

Kurşunun *Cyprinus carpio*'da Hepatosomatik indeks (HSI), Gonadosomatik indeks (GSI), Karaciğer ve Gonad Histolojisine etkileri

Cengiz Korkmaz^{1*}, Özcan Ay¹, Erdem Dönmez¹,

Burcu Demirbağ², Cahit Erdem³

¹Mersin Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Mersin, Türkiye

²Mersin Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji Bölümü, Mersin, Türkiye

³Çukurova Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü, Adana, Türkiye

* Sorumlu yazar Tel.: +90 546 401 87 05 Fax.: +90 324 341 30 25 E-posta: cengizkorkmaz@mersin.edu.tr.

Abstract

In this study, male and female *Cyprinus carpio* were exposed to two concentrations (0.13 and 0.26 ppm) of lead for 7,14 and 21 days and hepatosomatic, gonadosomatic index (HSI – GSI) and histopatologic effects of lead were investigated in liver and gonad tissues of fishes. GSI were not significantly altered in male and female fishes compared with control. Only 0.26 ppm lead significantly decrease HSI on 7. and 21. days. Dilatations of sinusoids and bile ducts, congestions of central veins, lenfosit infiltration and pigmentation were narrowly determined in histopatologic examination of livers. In testis, fibrosis with rare density were found and in ovaries no significant pathologies were determined compared with control. The studys concludes that, the selected concentrations of lead at the analyzed exposure periods, showed no endocrine disrupting effects in *C. carpio*.

Özet

Çalışmada, ağır metallere kurşunun 0.13 ve 0.26 ppm derişimlerinin 7, 15 ve 21 gün sürelerince etkisine bırakılan erkek ve dişi *Cyprinus carpio*'larda hepatosomatik ve gonadosomatik indeks değerlerine etkileri ve karaciğer ile gonad dokularındaki histolojik değişimler tespit edilmiştir. GSI değerleri dişi ve erkek bireylerde kontrol grubuna göre anlamlı bir değişiklik göstermemiş, HSI değerleri ise sadece dişi bireylerde yüksek derişim etkisinde 7. ve 21. günlerde azalmıştır. Histopatolojik muayenede, karaciğer dokusunda yaygın olmasada safra kanalları ve sinuzoidlerde dilatasyon, merkezi vena konjesyonları, lenfosit infiltrasyonu ve pigment birikimlerinin varlığı saptanmıştır. Testis dokularında düşük yoğunluklarda fibrozis, ovaryum dokularında ise kontrol grubu ile karşılaştırıldığına belirgin bir patolojiye rastlanılmamıştır. Sonuç olarak kurşunun belirlenen derişimler ve incelenen etkide kalma sürelerinde *C. carpio*'nun karaciğer ve gonad dokularında yaygın patolojik hasarlar oluşturmadığı ve GSI değerine etki etmediği tespit edilmiştir.

1. Giriş

Kara, deniz ve hava ortamında gelişen sanayi, tarım ve insan aktiviteleri toksik maddelerin, sucul ekosistemlere kontamine olmasına neden olmakta ve kirleticileri tüm canlılar için global bir sorun haline getirmektedir [1].

Sucul ekosistemlerde kirliliğe neden olan kimyasal maddeler arasında ağır metaller üst sıralarda yer almaktadır [2]. Doğada dünyanın oluşumundan itibaren doğal olarak bulunan ağır metallerin [3] başta sanayi olmak üzere, tarım ve madencilik gibi faaliyetlerin etkisiyle son yüzyılda sucul ortamlarda yayılımları hızla artmış [4], bu sayede sucul canlılar artan derişimlerde ağır metal konsantrasyonu etkisinde kalmaya başlamışlardır [5].

Dünyada diklorodifeniltrikloroetan (DDT) ve metabolitleri, dioksinler, bisfenol A, poliklorlu bifeniller (PCB), organoklorlu instektisitler, imdazol, triazol, fitalatlar ve parabenler gibi çeşitli kimyasalların yanı sıra ağır metallerin de endokrin bozucu kimyasallar (EBK) arasında yer aldığı bilinmektedir [6-11]. EBK'lar, Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından; "bir organizma, ya da o organizmanın alt-popülasyonlarında endokrin sistemi bozan dolayısıyla sağlık üzerinde olumsuz etki oluşturan maddeler" olarak tarif edilmektedir.

Ağır metallerin üreme ve endokrin sistem üzerine etkilerinin araştırıldığı çalışmaların önemli bir kısmının memeli türleri üzerinde yoğunlaştığı görülmektedir [3, 12, 13]. Yapılan çalışmalarda arseniğin (As), endokrin bozucu özelliği tanımlanmış ilk metal olduğu tespit edilmiştir. Arseniğin glukokortikoid reseptörlerine bağlanıp, hormon aktivitesini etkilediği, başka bir çalışmada ise östrojen reseptörlerinin sayısını anlamlı düzeylerde azalttığı bildirilmiştir [14]. Kadmiyum (Cd) in vivo ve in vitro çalışmalarda, dişi ve erkek üreme organlarında androjenlerin, östrojenlerin ve progesteron hormonunun sentezini etkilediği ve cinsiyet dönüşümüne neden olduğu belirtilmiştir [15]. Başka bir çalışmada cıvanın (Hg) hipotalamik-hipofiz-trioid eksenine etki ederek, sterogenesisi ve cinsiyet hormonlarının sentezini etkilediği bildirilmiştir [12, 16]. Nikelin (Ni), büyüme hormonu üzerine etki ettiği [15], kurşunun (Pb) uterusunda bulunan östrojen reseptörlerinin sayısını arttırdığı [13], manganezin (Mn) gonodotropin salınımını azalttığı [17], çinkonun ise (Zn) sperm kalitesini (hacim, yoğunluk, motilite, canlılık süresi) düşürdüğü bildirilmiştir [13].

Sucul canlılarda ağır metallerin üreme ve endokrin sistem üzerine etkileri konusunda sınırlı sayıda araştırmaların yapıldığı bilinmektedir [18, 19]. Bu nedenle

bu çalışmada, *Cyprinus carpio*'da kurşunun (Pb²⁺), endokrin bozucu etkilerini belirlemek amacıyla, metalin subletal derişimlerinin 7,15 ve 21 gün süreyle uygulanması sonrasında erkek ve dişi bireylerde gonadosomatik ve hepatosomatik indeks (GSI-HSI) değişimleri ölçülmüş, testis, gonad ve karaciğer dokularında histopatolojik oluşumlar incelenmiştir.

2. Materyal ve Yöntem

2.1 Çalışma Materyali

Araştırmada 54 adet dişi, 54 adet erkek olmak üzere toplamda 108 adet *C. carpio* kullanılmıştır. Deney materyali Devlet Su İşleri (DSİ) Adana 6. Bölge Müdürlüğünden temin edilerek 2 ay boyunca laboratuvar koşullarında adaptasyonları sağlanmıştır. Dinlendirilmiş çeşme suyu ile gün aşırı su değişimi yapılmış ve havalandırma merkezi sistem ile sağlanmıştır. Laboratuvar koşullarında, 12 saatlik aydınlık/karanlık periyodu sağlanmıştır. Balıklar, adaptasyon ve deney süresince, günde 2 defa vücut ağırlıklarının % 2'si kadar pond yem (Tetra® Pond Koi Sticks) ile beslenmiştir. Suyun fiziko-kimyasal özellikleri, sıcaklık 23.08 ± 0.9 °C, pH 7.12 ± 0.13, çözülmüş oksijen 7.05 ± 0.04 ppm ve sertlik 211.45 ± 6.37 ppm CaCO₃ olarak belirlenmiştir. Denemelerde kullanılan balıkların ortalama ağırlıkları 44.38 ± 8.23 g ve ortalama boyları da 14.50 ± 1.50 cm olarak ölçülmüştür. Denemeler kontrollü olarak yürütülmüştür.

2.2 Deney Uygulanması

Deneyler iki tekrarlı olarak yürütülmüş ve her tekrarda 3 balık kullanılmıştır. Deneme süresince balıklar 114 cm x 114 cm x 38 cm fiberglas tanklarda tutulmuştur. *C. carpio*' da kurşunun 96 saat LC50 değeri 1.33 ppm olarak bildirilmiştir [20]. Balıklar öncelikle dişi ve erkek olmak üzere iki gruba ayrılmış, gruplarda kendi aralarında iki farklı derişim ve bir kontrol grubu oluşturmak için tekrar ayrılmışlardır. Birinci gruba kurşunun 96 saat LC50 değerinin % 10'u olan 0.13 ppm, ikinci gruba ise kurşunun 96 saat LC50 değerinin % 20'si olan 0.26 ppm subletal derişimleri 7, 15 ve 21 gün sürelerle uygulanmıştır. Akvaryum suları, kurşun konsantrasyonunda olabilecek değişimleri engellemek amacıyla 24 saat aralıkla değiştirilmiştir.

2.3 Histolojik İnceleme

Histolojik inceleme amacıyla balıklardan alınan karaciğer ve gonad dokuları % 10'luk nötral formalin solüsyonu ile tespit edilmiş ardından rutin doku takibi işlemleri sonrasında parafine gömülerek 3-5 mikron kalınlığında doku kesitleri hazırlanmıştır. Bu kesitler Hematoksilen Eozin yöntemi ile boyanmış ve ışık mikroskopunda incelenerek fotoğrafları çekilmiştir [21].

2.4 HSI ve GSI'nin belirlenmesi

Serum örneklerinin elde edilmesinden hemen sonra HSI ve GSI analizleri için önceden boy ve ağırlıkları

belirlenmiş balıkların gonad ve karaciğer dokuları tartılarak yaş ağırlıkları alınmış ve aşağıdaki formüller kullanılarak HSI (%) ve GSI (%) değerleri belirlenmiştir.

$$GSI = \frac{\text{Gonad Ağırlığı (g)}}{\text{Toplam Vücut Ağırlığı (g)}} \times 100$$

$$HSI = \frac{\text{Karaciğer Ağırlığı (g)}}{\text{Vücut Ağırlığı (g)}} \times 100$$

Analizlerde SPSS 11.5 paket programı kullanılmıştır. Veriler aritmetik ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. Kontrol ve deney grupları arasındaki fark OneWay ANOVA testi kullanılarak belirlenmiştir. p<0.05 düzeyi önemli kabul edilmiştir.

3. Bulgular ve Tartışma

3.1 Bulgular

Erkek *C. carpio*'da kurşunun farklı derişimlerinin etkisinde HSI (%) değerleri Tablo 1'de görülmektedir. Kurşunun 0.13 ve 0.26 ppm subletal derişimlerinin etkisinde 7, 15 ve 21 gün sürelerince erkek *C. carpio*'da HSI değerleri kontrol grubuna göre değişiklik gösterdiği fakat bu değişikliklerin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlenmiştir (p < 0.05).

Tablo 1 Kurşunun farklı subletal derişimlerinin etkisinde erkek *C. carpio*'larda 7. 15. ve 21. günlerde HSI (%) değerleri.

Derişim (ppm)	Süre (Gün)		
	7. Gün	15. Gün	21. Gün
	$\bar{X} \pm S_{\bar{X}}^*$	$\bar{X} \pm S_{\bar{X}}^*$	$\bar{X} \pm S_{\bar{X}}^*$
0 ppm Pb	0,58 ± 0,12 ^{ax}	0,75 ± 0,19 ^{ax}	0,59 ± 0,12 ^{ax}
0.13 ppm Pb	0,55 ± 0,11 ^{ax}	0,52 ± 0,05 ^{ax}	0,81 ± 0,29 ^{ax}
0.26 ppm Pb	0,45 ± 0,18 ^{ax}	0,74 ± 0,07 ^{ax}	0,88 ± 0,17 ^{ax}

*SNK; Dikey sütunlar kurşunun farklı subletal derişimlerinin, yatay sütunlar ise etkide kalma süresi arası ayırımı belirtmek amacı ile kullanılmıştır. Veriler arasında P<0,05 düzeyinde istatistik ayırım vardır.

$\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$ = Aritmetik ortalama ± Standart sapma

Tablo 2'de kurşunun farklı subletal derişimlerinin etkisinde erkek *C. carpio*'da, 7, 15 ve 21 gün sürelerince GSI değerleri gösterilmektedir. GSI değerleri yüksek derişim kurşun etkisinde kontrol grubuna göre 7. günde azalış göstermiş ve bu azalışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edilmiştir (p < 0.05).

Derişim (ppm)	Süre (Gün)		
	7. Gün	15. Gün	21. Gün
	$\bar{X} \pm S_{\bar{X}}^*$	$\bar{X} \pm S_{\bar{X}}^*$	$\bar{X} \pm S_{\bar{X}}^*$
0 ppm Pb	3,23 ± 0,40 ^{ax}	2,69 ± 0,47 ^{ax}	3,30 ± 0,21 ^{ax}
0.13 ppm Pb	2,66 ± 0,43 ^{abx}	3,07 ± 0,50 ^{ax}	2,72 ± 0,69 ^{ax}
0.26 ppm Pb	2,16 ± 0,06 ^{bx}	3,08 ± 0,52 ^{ax}	3,41 ± 0,62 ^{ax}

Tablo 2 Kurşunun farklı subletal derişimlerinin etkisinde erkek *C. carpio*'larda 7. 15. ve 21. günlerde GSI (%) değerleri.

*SNK; Dikey sütunlar kurşunun farklı subletal derişimlerinin, yatay sütunlar ise etkide kalma süresi arası ayrımı belirtmek amacı ile kullanılmıştır. Veriler arasında P<0,05 düzeyinde istatistik ayrım vardır.

$\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$ = Aritmetik ortalama ± Standart sapma

Dişi *C. carpio*'da kurşun etkisine bağlı olarak HSI (%) değerleri Tablo 3'de sunulmuştur. Kurşunun 0.26 ppm subletal derişimlerinin etkisinde 7. ve 21. günlerde dişi *C. carpio*'da HSI değerlerinin kontrol grubuna göre azalış gösterdiği ve bu azalışların istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir (p < 0.05).

Tablo 3 Kurşunun farklı subletal derişimlerinin etkisinde dişi *C. carpio*'larda 7. 15. ve 21. günlerde HSI (%) değerleri.

Derişim (ppm)	Süre (Gün)		
	7. Gün	15. Gün	21. Gün
	$\bar{X} \pm S_{\bar{X}}^*$	$\bar{X} \pm S_{\bar{X}}^*$	$\bar{X} \pm S_{\bar{X}}^*$
0 ppm Pb	0,80 ± 0,08 ^{ax}	0,87 ± 0,12 ^{ax}	0,69 ± 0,16 ^{ax}
0.13 ppm Pb	0,61 ± 0,17 ^{ax}	0,65 ± 0,11 ^{ax}	0,68 ± 0,10 ^{ax}
0.26 ppm Pb	0,36 ± 0,05 ^{bx}	0,79 ± 0,14 ^{ay}	0,39 ± 0,15 ^{bx}

*SNK; Dikey sütunlar kurşunun farklı subletal derişimlerinin, yatay sütunlar ise etkide kalma süresi arası ayrımı belirtmek amacı ile kullanılmıştır. Veriler arasında P<0,05 düzeyinde istatistik ayrım vardır.

$\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$ = Aritmetik ortalama ± Standart sapma

Kurşunun 0.26 ppm subletal derişiminin etkisinde 15. günde dişi *C. carpio*'da GSI değerleri kontrol grubuna göre artış göstermiş ve bu artışların istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir (p < 0.05). Dişi *C. carpio*'da GSI (%) değerleri Tablo 4'de sunulmuştur.

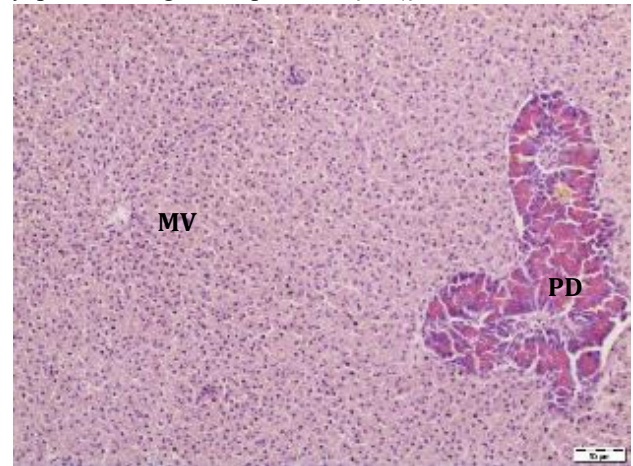
Tablo 4 Kurşunun farklı subletal derişimlerinin etkisinde dişi *C. carpio*'larda 7. 15. ve 21. günlerde GSI (%) değerleri.

Derişim (ppm)	Süre (Gün)		
	7. Gün	15. Gün	21. Gün
	$\bar{X} \pm S_{\bar{X}}^*$	$\bar{X} \pm S_{\bar{X}}^*$	$\bar{X} \pm S_{\bar{X}}^*$
0 ppm Pb	1,32 ± 0,29 ^{ax}	1,08 ± 0,11 ^{ax}	1,10 ± 0,13 ^{ax}
0.13 ppm Pb	1,03 ± 0,10 ^{ax}	1,47 ± 0,28 ^{ax}	1,45 ± 0,29 ^{ax}
0.26 ppm Pb	1,26 ± 0,14 ^{ax}	1,71 ± 0,16 ^{bx}	1,41 ± 0,26 ^{ax}

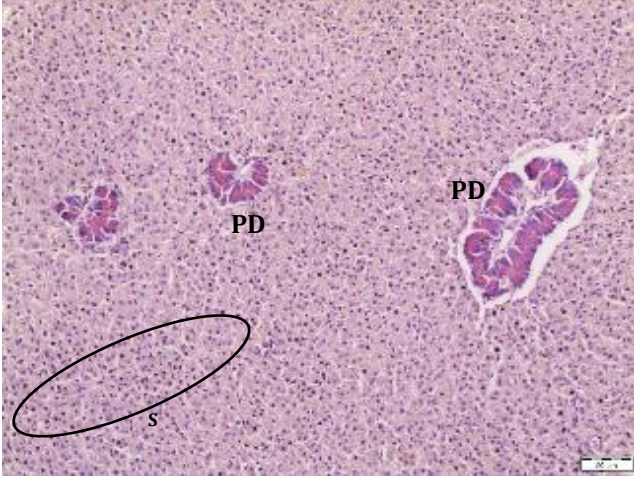
*SNK; Dikey sütunlar kurşunun farklı subletal derişimlerinin, yatay sütunlar ise etkide kalma süresi arası ayrımı belirtmek amacı ile kullanılmıştır. Veriler arasında P<0,05 düzeyinde istatistik ayrım vardır.

$\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$ = Aritmetik ortalama ± Standart sapma

Kontrol grubu karaciğer dokularının histolojik muayenesinde, karaciğer dokusu parenşiminin hepatosit hücrelerinden oluştuğu, hepatosit hücreleri çekirdek görünümünün normal olduğu gözlenmiştir. Ayrıca karaciğer dokusunda kan dolaşımını sağlayan arter, vena ve sinüzoidler ile doku içerisinde dağılmış pankreatik yapıların varlığı da tespit edilmiştir (Şekil 1 - 2).

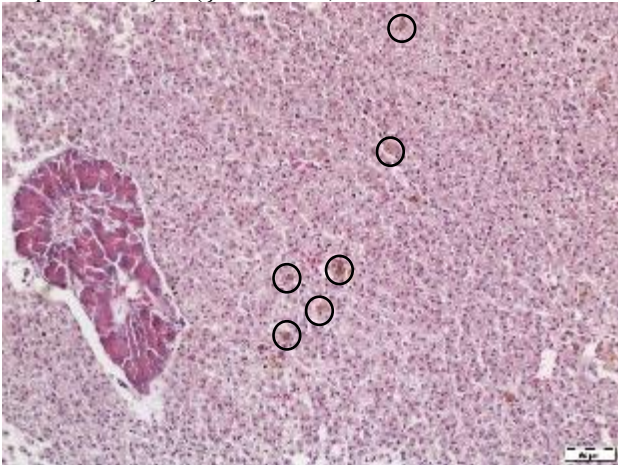


Şekil 1 *C. carpio*'da kontrol grubu karaciğer dokusunun histolojik görüntüsü dokusu (Hx&E, x100) (PD: Pankreatik doku, MV: Merkezi vena).

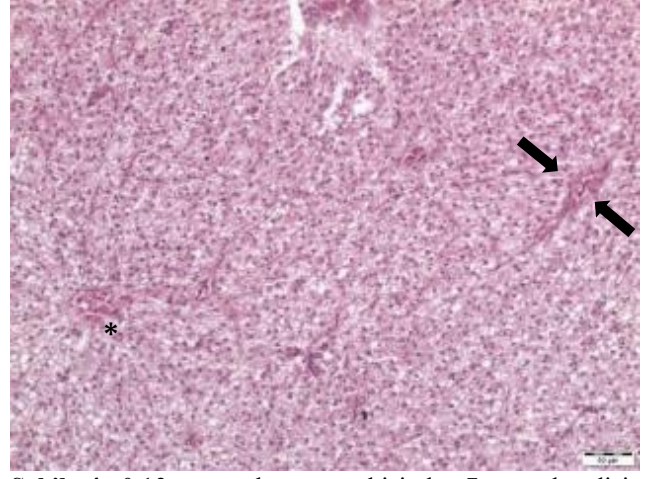


Şekil 2 *C. carpio*'da kontrol grubu karaciğer dokusunun histolojik görüntüsü dokusu (Hx&E, x100) (PD: Pankreatik doku, SK: Safra kanalları, S: Sinüzoid).

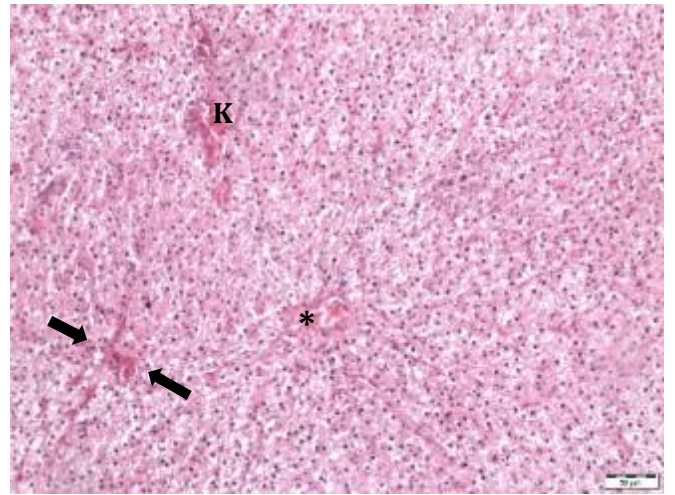
0.13 ppm kurşun etkisinde *C. carpio*'ların karaciğerlerinde safra pigmenti birikimlerine, merkezi venalarda konjesyonlara ve sinüzoidlerde de konjesyonların yanı sıra dilatasyon bulgularına rastlanılmıştır (Şekil 3 - 5). 0.13 ppm kurşun etkisinde tespit edilen patolojik bulguların rastlanma sıklığının kontrol grubuna oranla yoğun olmadığı da tespit edilmiştir. 0.26 ppm kurşun etkisinde ise hepatoportal damar ve sinüzoidlerde konjesyon ve dilatasyonların yanı sıra, karaciğer parenşiminde safra pigmenti birikimi ile lenfosit infiltrasyonları tespit edilmiştir (Şekil 6 - 9).



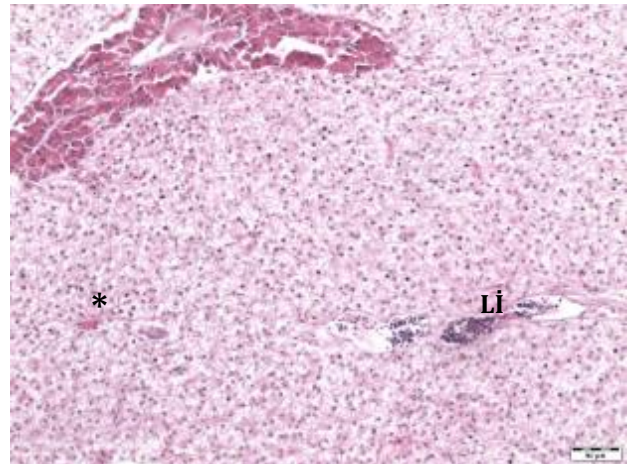
Şekil 3 0.13 ppm kurşun etkisinde 7. günde dişi *C. carpio*'ların karaciğer dokusunda safra pigmenti birikimi (Hx&E, x100).



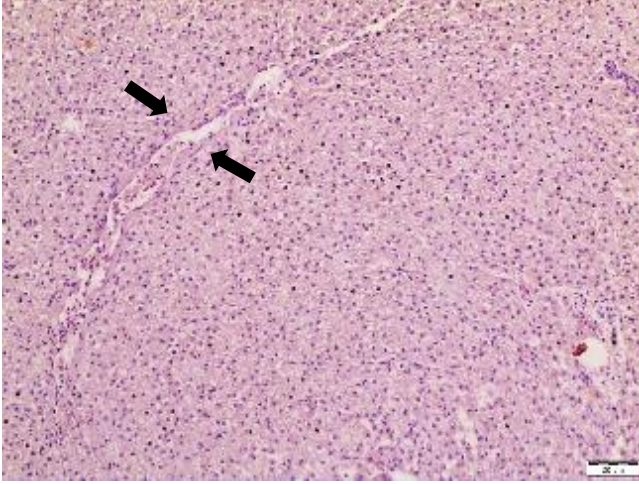
Şekil 4 0.13 ppm kurşun etkisinde 7. günde dişi *C. carpio*'ların karaciğer dokusunda sinüzoidlerde dilatasyon (oklar) ve merkezi venada konjesyon (*) (Hx&E, x100).



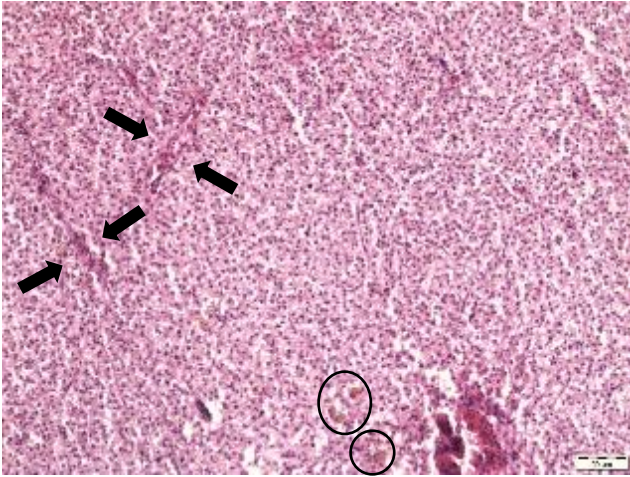
Şekil 5 0.13 ppm kurşun etkisinde 14. günde erkek *C. carpio*'ların karaciğer dokusunda konjesyon (K), sinüzoidlerde dilatasyon (oklar) ve merkezi venada konjesyon (*) (Hx&E, x100).



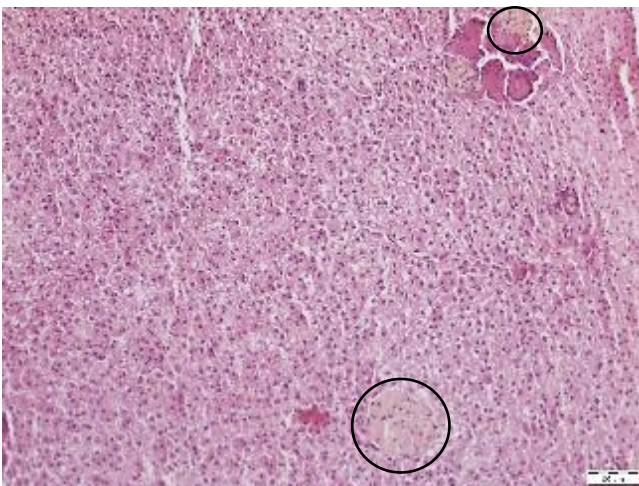
Şekil 6 0.26 ppm kurşun etkisinde 14. günde erkek *C. carpio*'ların karaciğer dokusunda lenfosit infiltrasyonu (Lİ) ve merkezi venada konjesyon (*) (Hx&E, x100).



Şekil 7 0.26 ppm kurşun etkisinde 14. günde dişi *C. carpio*'ların karaciğer dokusunda safra kanalında dilatasyon (oklar) (HxE, x100).



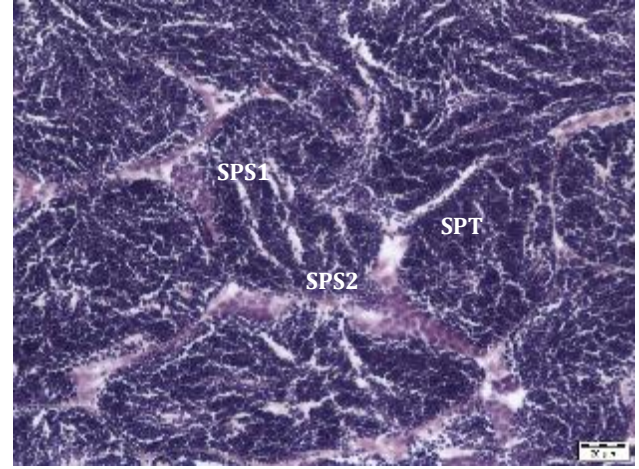
Şekil 8 0.26 ppm kurşun etkisinde 21. günde dişi *C. carpio*'ların karaciğer dokusunda sinüzoidlerde dilatasyon (oklar) ve safra pigmenti birikimi (HxE, x100).



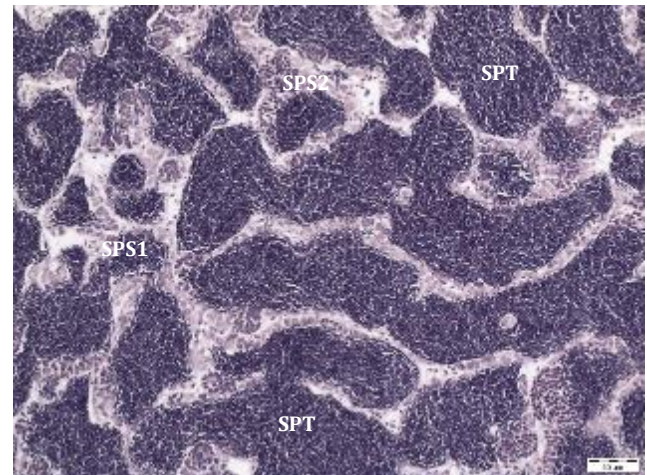
Şekil 9 0.26 ppm kurşun etkisinde 21. günde dişi *C. carpio*'ların karaciğer dokusunda melanomakrafaj merkezleri (HxE, x100).

Kontrol grubu testis dokularının histolojik muayenesinde, değişik şekil ve büyüklükte çok sayıda seminifer tübül ve seminifer tübüllerin içerisinde farklı

gelişim aşamalarında olan germ hücrelerinin varlığı gözlenmiştir. Bunun yanı sıra tübüller arası boşluklarda leydig hücreleri ve kan damarları gözlemlenmiştir (Şekil 10 - 11).

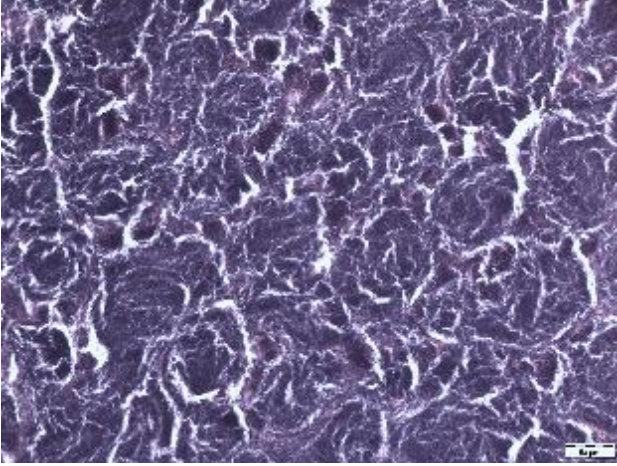


Şekil 10 *C. carpio*'da kontrol testis dokusu (SPT: Spermatid, SPS1: Primer spermatositler, SPS2:Seconder spermatositler, L: Leydig hücresi) (HxE, x400).

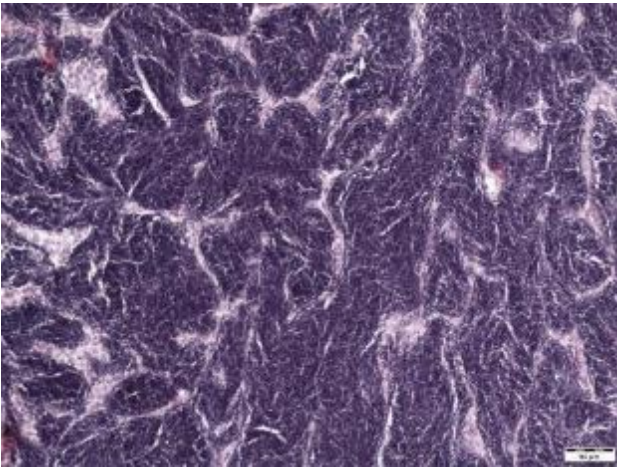


Şekil 11 *C. carpio*'da kontrol testis dokusu (SPT: Spermatid, SPS1: Primer spermatositler, SPS2:Seconder spermatositler) (HxE, x200).

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 0.13 ve 0.26 ppm derişimde *C. carpio*'ların testis dokularında 7. ve 30. günlerde herhangi bir patolojik değişim gözlenmemiştir. Seminifer tübül yapılarının kontrol grubu ile benzer yapıda olduğu, tübül yapılarında genişleme, dejenerasyon ve fibrozis gibi bulguların oluşmadığı tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra farklı gelişim evrelerindeki germ hücresi oranlarının yine kontrol grubu ile benzer düzeyde olduğu gözlenmiştir (Şekil 12 - 13).

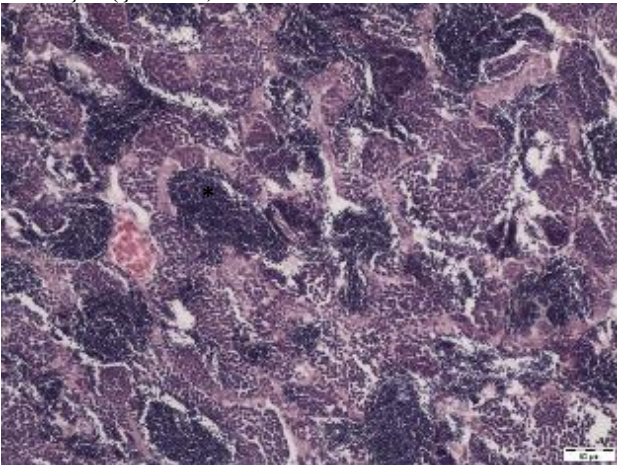


Şekil 12 0.13 ppm kurşun etkisinde 7. günde *C. carpio*'da testis dokusunun histolojik görüntüsü (HxE, x200).



Şekil 13 0.26 ppm kurşun etkisinde 7. günde *C. carpio*'da testis dokusunun histolojik görüntüsü (HxE, x200).

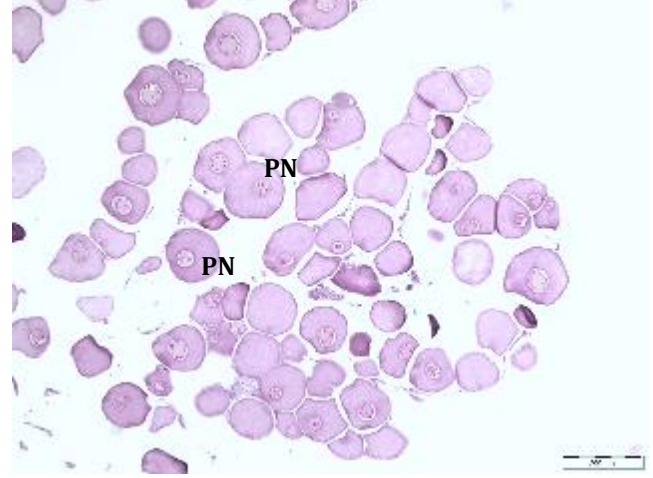
0.13 ppm kurşun etkisinde *C. carpio*'ların testis dokularında kontrol grubu ile karşılaştırıldığında sadece 14. günde yaygın olmasa da fibrosis varlığı tespit edilmiştir (Şekil 14).



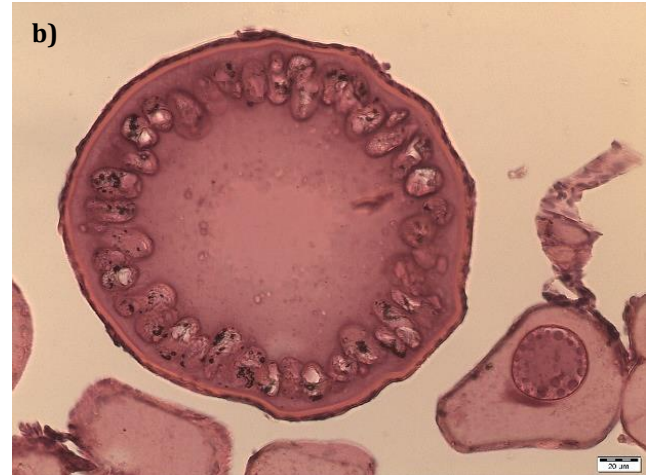
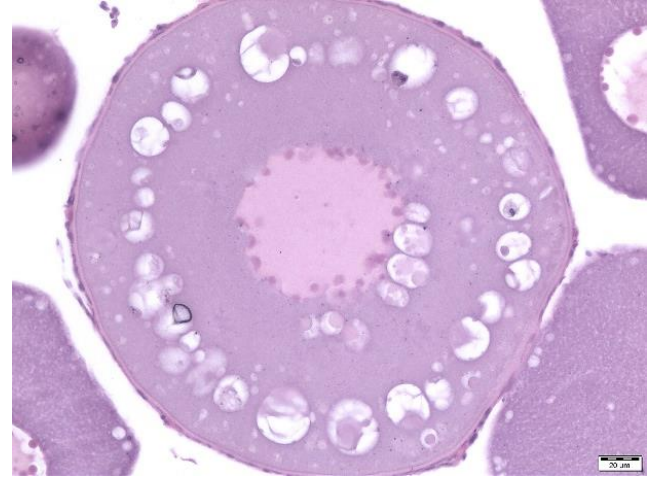
Şekil 14 0.13 ppm kurşun etkisinde 14. günde *C. carpio*'da testis dokularında fibrosis (*) (HxE, x200).

Kontrol grubunun ovaryum dokuları incelendiğinde; gonad epiteli ile çevrelenmiş bir stroma içerisinde çok sayıda ve farklı gelişim aşamalarındaki oositleri içeren folliküller gözlemlenmiştir. Gelişim aşamasındaki

folliküllerin daha çok perinükleolar oositlerden oluştuğu gözlenmiş, yer yer alveolik aşamadaki oositler ve vitellojenik oositlerin varlığı da tespit edilmiştir (Şekil 15 - 16).



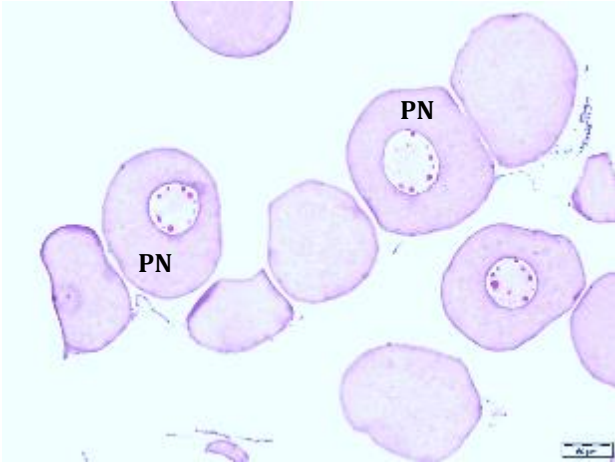
Şekil 15 *C. carpio*'da kontrol grubu ovaryum dokusu (PN: Perinükleolar oositler) (HxE, x40).



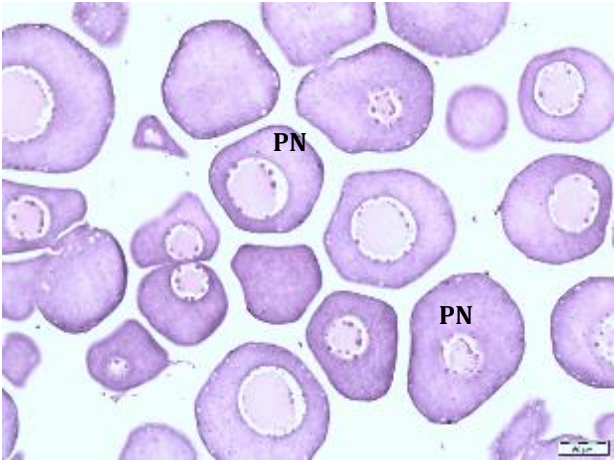
Şekil 16 *C. carpio*'da kontrol grubu ovaryum dokusu a) Alveolik aşamadaki oosit b) Vitellojenik aşamadaki oosit (HxE, x400).

0.13 ve 0.26 ppm kurşun derişiminin uygulandığı bireylerde patolojik bulgulara rastlanılmamıştır. Her iki

kurşun derişiminin etkisinde gözlemlenen follüküllerin genel olarak perinükleolar aşamada olduğu ve kontrol grubu ile benzer yapı gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 17 - 18).



Şekil 17 *C. carpio*'da 0.13 ppm kurşun etkisinde 21. günde ovaryum dokusunun histolojik görüntüsü (PN: Perinükleolar oositler) (HxE, x200).



Şekil 18 *C. carpio*'da 0.26 ppm kurşun etkisinde 21. günde ovaryum dokusunun histolojik görüntüsü (PN: Perinükleolar oositler) (HxE, x200).

3.2 Tartışma

Çalışmada, kurşun etkisine bırakılan erkek *C. carpio*'larda HSI değerlerinin kontrol grubuna göre istatistiksel bakımdan anlamlı bir değışim göstermediğı, dişi bireylerde ise HSI değerlerinin 7. ve 21. günler sonunda derişim etkisine bağılı olarak azaldığı tespit edilmiştir. Karaciğer dokusunun histopatolojik muayenesinde kontrol grubunda karaciğer parenşimi ve hepatosit görüntülerinin normal olduğu tespit edilmiştir. Fakat 7. ve 21. günlerde özellikle düşük derişim etkisinde dişi bireylerin karaciğerlerinde safra pigmentlerinin oluşumu ile yaygın olmasa da 21. gün 0.26 ppm kurşun etkisinde melanomakrofaj merkezlerinin varlığı tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra tüm derişim ve sürelerde seyrek de olsa merkezi vena konjesyonlarına, 14. gün 0.26 ppm kurşun etkisinde ise sinüzoidler ve safra kanallarında dilatasyonlara rastlanılmıştır. Campana, Sarasquete [22], kurşun etkisine bırakılan *Halobatrachus didactylus*'ların karaciğerlerinde hiperplazi ve piknotik hepatosit

çekirdeklerine rastlanıldığını rapor etmişlerdir. Camargo and Martinez [23], kirleticilerin yoğun olduğu bölgelerden örneklenen *Prochilodus lineatus*'ların hepatositlerinde hipertrofi, sitoplazmik ve nüklear dejenerasyon gelişimi ile melanomakrofaj merkezlerinin varlığına rastlanıldığını belirtmişlerdir. Rabitto, Costa [24], kurşun etkisinde *Hoplias malabaricus*'ların karaciğerlerinde hücre ölümlerine ve çekirdek bozulmalarına rastlanıldığını rapor etmişlerdir. Kim and Kang [25], besin yolu ile farklı derişimlerde kurşun etkisine bırakılan *Sebastes schlegelii*'lerde HSI değerlerinin 120 ppm derişim etkisinin üzerinde azalış gösterdiğini, daha düşük derişimlerde ise değışim olmadığını rapor etmişlerdir. Van Dyk, Pieterse [26], kadmiyum ve çinko etkisine bırakılan *Oreochromis mossambicus*'ların karaciğerlerinde hepatosit vakuolizasyonlarına ve kan damarlarında konjesyonlara rastlanıldığını fakat HSI değerlerinde anlamlı bir değışimin olmadığını rapor etmişlerdir. Mela, Randi [27], metil-cıva etkisine bırakılan *Hoplias malabaricus*'ların karaciğerlerinde nekrotik alanların varlığına, melanomakrofaj merkezlerine ve lökosit infiltrasyonlarına rastlanıldığını bildirmişlerdir. Mishra and Mohanty [28], hegzavalent krom etkisine bırakılan *Channa punctatus*'ların karaciğerlerinde atrofi ve sinüzoidal alanlarda genişlemelerin olduğunu rapor etmişlerdir. Figueiredo-Fernandes, Ferreira-Cardoso [29], bakır etkisine bırakılan *Oreochromis niloticus*'ların karaciğerlerinde vakuolizasyon ve nekrotik alanlara rastlanıldığını, düşük bakır etkisinde HSI'te değışim yaşanmazken, yüksek bakır derişimlerinde HSI'in arttığını bildirmişlerdir. Vinodhini and Narayanan [30], birden fazla metalin (Cd +Pb+ Cr +Ni) etkisine bırakılan *C. carpio*'ların karaciğerlerinde hemosiderin pigmenti ve fibrosis oluşumunun gözlemlendiğini rapor etmişlerdir. [31], metal kirliliğinin (Cu, Pb, Hg, Cd) yoğun olduğu bölgeden örneklenen *Oreochromis niloticus*'ların karaciğerlerinde merkezi venalarında konjesyon ve hepatosit çekirdeklerinde piknozis bulgularına rastlanıldığını bildirmişlerdir. Metal kirliliğinin yoğun olduğu bölgeden örneklenen *C. carpio* ve *Capoeta sp.*, türlerinin karaciğer dokularında gözlenen patolojik bulguların kontrol bölgesi ile karşılaştırıldığı daha yoğun olduğu rapor edilmiştir [4, 32]. Benzer patolojik bulgular metal etkisinde başka araştırmacılar tarafında da rapor edilmiştir [33-36].

Karaciğer dokusunda tespit edilen histopatolojik bulgular, metal etkisine bırakılan balık türlerinde meydana gelen patolojik bulgular ile benzerlik göstermektedir. *C. carpio*'ların karaciğer dokularında rastlanılan patolojilerin düşük yoğunluklu oluşunun, kurşunun belirlenen derişimlerinin yüksek olmaması nedeniyle gerçekleştiğı düşünülmektedir. 0.13 ve 0.26 ppm kurşun etkisinde erkek bireylerde HSI değerlerinde değışim yaşanmazken, dişi bireylerde ise HSI değerleri 7. ve 21. günde derişim etkisine bağılı olarak azalış göstermektedir. Bunun ise kirleticilerin aynı türün dişi ve erkek bireylerinin endokrin sistemini ve parametrelerini farklı şekilde etkileyebilme potansiyeli ile ilintili olduğu düşünülmektedir [37-43]. Dişi bireylerin karaciğerlerinde görülen patolojik hasarların erkek bireyler ile karşılaştırıldığında daha yoğun oluşu bunu desteklemektedir.

Çalışmada erkek ve dişi bireylerin gonadlarında kontrol grubundan farklı patolojik bulgulara rastlanılmamıştır. Sadece 0.13 ppm etkisinde 14. günde erkek bireylerin testis dokularında seyrekte olsa fibrozis bulgusuna rastlanılmıştır. Kurşun etkisine bırakılan diğer bireylerin testis dokularında kontrol grubundan farklı olarak semifer tübül dejenerasyonu, venoz konjesyon, testis arterlerinde dilatasyon vb., bulgulara rastlanılmamıştır. Benzer şekilde dişi ovaryumlarında atretik folikül, adezik hücre yapıları vb., bulguların varlığı tespit edilmemiştir. Tüm deney gruplarında GSI değerleri kontrol grubuna göre değişiklik göstermiş fakat bu değişimlerin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlenmiştir. Srivastava [44], 15 ppm kurşun etkisinde *C. fasciatus*'da, testis dokularının kan damarlarında dilatasyon ve dejenerasyonların tespit edildiğini bunun yanı sıra tübül yapılarında nekrosis, büzülme ve germinal epitelyumda erimelerin görüldüğünü rapor etmişlerdir. Kumar and Pant [45], 4 ay süresince 127 ppb kurşun etkisine bırakılan *Puntius conchonioides* 'ta testis dokularının kan damarlarında nekroz ve dilatasyon ile semifer tübül yapılarında dejenerasyonların gözlemlendiğini belirtmişlerdir. Ruby, Jaroslowski [46], 12 gün süresince 10 ppb kurşun etkisinde kalan *Oncorhynchus mykiss*'lerde spermatozoid sayısının azaldığını belirtmişlerdir. Weber [47], 30. gün süresince 0.5 ppm kurşun etkisine bırakılan erkek ve dişi *Pimephales promelas*'larda testis ve ovaryum gelişiminin gerilediğini fakat GSI değerlerinin değişmediğini belirtmiştir. Tulasi, Reddy [48], Kurşunun *Anabas Testudineus*'un ovaryum dokusunda derişimine bağlı olarak artış gösterdiğini ve gonadosomatik indeksi düşürdüğünü belirtmişlerdir. Ruby, Jaroslowski [46], *Oncorhynchus mykiss*'te kurşunun spermatozoid baskıladığını ve spermatozoidlerin sayısının kontrol grubuna göre azaldığını belirtmişlerdir. Thomas [49], 0.2 ppm kurşun etkisinde *Micropogonias undulatus*'ta ovaryum gelişiminde gerilemenin görüldüğünü belirtmiştir. Katti and Sathyanesan [50], 9 ay süresince 5 ppm kurşun-nitrat etkisine bırakılan *Clarias batracuhus*'larda ovaryum gelişiminde gerilemenin görüldüğünü rapor etmişlerdir. Kumar and Pant [45], 4 ay süresince 0.1 ppm kurşun etkisine bırakılan *Puntius conchonioides*'ların oositlerinde atrezilerin görüldüğünü belirtmişlerdir. Singh [51], 3 ppm kadmiyum etkisinde *Monopterus albus*'ta oogenesisinde gerileme, nekroz, ovaryum dokusunun lamel duvarlarında fibrozis gibi morfolojik bulgulara rastlanıldığını rapor etmiştir. Tulasi, Reddy [48], 1-20 ppm kurşun etkisinde *Anabas testudineus*'larda ovaryum gelişiminde gerilemelerin olduğunu rapor etmişlerdir. Shukla and Pandey [52], 2 ppm arsenik etkisinde *Colisa fasciatus*'un testis dokularında seyrek patolojik bulgulara rastlanıldığı fakat aynı çalışmada 14 ppm arsenik etkisinde testis dokularının tübül yapılarında dejenerasyon ve intersistial hücre çaplarında belirgin azalmaların gözlemlendiğini rapor etmişlerdir. Kumari and Dutt [53], 20 ppm kadmiyum etkisinde *Puntius Sarana*'nın testis dokularında 10. günde sarı-kahverengi pigment birikimi ve tübül yapılarında bozulmaların olduğunu belirtmişlerdir. Shukla and Pandey [52], 30. gün boyunca 14 ppm arsenik etkisine bırakılan *C. fasciatus*'un ovaryum dokularında atrezi ve intra-foliküler boşlukların arttığını ve oosit gelişiminin gerilediğini belirtmişlerdir. Ruby, Hull [54], 12 gün süresince 10 ppb

kurşun etkisine bırakılan *O. mykiss*'lerde, GSI ve oosit gelişiminin erken vitellojenik evrede olan bireylerde kontrol grubuna göre değişiklik göstermediğini fakat vitellojenik evrede olan bireylerde oosit gelişiminin gerilemesine bağlı olarak GSI'in azaldığını belirtmişlerdir. Kirubakaran and Joy [55], *C. batracus*'ta organik ve inorganik cıvanın leyding hücrelerinde histolojik lezyonlara neden olduğunu bildirmişlerdir. Embriyolojik gelişim aşamasında Cd etkisine bırakılan erkek *Pimephales promelas*'larda GSI düzeylerinin değişim göstermediği belirtilmiştir [56]. Kime [57], kadmiyumun salmonid türlerinde çok düşük derişimlerde bile (10 ppb) testis dokularında hemaraji, nekrosis, piknotik hücre oluşumu gibi patolojilere neden olduğunu fakat benzer patolojik bulguların salmonid olmayan türlerde çok daha yüksek derişimlerde (225 ppm) görüldüğünü belirtmiştir. Pyron and Beitinger [58], 24 saat süresince 20 ve 30 ppm selenyum etkisine bırakılan *Pimephales promelas*'ların kur davranışlarında kontrol grubu ile karşılaştırıldığında bir değişiklik gözlemlenmediğini fakat doğan yavrularının çoğunda deformite ve ölümlerin olduğunu belirtmişlerdir. Allen [59], *Oreochromis aureus*'ta kurşun ve kadmiyumun döllenme başarısını ve embriyolojik gelişmeyi olumsuz yönde etkilediğini bildirmiştir. Kumari and Dutt [53], kadmiyumun erkek *Puntius sarana*'nın testis dokularında sitotoksik etki gösterdiğini ve histopatolojik hasarlara neden olduğunu belirtmişlerdir.

0.13 ve 0.26 ppm kurşun etkisinde erkek ve dişi *C. carpio*'larda gonad morfolojisinde ve GSI değerlerinde belirgin değişimler gözlenmemiştir. Bunun, *C. carpio*'da kurşunun belirlenen derişimler ve etkide kalma sürelerinde gonad gibi metabolik bakımdan çokda aktif olmayan bir organ üzerine etki gösterebilecek düzeylere ulaşamaması nedeniyle gerçekleştiği düşünülmektedir.

Teşekkürler

Bu proje Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından "2016-2-TP3-1835" proje numarası ile desteklenmiştir. Projenin gerçekleşmesi noktasında vermiş olduğu desteklerden ötürü Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimine teşekkür ederiz.

Kaynaklar

1. Maanan, M., *Heavy metal concentrations in marine molluscs from the Moroccan coastal region*. Environmental Pollution, 2008. **153**(1): p. 176-183.
2. Bettini, S., F. Ciani, and V. Franceschini, *Recovery of the olfactory receptor neurons in the African Tilapia mariae following exposure to low copper level*. Aquatic toxicology, 2006. **76**(3-4): p. 321-328.
3. Dyer, C.A., *Heavy metals as endocrine-disrupting chemicals*, in *Endocrine-Disrupting Chemicals*. 2007, Springer. p. 111-133.
4. Ebrahimi, M. and M. Taherianfard, *The effects of heavy metals exposure on reproductive systems of cyprinid fish from Kor River*. Iranian Journal of Fisheries Sciences, 2011. **10**(1): p. 13-26.

5. Levesque, H., et al., *Seasonal variation in carbohydrate and lipid metabolism of yellow perch (*Perca flavescens*) chronically exposed to metals in the field*. *Aquatic Toxicology*, 2002. **60**(3-4): p. 257-267.
6. Roy, D., et al., *Biochemical and molecular changes at the cellular level in response to exposure to environmental estrogen-like chemicals*. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A*, 1997. **50**(1): p. 1-30.
7. Mantovani, A., et al., *Problems in testing and risk assessment of endocrine disrupting chemicals with regard to developmental toxicology*. *Chemosphere*, 1999. **39**(8): p. 1293-1300.
8. Oishi, S., *Effects of propyl paraben on the male reproductive system*. *Food and Chemical Toxicology*, 2002. **40**(12): p. 1807-1813.
9. Tseng, C.-H., et al., *Long-term arsenic exposure and ischemic heart disease in arseniasis-hyperendemic villages in Taiwan*. *Toxicology Letters*, 2003. **137**(1-2): p. 15-21.
10. Choi, S.M., S.D. Yoo, and B.M. Lee, *Toxicological characteristics of endocrine-disrupting chemicals: developmental toxicity, carcinogenicity, and mutagenicity*. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, 2004. **7**(1): p. 1-23.
11. Kunz, P.Y. and K. Fent, *Estrogenic activity of UV filter mixtures*. *Toxicology and applied pharmacology*, 2006. **217**(1): p. 86-99.
12. Darbre, P., *Metalloestrogens: an emerging class of inorganic xenoestrogens with potential to add to the oestrogenic burden of the human breast*. *Journal of Applied Toxicology*, 2006. **26**(3): p. 191-197.
13. Iavicoli, I., L. Fontana, and A. Bergamaschi, *The effects of metals as endocrine disruptors*. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, 2009. **12**(3): p. 206-223.
14. Davey, J.C., et al., *Arsenic as an endocrine disruptor: effects of arsenic on estrogen receptor-mediated gene expression in vivo and in cell culture*. *Toxicological Sciences*, 2007. **98**(1): p. 75-86.
15. Georgescu, B., et al., *Heavy metals acting as endocrine disruptors*. *Scientific Papers Animal Science and Biotechnologies*, 2011. **44**(2): p. 89-93.
16. Tan, S. and K. Mahaffey, *Evidence for mercury as an endocrine disrupter: an overview of the literature*. 2003.
17. Pine, M., et al., *Manganese acts centrally to stimulate luteinizing hormone secretion: a potential influence on female pubertal development*. *Toxicological Sciences*, 2005. **85**(2): p. 880-885.
18. Choe, S.-Y., et al., *Evaluation of estrogenicity of major heavy metals*. *Science of the Total Environment*, 2003. **312**(1-3): p. 15-21.
19. Mishra, A.K. and B. Mohanty, *Effect of sublethal hexavalent chromium exposure on the pituitary-ovarian axis of a teleost, *Channa punctatus* (Bloch)*. *Environmental toxicology*, 2012. **27**(7): p. 415-422.
20. Alam, M. and O. Maughan, *The effect of malathion, diazinon, and various concentrations of zinc, copper, nickel, lead, iron, and mercury on fish*. *Biological trace element research*, 1992. **34**(3): p. 225-236.
21. Short, S. and T.R. Meyers, *Histology for finfish*. NWFHS laboratory procedures manual. Version, 2001. **1**(0).
22. Campana, O., C. Sarasquete, and J. Blasco, *Effect of lead on ALA-D activity, metallothionein levels, and lipid peroxidation in blood, kidney, and liver of the toadfish *Halobatrachus didactylus**. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2003. **55**(1): p. 116-125.
23. Camargo, M.M. and C.B. Martinez, *Histopathology of gills, kidney and liver of a Neotropical fish caged in an urban stream*. *Neotropical Ichthyology*, 2007. **5**(3): p. 327-336.
24. Rabitto, I., et al., *Effects of dietary Pb (II) and tributyltin on neotropical fish, *Hoplias malabaricus*: histopathological and biochemical findings*. *Ecotoxicology and environmental safety*, 2005. **60**(2): p. 147-156.
25. Kim, J.-H. and J.-C. Kang, *The lead accumulation and hematological findings in juvenile rock fish *Sebastes schlegelii* exposed to the dietary lead (II) concentrations*. *Ecotoxicology and environmental safety*, 2015. **115**: p. 33-39.
26. Van Dyk, J.C., G. Pieterse, and J. Van Vuren, *Histological changes in the liver of *Oreochromis mossambicus* (Cichlidae) after exposure to cadmium and zinc*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2007. **66**(3): p. 432-440.
27. Mela, M., et al., *Effects of dietary methylmercury on liver and kidney histology in the neotropical fish *Hoplias malabaricus**. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2007. **68**(3): p. 426-435.
28. Mishra, A.K. and B. Mohanty, *Acute toxicity impacts of hexavalent chromium on behavior and histopathology of gill, kidney and liver of the freshwater fish, *Channa punctatus* (Bloch)*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2008. **26**(2): p. 136-141.
29. Figueiredo-Fernandes, A., et al., *Histopathological changes in liver and gill epithelium of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, exposed to waterborne copper*. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 2007. **27**(3): p. 103-109.
30. Vinodhini, R. and M. Narayanan, *Heavy Metal Induced Histopathological Alterations in Selected Organs of the *Cyprinus carpio* L. (Common Carp)*. *International Journal of Environmental Research*, 2009. **3**(1).
31. Kaoud, H. and A. El-Dahshan, *Bioaccumulation and histopathological alterations of the heavy metals in *Oreochromis niloticus* fish*. *Nature and science*, 2010. **8**(4): p. 147-156.
32. Ebrahimi, M. and M. Taherianfard, *Concentration of four heavy metals (cadmium, lead, mercury, and arsenic) in organs of two cyprinid fish (*Cyprinus carpio* and *Capoeta* sp.) from the Kor River (Iran)*. *Environmental monitoring and assessment*, 2010. **168**(1-4): p. 575-585.
33. Arellano, J.M., V. Storch, and C. Sarasquete, *Histological changes and copper accumulation in liver and gills of the Senegales sole, *Solea senegalensis**. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 1999. **44**(1): p. 62-72.
34. Costa, P.M., et al., *Histological biomarkers in liver and gills of juvenile *Solea senegalensis* exposed to contaminated estuarine sediments: a weighted indices approach*. *Aquatic toxicology*, 2009. **92**(3): p. 202-212.
35. Raldúa, D., et al., *Mercury levels and liver pathology in feral fish living in the vicinity of a mercury cell chlor-alkali factory*. *Chemosphere*, 2007. **66**(7): p. 1217-1225.

36. Velma, V. and P.B. Tchounwou, *Chromium-induced biochemical, genotoxic and histopathologic effects in liver and kidney of goldfish, Carassius auratus*. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 2010. **698**(1): p. 43-51.
37. Dong, M., et al., *The effects of endosulfan on cytochrome P450 enzymes and glutathione S-transferases in zebrafish (Danio rerio) livers*. Ecotoxicology and environmental safety, 2013. **92**: p. 1-9.
38. Folmar, L.C., et al., *Vitellogenin induction and reduced serum testosterone concentrations in feral male carp (Cyprinus carpio) captured near a major metropolitan sewage treatment plant*. Environmental Health Perspectives, 1996. **104**(10): p. 1096.
39. Ishibashi, H., et al., *Effects of triclosan on the early life stages and reproduction of medaka Oryzias latipes and induction of hepatic vitellogenin*. Aquatic Toxicology, 2004. **67**(2): p. 167-179.
40. Lee, Y.-M., et al., *Endocrine disrupting chemicals (bisphenol A, 4-nonylphenol, 4-tert-octylphenol) modulate expression of two distinct cytochrome P450 aromatase genes differently in gender types of the hermaphroditic fish Rivulus marmoratus*. Biochemical and biophysical research communications, 2006. **345**(2): p. 894-903.
41. Solé, M., D. Barceló, and C. Porte, *Seasonal variation of plasmatic and hepatic vitellogenin and EROD activity in carp, Cyprinus carpio, in relation to sewage treatment plants*. Aquatic Toxicology, 2002. **60**(3-4): p. 233-248.
42. Solé, M., et al., *Feminization of wild carp, Cyprinus carpio, in a polluted environment: plasma steroid hormones, gonadal morphology and xenobiotic metabolizing system*. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 2003. **136**(2): p. 145-156.
43. Spanò, L., et al., *Effects of atrazine on sex steroid dynamics, plasma vitellogenin concentration and gonad development in adult goldfish (Carassius auratus)*. Aquatic Toxicology, 2004. **66**(4): p. 369-379.
44. Srivastava, A., *Changes induced by lead in fish testis*. Journal of Environmental Biology, 1987. **8**(4): p. 329-332.
45. Kumar, S. and S. Pant, *Comparative effects of the sublethal poisoning of zinc, copper and lead on the gonads of the teleost Puntius conchoniensis Ham*. Toxicology letters, 1984. **23**(2): p. 189-194.
46. Ruby, S.M., P. Jaroslowski, and R. Hull, *Lead and cyanide toxicity in sexually maturing rainbow trout, Oncorhynchus mykiss during spermatogenesis*. Aquatic toxicology, 1993. **26**(3-4): p. 225-238.
47. Weber, D., *Exposure to sublethal levels of waterborne lead alters reproductive behavior patterns in fathead minnows (Pimephales promelas)*. Neurotoxicology, 1993. **14**(2-3): p. 347-358.
48. Tulasi, S., P. Reddy, and J.R. Rao, *Accumulation of lead and effects on total lipids and lipid derivatives in the freshwater fish Anabas testudineus (Bloch)*. Ecotoxicology and environmental safety, 1992. **23**(1): p. 33-38.
49. Thomas, P., *Teleost model for studying the effects of chemicals on female reproductive endocrine function*. Journal of Experimental Zoology, 1990. **256**(S4): p. 126-128.
50. Katti, S.R. and A. Sathyanesan, *Lead nitrate-induced nuclear inclusions in the oocytes of the catfish Clarias batrachus (L)*. Environ. Res.:(United States), 1987. **44**(2).
51. Singh, H., *Interaction of xenobiotics with reproductive endocrine functions in a protogynous teleost, Monopterus albus*. Marine Environmental Research, 1989. **28**(1-4): p. 285-289.
52. Shukla, J.P. and K. Pandey, *Impaired spermatogenesis in arsenic treated freshwater fish, Colisa fasciatus (Bl. and Sch.)*. Toxicology letters, 1984. **21**(2): p. 191-195.
53. Kumari, M. and N.G. Dutt, *Cadmium-induced histomorphological changes in the testis and pituitary gonadotrophic hormone secreting cells of the cyprinid Puntius sarana*. Italian Journal of Zoology, 1991. **58**(1): p. 71-76.
54. Ruby, S., R. Hull, and P. Anderson, *Sublethal lead affects pituitary function of rainbow trout during exogenous vitellogenesis*. Archives of environmental contamination and toxicology, 2000. **38**(1): p. 46-51.
55. Kirubakaran, R. and K. Joy, *Toxic effects of mercury on testicular activity in the freshwater teleost, Clarias batrachus (L.)*. Journal of fish biology, 1992. **41**(2): p. 305-315.
56. Sellin, M.K. and A.S. Kolok, *Cadmium exposures during early development: do they lead to reproductive impairment in Fathead minnows?* Environmental toxicology and chemistry, 2006. **25**(11): p. 2957-2963.
57. Kime, D.E., *Endocrine disruption in fish*. 2012: Springer Science & Business Media.
58. Pyron, M. and T.L. Beitinger, *Effect of selenium on reproductive behavior and fry of fathead minnows*. Bulletin of environmental contamination and toxicology, 1989. **42**(4): p. 609-613.
59. Allen, P., *Accumulation profiles of lead and cadmium in the edible tissues of Oreochromis aureus during acute exposure*. Journal of fish biology, 1995. **47**(4): p. 559-568.