxicity in *Bubalus*

- bubalis. *Environ Toxicol Pharmacol* 26:45-48. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2008.01.004>
- [7] Giordano G, Afsharinejad Z, Guizzetti M, Vitalone A, Kavanagh JT, Costa GL (2007) Organophosphorus insecticides chlorpyrifos and diazinon and oxidative stress in neuronal cells in a genetic model of glutathione deficiency. *Toxicol Appl Pharmacol* 219:181-189. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2006.09.016>.
- [8] Abass A, Kudi AC, Moodi AJ (2011) Spontaneous reactivation and aging kinetics of acetylcholinesterase inhibited by dichlorvos and diazinon. *J Toxicol Sci* 36: 237–241. <https://doi.org/10.2131/jts.36.237>.
- [9] Rauf A, Arain, N (2013) Acute toxicity of diazinon and its effects on hematological parameters in the Indian carp, *Cirrhinus mrigala* (Hamilton). *Turk J Vet Anim Sci* 37: 535-540. <https://doi.org/10.3906/vet-1212-39>.
- [10] El-Sherif MS, Ahmed MT, El-Danasoury MA, El-Nwish NHK (2009) Evaluation of diazinon toxicity on Nile tilapia fish (*O. niloticus*). *J Fish Aquat Sci* 4(4):169-177. <https://doi.org/10.3923/jfas.2009.169.177>
- [11] Cavas S, Ergene-Gözükara S (2005) Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in *Oreochromis niloticus* following exposure to petroleum refinery and chromium processing plant effluents. *Aquat Toxicol* 74:264-271. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2005.06.001>.
- [12] Almedia JA, Diniz YS, Marques SFG, Faine LA, Ribas BO, Burneiko RC, Novelli ELB (2002) The use of the oxidative stress responses as biomarkers in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to in vivo cadmium contamination. *Environ Int* 27(8):673-679. [https://doi.org/10.1016/s0160-4120\(01\)00127-1](https://doi.org/10.1016/s0160-4120(01)00127-1).
- [13] Dönmez AE (2016) Melanomacrophage centers in fishes. *EgeJFAS* 33(1):81-87.
- [14] Ocak F (2006) Lenfoid organs and the properties of immune system in fish (in Turkish with English abstract). *Journal of Faculty of Veterinary Medicine, Erciyes University* 3(1):61-66.
- [15] Lawrence AJ, Hemingway KL (2003) Effects of Pollution on Fish. UK. 144-153.
- [16] Sundaresan M (2014) Ultrastructure of spleen in the freshwater fish, *Tilapia mossambica* (Peters). *European Academic Research* 2(2):2894-2908.
- [17] Li XY, Liu L, Zhang YN, Fang Q, Li YY, Li YL (2013) Toxic effects of chlorpyrifos on lysozyme activities, the contents of complement C3 and IgM, and IgM and complement C3 expressions in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Chemosphere*, 93(2):428-433. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.05.023>
- [18] Ma JG, Li YY, Niu DC, Li Y, Li XY (2014) Immunological effects of paraquat on common carp, *Cyprinus carpio* L. *Fish Shellfish Immunol* 37(1):166-172. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.01.015>
- [19] Ma JG, Li XY (2015) Transcription alteration of immunologic parameters and histopathological damage in common carp (*Cyprinus carpio* L.) caused by paraquat. *J Biochem Mol Toxicol* 29(1):21-28. <https://doi.org/10.1002/jbt.21602>
- [20] Díaz-Resendiz KJG, Ortiz-Lazareno PC, Covantes-Rosales CE, Trujillo-Lepe AM, Toledo-Ibarra GA, Ventura-Ramón GH, Girón-Pérez MI (2019) Effect of diazinon, an organophosphate pesticide, on signal transduction and death induction in mononuclear cells of Nile tilapia fish (*Oreochromis niloticus*). *Fish Shellfish Immunol* 89, 12–17. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.03.036>
- [21] 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(1):25-35. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.1999.00134.x>
- [22] Segner H, Braunbeck T (1998) Cellular response profile to chemical stress. In: Schuurmann G, Markert B (ed) *Ecotoxicology: Ecological Fundamentals, Chemical Exposure, and Biological Effects*. Wiley-Liss, New York, USA, pp 521-569.
- [23] Zapata A, Diez B, Cejalvo T, Gutierrez-de Frias C, Corte A (2006) Ontogeny of the immune system of fish. *Fish Shellfish Immunol* 20:126-136. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2004.09.005>
- [24] Uribe C, Folch H, Enriquez R, Moran G (2011) Innate and adaptive immunity in teleost fish: a review. *Vet Med* 56(10):486-503.
- [25] Osman AGM, Abd-El Reheem AM, AbuelFadl KY, GadEl- Rab AG (2010) Enzymatic and histopathologic biomarkers as indicators of aquatic pollution in fishes. *Natural Science* 2(11):1302-1311. <https://doi.org/10.4236/ns.2010.211158>
- [26] Liebe S, Tomotake MEM, Ribeiro CAO (2013) Fish histopathology as biomarker to evaluate water quality. *Ecotoxicology and Environmental Contamination* 8(2):09-15. <https://doi.org/10.5132/eec.2013.02.002>
- [27] Garcia-Abiado MA, Mbahinzireki G, Rinchar J, Lee KJ, Dabrowski K (2004) Effect of diets structure in tilapia, *Oreochromis* sp., reared in a recirculating system. *J Fish Dis* 27:359-368. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2004.00551.x>
- [28] David M, Kartheek RM (2015) Histopathological alterations in spleen of freshwater fish *Cyprinus carpio* exposed to sublethal concentration of sodium cyanide. *Open Vet J* 5(1):1-5.
- [29] Guo TL, White KL (2010) Methods to Assess Immunotoxicity. In: McQueen CA (ed) *Comprehensive Toxicology*. 2nd Edition, Elsevier, pp 567-590. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00633-3>
- [30] Miller MA, Zachary JF (2017) Mechanisms and morphology of cellular injury, adaptation, and death. *Pathologic Basis of Veterinary Disease* 19:2-43. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-35775-3.00001-1>
- [31] Capkin E, Terzi E, Boran H, Yandi I, Altinok I (2010) Effects of some pesticides on the vital organs of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Tissue and Cell* 42:376–382. <https://doi.org/10.1016/j.tice.2010.10.001>
- [32] Karim A, Ahmad N, Ali W (2016) Histopathological changes in spleen and kidney of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) after acute exposure to deltamethrin. *Biologia (Pakistan)* 62 (1):139-144.
- [33] Farhan M, Wajid A, Hussain T, Jabeen F, Ishaque U, Iftikhar M, Daim MA, Noureen A (2021) Investigation of oxidative stress enzymes and histological alterations in tilapia exposed to chlorpyrifos. *Environ Sci Pollut*

- Res 28:13105–13111. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-11528-y>
- [34] Hou L, Liu K, Li Y, Ma S, Ji X, Liu L (2016) Necrotic pyknosis is a morphologically and biochemically distinct event from apoptotic pyknosis. *J Cell Sci* 129:3084-3090. <https://doi.org/10.1242/jcs.184374>
- [35] Kranz H (1989) Changes in splenic melano-macrophage centres of dab *Limanda limanda* during and after infection with ulcer disease. *Dis Aquat Org* 6:167-173.
- [36] Ferreira CMH (2011) Can fish liver melanomacrophages be modulated by xenoestrogenic and xenoandrogenic pollutants? Experimental studies on the influences of temperature, sex, and ethynylestradiol, using the platyfish as the model organism. Master of Science Thesis, Universidade de Porto, Institute of Biomedical Sciences Abel Salazar, 53 p.
- [37] Van der Oost R, Beyer J, Vermeulen NPE (2003) Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ Toxicol Pharmacol* 13:57-149. [https://doi.org/10.1016/S1382-6689\(02\)00126-6](https://doi.org/10.1016/S1382-6689(02)00126-6)
- [38] Faccioli CK, Chedid RA, Bombonato MTS, Vicentini CA, Vicentin IBF (2014) Morphology and histochemistry of the liver of Carnivorous fish *Hemisorubim platyrhynchos*. *Int J Morphol* 32(2):715-720. <https://doi.org/10.4067/S0717-95022014000200055>.
- [39] Ledic-Neto J, Dotta G, Garcia P, Brum A, Gonçalves TEL, Martins ML (2014) Haematology and melanomacrophage centers of Nile tilapia fed supplemented diet with propolis. *Acta Sci Biol Sci* 36(3):263-269. <https://doi.org/10.4025/actascibiols.v36i3.22024>.