



**Uniwersytet Rzeszowski
Wydział Biologiczno-Rolniczy**

Mgr inż. AGNIESZKA LUDWIKOWSKA

Ocena toksycznego wpływu wybranych fungicydów na organizm ryb

Praca wykonana
w Katedrze Hodowli Drobiu, Zwierząt
Futerkowych i Zoohigieny
Uniwersytetu Rolniczego im. Hugona
Kołłątaja
pod kierunkiem
dr hab. lek. wet. Hanny Lutnickiej

Rzeszów 2015

*Składam serdeczne podziękowania
Pani dr. hab. lek. wet. Hannie Lutnickiej
za merytoryczną opiekę i pomoc w trakcie
przygotowania niniejszej pracy*

SPIS TREŚCI

SPIS TREŚCI	3
WYKAZ ZASTOSOWANYCH SKRÓTÓW	5
I. WSTĘP	6
II. MATERIAŁ I METODY	18
2.1. TESTOWANE SUBSTANCJE CHEMICZNE	18
2.1.1. Mankozeb	19
2.1.2. Prochloraz	19
2.1.3. Tebukonazol	20
2.2. ZWIERZĘTA DOŚWIADCZALNE	20
2.3. UKŁAD DOŚWIADCZENIA	21
2.3.1. Etap I	22
2.3.2. Etap II	23
2.4. ANALIZA STATYSTYCZNA DANYCH	29
III. WYNIKI	30
3.1. ANALIZA PATOMORFOLOGICZNA	30
3.1.1. Obserwacje zmian histopatologicznych w skrzelach karpia w mikroskopie świetlnym (LM)	30
3.1.2. Obserwacje zmian w ultrastrukturze komórek blaszek oddechowych skrzeli karpia w transmisyjnym mikroskopie elektronowym (TEM)	38
3.1.3. Obserwacje zmian w ultrastrukturze komórek listów oddechowych karpia w skaningowym mikroskopie elektronowym (SEM)	52
3.1.4. Obserwacje zmian histopatologicznych w wątrobotrzustce karpia w mikroskopie świetlnym (LM)	71
3.1.5. Obserwacje zmian w ultrastrukturze hepatocytów karpia w transmisyjnym mikroskopie elektronowym (TEM)	77
3.1.6. Obserwacje zmian histopatologicznych nerki tułowiowej karpia w mikroskopie świetlnym (LM)	86
3.1.7. Obserwacje zmian w ultrastrukturze nerki tułowiowej karpia w transmisyjnym mikroskopie elektronowym (TEM)	91
3.2. ANALIZA WSKAŹNIKÓW METABOLICZNYCH	104
3.2.1. Stężenie kortyzolu w osoczu krwi	104
3.2.2. Stężenie glukozy we krwi oraz trójglicerydów i białka ogólnego w osoczu krwi	106
3.2.3. Aktywność enzymów wątrobowych - aminotransferazy asparaginianowej (AST) i aminotransferazy alaninowej (ALT)	110

3.3.	ANALIZA WSKAŹNIKÓW HEMATOLOGICZNYCH.....	114
3.3.1.	Wskaźniki czerwonych: RBC, Ht, Hb, MCV, MCH, MCHC.....	114
3.3.2.	Wskaźniki białych: WBC i leukogramy	121
3.4.	ANALIZA ZMIAN PATOMORFOLOGICZNYCH W ELEMENTACH MORFOTYCZNYCH KRWI OBWODOWEJ KARPI	126
IV.	DYSKUSJA WYNIKÓW	135
V.	WNIOSKI.....	145
VI.	STRESZCZENIE	146
	PIŚMIENNICTWO.....	162

WYKAZ ZASTOSOWANYCH SKRÓTÓW

ACTH - hormon adrenokortykotropowy

ALT - aminotransferaza alaninowa

AST - aminotransferaza asparaginianowa

CMM – centrum melanomakrofagowe

ETU - etylenotiomocznik

Hb – stężenie hemoglobiny we krwi

HPI - oś przysadka-podwzgórze-nadnercza

Ht – wartość hematokrytowa

LD₅₀ - medialne dawki śmiertelne

LM – mikroskop świetlny, ang. light microscopy

MCH - średnia masa hemoglobiny w krwince czerwonej, ang. mean cell hemoglobin

MCHC - średnie stężenie hemoglobiny w krwinkach czerwonych, ang. mean corpuscular hemoglobin concentration

MCV - średnia objętość krwinki czerwonej, ang. mean erythrocyte volume

MM – komórki melanomakrofagowe

PVC – komórki nabłonkowe skrzel, ang. pavement cell

RBC – liczba krwinek czerwonych, ang. red blood cell

RER – szorstka siateczka endoplazmatyczna, ang. rough

SEM - Skaningowy mikroskop elektronowy, ang. scanning electron microscopy

T_{1/2} - czas półrozkładu

TEM - Transmisyjny mikroskop elektronowy, ang. transmission electron microscopy

WBC – liczba krwinek białych, ang. white blood cell

I. WSTĘP

Pestycydy są związkami syntetycznymi stosowanymi do eliminacji organizmów szkodliwych lub niepożądanych. Nazwa pochodzi od łacińskiego słowa *pestis* – zaraza, plaga i *caedere* – zabijać. Z ich pomocą dąży się do rozwiązania jednego z najważniejszych problemów ludzkości – niedostatku żywności. We współczesnym świecie zastosowanie pestycydów wykracza jednak poza samo rolnictwo. Związki te stosowane są np. do zwalczania ektopasożytów ludzi i zwierząt czy likwidacji szkodników w ochronie materiałów technicznych. Najważniejszym składnikiem pestycydów są zawarte w nich substancje aktywne (biologicznie czynne). To głównie one, czasem wraz z niektórymi składnikami preparatów użytkowych, decydują o mechanizmie i sile toksycznego działania (Różański, 1992).

Na początku XXI w. produkcja pestycydów na świecie wynosiła ok. kilka tysięcy ton rocznie (Kaleta, 2004). Globalny rynek ochrony upraw wykazuje umiarkowaną tendencję wzrostową, o czym decyduje wzrost światowego popytu na żywność, wysokie ceny prowadzenia upraw, niekorzystne warunki pogodowe i rosnące zapotrzebowanie na biopaliwa. Również w Europie notuje się wzrost rocznych wydatków na środki ochrony roślin (o 1,9% w 2012 r. w porównaniu do roku 2011) i w roku 2012 rynek ten wyniósł ponad 12 mld \$ (Annual Report, 2012). Podobną tendencję obserwuje się również na krajowym rynku środków ochrony roślin. W ostatnich latach polski rynek szacowany był na poziomie 455 mln EUR (Rynek środków produkcji i usług dla rolnictwa, 2011).

Fungicydy stanowią drugą pod względem ilości sprzedanych preparatów klasę pestycydów. Według danych Ministerstwa Rolnictwa i Rozwoju Wsi w Polsce sprzedaż środków grzybobójczych w ostatnich latach wynosiła od 9 914 ton w 2005 r. do 14 474 ton w 2012 r., co stanowi 23 - 27% wszystkich pestycydów sprzedawanych w tym czasie (Sprzedaż i zapasy środków ochrony roślin – dane od producentów i

importerów, 2005-2012). Szczegółowe dane sprzedaży różnych klas fungicydów w Polsce przedstawia Tab. 1.

Tab. 1. Sprzedaż środków grzybobójczych w przeliczeniu na substancję aktywną (w tonach) w Polsce w latach 2005 - 2012 (opracowanie własne na podstawie danych uzyskanych od producentów i importerów zawartych na stronie internetowej MRiRW).

KATEGORIA FUNGICYDÓW	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012
Nieorganiczne	861,6	885,6	833,7	783,7	738,0	643,4	489,6	521,3
Na bazie karbaminianów i ditiokarbaminianów	1 853,4	1 582,9	1 707,4	2 040,8	1 935,8	1 784,5	1 796,5	1 815,6
Na bazie benzimidazoli	656,1	621,3	546,7	458,0	477,5	412,8	459,5	489,1
Na bazie imidazoli i triazoli	396,1	345,6	505,4	657,5	770,4	687,4	785,5	823,0
Na bazie morfolin	160,8	122,8	94,0	130,6	123,9	76,6	135,4	110,2
Pozostałe	986,6	1 566,2	1 514,2	1 989,7	1 852,9	2 150,4	2 417,0	2 371,6
WSZYSTKIE	4 914,6	5 124,4	5 201,4	6 060,3	5 898,5	5 755,1	6 083,5	6 130,8

Fungicydy wydają się być nieodłącznym elementem współczesnej gospodarki, zarówno krajowej, jak i światowej. Co więcej szacuje się, że globalna uprawa warzyw i owoców bez aplikacji fungicydów mogłaby przyczynić się do zmniejszenia plonów nawet o 50 - 90% (Annual Report, 2012), co wskazuje na nieodzowność ich stosowania.

Środki grzybobójcze stanowią dużą i bardzo zróżnicowaną pod względem struktury chemicznej i mechanizmu działania grupę pestycydów. Głównie są to związki metaloorganiczne i organiczne. Wykorzystuje się także fungicydy nieorganiczne takie jak związki siarki lub miedzi (Tab. 2).

Tab. 2. Podział fungicydów na klasy, rodzaje substancji aktywnej oraz ich toksyczność dla ssaków (opracowanie własne na podstawie dostępnej literatury).

Klasy fungicydów	Substancja biologicznie czynna	Toksyczność dla ssaków LD ₅₀ [mg kg ⁻¹]
Anilinopirymidyny	cyprodynil, pyrimetanił	> 5 000
Benzimidazolowe	karbendazym, tiofanat metylowy, fuberidazol, tiabendazol	6 400
Chloronitrylowe	chlorotalonil	200
Ditiokarbaminiany	mankozeb , metiram, propineb, tiuram	800 – 8 000
Feniloamidowe	benalaksyl-M, furalaksyl, metalaksyl-M	4 700
Fosfonowe	fosetyl glinowy	>2 000
Hydroksy-pirymidynowe	bupirymat, fenarymol, metyrymol	5,6 [ml kg ⁻¹]
Imidazoliny	fenamidon	>2 000
Imidazolowe	imazalil, prochloraz	230 – 1 200
Pochodne kwasów organicznych	bentiowalikarb, dimetomorf, mandipropamid, propamokarb	500 – 2 000
Miedziowe	tlenochlorek miedziowy, trójjasadowy siarczan miedziowy, wodorotlenek miedziowy	700 – 2 000
Morfolinowe	fenpropimorf, fenpropidyna, triforyna	300 – 2 000
Pochodne Karboksamidów	boskalid, karboksyna, oksykarboksyna	2 500 – 3 200
Siarkowe	siarka, wodorotlenek siarki	5 500
Pochodne strobiluriny	azoksystrobina, dimoksystrobina, fluoksastrobina, krezoksym metylowy, piraklostrobina, pikoksystrobina, trifloksystrobina	500 – 5 000
Triazolowe	bitertanol, bromukonazol, cyprokonazol, difenokonazol, dinokonazol, epoksykonazol, fenbukonazol, fluchinkonazol, flusilazol, flutriafol, metkonazol, myclobutanił, propikonazol, protiokonazol, tebukonazol , tetrakonazol, triadimefon, triadimenol, tritikonazol	500 – 4 000

Jedną z pierwszych organicznych grup fungicydów zastosowanych na większą skalę były związki na bazie karbaminianów i ditiokarbaminianów (etyleno-bis-ditiokarbaminiany i N,N-dimetyloditiokarbaminiany). Fungicydy ditiokarbaminianowe charakteryzują się szerokim spektrum stosowania w ochronie różnych gatunków roślin - zbóż, warzyw, drzew owocowych (Russel, 2005). Związki te stanowią obecnie bardzo ważną pod względem gospodarczym grupę fungicydów, a ich zużycie w roku 2012

stanowiło w Polsce 1/3 wszystkich fungicydów (Tab. 1). Ważnym przełomem w produkcji środków grzybobójczych były związki należące do dużej grupy aromatycznych związków organicznych - azoli. W jej skład wchodzi fungicydy z grupy benzimidazoli, triazoli i imidazoli. Wykorzystywane są głównie do ochrony upraw zbóż i owoców. Charakteryzuje je wysoka selektywność, skuteczność, minimalny lub niski stopień kumulacji w środowisku i brak interakcji z agrochemikaliami. Działają systemowo i zapobiegają rozwojowi licznych gatunków grzybów. Azole do dzisiaj uważane są za najskuteczniejszą klasę środków grzybobójczych, a ich selektywne działanie zapewnia bezpieczeństwo dla ssaków, ptaków i pszczół, z utrzymaniem wysokiej aktywności bójczej w stosunku do organizmów docelowych (Delp, 1995; Russel, 2005). W Polsce fungicydy na bazie benzimidazoli, imidazoli i triazoli, ze względu na wyżej wymienione właściwości, zyskały duże znaczenie. W 2012 roku stanowiły ok. 20% wszystkich sprzedanych środków grzybobójczych (Tab. 1).

Wśród środków grzybobójczych możemy wyróżnić fungicydy kontaktowe, które na organizm patogennego grzyba oddziałują poprzez bezpośrednią z nim styczność lub fungicydy systemowe działające po wnikięciu do organizmu rośliny jako substancje układowe (Lyr, 1995).

Wszystkie pestycydy objęte są ścisłą kontrolą toksykologiczną. Wśród związków grzybobójczych znajdują się zarówno silnie toksyczne preparaty, jak i środki uznane za praktycznie nieszkodliwe. W przypadku człowieka największe zagrożenie dla zdrowia dotyczy ludzi stykających się bezpośrednio z dużymi dawkami preparatów użytkowych, co ma miejsce np. podczas wykonywania oprysków bądź zaprawiania ziarna siewnego. Pewne zagrożenie mogą też stwarzać pozostałości fungicydów na/w roślinach, stąd ważne jest przestrzeganie okresu karencji (Borecki, 1984).

Na tle innych pestycydów, fungicydy uważane są za względnie bezpieczne preparaty ze względu na ich niewielką toksyczność dla organizmów stałocieplnych. Medialne dawki śmiertelne (LD_{50}) większości fungicydów dla ssaków są z reguły bardzo wysokie i przekraczają kilkaset $mg\ kg^{-1}$ m. c. zwierzęcia doświadczalnego (Tab. 2). Przykładowo fungicydy na bazie karbaminianów i ditiokarbaminianów charakteryzują się LD_{50} na poziomie 800 - 8000 $mg\ kg^{-1}$ m. c. i nie wykazują wpływu na rozród zwierząt

czy też działania mutagennego i kancerogennego. Udowodniono jednak ich teratogenność przy dawkach rzędu 50 - 1000 mg kg⁻¹/dzień oraz powodowanie nieznacznych zmian histopatologicznych w nerkach (Kamrin, 1997). Bardziej toksyczne od macierzystych związków mogą być ich metabolity, zwłaszcza etylenotiomocznik (ETU). Transformacja ditiokarbaminianów, której produktem jest ETU, należy do najważniejszych zarówno w żywych organizmach, jak i w środowisku. ETU wykazuje właściwości kancerogenne, co skutkuje tworzeniem się guzów w narządach wewnętrznych ssaków. Ponadto działa na układy enzymatyczne zawarte w mikrosomach wątroby, powodując hamowanie aktywności monooksygenaz, hydroksylazy anilinowej i N-demetylasy aminoprotrynowej. ETU wykazuje zróżnicowaną toksyczność dla myszy i szczura, może także kumulować się w tarczycy szczura (Kamrin, 1997; Róžański, 1992).

Fungicydy z grupy triazoli charakteryzują się niską toksycznością ostrą, a LD₅₀ wyznaczono na poziomie 500 mg kg⁻¹ i więcej (Delp, 1995; Kamrin, 1997). Wykazano brak działania mutagennego, kancerogennego, genotoksycznego, teratogennego czy wpływu na rozrodczość zwierząt doświadczalnych w wyniku ekspozycji na dawki użytkowe fungicydów triazolowych (Fishel, 2013a; Fishel, 2013b). Natomiast wiele badań wskazuje na występowanie niepożądanych skutków chronicznej ekspozycji ssaków. Triazole, jako inhibitory w szlaku steroidogenezy, mogą wykazywać działanie hepatotoksyczne i hamować aktywność enzymów wątrobowych, a ich głównym celem jest cytochrom P-450. Niektóre triazole zaburzają także syntezę cholesterolu w doświadczeniach na myszach i szczurach (Allen i wsp., 2006; Chen i wsp., 2009; Kamrin, 1997; Sun i wsp., 2005; Zarn i wsp., 2003). Dodatkowo, w wyniku ekspozycji na triazole w dawkach 3 - 6 mg kg⁻¹/dzień, obserwuje się powiększenie tarczycy i zmniejszenie wychwytu jonów jodu u gryzoni doświadczalnych (Kamrin, 1997).

Fungicydy z grupy benzimidazolowych wykazują toksyczność ostrą na poziomie 6000 mg kg⁻¹ m. c. Jednak z ich stosowaniem wiążą się obawy dotyczące właściwości rakotwórczych wykazywanych przez niektóre ich metabolity (Induski, 1994; Róžański, 1992). Jedną z substancji aktywnych tej grupy fungicydów - karbendazym, w dawkach ≥ 200 mg kg⁻¹ m. c., zaburza rozród zwierząt doświadczalnych, działa gonadotoksycznie i indukuje wady wrodzone szczurów narażanych w okresie organogenezy. W badaniach

toksyczności przewlekłej (dawki $\geq 16 \text{ mg kg}^{-1} \text{ m. c.}$) wykazuje działanie hepatotoksyczne, którego mechanizm polega głównie na uszkodzeniu mikrotubul (Sitarek, 2004). Co więcej, fungicydy na bazie azoli (benzimidazole, triazole i imidazole) uważane są za związki zwiększające toksyczny efekt innych ksenobiotyków np. 3 - 7-krotne wzmocnienie toksyczności insektycydów pyretroidowych (efekt synergistyczny) dla organizmów wodnych i lądowych (Bjergager i wsp., 2011; Cedergreen i wsp., 2006; Colin i Belzunces, 1992).

W środowisku przyrodniczym fungicydy ulegają transformacji na skutek takich reakcji jak: hydroliza, utlenianie, fotoliza, biotransformacja, itp. O ich przemianach decyduje głównie struktura chemiczna substancji aktywnej i właściwości fizyko-chemiczne środowiska, w którym się znajdują. Ponieważ do gleby dostaje się znaczna część dawki preparatów użytkowych fungicydów i produkty ich metabolizmu, tu też następuje rozkład i detoksykacja większości związków grzybobójczych. Procesy te wiążą się z aktywnością biologiczną gleby, zawartością substancji chemicznie czynnych, obecnością kompleksów sorpcyjnych oraz stosunkowo stałymi warunkami termicznymi i wilgotnościowymi. Dużą rolę w trwałości fungicydów w środowisku odgrywają mikroorganizmy glebowe posiadające zdolność ich metabolizowania. Jednakże w przypadku niektórych fungicydów np. ditiokarbaminianów dawki rzędu kilkudziesięciu mg kg^{-1} mogą hamować procesy nitryfikacyjne w glebie (interakcja z bakteriami z rodzaju *Nitrosomonas* i *Nitrobacter*). Proces nitryfikacji zakłóca też obecność ETU oraz produktów transformacji fungicydów, a zwłaszcza tych, które są stosunkowo trwałe i długo zachowują toksyczność względem różnych organizmów (benzimidazole) (Borecki, 1984; Różański, 1992).

Wśród fungicydów wyróżnia się związki, które po aplikacji zazwyczaj nie pozostają w środowisku zbyt długo, a czas ich rozkładu ogranicza się do kilkudziesięciu godzin (np. mankozeb, karboksyna). Jednak wiele substancji aktywnych ulega degradacji w dłuższym okresie czasu, tj. kilku dni np. kaptan, prochloraz, tiuram. W środowisku gleby ditiokarbaminiany są na ogół umiarkowanie trwałe, z czasem półrozkładu ($T_{1/2}$) wynoszącym kilka dni do paru tygodni (Kamrin, 1997). Są też związki trwale zalegające w środowisku, których $T_{1/2}$ to zwykle kilka-kilkadziesiąt tygodni (m. in. imazalil, tebukonazol, triadimenof). Stabilność fungicydów w środowisku wynika z

ich silnej adsorpcji do frakcji koloidalnej gleby i materii organicznej. Do takich fungicydów należą m. in. liczne substancje zawierające w cząsteczkach układ benzimidazolowy, które po skompleksowaniu z jonami gleby bardzo wolno ulegają degradacji i wraz z cząsteczkami gleby mogą być transportowane do środowiska wodnego (Depl, 1995; de Jonge i wsp., 1998).

Środowisko wodne może być zanieczyszczone pestycydami obszarowo lub punktowo. W większości przypadków pestycydy dostają się do wód powierzchniowych w sposób niezamierzony, głównie w wyniku znoszenia kropli cieczy opryskowej w czasie wykonywania zabiegów agrochemicznych czy spływu powierzchniowego (głównie w czasie ulewnych opadów bądź spływu wód roztopowych) (Larson i wsp., 1995; Schriever i Liess, 2007). Ze względu na stabilność triazoli w środowisku wodnym oraz ich sukcesywny dopływ z terenów intensywnie wykorzystywanych rolniczo, mogą one występować miejscowo, w stężeniach śladowych aż po wysoce toksyczne. Środowiskowe stężenia fungicydów azolowych obserwowano na poziomie 0,175 - 0,2 mg l⁻¹ (Elsaesser i Schulz, 2008; Zubrod i wsp., 2010). Andreu-Sánchez i Carrasco (2007) zanotowali stężenie tebukonazolu na poziomie 5 µg l⁻¹ w wodach powierzchniowych Albufera Natural Park (Walencja, Hiszpania). Natomiast Padovani i wsp. (2006) określili poziom tricyklazolu (odpowiednik prochlorazu) oznaczanego w wodach powierzchniowych z obszarów czystych ekologicznie (na terenie Włoch) na poziomie 10 µg l⁻¹. Natomiast w wodach powierzchniowych Norwegii wykryto propikonazol w stężeniach 0,1 - 10 µg l⁻¹ (Almli i wsp., 2002). Częstość wykrywania pozostałości substancji aktywnych w wodach powierzchniowych związana jest z terminami zabiegów wiosennych i jesiennych oraz asortymentem stosowanych fungicydów w danym rejonie. Trudności w oznaczaniu/wykrywaniu pozostałości fungicydów wynikają też z szybkiego ich rozcieńczenia w wodach płynących oraz granicy ich wykrywalności w stosowanych metodach analitycznych (na poziomie 10⁻⁴ mg l⁻¹) (Sadowski i Kucharski, 2007). Na skromną krajową literaturę z tego zakresu ma również wpływ duży koszt i pracochłonność badań oraz brak odpowiedniej aparatury. Należy tu podkreślić, że prawo Unii Europejskiej wyraźnie reguluje, jakie pestycydy należy monitorować w wodach powierzchniowych i gruntowych, a wśród nich brak jest fungicydów. Skutkuje to brakiem realnej wiedzy o ładunku fungicydów przedostającym się do wód

powierzchniowych na obszarach rolniczo intensyfikowanych, a co za tym idzie wpływie fungicydów na różne typy biocenoz wodnych.

Wśród właściwości fungicydów, które mogą mieć decydujący wpływ na faunę i florę środowiska wodnego należy wymienić rozpuszczalność, trwałość oraz toksyczność. Trwałość pestycydów w środowisku jest jednym z decydujących czynników branych pod uwagę przy dopuszczaniu ich do użytkowania. Przykładem mogą być fungicydy ditiokarbaminianowe uważane generalnie za nietrwałe w środowisku wodnym i łatwo ulegające hydrolizie. Przeciwnieństwem ich są triazole. Odporność ich na utlenianie i działanie promieniowania UV powoduje dłuższe utrzymywanie się w środowisku wodnym, stąd też wykazują one znaczną toksyczność dla organizmów. Duży wpływ na stopień degradacji środków grzybobójczych ma odczyn wody i jej temperatura. Wydajność degradacji ditiokarbaminianów w przedziale pH 4,3 - 6,4 rośnie z 25 do 72% (Różański, 1992). Znaczenie ma również obecność mikroorganizmów zdolnych do ich rozkładu oraz czas ich adaptacji (Dojlido, 1995). Okres półtrwania niektórych fungicydów w środowisku wodnym waha się od kilku godzin do nawet kilkudziesięciu tygodni (Tab. 3). W środowisku wodnym może dojść również do wtórnego zanieczyszczenia pestycydami w wyniku czynności życiowych organizmów wodnych oraz desorpcji z osadów dennych i zawiesiny (Kaleta, 2004).

Pestycydy z założenia są substancjami toksycznymi. Niemniej jednak dąży się, aby cechowała je silna selektywność. Cel ten jest bardzo trudny do osiągnięcia, a pestycydy zawsze w jakimś stopniu są szkodliwe dla biotycznych elementów środowiska. Tak jest i w przypadku fauny słodkowodnej. Szkodliwy wpływ fungicydów i innych pestycydów na organizmy wodne polega na zakłóceniu równowagi biologicznej oraz zaburzeniu procesu samooczyszczania się wód. Toksyczność fungicydów dla organizmów wodnych zależy od temperatury, siły jonowej wody (zasolenia), zawartości i rodzaju zawiesin oraz od rodzaju i struktury chemicznej związku. Przeciwnie do zwierząt lądowych, toksyczność fungicydów dla organizmów wodnych jest na ogół duża (Tab. 3).

Tab. 3. Trwałość w środowisku niektórych substancji aktywnych i ich toksyczność dla organizmów wodnych (opracowanie własne na podstawie dostępnej literatury).

FUNGICYD	TRWAŁOŚĆ W GLEBIE	TRWAŁOŚĆ W WODZIE	TOKSYCZNOŚĆ: LD ₅₀ /LC ₅₀
Benomyl	Trwały; T _{1/2} – 3-6 miesięcy	Szybka degradacja do karbendazymu	tilapia nilowa – (96h) 4,39 mg l ⁻¹
Imazalil	Trwały; T _{1/2} – 120-190 dni	Trwały	pstrąg tęczowy – 2,5 mg l ⁻¹ bass pręgowany – 3,2 mg l ⁻¹
Kaptan	Średnio trwały; T _{1/2} – 1-10 dni	Nietrwały; T _{1/2} – do 54h	bass pręgowany – (96h) 0,072 mg l ⁻¹ czawycza – (96h) 0,056 mg l ⁻¹ rozwiłitka – 7-10 mg l ⁻¹
Karbendazym	Trwały; T _{1/2} – 3-6 miesięcy	Średnio trwały; T _{1/2} – 6-25 tygodni	ryby sumokształtne – 0,05-14 mg l ⁻¹
Karboksyna	Nietrwały; T _{1/2} – 3 dni	Nietrwały, max do 7 dni	pstrąg tęczowy – (96h) 0,1 mg l ⁻¹
Mankozeb	Nietrwały; T _{1/2} – 1-5 dni,	Nietrwały; T _{1/2} – 1-2 dni	pstrąg tęczowy – (96h) 1,1 mg l ⁻¹ karaś złocisty – (48h) 9 mg l ⁻¹ karp – (48h) 4 mg l ⁻¹ rozwiłitka – (48h) 0,6-1,0 mg l ⁻¹ algi – (5 dni) 0,05 mg l ⁻¹
Prochloraz	Stabilny	Średnio trwały; T _{1/2} – 4-7 dni	pstrąg tęczowy – (96h) 2,4 mg l ⁻¹ rozwiłitka – (48h) 4,3 mg l ⁻¹
Tebukonazol	Średnio trwały; T _{1/2} – 5-41 dni	Średnio trwały; T _{1/2} – 22 dni	pstrąg tęczowy – (96h) 4,4 mg l ⁻¹ karp – (96h) 2,37 mg l ⁻¹ karaś złocisty – (96h) 8,7 mg l ⁻¹ danio pręgowany – (96h) 19,6 mg l ⁻¹ <i>Rhamdia quelen</i> – (96h) 5,3 mg l ⁻¹ rozwiłitka – (48h) 11,8 mg l ⁻¹ algi – (72h) 5,3 mg l ⁻¹
Tiuram	Średnio trwały; T _{1/2} – 14-40 dni	Nietrwały	bass pręgowany – 0,23 mg l ⁻¹ pstrąg tęczowy – 0,13 mg l ⁻¹ karp – 4 mg l ⁻¹
Triadimefon	Średnio trwały; T _{1/2} – 14-60 dni	Bardzo stabilny; po 28 tygodniach pozostaje prawie 95%	pstrąg tęczowy – (96h) 14 mg l ⁻¹ karaś złocisty – (96h) 10-20 mg l ⁻¹

Wśród organizmów wodnych szczególnie wrażliwych na skażenie wód powierzchniowych pestycydami, w tym fungicydami, są ryby. Fungicydy ditiokarbaminianowe w większości wykazują toksyczność ostrą (96 h LC₅₀) w stosunku do różnych gatunków ryb w granicach 0,5 - 17 mg l⁻¹. Podobnie LC₅₀ większości fungicydów triazolowych wynosi 2 - 26 mg l⁻¹, natomiast karbendazym wykazuje toksyczność ostrą dla pstruga tęczowego, *Oncorhynchus mykiss*, na poziomie 370 µg l⁻¹ (Palawski i Knowles, 1986; Tab. 3). Również dla tego gatunku ryb tiuram wykazuje dużą

toksyczność ostrą (96 h LC₅₀) na poziomie 130 µg l⁻¹ (Tab. 3). Trzeba jednak zaznaczyć, że wyższą toksyczność dla ryb wykazują z reguły fungicydy o niewielkiej trwałości w środowisku wodnym. Udowodniono, że skażenie fungicydami może być przyczyną wystąpienia różnych objawów toksycznych u ryb. Ditiokarbaminiany uważa się za embriotoksyczne i teratogenne (powodują m. in. deformacje szkieletu u wylęgu) w stosunku do wielu gatunków ryb (Haendel i wsp., 2004; van Bortel i wsp., 2010; Tilton i wsp., 2009). Przy ekspozycji na tiuram zaobserwowano modulację niektórych parametrów fizjologicznych, np. obniżenie poziomu hemoglobiny i glukozy, leukopenię, wzmożoną aktywność dehydrogenazy-6-fosforanowej oraz podwyższenie poziomu lipidów i dehydrogenazy mleczanowej w wątrobie (Van Leeuwen i wsp., 1986). Udowodniono także, że propikonazol i tiabendazol mogą modyfikować aktywność enzymów kluczowych dla biotransformacji ksenobiotyków (Almli i wsp., 2002). Natomiast prochloraz, inhibitor cytochromu P-450 w komórkach grzybów, może również wiązać się i hamować aktywność różnych typów aromatyzacji (CYPs) w komórkach kręgowców, a tym samym przyczyniać się do upośledzenia procesu detoksykacji bądź przemian hormonów steroidowych. Taki mechanizm działania prochlorazu znacząco wpływa na hormonalną kontrolę rozrodu ryb (Ankley i wsp., 2009; Ankley i wsp., 2005; Thorpe i wsp., 2007). Stąd też prochloraz jest klasyfikowany do grupy polutantów zaburzających gospodarkę hormonalną, zwanych „endocrine disruptors”. Wykazano też znaczący wpływ fungicydów na integralność membran w komórce, a tym samym na indukowanie reaktywnych form tlenu, co prowadzi do stresu oksydacyjnego (Atamaniuk i wsp., 2013; Ferreira i wsp., 2010; Sancho i wsp., 2010; Toni i wsp., 2011a i b).

W przypadku ekspozycji ryb na różne pestycydy wielokrotnie badano liczne i bardzo odmienne parametry wskaźnikowe. Jednak odpowiedź organizmu ryb na stres chemiczny wydaje się nie wykazywać specyficzności w stosunku do rodzaju pestycydów. Powszechnie uważa się, że wskaźniki hematologiczne są bardzo czułe i mogące dostarczyć ważnych informacji o stanie zdrowotnym ryb (Silbergeld i wsp., 1974; Silveira-Coffigny i wsp., 2004; Soldatov, 2005; Sopińska, 1983). Podobnie jest z badaniem aktywności enzymów wątrobowych, aminotransferazy asparaginowej i alaninowej, które są wyznacznikami aktywności metabolicznej i odzwierciedleniem

stanu czynnościowego wątroby - narządu odpowiedzialnego za metabolizm ksenobiotyków. Wzrost aktywności enzymatycznej w macierzy zewnątrzkomórkowej lub osoczu jest czułym wskaźnikiem nawet drobnego uszkodzenia komórek, które niejednokrotnie notowano w przypadku narażenia ryb na liczne pestycydy (Przybylska-Wojtyszyn i wsp., 1992; Sancho i wsp., 2010; Scott i Sloman, 2004). Wiele prowadzonych badań skupia się na zmianach aktywności poszczególnych enzymów, białek bądź reakcjach konkretnego układu fizjologicznego. Z przeglądu dostępnej literatury wynika, że w badaniach toksykologicznych wykorzystuje się różne wskaźniki np. markery efektu, ekspozycji bądź wskaźniki wrażliwości (podatności) na substancje toksyczne, wspólnie określanym mianem biomarkerów (WHO, 1993). Takimi biomarkerami są np. aktywność enzymów kluczowych w procesie biotransformacji, wskaźniki stresu oksydacyjnego, metabolity powstające w procesie biotransformacji, wskaźniki hematologiczne, immunologiczne, endokrynne, behawioralne i szereg innych. Właśnie w badaniach ekotoksykologicznych wykorzystanie biomarkerów staje się kluczowe, gdyż praktycznie nie jest możliwe, aby monitorować wszystkie zanieczyszczenia antropogeniczne czy pochodzenia naturalnego.

Szkodliwy wpływ podprogowych stężeń substancji toksycznych na populacje organizmów jest często trudny do wykrycia, a efekty te wydają się przejawiać tylko po dłuższym okresie ekspozycji, kiedy stają się nieodwracalne. Bioindykatory (biomarkery, wskaźniki ekologiczne) jako mierzalne biologiczne odpowiedzi ustroju (od molekularnych poprzez reakcje komórkowe, fizjologiczne i zmiany behawioralne) mogą być stosowane do ogólnej oceny kondycji organizmów oraz być sygnałem wczesnego zagrożenia ze strony środowiska (van der Oost i wsp., 2003). Co więcej, z dostępnej literatury wynika, iż substancje toksyczne dają obraz zmian bioznaczników hematologicznych, genetycznych, enzymów procesu biotransformacji, związanych z procesem rozrodu i szereg innych. Może to świadczyć o tym, iż substancje toksyczne, nawet w podprogowych dawkach wpływają znacząco na działanie całego organizmu, a nie tylko zakłócają funkcjonowanie poszczególnych komórek czy narządów.

CEL PRACY

Ryby, jako organizmy na najwyższym szczeblu łańcucha troficznego ekosystemów wodnych są ważnym modelem w badaniach toksyczności wielu związków antropogenicznych. Pomimo szerokiego stosowania fungicydów, opublikowane dane dotyczące ich wpływu na ryby są fragmentaryczne i niewystarczające. Dotyczy to zwłaszcza wpływu subtoksycznych stężeń fungicydów na organizmy wodne, w tym i ryby. Większość prac ogranicza się zwykle do wyznaczenia toksyczności ostrej, a badania przeprowadzone są w warunkach laboratoryjnych, z wykorzystaniem klasycznych testów toksyczności na standardowych gatunkach organizmów wodnych: glonach, skorupiakach (rozwiłitka), czasem mięczakach oraz rybach.

Celem pracy doktorskiej była ocena wpływu subtoksycznych stężeń wybranych fungicydów na organizm karpia na podstawie zmian histopatologicznych i ultrastrukturalnych w wytypowanych narządach.

Drugim celem była ocena zaburzeń stanu fizjologicznego karpia eksponowanych na subtoksyczne stężenia fungicydów, na podstawie analizy wybranych wskaźników metabolicznych i hematologicznych.

Przeprowadzone badania stanowiły także podstawę do dokonania całościowej oceny toksycznego oddziaływania wybranych fungicydów na organizm karpia.

II. MATERIAŁ I METODY

2.1. TESTOWANE SUBSTANCJE CHEMICZNE

W doświadczeniach zastosowano substancje aktywne powszechnie stosowanych w rolnictwie środków grzybobójczych – mankozeb, prochloraz i tebukonazol. Najważniejsze właściwości fizykochemiczne badanych fungicydów przedstawia Tab. 4.

Tab. 4. Właściwości fizykochemiczne wybranych fungicydów (opracowanie własne na podstawie e-Pesticide Manuals).

	MANKOZEB	PROCHLORAZ	TEBUKONAZOL
nr CAS	8018-01-7	67747-09-5	10734-96-3
Postać	krystaliczna, jasno szara	krystaliczna, biała	krystaliczna, biała
wzór sumaryczny	$[C_4H_6MnN_2S_4]_xZn_y$	$C_{15}H_{16}Cl_3N_3O_2$	$C_{16}H_{22}C_1N_3O$
masa molowa [g mol ⁻¹]	271,2	376,67	307,82
gęstość [g cm ⁻³]	1,92	1,42	1,25
rozpuszczalność w wodzie w 20°C [g l ⁻¹]	0,0062	0,035	0,032
rozpuszczalność w innych rozpuszczalnikach	dobrze rozpuszczalny w większości rozpuszczalników organicznych	2 500 g l ⁻¹ w chloroformie, ksylenie, toluenie; 3 500 g l ⁻¹ w acetonie	brak danych
trwałość w środowisku	nietrwały	średnio trwały	trwały

2.1.1. Mankozeb

Mankozeb (nazwa zwyczajowa fungicydu) należy do grupy chemicznej etyleno-bis-ditiokarabinianów. Jest to kompleks cynku z etyleno-bis-ditiokarbaminianem manganu, o różnych proporcjach tych składników.

Zakres stosowania mankozebu w rolnictwie jest szeroki i obejmuje zwalczanie: mączniaków rzekomych, zarazy ziemniaczanej, parcha jabłoni i gruszy, opadziny liści porzeczek, rdzy roślin ozdobnych i rdzy wejmutkowo-porzeczkowej oraz grzybiczych pasożytów liści z rodzajów: *Septoria*, *Alternaria*, *Phyllosticta* i innych. Powszechnie stosowany jest w ochronie roślin warzywnych, sadowniczych, leśnych, ozdobnych i zielarskich przed chorobami grzybiczymi, a także jako środek przeznaczony do zaprawiania ziarna, bulw, cebul i nasion.

Do przeprowadzenia badań użyto czystej substancji aktywnej (czystość wzorca analitycznego: 96,4%; Sigma-Aldrich). Mankozeb, ze względu na niską trwałość w środowisku wodnym aplikowano do wody w akwarium 3-krotnie, w równych odstępach czasu w trakcie trwania doświadczenia, każdorazowo w stężeniu $1,0 \text{ mg l}^{-1}$, w formie rozpuszczonej w niewielkiej ilości wody destylowanej (Tab. 4).

2.1.2 Prochloraz

Prochloraz jest związkiem organicznym, pochodną imidazolu (grupa azole), o pełnej nazwie chemicznej: 1-karboksyamid-N-propylo-N-[2-(2,4,6-trichlorofenoksy)etylo] imidazolu. Ma zastosowanie w zwalczaniu agrofagów powodujących: łamliwość podstawy źdźbła, mączniaka prawdziwego, plamistość siatkową, rynchosporiozę, septoriozę liści, szarą pleśń, zgniliznę twardzikową, głównie w uprawach zbóż ozimych i jarych oraz rzepaku.

Ze względu na trwałość w środowisku substancję aktywną (o czystości wzorca analitycznego $99,3 \pm 0,4\%$; Instytut Przemysłu Organicznego, Warszawa), rozpuszczoną w wodzie destylowanej, zaaplikowano do wody akwariowej jednorazowo, w stężeniu 1 mg l^{-1} (Tab. 4).

2.1.3 Tebukonazol

Tebukonazol to zwyczajowa nazwa fungicydu z grupy azoli (konazoli-triazoli). Jego pełna nazwa chemiczna to (RS)-1-(4-Chlorophenyl)-4,4-dimetyl-3-(1,2,4-triazol-1-ylmethyl)pentan- 3-ol. Jest powszechnie stosowany w uprawie: rzepaku jarego i ozimego, zboża jarego i ozimego, owsa, roślin ozdobnych, buraka cukrowego i pastewnego, wiśni, śliwy oraz do ochrony modrzewia. Uważany jest za jeden z lepszych środków grzybobójczych zapobiegający fuzariozie kłosa. Wchodzi także w skład preparatów do zaprawy ziarna zbóż jarych i ozimych.

W doświadczeniu tebukonazol (czystość wzorca: $99,9 \pm 0,1\%$; Instytut Przemysłu Organicznego, Warszawa) rozpuszczono w wodzie destylowanej i jednorazowo, ze względu na trwałość w środowisku, zaaplikowano do wody akwariowej w stężeniu $2,5 \text{ mg l}^{-1}$ (Tab. 4).

Wybór poszczególnych fungicydów do doświadczeń podyktowany był ich szerokim spektrum zastosowania oraz popularnością wykorzystania w rolnictwie. Zastosowane w badaniach stężenia wyjściowe związków zostały wybrane na podstawie danych literaturowych dotyczących wartości LC_{50} dla ryb (głównie dla ryb karpiowatych). Zastosowane stężenia stanowią nie więcej niż 25% tej wartości.

2.2. ZWIERZĘTA DOŚWIADCZALNE

Do badań wykorzystano ryby z gatunku karp (*Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758), o masie ciała $60 \pm 10 \text{ g}$, pochodzące z gospodarstwa stawowego Rybackiej Stacji Doświadczalnej Katedry Ichtiobiologii i Rybactwa Uniwersytetu Rolniczego im. Hugona Kołłątaja w Krakowie. Pozyskiwano je do badań zawsze w okresie wiosennych odłowów, w latach 2011 - 2013. Przed rozpoczęciem właściwych eksperymentów losowo wybrane zwierzęta badano klinicznie i parazytologicznie, następnie umieszczano je w basenach przepływowych i aklimatyzowano do warunków akwaryjnych przez okres miesiąca. W okresie eksperymentalnym ryby przebywały w

akwariach o pojemności 300 l, w warunkach statycznych, o stałych parametrach fizykochemicznych wody: temperatura $19,0 \pm 2^{\circ}\text{C}$; pH 7 - 8; zawartość tlenu rozpuszczonego $7,20 - 9,11 \text{ mg O}_2 \text{ dm}^{-3}$; twardość ogólna 16 – 18°n; stężenie amoniaku gazowego $0,1 - 0,2 \text{ mg NH}_3 \text{ dm}^{-3}$; stężenie jonów azotynowych (NO_2^-) oraz azotanowych (NO_3^-) – 5 mg dm^{-3} oraz $20 - 25 \text{ mg dm}^{-3}$. Podczas trwania eksperymentu regularnie sprawdzano parametry fizykochemiczne wody przy pomocy gotowych zestawów odczynników oraz fotometru firmy HANNA Instruments (Olsztyn). Woda była nieustannie napowietrzana oraz filtrowana przy użyciu filtrów wewnętrznych Fan 3 (Aquael). Ryby w okresie doświadczalnym karmiono raz dziennie płatkami jęczmiennymi oraz larwami ochotkowatych (Chironomidae).

2.3. *UKŁAD DOŚWIADCZENIA*

Badania eksperymentalne nad wpływem wybranych fungicydów na organizm ryb zostały wykonane w dwóch etapach. Etap I dotyczył obserwacji zmian patomorfologicznych powstałych wskutek ekspozycji ryb na fungicydy i do realizacji tego etapu wybrano narządy: skrzela, wątrobę (będącą w rzeczywistości wątrobotrzustką) oraz nerkę tułowiową karpia. Są to najważniejsze narządy uczestniczące w przenikaniu ksenobiotyków ze środowiska wodnego, ich metabolizowaniu i wydalaniu z ustroju.

W etapie II dokonano analizy zmian wybranych wskaźników stanu fizjologicznego ryb wskutek ich ekspozycji na czynnik toksyczny. Podstawę wyboru konkretnych parametrów odzwierciedlających stan fizjologiczny organizmu ryb stanowiły wyniki badań I etapu. Przy ich wyborze kierowano się także możliwością wystąpienia reakcji stresowej podczas ekspozycji ryb na fungicyd. Wybrano także wskaźniki hematologiczne odzwierciedlające interakcję fungicydu z krwią obwodową karpia.

W obu etapach badawczych ryby podzielono na trzy grupy doświadczalne i jedną kontrolną. Jedną grupę doświadczalną ryb eksponowano na jeden fungicyd przez okres 14 dni. Okres ten uznano za wystarczający do całkowitego zaniku substancji

aktywnej fungicydu w wodzie oraz obserwowanego w środowisku naturalnym, ponownego zanieczyszczenia wód powierzchniowych tymi związkami. Po okresie ekspozycji ryby przebywały w czystej wodzie przez kolejne 30 dni (okres rekonwalescencji) celem sprawdzenia, czy ewentualny wpływ fungicydów na organizm ryb jest zjawiskiem przejściowym, czy skutkuje trwałymi zmianami. Układ doświadczenia ilustruje Tab. 5.

Tab. 5. Układ grup doświadczalnych z rodzajem i stężeniem zastosowanych fungicydów.

Grupa doświadczalna	Stężenie aplikowanego fungicydu		Ilość ryb (szt.) w akwarium
	[mg l ⁻¹]	Ilość aplikacji	
KONTROLA	0	0	10
MANKOZEB	1,0	3x	10
PROCHLORAZ	1,0	1x	10
TEBUKONAZOL	2,5	1x	10

2.3.1 Etap I

Narządy do analizy patomorfologicznej pozyskiwano w trakcie sekcji od trzech ryb z każdej grupy eksponowanej na fungicyd i trzech - z grupy kontrolnej. Pobierano następujące narządy: skrzela, wątrobotrzustkę oraz nerkę tułowiową. Skrzela pobrano trzykrotnie: po 3 i 14 dniach ekspozycji ryb oraz po zakończeniu okresu rekonwalescencji. Skrzela, stanowią bramę wejścia ksenobiotyku do organizmu ryby i dlatego pierwszych zmian patologicznych można się spodziewać już w początkowym okresie ekspozycji, tj. po 3 dniach. Do analizy w skaningowym mikroskopie elektronowym pobierano pierwszy łuk skrzelowy z prawej strony ciała ryby, natomiast do transmisyjnego mikroskopu elektronowego i jednocześnie mikroskopu świetlnego - drugi łuk skrzelowy. Nerkę tułowiową oraz wątrobę pobierano dwukrotnie: po 14 dniach ekspozycji oraz po zakończeniu okresu rekonwalescencji ryb.

Do obserwacji zmian patologicznych w wybranych narządach wykorzystano mikroskop świetlny (LM) - Nikon Eclipse Ci-L , elektronowy skaningowy (SEM) - JEOL

JSM 5410 i elektronowy transmisyjny (TEM) - JOEL JEM-100 SX. Pobrane narządy krojono na małe fragmenty, ok. 1 - 3 mm i umieszczano w utrwalaczu Karnovsky'ego. Przygotowano preparaty do obserwacji mikroskopowych wg ogólnie przyjętej dla mikroskopii elektronowej metody (Karnovsky, 1965; Mercer i Birbeck, 1970), z zastosowaniem żywicy epoksydowej (Epoxy Embedding Medium, Sigma Aldrich). Dla uzyskania skrawków ultracienkich (50 - 80 nm) użyto mikrotomu Reichert Jung Ultracut. W celu wnikliwej analizy zmian patologicznych wykorzystano pozyskiwane w tej metodzie skrawki półcienkie (o grubości 0,5 - 1 μm), krojone na ultramikrotomie Tesla BS 490A i wybarwione mieszaniną błękitu metylenowego i Azuru II (1:1). Oglądano je w w/w mikroskopie świetlnym.

3.3.2 Etap II

Na podstawie wyników badań etapu I, do oceny stanu fizjologicznego ryb eksponowanych na fungicydy wybrano następujące wskaźniki:

a. wskaźniki metaboliczne:

- stężenie kortyzolu w osoczu krwi
- stężenie glukozy w pełnej krwi
- stężenie białka ogólnego w osoczu krwi
- stężenie trójglicerydów w osoczu krwi
- aktywność aminotransferaz: asparaginianowej (AST) i alaninowej (ALT) w osoczu krwi

b. wskaźniki hematologiczne:

- ilość krwinek czerwonych (RBC) i białych (WBC)
- wartość hematokrytowa (Ht)
- stężenie hemoglobiny w pełnej krwi (Hb)
- średnia objętość krwinki czerwonej (MCV)
- średnia masa hemoglobiny w krwince czerwonej (MCH)
- średnie stężenie hemoglobiny w krwinkach czerwonych (MCHC)
- leukogram (inaczej leukocytogram, odsetkowy wzór leukocytów)
- analiza zmian patomorfologicznych w elementach morfotycznych krwi.

Do analizy wszystkich parametrów stanu fizjologicznego wykorzystano heparynowaną krew obwodową karpi pobraną metodą punkcji z serca (Svobodová i wsp., 1986 za: Svobodová i wsp., 2012), każdorazowo od 10. osobników z grupy doświadczalnej i 10. – z kontrolnej. Do pobierania krwi obwodowej ryb użyto szklanych pipet Pasteurowskich o specjalnie wydłużonych i cienkich końcach, wcześniej przepłukanych niefrakcjonowaną heparyną sodową, o stężeniu 5000 j.m./ml roztworu (Warszawskie Zakłady Farmaceutyczne Polfa S.A.). Krew obwodową odwirowano (5000 rpm przez 5 minut), a uzyskane osocze zamrożono (w temperaturze -25°C) do czasu wykonania zaplanowanych oznaczeń.

Zaplanowane analizy wykonano kilkakrotnie w trakcie trwania doświadczenia. Stosowano różne czasy pobrań krwi dla różnych wskaźników (Tab. 6) ze względu na zróżnicowany czas ich reakcji na czynnik stresowy - ekspozycję na fungicydy. Każdej grupie eksponowanej na fungicyd przyporządkowano grupę kontrolną: K_M - dla mankozebu, K_P - dla prochlorazu oraz K_T - dla tebukonazolu. W przypadku wartości kontrolnych bardzo zbliżonych do siebie na wykresie przedstawiono je jako jedną wartość (jeden punkt na wykresie).

Tab. 6. Schemat pobierania krwi oraz badania wskaźników stanu fizjologicznego ryb (h – godzina; detoks – okres rekonwalescencji).

Badany parametr	Czas ekspozycji na fungicyd								
	0 h (Kontrola)	1h	3h	6h	12h	24h	3 dni	14 dni	detoks
Kortyzol	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glukoza	+	-	+	+	-	+	+	+	+
Trójglicerydy	+	-	-	-	+	+	+	+	+
Białko ogólne	+	+	+	+	+	+	-	+	+
Aminotransferazy AST i ALT	+	-	-	-	-	-	+	+	+
Wskaźniki hematologiczne	+	-	-	-	-	+	+	+	+

2.3.2.1 Wskaźniki metaboliczne

A) Oznaczanie stężenia kortyzolu

Ilościowe oznaczanie całkowitego stężenia kortyzolu w osoczu heparynowanym wykonano za pomocą zestawu CORTISOL-RIA-CT (DIAsource ImmunoAssays S.A., Belgia). Zasada testu opiera się na technice kompetycyjnej, radioimmunologicznej z zastosowaniem technologii próbek opłaszczonych (przeciwciałami monoklonalnymi), znakowanych izotopem jodu ^{125}I . Pomiar przeprowadzono licznikiem promieniowania gamma typu Wallac 1470 Wizard.

B) Oznaczanie stężenia glukozy

Poziom glukozy w pełnej krwi, bezpośrednio po jej pobraniu od karpia, oznaczano przy pomocy Systemu Monitorowania Stężenia Glukozy we krwi EUSURE Plus (EUMED BIOTECH. CO. LTD). Działanie systemu, zawierającego glukometr oraz paski testowe, oparte jest na technologii biosensora elektrochemicznego oraz działania sił kapilarnych.

C) Oznaczanie stężenia białka ogólnego

Ilościowe stężenie białka ogólnego oznaczano w osoczu krwi ryb kontrolnych i doświadczalnych metodą ilościową wg Lowry'ego w modyfikacji Ślebodzińskiego i wsp. (1982). Absorbancję powstałego zabarwienia odczytywano przy $\lambda = 660 \text{ nm}$, przy pomocy spektrofotometru SPEKOL 11. Stężenie białka ogólnego obliczono za pomocą następującego wzoru:

$$\text{Stężenie białka ogólnego (g ml}^{-1}\text{)} = \frac{E_{\text{próbki}}}{E_{\text{wzorca}}} \times \text{stężenie wzorca} \times \text{rozcieńczenie}$$

gdzie:

E próby – wartość ekstynkcji badanej próbki

E wzorca – wartość ekstynkcji wzorca.

D) Oznaczanie stężenia trójglicerydów

Ilościowe oznaczenie stężenia trójglicerydów w osoczu krwi ryb wykonywano metodą kolorymetryczną (wg Duncombe'a, 1964), przy użyciu gotowego zestawu odczynników (Alpha Diagnostics, Warszawa), przy długości fali 500 nm, na spektrofotometrze CECIL CE 2021. Następnie obliczono stężenia trójglicerydów według następującego wzoru:

$$\text{Stężenie trójglicerydów (mg dl}^{-1}\text{)} = \frac{E \text{ próbki}}{E \text{ wzorca}} \times \text{stężenie wzorca}$$

gdzie:

E próby – wartość ekstynkcji badanej próbki

E wzorca – wartość ekstynkcji wzorca.

E) Oznaczanie aktywności aminotransferazy asparaginianowej (AST) i aminotransferazy alaninowej (ALT)

Oznaczenie aktywności AST i ALT w osoczu karpia wykonano metodą kolorymetryczną opartą na kinetycznej metodzie zaproponowanej przez Karmen i wsp. (1995). Do wykonania analizy aktywności enzymów użyto gotowych zestawów odczynników (Alpha Diagnostics, Warszawa). Pomiaru absorbancji zarówno AST, jak i ALT dokonywano w przeciągu 3 minut, w odstępach czasowych co 1 min. Pomiar został przeprowadzony w temp. 25°C, przy długości fali $\lambda = 340$ nm, długość drogi optycznej: 1 cm na spektrofotometrze CECIL CE 2021. Aktywność aminotransferazy w próbce została wyliczona wg następującego wzoru:

$$\text{Aktywność aminotransferazy } \left(\frac{IU}{l} \right) = \frac{\Delta Abs}{min} \times 1746$$

gdzie:

$\Delta Abs/min$ – średnia wartość absorbancji na minutę.

2.3.2.2. Wskaźniki hematologiczne

Oznaczano RBC, WBC, Ht, stężenie Hb oraz wykonano rozmazy z pełnej krwi ryb doświadczalnych i kontrolnych. Pozostałe parametry czerwonokrwinkowe: MCV, MCH, MCHC przeliczono matematycznie w standardowy sposób.

B) Obliczanie RBC i WBC

RBC i WBC liczono klasyczną metodą komorową, bezpośredniego liczenia przy użyciu mikroskopu świetlnego i hemocytometru. Elementy morfotyczne krwi obwodowej ryb wybarwiono płynem Natta-Herricka (Natt i Herrick, 1952). Krew pełną rozcieńczano w płynie Natta-Herricka w stosunku 1:200, a następnie erytrocyty i leukocyty liczono w komorze Bürkera pod powiększeniem 400 x (Campbell, 2012; Hrubec i Smith, 2010). Ostateczną liczbę krwinek wyliczono wg następującego wzoru:

$$\text{Liczba krwinek (w } 1 \mu\text{l)} = a \times 0,004 \times \text{rozcieńczenie}$$

gdzie:

a – średnia liczba krwinek w małym kwadracie

0,004 – objętość jednego kwadratu.

C) Oznaczanie wartości hematokrytowej

Ht określono wg metody Hedina (1890) (za Bomski, 1995). Krew pełną umieszczano w heparynowanej kapilarze i przy użyciu szybkoobrotowej wirówki mikrohematokrytowej wirowano przez 5 minut (12 tys. obrotów/min). Następnie odczytywano wynik (w %) przy pomocy czytnika hematokrytowego.

D) Oznaczanie stężenia hemoglobiny we krwi

Hb we krwi oznaczano metodą cyjanomethemoglobinową. Gęstość optyczną cyjanomethemoglobiny mierzono fotometrycznie przy długości fali $\lambda = 540 \text{ nm}$ (SPEKOL 11). Stężenie hemoglobiny wyliczano z następującego wzoru:

$$\text{Hb (g\%)} = \frac{E_{\text{próby}}}{E_{\text{wzorca}}} \times \text{współczynnik}$$

gdzie:

E próby – wartość ekstynkcji badanej próbki

E wzorca – wartość ekstynkcji wzorca Hb

współczynnik – stężenie wzorca Hb.

E) Obliczanie wskaźników czerwonych (MCV, MCH, MCHC)

Wskaźniki czerwonych obliczono na podstawie: stężenia hemoglobiny, wartości hematokryty oraz liczby erytrocytów (Lee i wsp., 1998).

- **Średnia objętość krwinki czerwonej - MCV**

Obliczono wg następującego wzoru:

$$MCV (m^3) = \frac{Ht}{RBC} \times 10$$

gdzie:

Ht – wartość hematokrytu (%)

RBC – liczba krwinek czerwonych w 1 mm³ krwi (w mln).

- **Średnia masa hemoglobiny w krwince czerwonej - MCH**

Wyliczono z następującego wzoru:

$$MCH (pg) = \frac{Hb}{RBC} \times 10$$

gdzie:

Hb – stężenie hemoglobiny we krwi (g dl⁻¹)

RBC - liczba krwinek czerwonych w 1 mm³ krwi (w mln).

- **Średnie stężenie hemoglobiny w krwinkach czerwonych - MCHC**

Obliczono wg następującego wzoru:

$$MCHC (g dl^{-1}) = \frac{Hb}{Ht} \times 100 \%$$

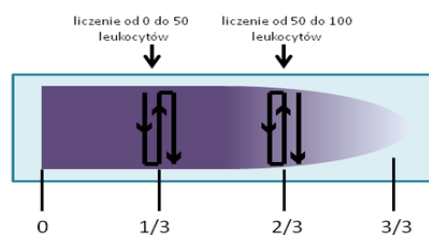
gdzie:

Hb – stężenie hemoglobiny we krwi (g dl⁻¹)

Ht – wartość hematokrytu (%).

F) Wykonanie rozmazów krwi

Od każdej ryby grupy kontrolnej i grup narażonych na fungicydy wykonano po trzy rozmazy krwi. Wybarwiono je zestawem odczynników Hemacolor®staining kit (Merck, Niemcy). Leukocyty liczono metodą dwupolową meandrową na 100 komórek przy powiększeniu 600 x (Bomski, 1995).



Ryc. 1. Liczenie leukocytów metodą dwupolową meandrową (za: Bomski, 1995).

Określono leukogramy, w których wyróżniono następujące rodzaje elementów morfotycznych krwi obwodowej karpia: limfocyty, monocyty oraz granulocyty obojętnochłonne. Wśród tych ostatnich wyróżniono formy niedojrzałe (promielocyty, metamielocyty i mielocyty) oraz neutrofile dojrzałe (pałeczkowate i segmentowane). Identyfikację leukocytów wykonano wg Iwanovej (1970). Procentowy udział poszczególnych rodzajów leukocytów w leukogramie obliczono na 100 krwinek białych. W elementach morfotycznych obserwowano także występowanie zmian patomorfologicznych.

2.4. ANALIZA STATYSTYCZNA DANYCH

Wyniki oznaczeń metabolicznych i hematologicznych poddano analizie statystycznej, wykorzystując program komputerowy STATISTICA 10.0 PL. W ocenie statystycznej przyjęto poziom istotności statystycznej $\alpha = 0,05$ (Łomnicki, 2010). Wyniki przedstawiono w postaci wykresów liniowych, gdzie wartości statystycznie istotne ($P < 0,05$) w porównaniu do kontroli oznaczono symbolem „*”, natomiast leukocytogramy - w tabelach w postaci wartości średnich i odchylenia standardowego ($\bar{x} \pm SD$).

Dla każdego parametru ilościowego określano podstawowe charakterystyki statystyki opisowej: średnią, odchylenie standardowe, wariancję oraz za pomocą testu Shapiro-Wilka oceniano, czy dany parametr charakteryzował się rozkładem zbliżonym lub odbiegającym od normalnego. Następnie do oceny zależności międzygrupowych dla parametrów ilościowych mających rozkład zbliżony do normalnego wykorzystano jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA), poprzedzoną testem Levene (sprawdzającym jednorodność wariancji), a następnie zastosowano porównanie post hoc: test Tukeya w celu wskazania różnic pomiędzy poszczególnymi grupami. W przypadku parametrów jakościowych (zmian histopatologicznych) opierano się na opisowej ocenie zmian patomorfologicznych.

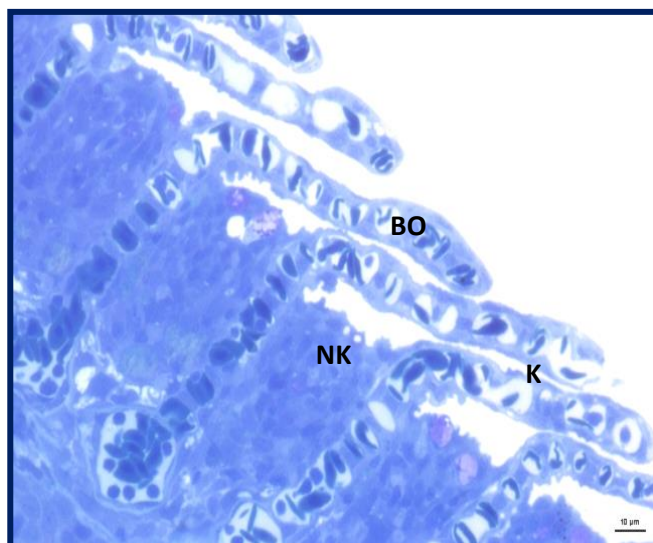
III. WYNIKI

3.1. ANALIZA PATOMORFOLOGICZNA

3.1.1. Obserwacje zmian histopatologicznych w skrzelach karpia w mikroskopie świetlnym (LM)

KONTROLA

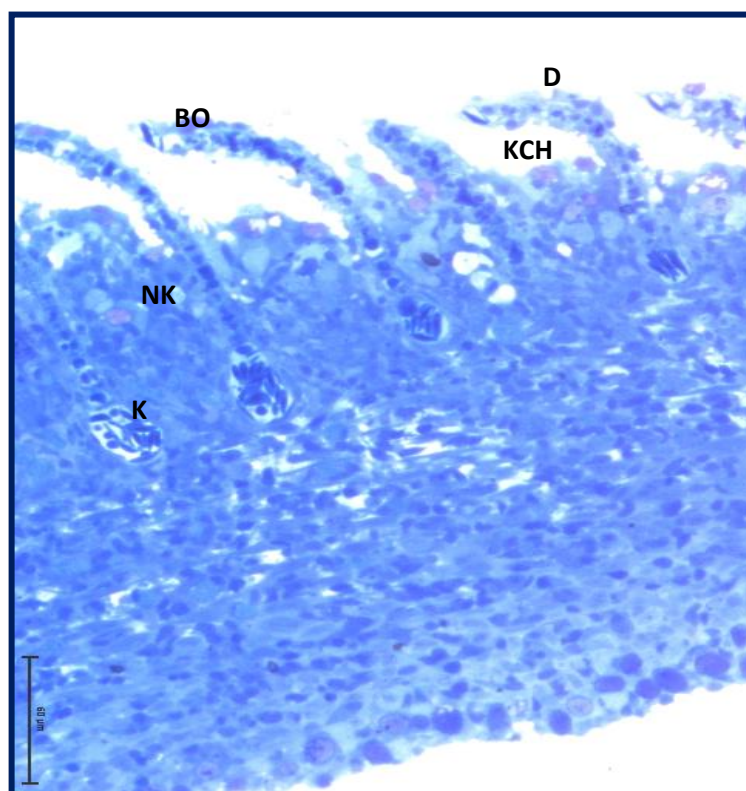
Obserwowano listki skrzelowe karpia grupy kontrolnej (Fot. 1). Na każdym listku skrzelowym widoczne były wąskie, długie blaszki oddechowe pokryte ściśle przylegającymi do siebie komórkami nabłonkowymi (nabłonek oddechowy). W blaszkach oddechowych widoczne były naczynia włosowate (kapilary) z pojedynczymi krwinkami, a tylko miejscowo naczynia zarówno listka skrzelowego, jak i blaszek oddechowych były bardziej wypełnione elementami morfotycznymi. Pomiędzy blaszkami obecne były nacieki komórkowe.



Fot. 1. Fragment listka skrzelowego karpia grupy kontrolnej wraz z blaszkami oddechowymi (BO). Widoczne kapilary wypełnione krwinkami (K). Nacieki komórkowe pomiędzy blaszkami oddechowymi (NK).

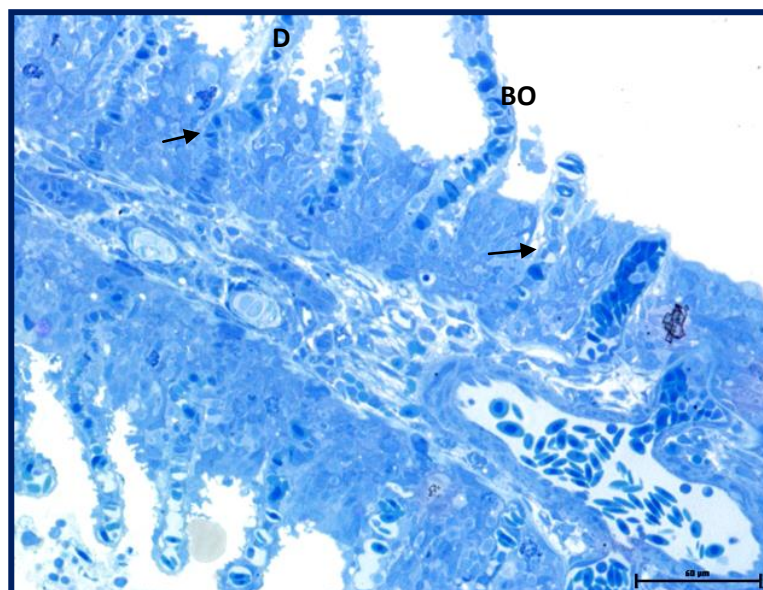
MANKOZEB

Ekspozycja karpia na mankozeb spowodowała wystąpienie licznych zmian patomorfologicznych (Fot. 2). Po trzech dniach ekspozycji blaszki oddechowe miały nieregularny kształt, uległy wydłużeniu i pofałdowaniu. Miejscami nabłonek przylegał ściśle do blaszek oddechowych, miejscami zaś struktura blaszki ulegała zatarciu wraz z pokrywającym je nabłonkiem. W naczyniach krwionośnych obserwowano liczne krwinki. Zwiększył się, w porównaniu do kontroli, naciek komórkowy pomiędzy blaszkami oddechowymi. W nabłonku skrzelii obecne były komórki śluzowe i chlorkowe.



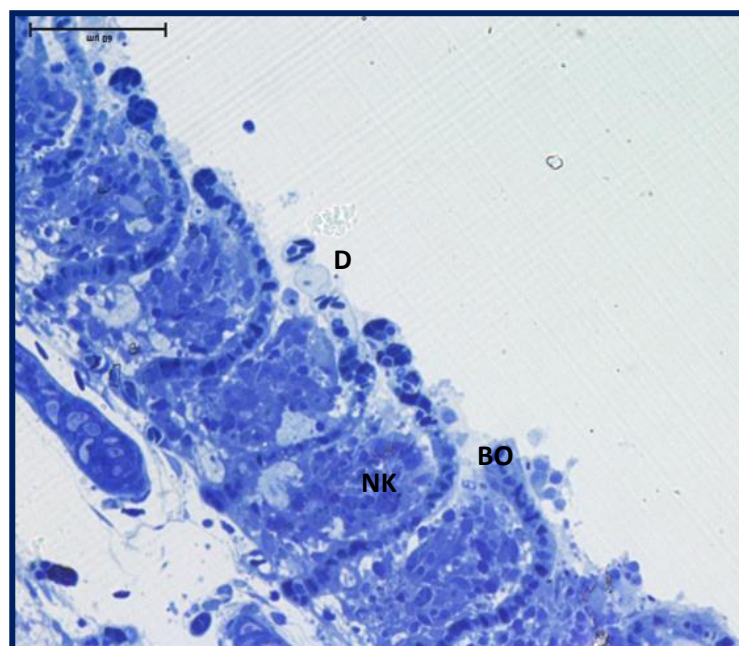
Fot. 2. Fragment listka skrzelowego z blaszkami oddechowymi karpia po 3. dniowej ekspozycji na mankozeb. Kapilary (K) wypełnione elementami morfotycznymi. Nacieki komórkowe (NK) pomiędzy blaszkami oddechowymi (BO) i obecność komórek chlorkowych (KCH). Destrukcja nabłonka oddechowego (D) na końcach blaszek.

Po 14. dniowej ekspozycji karpia na fungicyd struktura blaszek oddechowych ulegała miejscowej, znacznej destrukcji. Nabłonek blaszek oddechowych miejscami odstawał od rusztowania podporowego i złuszczał się. Natomiast rusztowanie podporowe ulegało często rozchwianiu. W blaszkach oddechowych naczynia krwionośne były wypełnione krwinkami (Fot. 3).



Fot. 3. Fragment listka skrzelowego z blaszkami oddechowymi (BO) karpia po 14. dniowej ekspozycji na mankozeb. Nieco rozchwiana struktura podporowa (strzałki), przekrwienie blaszek, destrukcja nabłonka oddechowego (D).

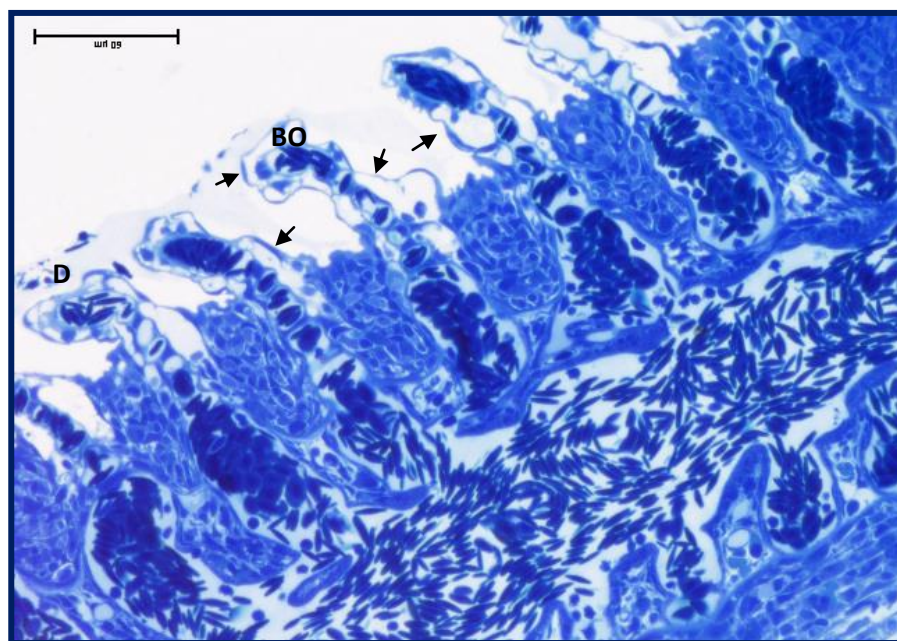
Po okresie rekonwalescencji (Fot. 4) blaszki oddechowe ryb eksponowanych na mankozeb były miejscami pozbawione nabłonka lub ulegał on złuszczeniu. Konstrukcja z komórek podporowych była rozchwiana, zwłaszcza na końcach blaszek oddechowych, gdzie obserwowano też buławkowate rozszerzenie naczyń krwionośnych. Pomiędzy blaszkami oddechowymi obecny był bardzo duży naciek komórkowy.



Fot. 4. Fragment listka skrzelowego z blaszkami oddechowymi karpia po okresie rekonwalescencji po ekspozycji na mankozeb. Bardzo duże nacieki komórkowe (NK) pomiędzy blaszkami oddechowymi (BO). Rozszerzone i uszkodzone końce blaszek oddechowych (D).

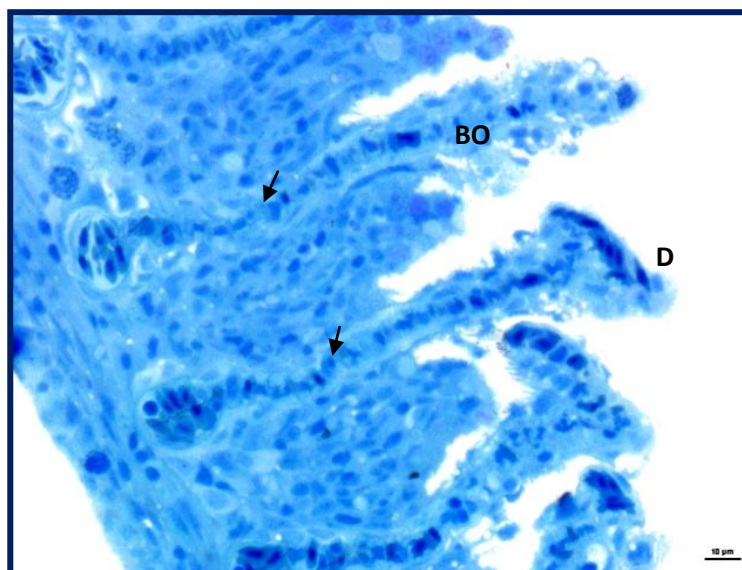
PROCHLORAZ

Po trzech dniach ekspozycji karpia na prochloraz (Fot. 5) obserwowano przekrwienie narządu widoczne w formie rozszerzonych i przepętnionych elementami morfotycznymi naczyń krwionośnych głównych, jak i włosowatych. Nabłonek oddechowy blaszek często odstawał od komórek podporowych lub wykazywał cechy destrukcji. W wielu miejscach blaszek oddechowych, a zwłaszcza na końcach, komórki podporowe ulegały rozchwianiu. Pomiędzy blaszkami oddechowymi obecny był naciek komórkowy. W nabłonku listka skrzelowego obserwowano także komórki śluzowe.



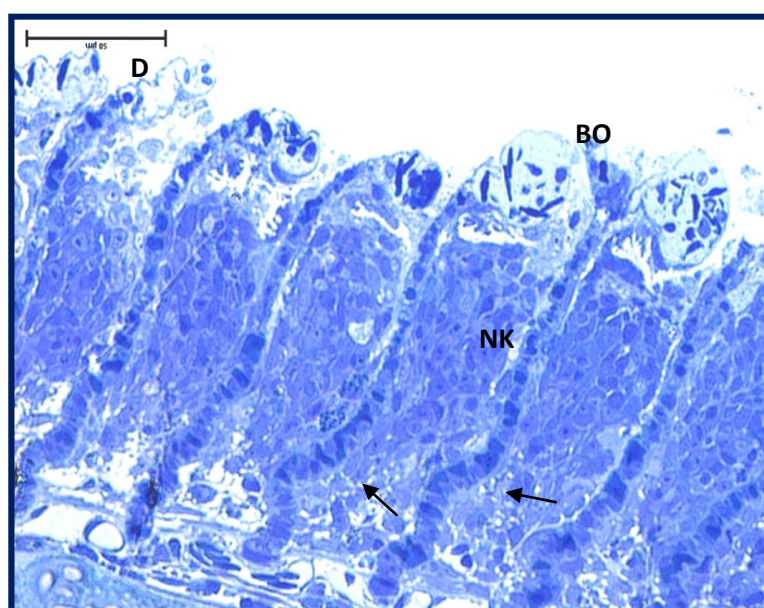
Fot. 5. Fragment listka skrzelowego z blaszkami oddechowymi karpia po 3. dniowej ekspozycji na prochloraz. Silne przekrwienie narządu rujnące strukturę blaszek (BO), odstawanie nabłonka oddechowego od struktury podporowej (strzałki), miejscowa destrukcja blaszek oddechowych (D).

Po 14. dniowej ekspozycji karpia na prochloraz (Fot. 6) obserwowano wydłużone i pofałdowane blaszki oddechowe z miejscowo uszkodzonym nabłonkiem oddechowym. Naczynia włosowate wypełniały gęsto elementy morfotyczne. Komórki podporowe blaszek nie tworzyły zwartej konstrukcji, ulegały rozchwianiu, zwłaszcza na ich końcach. Pomiędzy blaszkami oddechowymi obserwowano naciek komórkowy. Obecne były też komórki śluzowe.

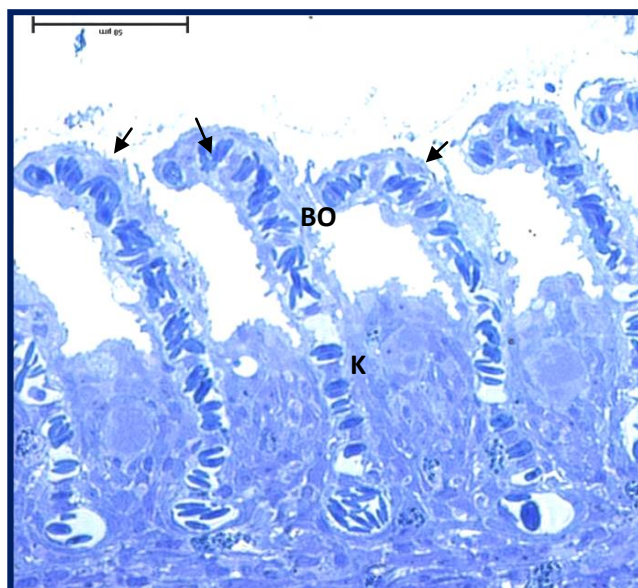


Fot. 6. Fragment listka skrzelowego z blaszkami oddechowymi karpia po 14. dniowej ekspozycji na prochloraz. Rozchwianie struktury podporowej (strzałki) blaszek oddechowych (BO) oraz miejscowa ich destrukcja (D).

Po okresie rekonwalescencji w blaszkach oddechowych ryb (Fot. 7 i 8) obserwowano częściowe zniszczenie czy przerost nabłonka oddechowego, zwłaszcza na ich końcach. Naczynia włosowate blaszek, głównie na ich końcach, były często rozszerzone i wypełnione krwinkami, w tych też miejscach uszkodzeniu ulegały także komórki podporowe. Między blaszkami oddechowymi obecny był duży naciek komórkowy.



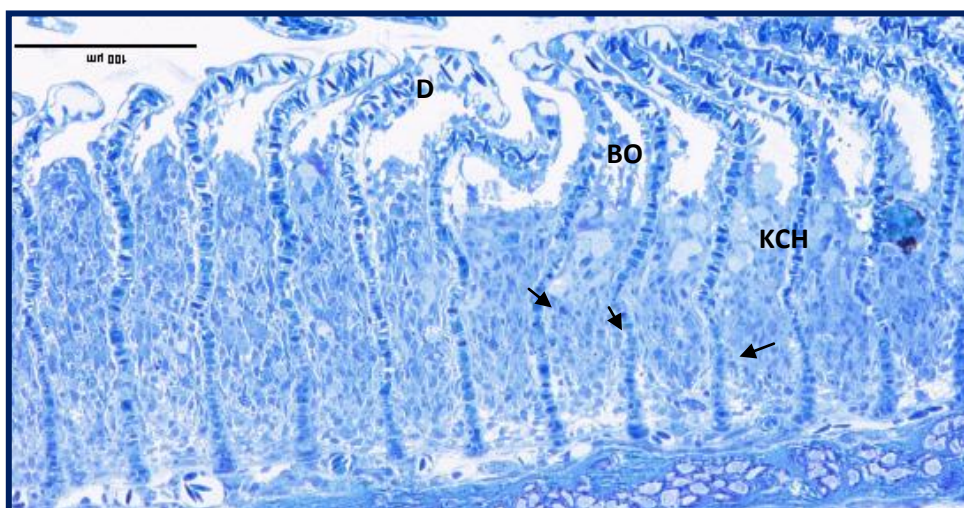
Fot. 7. Fragment listka skrzelowego z blaszkami oddechowymi karpia po okresie rekonwalescencji po ekspozycji na prochloraz. Rozszerzone końce blaszek (BO), częściowa destrukcja nabłonka oddechowego (D) i rozchwiana struktura podporowa (strzałki).



Fot. 8. Fragment listka skrzelowego z blaszkami oddechowymi karpia po okresie rekonwalescencji po ekspozycji na prochloraz. Obrzmienie (strzałki) i uszkodzenie nabłonka oddechowego blaszek (BO). Rozszerzone i wypełnione elementami morfotycznymi kapilary (K).

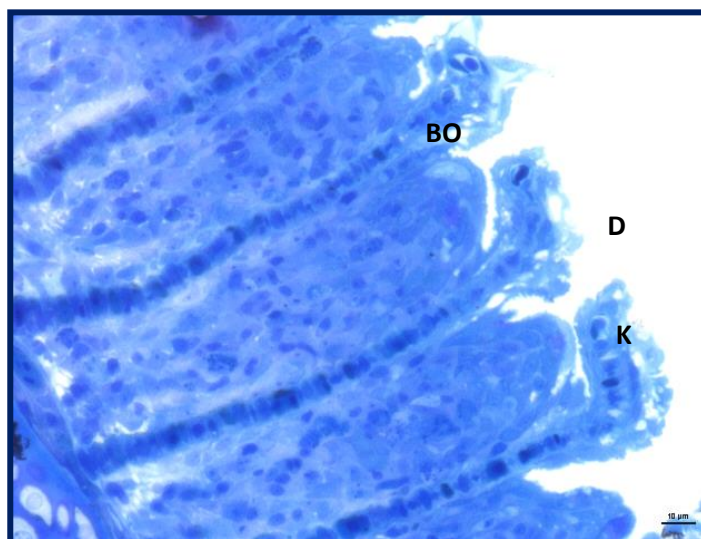
TEBUKONAZOL

W skrzelach karpia eksponowanych na tebukonazol po 3. dniach narażenia (Fot. 9) liczne blaszki oddechowe były wydłużone, a ich konstrukcja podporowa - miejscowo rozchwiana. Końce blaszek oddechowych były na ogół obrzmiałe, a nabłonek oddechowy w tych miejscach ulegał często destrukcji. Między blaszkami skrzelowymi obecny był duży naciek komórkowy z pojedynczymi komórkami chlorkowymi.



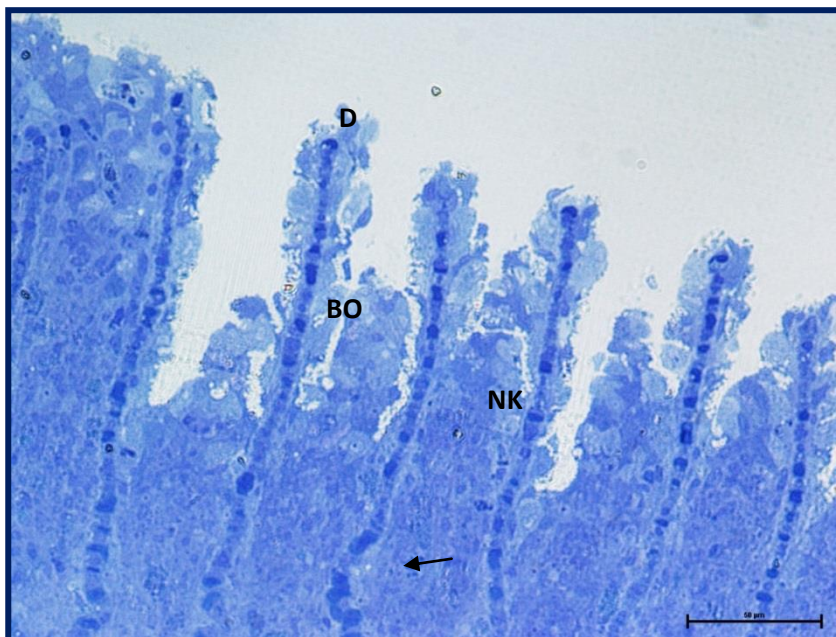
Fot. 9. Fragment listka skrzelowego z blaszkami oddechowymi karpia po 3. dniowej ekspozycji na tebukonazol. Rozchwiana struktura (strzałki) oraz częściowa destrukcja (D) odcinków końcowych blaszek oddechowych (BO). Obecne pojedyncze komórki chlorkowe (KCH).

Po 14. dniowej ekspozycji karpia na tebukonazol obserwowano (Fot. 10) obecność ogromnych nacieków komórkowych pomiędzy blaszkami oddechowymi, często sięgających ich wierzchołków. Końce blaszek oddechowych uległy znacznemu obrzmieniu, a w naczyniach włosowatych w tych miejscach obecne były liczne krwinki.



Fot. 10. Fragment listka skrzelowego z blaszkami oddechowymi karpia po 14. dniowej ekspozycji na tebukonazol. Obrzmiałe końce blaszek (BO) z destrukcją nabłonka oddechowego (D) i rozszerzonymi kapilarami (K).

Po okresie rekonwalescencji u karpia narażonych na tebukonazol (Fot. 11) obserwowano w niektórych blaszkach oddechowych uszkodzenie komórek nabłonkowych. Na końcach blaszek nabłonek był wyraźnie „postrzępiony”, prowadząc do złuszczenia się komórek. Pomiędzy blaszkami obecny był niewielki naciek komórkowy, na którego powierzchni zlokalizowały się pojedyncze komórki chlorkowe. W innych blaszkach obserwowano rozchwianie struktury podporowej, silne złuszczenie się uszkodzonego nabłonka oraz obecność dużych nacieków komórkowych pomiędzy blaszkami oddechowymi.

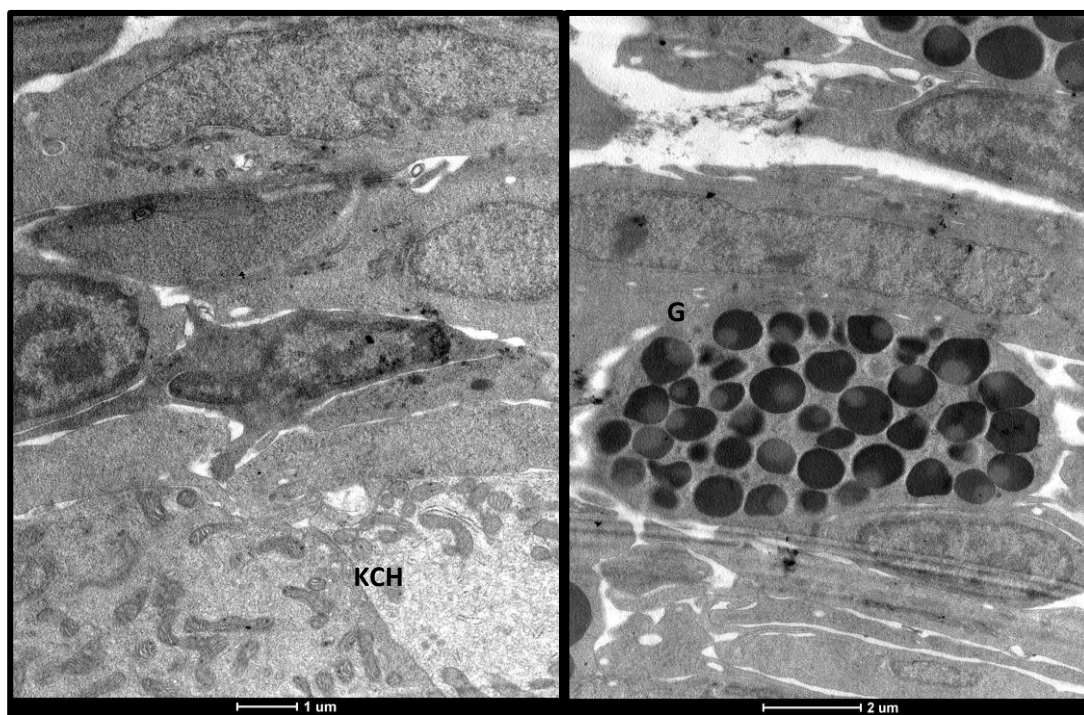


Fot. 11. Fragment listka skrzelowego z blaszkami oddechowymi karpia po okresie rekonwalescencji po ekspozycji na tebukonazol. Obecność różnej wielkości nacieków komórkowych (NK) pomiędzy blaszkami (BO). Rozchwiana struktura podporowa blaszek (strzałka), obrzmienie i destrukcja nabłonka oddechowego (D).

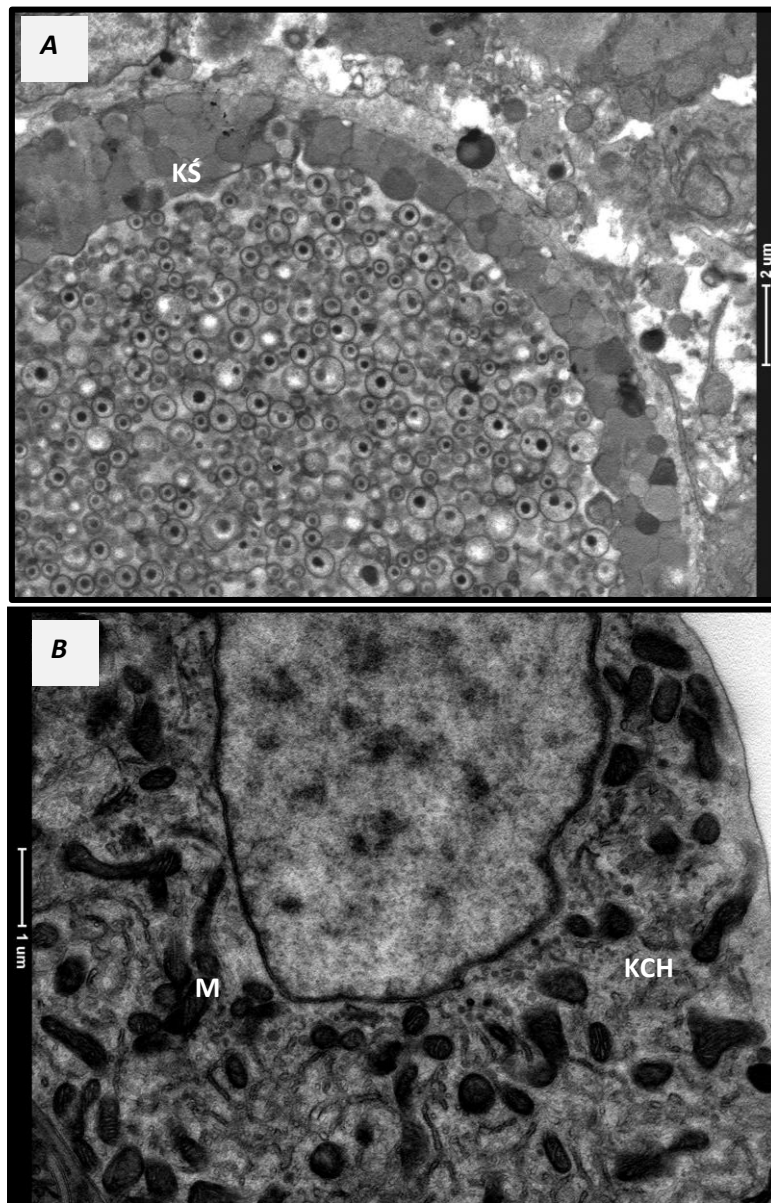
3.1.2. Obserwacje zmian w ultrastrukturze komórek blaszek oddechowych skrzelii karpia w transmisyjnym mikroskopie elektronowym (TEM)

KONTROLA

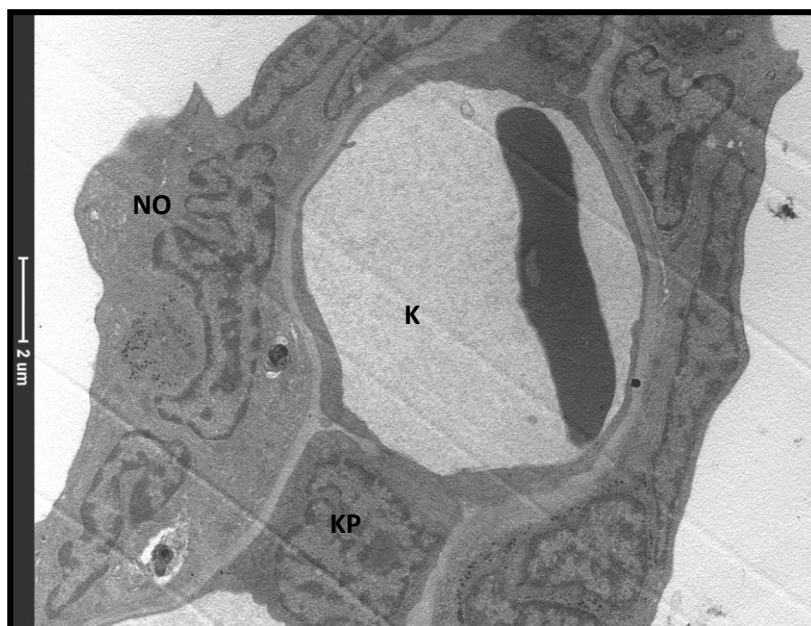
Obserwowano strukturę blaszek oddechowych skrzelii karpia kontrolnych (Fot. 12 - 14), w której wyróżniono nabłonek oddechowy, komórki podporowe tworzące rusztowanie dla cienkiego nabłonka i naczynia włosowate (kapilary), dzięki którym odbywa się wymiana gazowa z otoczeniem. W nabłonku oddechowym komórki na ogół ściśle do siebie przylegały. Pomiedzy nimi zlokalizowane były pojedyncze komórki śluzowe w różnej fazie procesu mukosekrecji, sporadycznie występujące komórki chlorkowe oraz pojedyncze granulocyty. W naczyniach włosowatych obserwowano pojedyncze krwinki, głównie erytrocyty. Struktura blaszek oddechowych tworzyła zwartą całość.



Fot. 12. Elektronogramy nabłonka oddechowego blaszki oddechowej karpia grupy kontrolnej. Ścisłe na ogół przyleganie do siebie różnych komórek blaszki. Obecna komórka chlorkowa (KCH) i granulocyt (G). 9900 x i 8200 x.



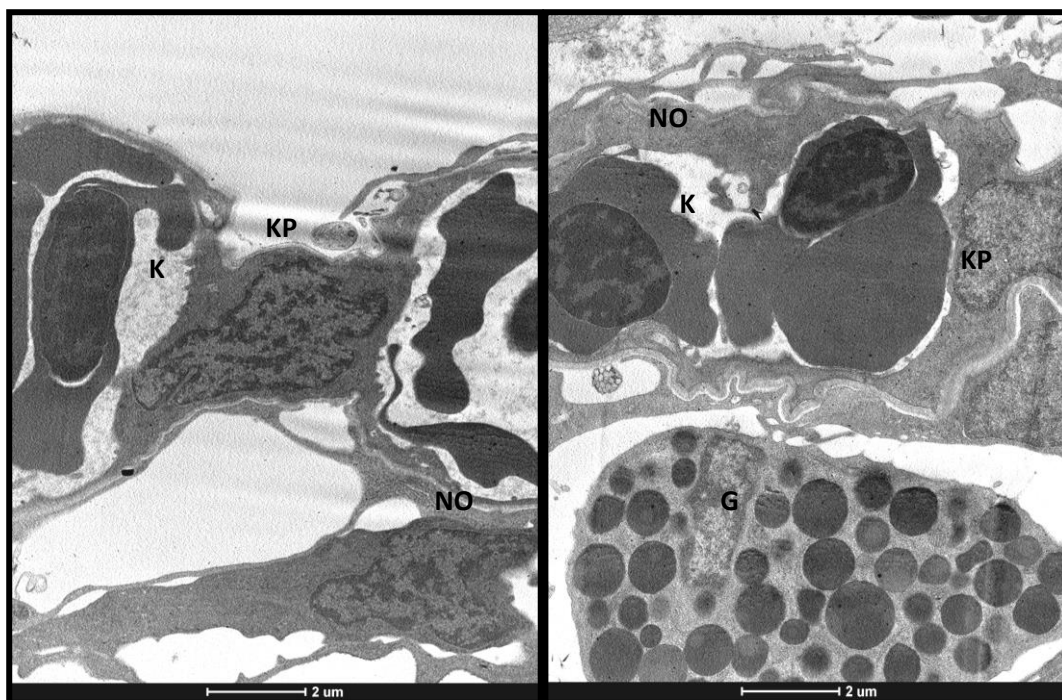
Fot. 13. Elektronogramy nabłonka oddechowego blaszki oddechowej karpia grupy kontrolnej. A. Komórka śluzowa (KŚ). 6000 x. B. Komórka chlorkowa (KCH) z licznymi mitochondriami (M). 11500 x.



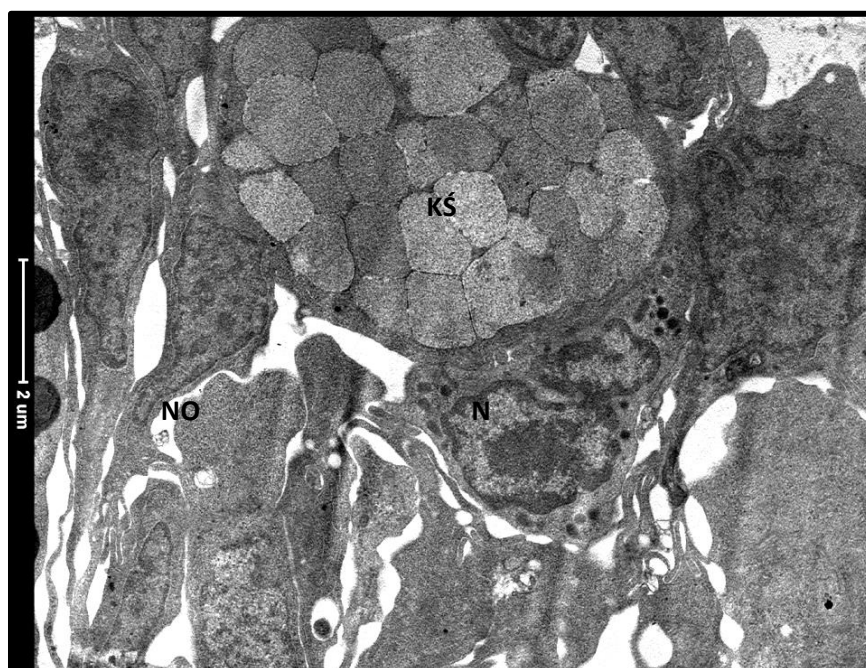
Fot. 14. Elektronogram blaszki oddechowej karpia grupy kontrolnej. Widoczne komórki nabłonkowe (NO) ściśle przylegające do komórki podporowej (KP) i kapilary (K). 6000 x.

MANKOZEB

Po trzech dniach ekspozycji na mankozeb (Fot. 15 - 16) struktura blaszki oddechowej karpia uległa znacznemu rozluźnieniu. W rozszerzonych kapilarach obecne były obrzmiałe, często zniekształcone elementy morfotyczne szczelnie wypełniające ich światło. Pomiedzy komórkami nabłonkowymi obserwowano liczne komórki śluzowe oraz pojedyncze komórki chlorkowe.



Fot. 15. Elektronogramy blaszek oddechowych karpia po 3. dniowej ekspozycji na mankozeb. Rozluźnienie struktury blaszki. Widoczne: zniekształcone i ulegające fragmentacji komórki nabłonka oddechowego (NO) oraz komórki podporowe (KP), pojedynczy granulocyt (G) i rozszerzone kapilary (K) ze zmienionymi patologicznie krwinkami. 8200 x.

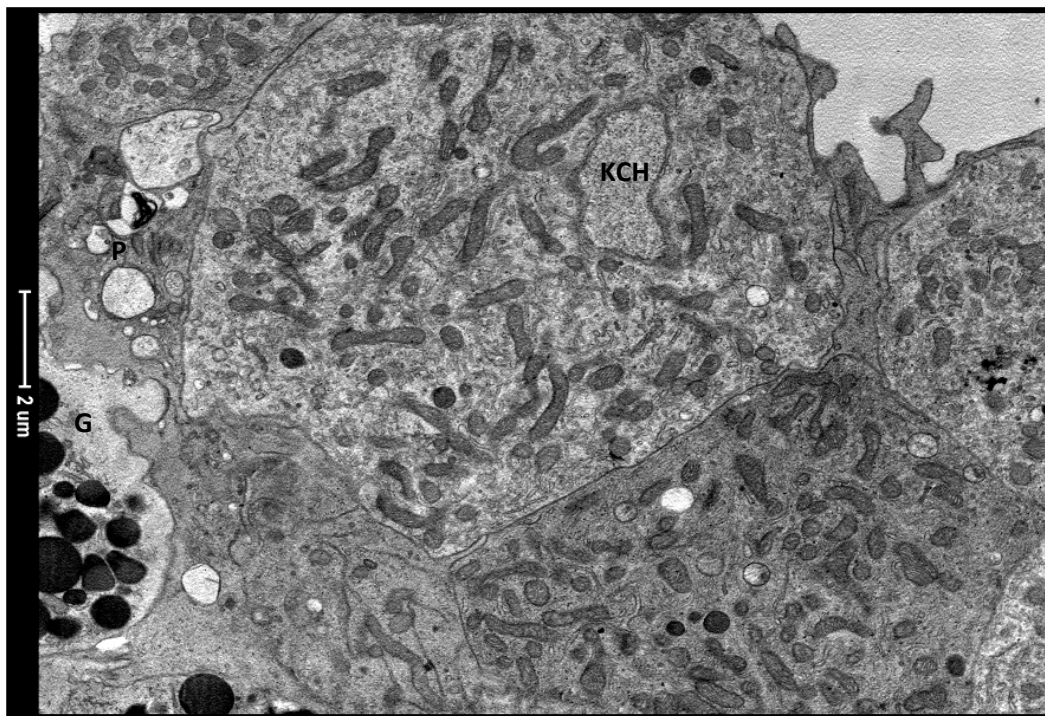


Fot. 16. Elektronogram nabłonka oddechowego karpia po 3. dniowej ekspozycji na mankozeb. W rozluźnionej strukturze nabłonka oddechowego (NO) widoczna komórka śluzowa (KŚ) wypełniona wydzieliną i neutrofil (N). 8200 x.

Po 14. dniach ekspozycji na mankozeb u narażonych karpi obserwowano blaszki oddechowe zarówno z prawidłową, jak i zmienioną patologicznie strukturą (Fot. 17 - 18). W wielu miejscach struktura blaszki była rozluźniona, a liczne komórki nabłonkowe złuszczały się, tworząc luźno rozmieszczone ich fragmenty w wolnych przestrzeniach. W pozostałych komórkach obserwowano liczne pęcherzyki o różnej zawartości, aparat Golgiego oraz nieliczne mitochondria o prawidłowej lub zatartej strukturze. Wśród komórek nabłonkowych blaszek oddechowych obecne były liczne komórki chlorkowe. W naczyniach włosowatych widoczne były zmienione patologicznie elementy morfotyczne krwi.

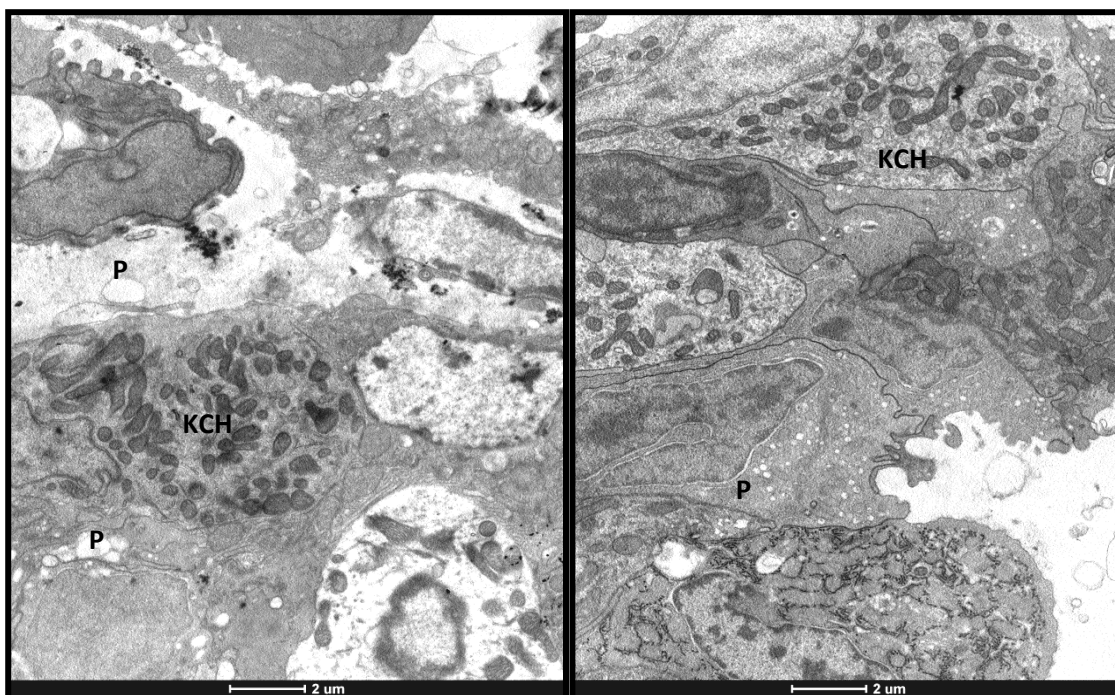


Fot. 17. Elektronogram blaszki oddechowej karpi po 14. dniowej ekspozycji na mankozeb. Rozluźnienie struktury blaszki, fragmentacja i złuszczenie się komórek nabłonkowych (NO), zniszczona komórka podporowa (KP), rozszerzone kapilary (K) wypełnione zmienionymi patologicznie krwinkami. 6000 x.

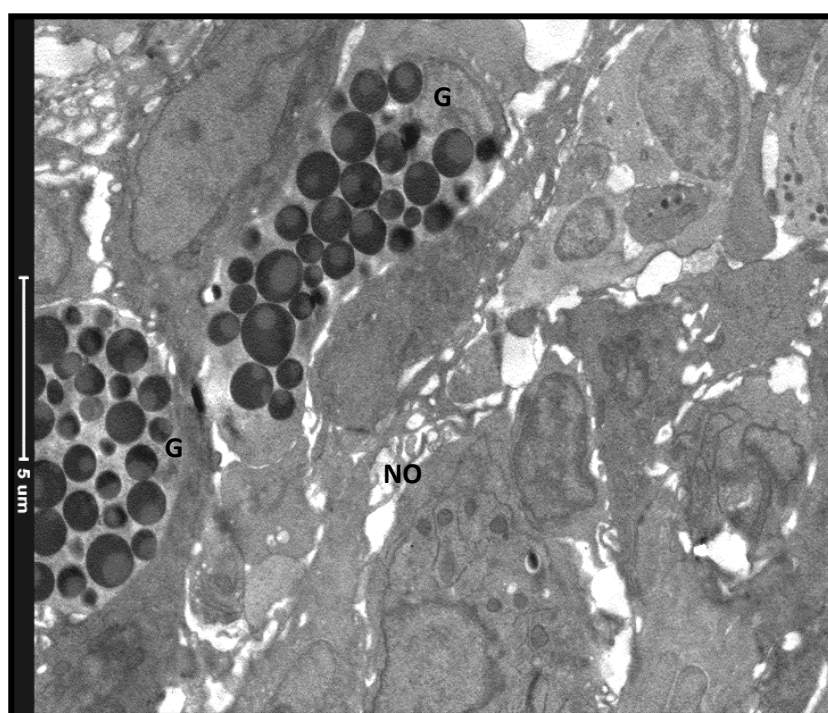


Fot. 18. Elektronogram nabłonka blaszki oddechowej karpia po 14. dniowej ekspozycji na mankozeb. Zwarta struktura nabłonka z obecnymi komórkami chlorkowymi (KCH) przy jego powierzchni oraz granulocytem obojętnochłonnym (G). W komórce nabłonkowej obecne pojedyncze pęcherzyki z fragmentami organelli (P). 6000 x.

Po okresie rekonwalescencji po ekspozycji karpia na mankozeb (Fot. 19 - 20) obserwowano bardzo różny stan struktury blaszek oddechowych: prawidłowy i patologicznie zmieniony. W niektórych blaszkach komórki nabłonka ściśle przylegały do siebie, jednak pojawiły się w nich liczne pęcherzyki zawierające fragmenty organelli. Inne blaszki wykazywały cechy rozluźnienia struktury; obecne w nich komórki nabłonka miały zmienione kształty i były oddalone od siebie, a niektóre z nich ulegały destrukcji. Pomiedzy komórkami nabłonka zlokalizowane były też pojedyncze granulocyty.



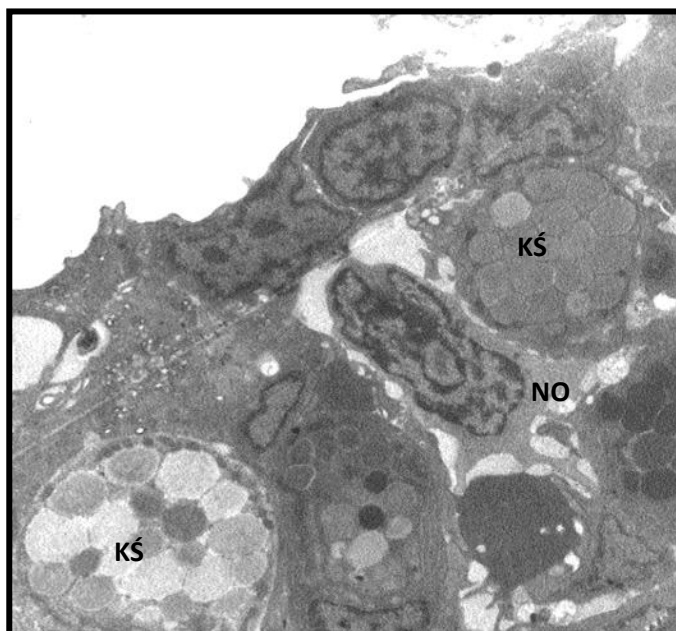
Fot. 19. Elektronogramy nabłonka blaszki oddechowej karpi po rekonwalescencji po ekspozycji na mankozeb. Widoczna zwarta i rozluźniona struktura tkanki, w komórkach nabłonka obecne pęcherzyki (P), a pomiędzy nimi komórki chlorkowe (KCH). 6000 x.



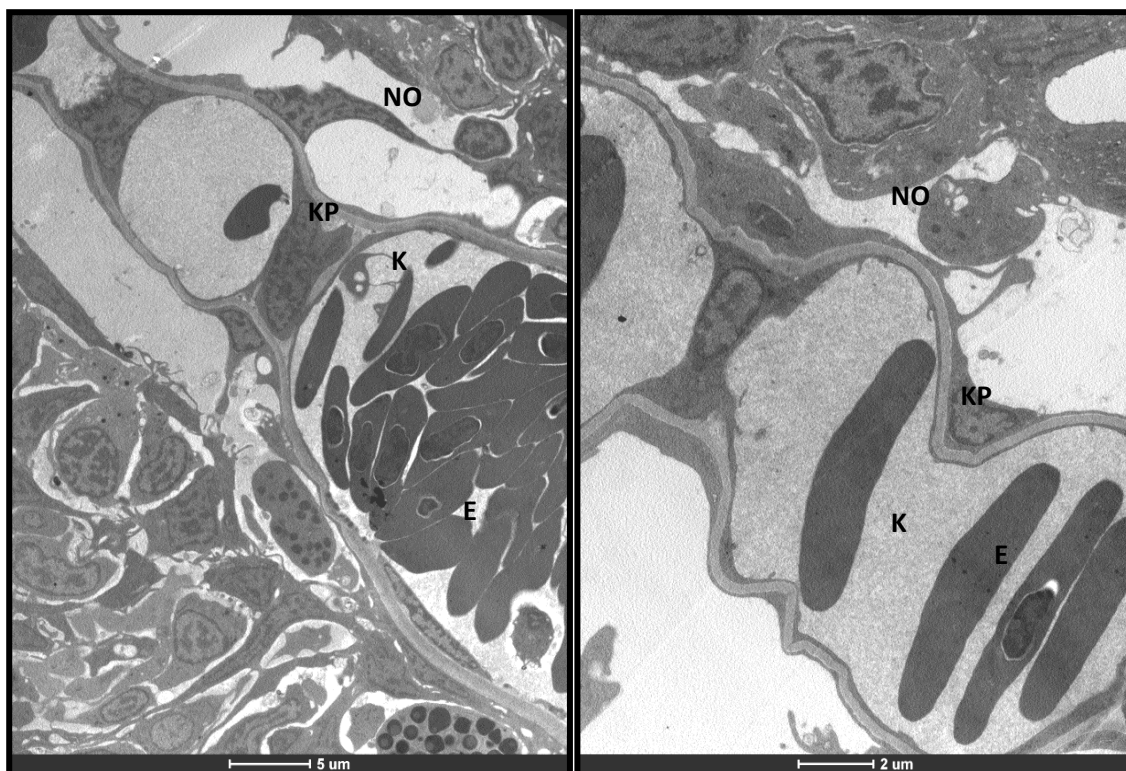
Fot. 20. Elektronogram blaszki oddechowej karpi po okresie rekonwalescencji po ekspozycji na mankozeb. Widoczne pojedyncze granulocyty (G) w rozluźnionej strukturze nabłonka (NO). 4200 x.

PROCHLORAZ

Obserwowano miejscami rozluźnienie struktury blaszki oddechowej w wyniku 3. dniowej ekspozycji karpi na prochloraz (Fot. 21 - 22). Nabłonek oddechowy był niekiedy odseparowany od komórek podporowych, wskutek czego tworzyły się wolne przestrzenie, a w nich obecne były fragmenty organelli i granulocyty obojętnochłonne. W nabłonku obserwowano także komórki śluzowe w różnej fazie mukosekrecji oraz pojedyncze komórki chlorkowe. Komórki podporowe były zniekształcone wskutek ucisku na nie silnie rozszerzonych kapilar. W naczyniach tych były liczne, zwykle obrzmiałe erytrocyty.



Fot. 21. Elektronogram nabłonka blaszki oddechowej karpi po 3. dniowej ekspozycji na prochloraz. W rozluźnionej strukturze nabłonka oddechowego (NO) obecne komórki śluzowe (KŚ) w różnej fazie tworzenia śluzu. 4200 x.

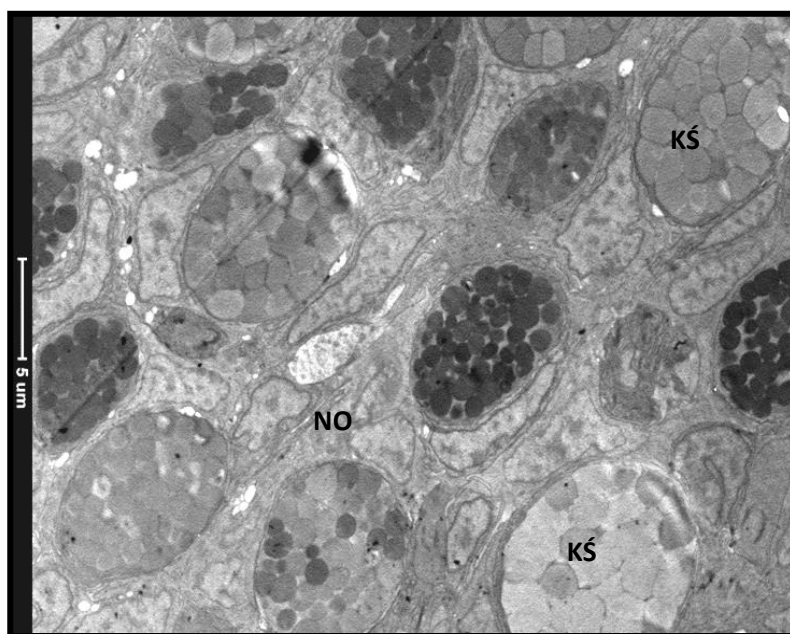


Fot. 22. Elektronogramy blaszek oddechowych karpia po 3. dniowej ekspozycji na prochloraz. Rozluźnienie struktury blaszek, miejscowe odstawanie komórek nabłonka oddechowego (NO) od rusztowania podporowego. Zmienione patologicznie i przemieszczone komórki podporowe (KP). Silnie rozszerzone kapilary (K) z licznymi, obrzmiałymi i prawidłowymi erytrocytami (E). 2550 x i 6000 x.

Po 14. dniowej ekspozycji karpia na prochloraz (Fot. 23 - 24) w blaszkach oddechowych obserwowano miejsca rozluźnienia struktury oraz z prawidłową, zwartą budową. Do miejscowych zmian struktury blaszek przyczyniły się rozszerzone naczynia włosowate wymuszające na otaczających je komórkach zmiany ich kształtu i przesuwanie się w ramach struktury blaszki. Pomędzy komórkami nabłonkowymi blaszek obecne były liczne komórki śluzowe, granulocyty i pojedyncze komórki chlorkowe. Naczynia włosowate były wypełnione często obrzmiałymi erytrocytami.



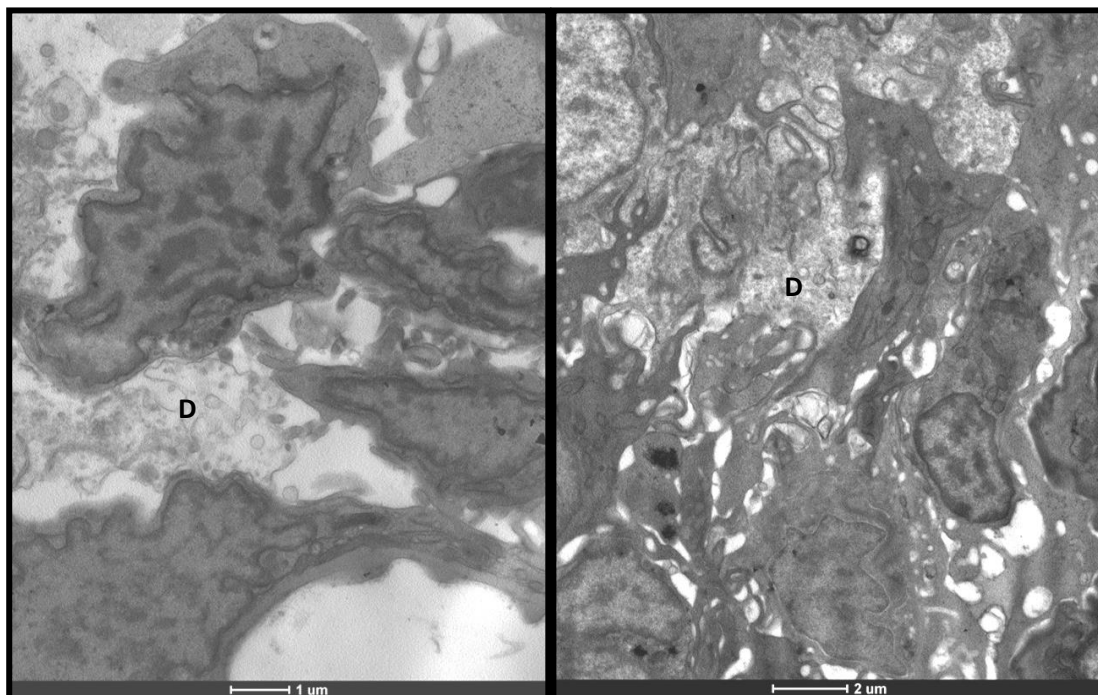
Fot. 23. Elektronogram blaszki oddechowej karpia po 14. dniowej ekspozycji na prochloraz. Kapilary (K) rozszerzone i wypełnione obrzmiałymi erytrocytami (E). 9900 x.



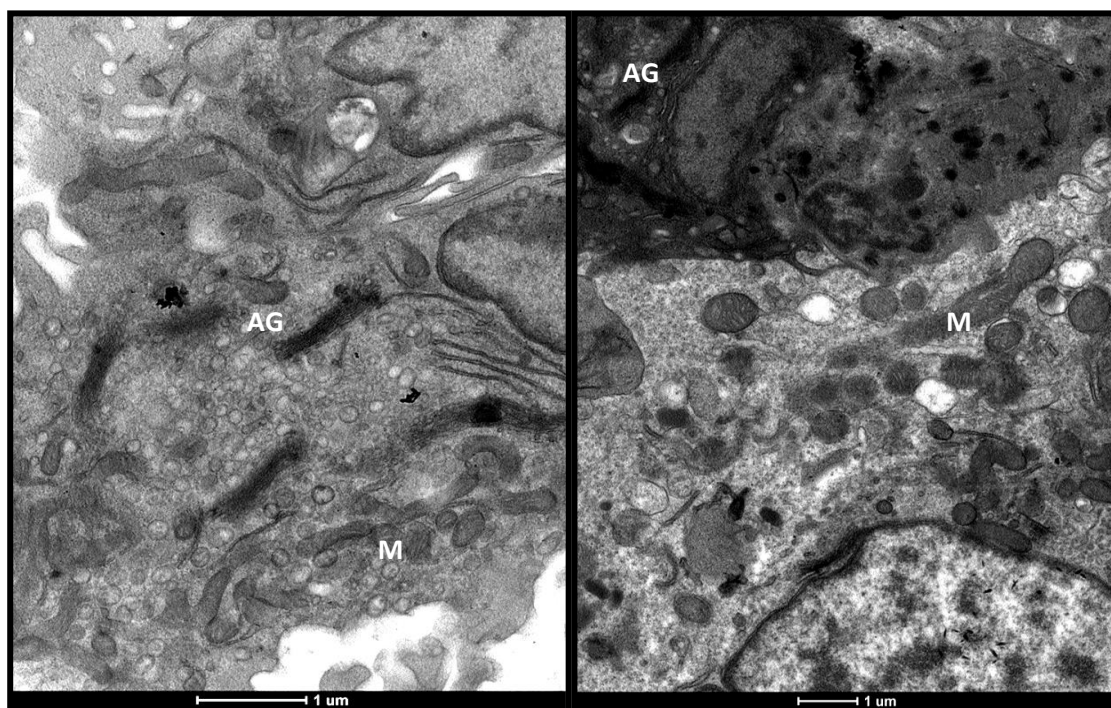
Fot. 24. Elektronogram nabłonka oddechowego karpia po 14. dniowej ekspozycji na prochloraz. Zwarta struktura nabłonka (NO); pomiędzy komórkami liczne komórki śluzowe (KŚ) w różnym stadium tworzenia śluzu. 2550 x.

Po okresie rekonwalescencji po ekspozycji na prochloraz (Fot. 25 - 26) w blaszkach oddechowych obserwowano miejsca zarówno o wyraźnym, jak i umiarkowanym rozluźnieniu struktury. W wielu komórkach nabłonkowych obecne były pęcherzyki. Niekiedy obserwowano też ich złuszczenie. Pomędzy komórkami nabłonka obecne były pojedyncze granulocyty oraz nieliczne komórki śluzowe. Licznie natomiast występowały komórki chlorkowe. Obecne w nich mitochondria były bardzo

zróżnicowane pod względem struktury; w niektórych była ona prawidłowa, inne wykazywały zatarcie struktury wewnętrznej.



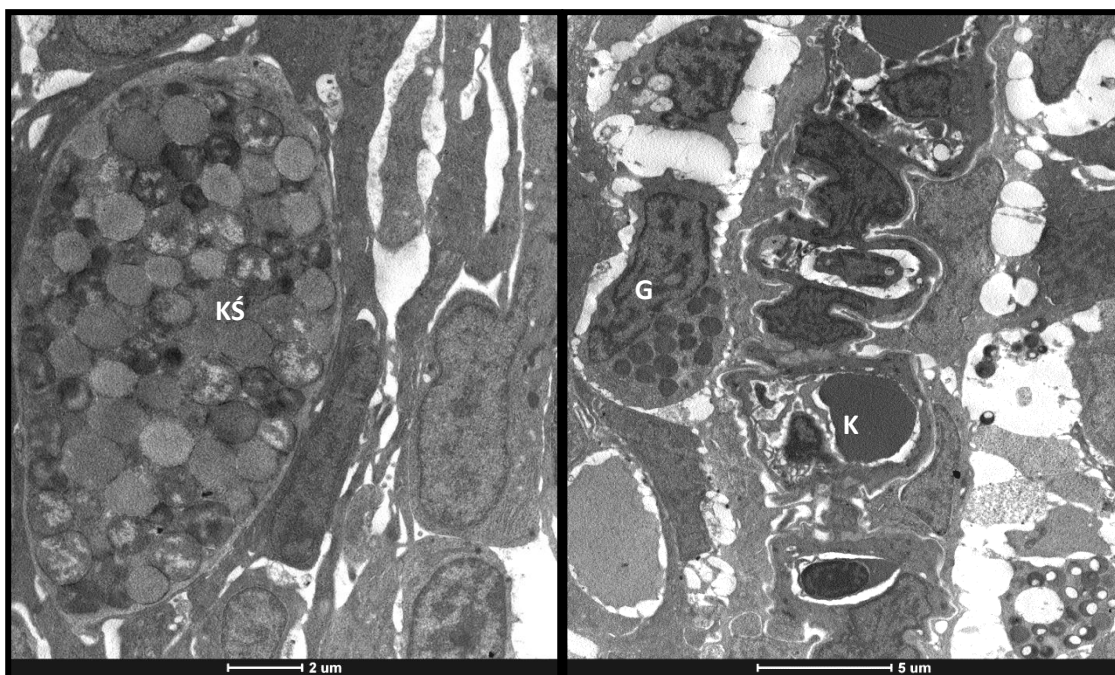
Fot. 25. Elektronogramy nabłonka oddechowego karpia po rekonwalescencji po ekspozycji na prochloraz. Silnie wyrażone i umiarkowane rozluźnienie struktury, destrukcja pojedynczych komórek nabłonkowych (D). 9900 x i 6000 x.



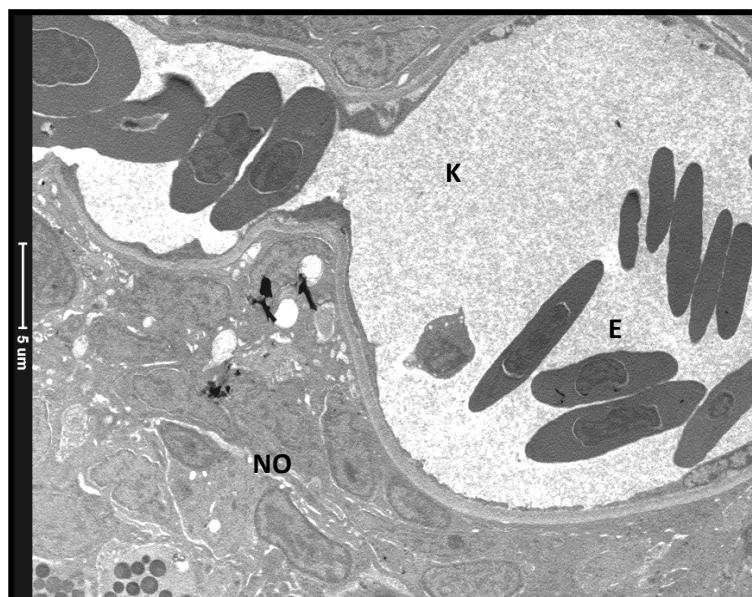
Fot. 26. Elektronogramy nabłonka oddechowego karpia po rekonwalescencji po ekspozycji na prochloraz. W komórkach chlorkowych widoczne aparaty Golgiego (AG) wraz z pęcherzykami i mitochondriami (M) o prawidłowej i zatartej strukturze. 16500 x i 9900 x.

TEBUKONAZOL

U karpia po 3. dniach ekspozycji na tebukonazol (Fot. 27 - 28) obserwowano miejscowe rozluźnienie struktury blaszek oddechowych. Rozszerzone naczynia włosowate wciskały się pomiędzy komórki podporowe doprowadzając do naruszenia konstrukcji podporowej blaszki. Pomiedzy komórkami nabłonka oddechowego występowały liczne komórki śluzowe, chlorkowe, a także granulocyty obojętnochłonne. W naczyniach obecne były silnie obrzmiałe elementy morfotyczne, a niektóre z nich posiadały poszerzoną przestrzeń okołojądrową.

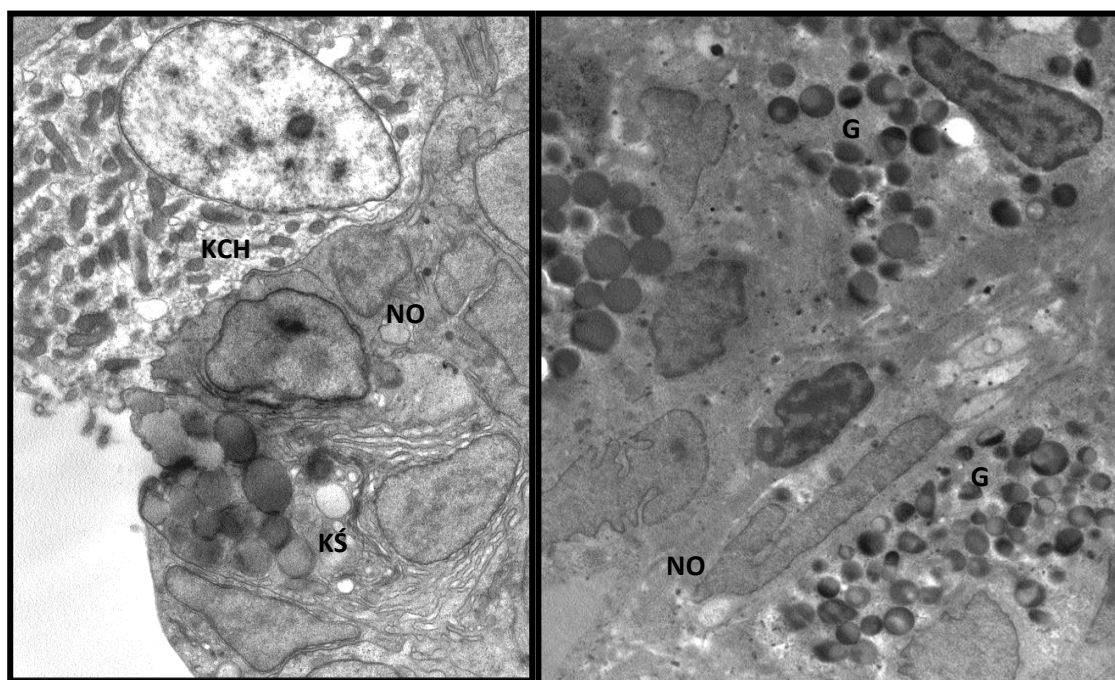


Fot. 27. Elektronogramy blaszek oddechowych karpia po 3. dniowej ekspozycji na tebukonazol. Rozluźnienie struktury blaszek, obecny w nabłonku granulocyt (G) oraz komórka śluzowa (KŚ), rozszerzone i wypełnione krwinkami kapilary (K) rujnące strukturę podporową blaszki oddechowej. 6000 x i 4200 x.

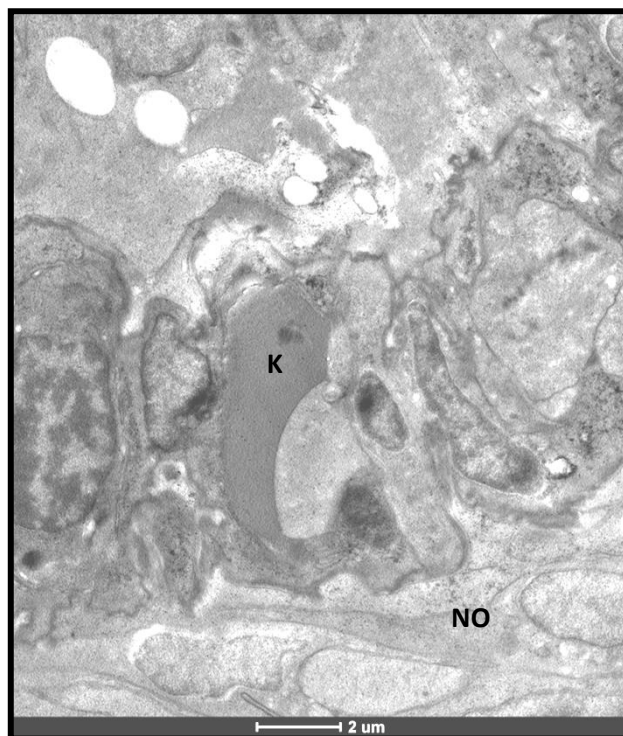


Fot. 28. Elektronogram blaszki oddechowej karpia po 3. dniowej ekspozycji na tebukonazol. Zwarta struktura nabłonka oddechowego (NO). Rozszerzone i połączone kapilary (K) z obecnymi w nich prawidłowymi i zmienionymi patologicznie erytrocytami (E). 2550 x.

Po 14. dniach ekspozycji karpia na tebukonazol (Fot. 29 - 30) obserwowano najczęściej zwartą budowę blaszek oddechowych, z nielicznymi miejscami jej rozluźnienia. W nabłonku oddechowym licznie występowały komórki śluzowe i chlorkowe. Światło naczyń włosowatych było najczęściej szczelnie wypełnione obrzmiałymi elementami morfotycznymi.

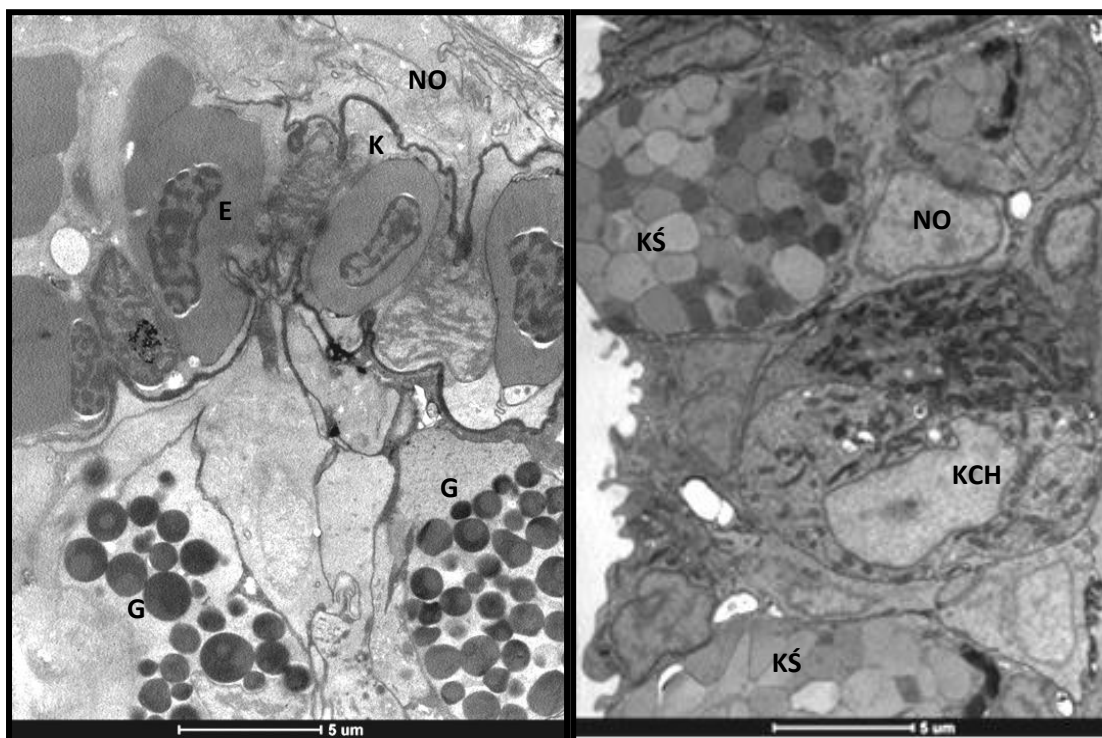


Fot. 29. Elektronogramy nabłonka oddechowego karpia po 14. dniowej ekspozycji na tebukonazol. Zwarta struktura nabłonka (NO), obecne granulocyty (G), pojedyncza komórka śluzowa (KŚ) oraz komórka chlorkowa (KCH). 6000 x.



Fot. 30. Elektronogram blaszki oddechowej karpia po 14. dniowej ekspozycji na tebukonazol. Rozszerzone i szczelnie wypełnione elementami morfotycznymi kapilary (K) otoczone zwartym nabłonkiem oddechowym (NO). 6000 x.

Po okresie rekonwalescencji po ekspozycji na tebukonazol (Fot. 31) w blaszkach oddechowych karpia obserwowano na ogół zwartą ich strukturę. Pomiędzy komórkami nabłonka oddechowego obecne były liczne komórki śluzowe i granulocyty oraz pojedyncze komórki chlorkowe. Obserwowano rozszerzenie naczyń włosowatych z obecnymi w nich obrzmiałymi erytrocytami. Wokół jąder komórkowych erytrocytów notowano poszerzoną przestrzeń. Wskutek tak silnego rozszerzenia naczyń konstrukcja podporowa blaszki była nieco rozchwiana.



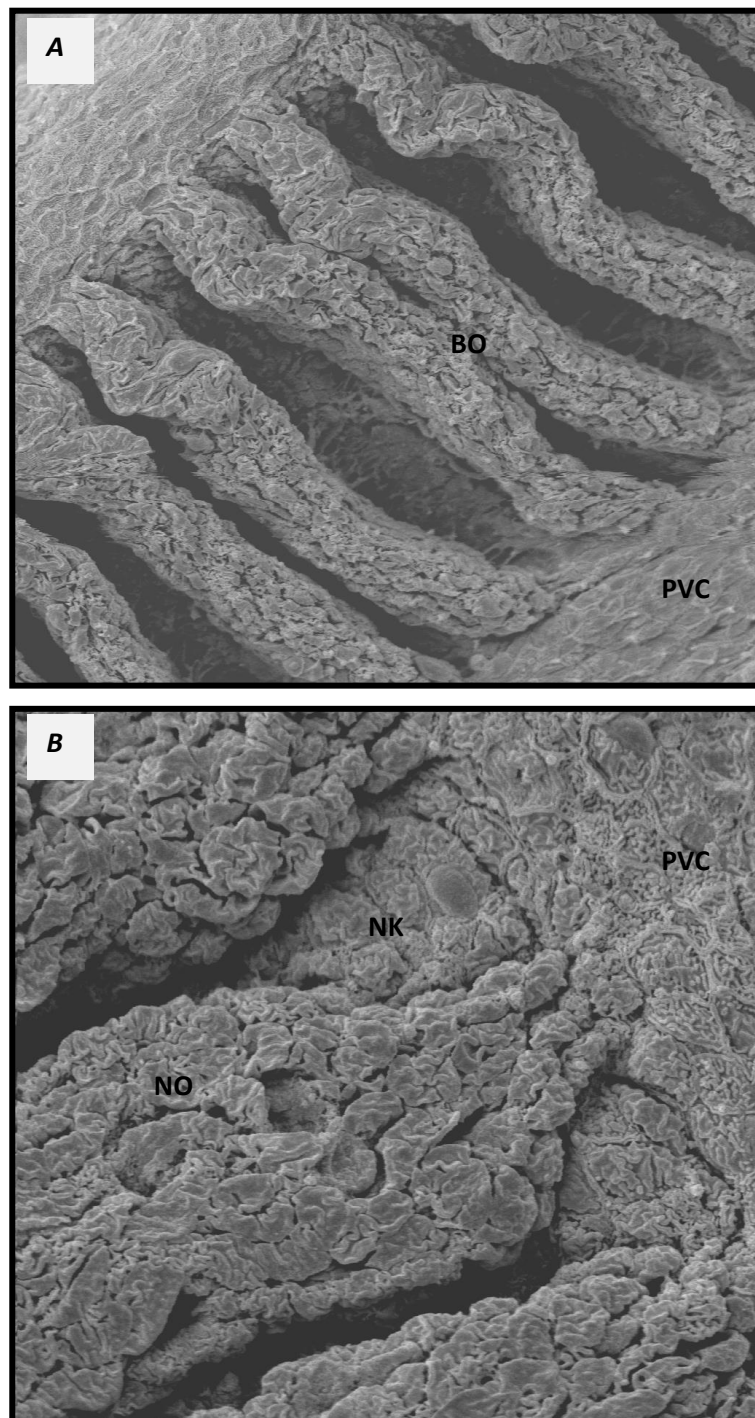
Fot. 31. Elektronogramy: blaszki oddechowej i nabłonka karpi po rekonwalescencji po ekspozycji na tebukonazol. Tkanka nabłonkowa (NO) o zwartej budowie, z licznymi granulocytami (G), komórkami śluzowymi (KŚ) i chlorkowymi (KCH). Kapilary (K) silnie rozszerzone i wypełnione obrzmiałymi erytrocytami (E). 4200 x.

3.1.3. Obserwacje zmian w ultrastrukturze komórek listów oddechowych karpia w skaningowym mikroskopie elektronowym (SEM)

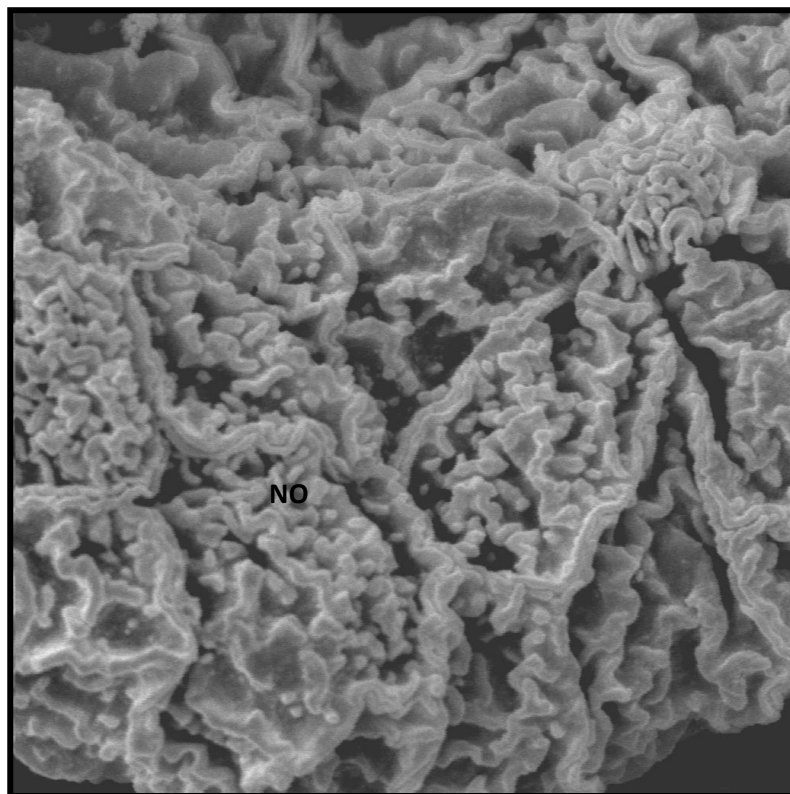
KONTROLA

Na listku skrzelowym karpia grupy kontrolnej (Fot. 32 - 34) obserwowano liczne blaszki oddechowe, które były rozmieszczone od nasady listka skrzelowego aż do jego części końcowej (dystalnej). Blaszkę oddechową zmniejszały się wraz z odległością od nasady listka skrzelowego (część proksymalna), a przestrzeń pomiędzy nimi malała aż do całkowitego zaniku w jego części dystalnej. Powierzchnia blaszek pokryta była nabłonkiem o komórkach dużych, podłużnych, wielokątnych, na której obecne były mikrofałdy (Fot. 33). Nieco odmienny był wygląd „bocznej” powierzchni listka skrzelowego. Obecny tu nabłonek składał się głównie z komórek PVC (pavement cell), pełniących funkcję głównie osmoregulacyjną. PVC obserwowano jako komórki płaskie,

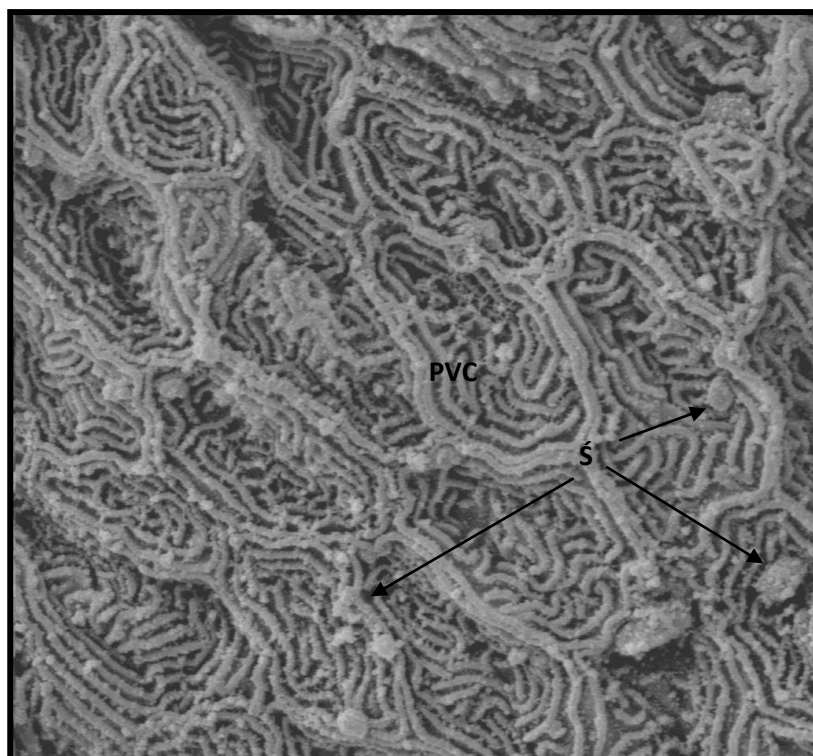
szerokie, wielokątne. Ich powierzchnia pokryta była charakterystycznym wzorem mikrofald (Fot. 34). Pomiędzy komórkami PVC obecne były komórki śluzowe w różnej fazie wydzielania. Komórki śluzowe rzadko natomiast występowały w nabłonku oddechowym.



Fot. 32. Fragment listka skrzelowego z blaszkami oddechowymi karpia grupy kontrolnej. *A* Ułożenie blaszek oddechowych (BO) na listku skrzelowym (PVC). 500 x. *B*. Widoczne komórki nabłonka oddechowego (NO) i komórki PVC powierzchni bocznej. Niewielkie nacieki komórkowe (NK) pomiędzy blaszkami oddechowymi. 1500 x.



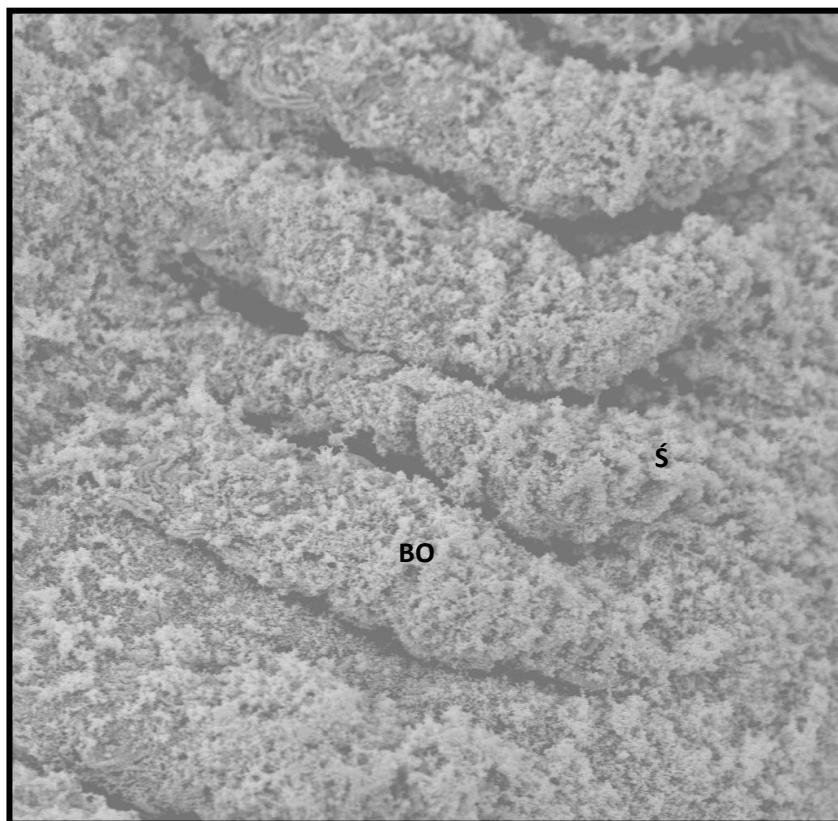
Fot. 33. Fragment blaszki oddechowej karpia grupy kontrolnej. Widoczne komórki nabłonka oddechowego (NO) z ich charakterystycznymi mikrofałdami. 5000 x.



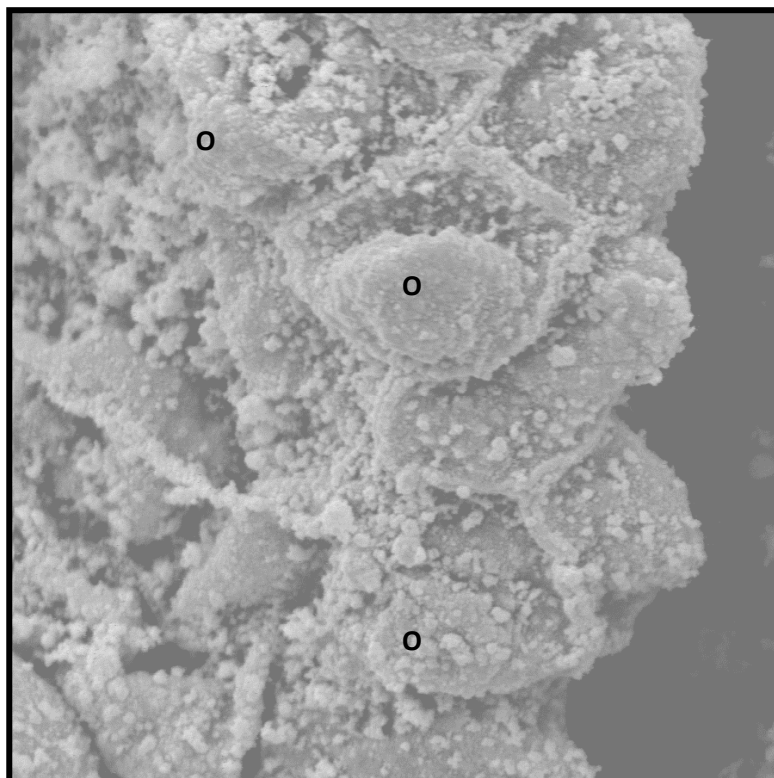
Fot. 34. Komórki PVC nabłonka bocznej powierzchni listka skrzelowego karpia grupy kontrolnej. Charakterystyczny układ mikrofałd na ich powierzchni. Niewielkie ilości śluzu na nabłonku (Ś). 3500 x.

MANKOZEB

3. dniowa ekspozycja karpia na mankozeb (Fot. 35 - 36) była przyczyną pogrubienia blaszek oddechowych, co przyczyniło się do zmniejszenia lub braku przestrzeni międzyblaszkowych. Zaobserwowano również wzmożoną wydzielniczość śluzową.

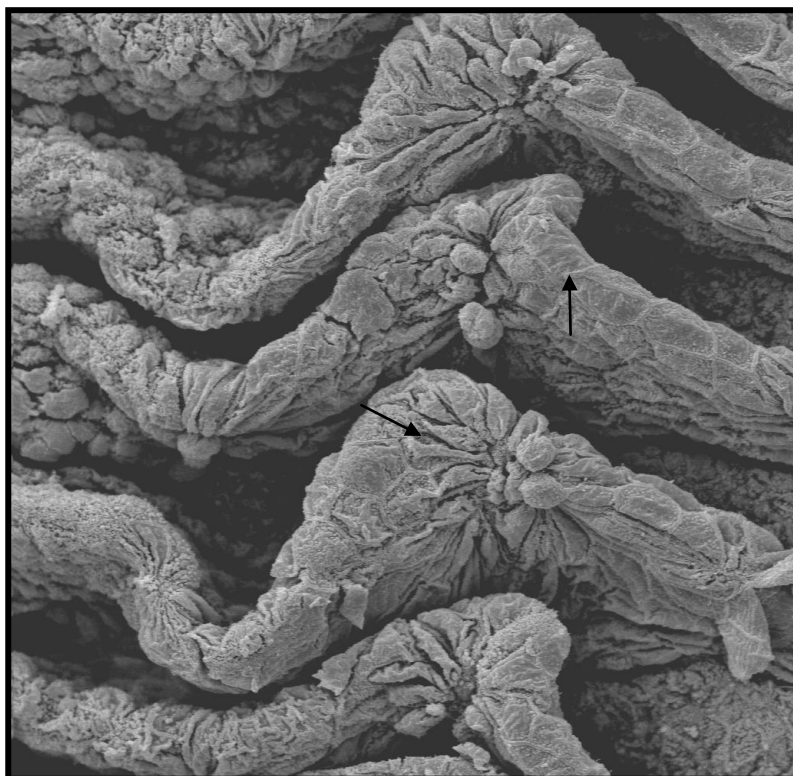


Fot. 35. Fragment listka skrzelowego z blaszkami oddechowymi karpia po 3. dniach ekspozycji na mankozeb. Pogrubione blaszki oddechowe (BO) i zmniejszone przestrzenie międzyblaszkowe. Blaszki oddechowe pokryte dużą ilością śluzu (Ś). 750 x.

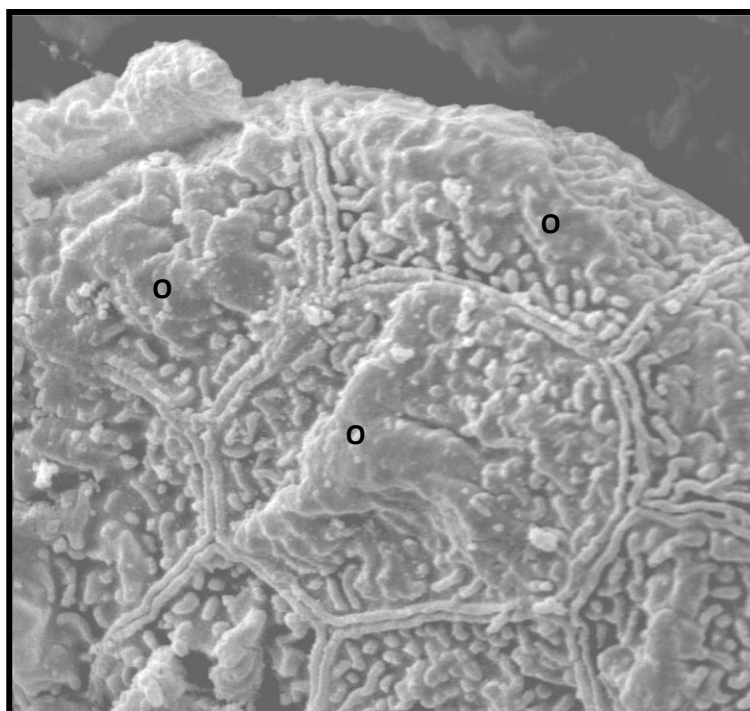


Fot. 36. Fragment blaszki oddechowej karpia po 3. dniach ekspozycji na mankozeb. W komórkach nabłonkowych widoczne miejsca obrzmienia (O), utraty mikrofałd i sfałdowania błon komórkowych. 3500 x.

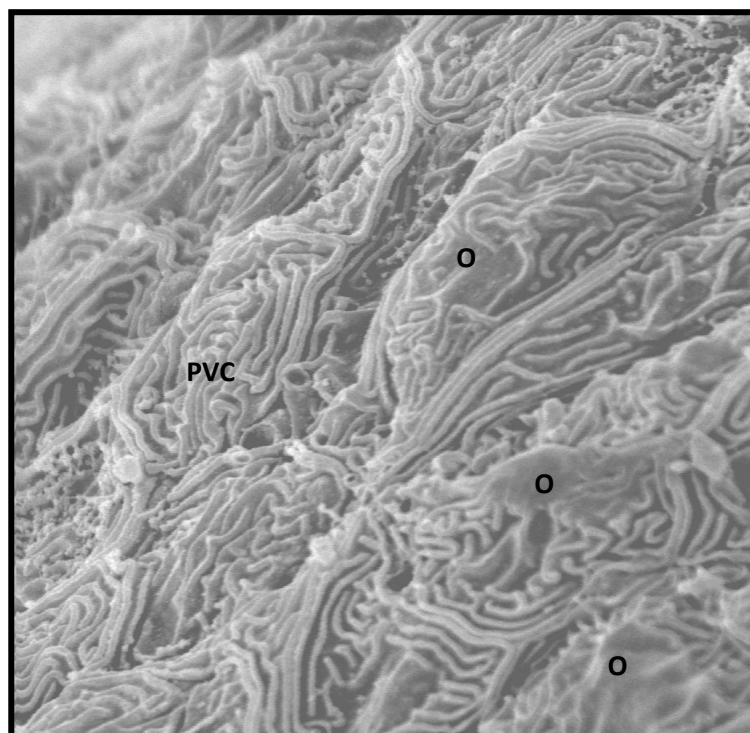
Po 14. dniach ekspozycji na mankozeb (Fot. 37 - 39) obserwowano pogłębiony, w stosunku do badania poprzedniego, proces obrzmienia komórek nabłonka oddechowego, manifestujący się zwiększaniem rozmiarów komórek i całkowitym brakiem mikrofałd (Fot. 37). Jedne komórki miały bardzo płaską, wyciągniętą powierzchnię, inne fałdowały się. W wyniku wyżej opisanych zmian, koniec blaszek oddechowych był wyraźnie wydłużony, a cała blaszka ulegała falowaniu (Fot. 38). W komórkach PVC znajdujących się na powierzchni bocznej listka skrzelowego zaobserwowano stopniowe zaburzenie wzoru mikrofałd oraz zapadanie się komórek w strukturze nabłonka (Fot. 39).



Fot. 37. Błazki oddechowe karpia po 14. dniowej ekspozycji na mankozeb. Zmienione patologicznie komórki nabłonkowe: z nielicznymi lub pozbawione mikrofałd, o zwiększonych rozmiarach, płaskie lub ze sfalowaną i wygrzbieconą powierzchnią (strzałki). 750 x.

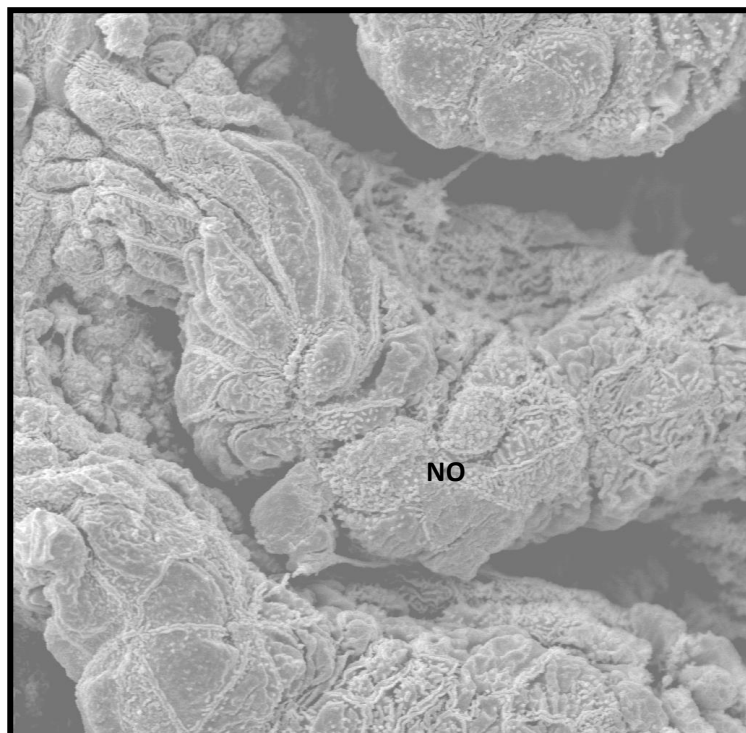


Fot. 38. Fragment błazki oddechowej karpia po 14. dniowej ekspozycji na mankozeb. Różny stopień obrzmienia komórek nabłonka (O). 5000 x.

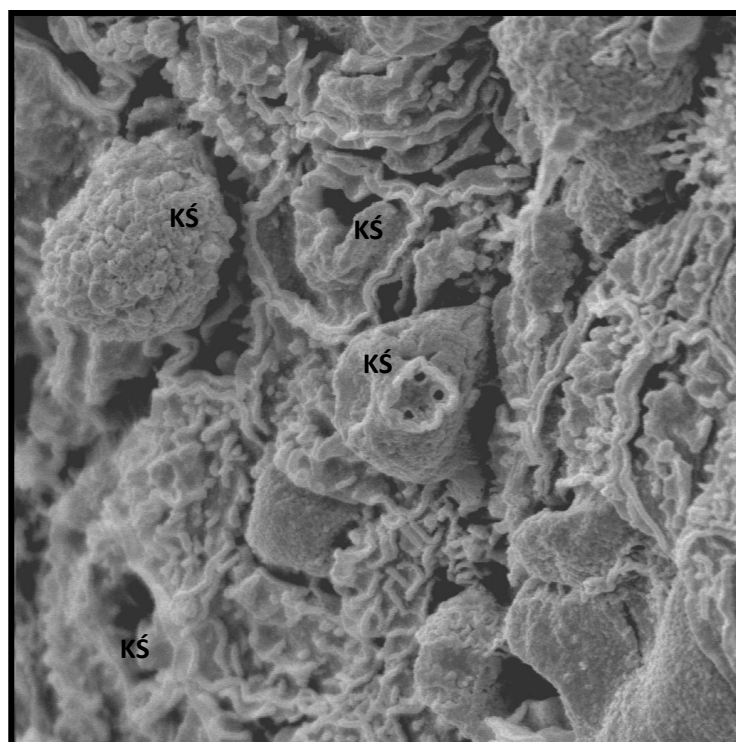


Fot. 39. Fragment powierzchni bocznej listka skrzelowego karpia po 14. dniowej ekspozycji na mankozeb. Zapadanie się i wygrzbiecanie powierzchni komórek PVC w skutek ich obrzmienia (O). Niewielkie zaburzenie układu mikrofałd. 3500 x.

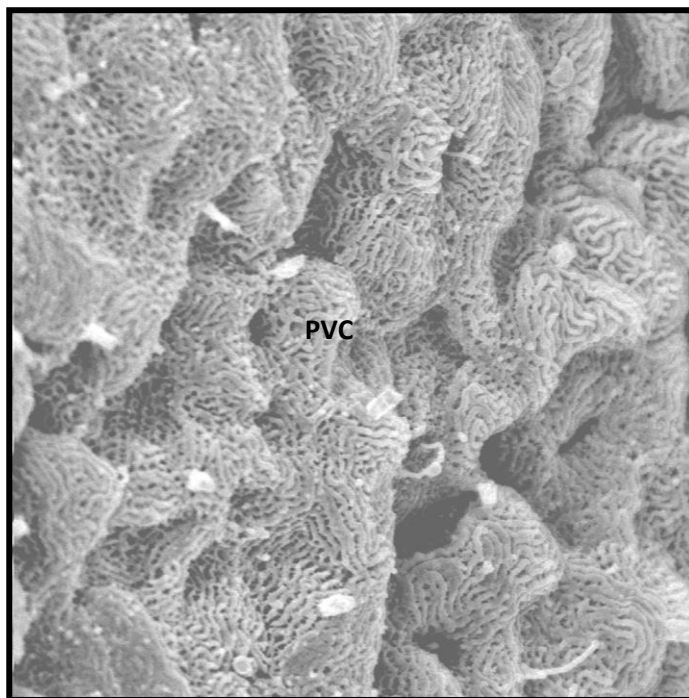
Po okresie rekonwalescencji karpia (Fot. 40 - 42) obserwowano dalsze obrzmienie i wydłużanie komórek nabłonkowych, co przekładało się na dalsze wydłużanie końców blaszek oddechowych (Fot. 40). Na powierzchni bocznej listka skrzelowego liczne komórki PVC były obrzmiałe, wskutek czego niektóre komórki zapadały się, a inne ulegały wygrzbieceniu, co tworzyło nierówną powierzchnię całego nabłonka (Fot. 42). Pomiedzy komórkami PVC, szczególnie w bezpośrednim sąsiedztwie podstaw blaszek oddechowych, obecne były liczne komórki śluzowe będące w różnej fazie aktywności mukosekrecyjnej (Fot. 41).



Fot. 40. Blaszki oddechowe karpia po okresie rekonwalescencji po ekspozycji na mankozeb. Zróżnicowany kształt komórek nabłonka oddechowego (NO) z różnym stopniem utraty mikrofałd. 1500 x.



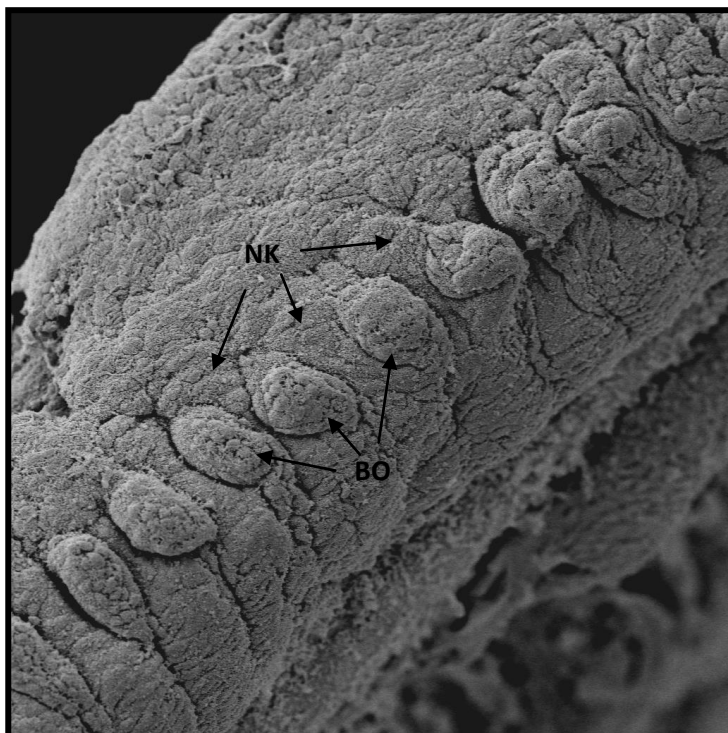
Fot. 41. Fragment powierzchni bocznej listka skrzelowego karpia po okresie rekonwalescencji po ekspozycji na mankozeb. Pole mukosekrecyjne z licznymi komórkami śluzowymi (KŚ). 350 x.



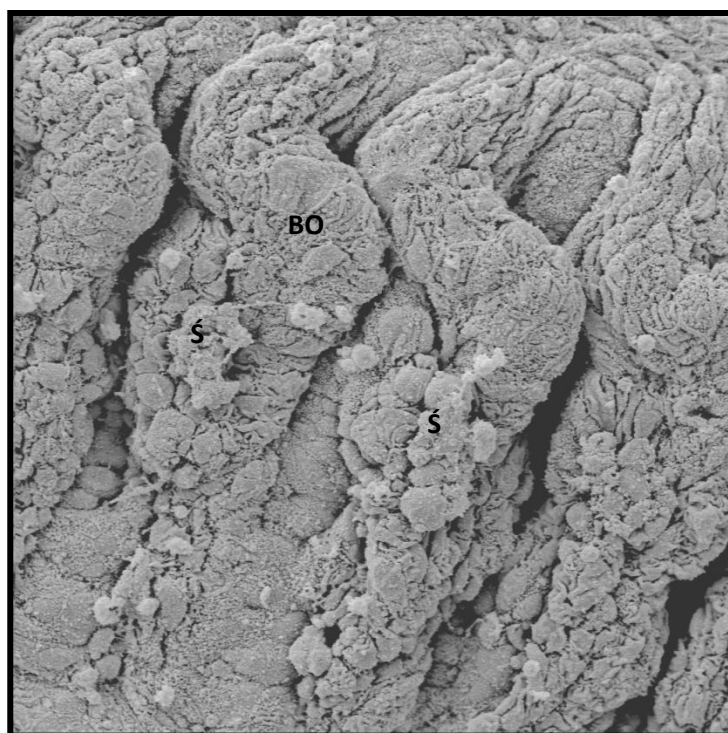
Fot. 42. Fragment powierzchni bocznej listka skrzelowego karpia po okresie rekonwalescencji po ekspozycji na mankozeb. Pofałdowana powierzchnia komórek PVC. 3500 x.

PROCHLORAZ

Po 3. dniach ekspozycji karpia na prochloraz (Fot. 43 - 44) obserwowano zaburzenia w strukturze blaszek oddechowych. Były one obrzmiałe i zlewały się ze sobą, a dodatkowo do ich zlewania przyczyniały się obecne między nimi nacieki komórkowe. Obserwowano także wzmożoną mukosekrecję.

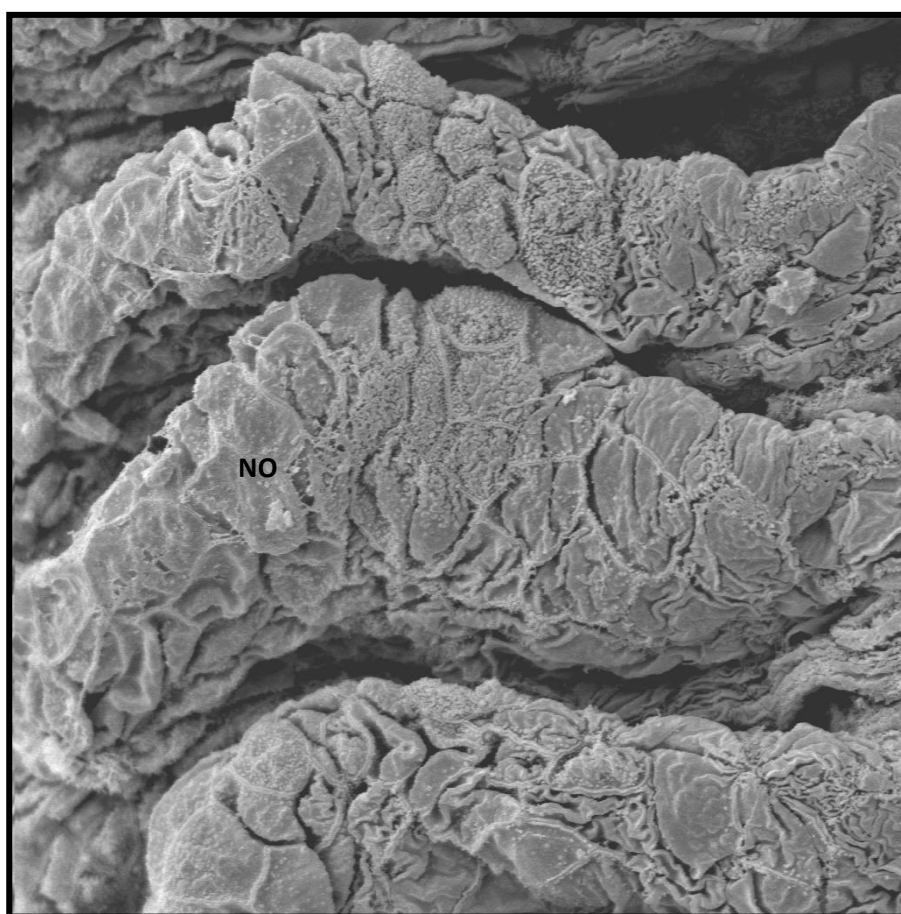


Fot. 43. Fragment listka skrzelowego z blaszkami oddechowymi karpia po 3. dniach ekspozycji na prochloraz. Obecność dużych nacieków komórkowych (NK) między blaszkami (BO) i całkowity brak przestrzeni międzyblaszkowych. 350 x.

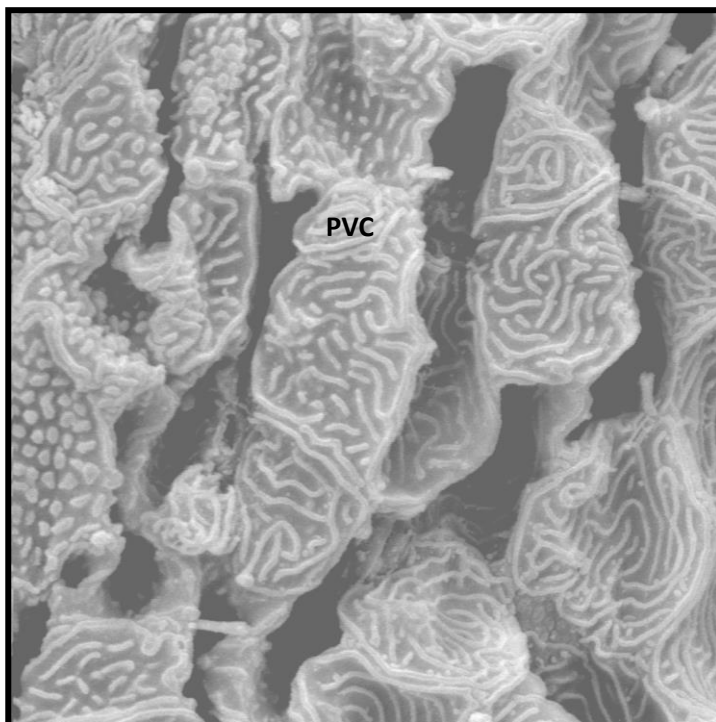


Fot. 44. Blaszki oddechowe karpia po 3. dniach ekspozycji na prochloraz. Obecny śluz (Ś) pokrywający blaszki (BO). 750 x.

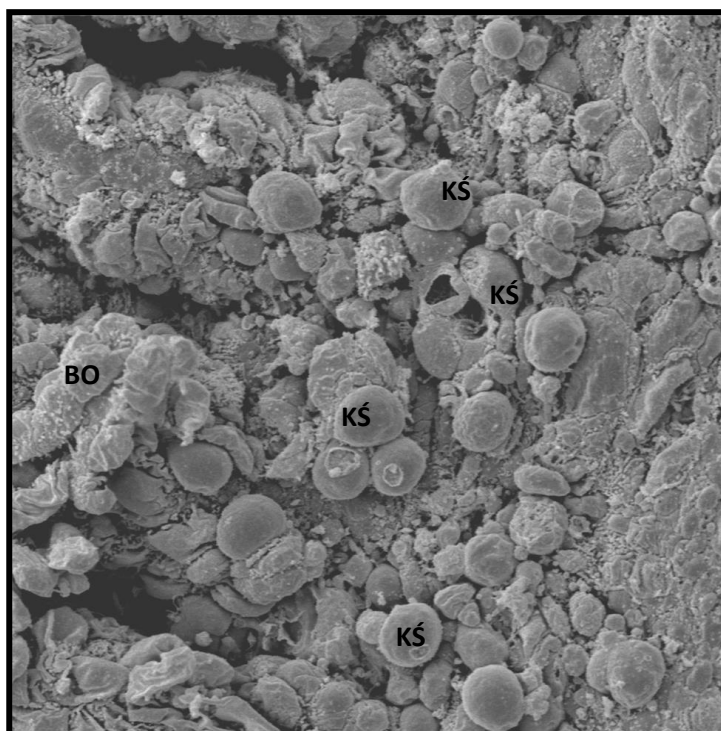
14. dniowa ekspozycja karpia na fungicyd (Fot. 45 - 47) spowodowała pogłębienie wyżej opisanych zmian patologicznych. Końce blaszek oddechowych były wyraźnie wydłużone, a cała blaszka ulegała falowaniu (Fot. 45). Pomiędzy nimi obecne były nacieki komórkowe. Zmieniła się też struktura nabłonka bocznej powierzchni listka skrzelowego. W wielu miejscach niektóre komórki PVC zapadły się, a inne uległy wygrzbieceniu. Zmienił się także charakterystyczny wzór mikrofałd na ich powierzchni (Fot. 46). Obserwowano również wzmożoną aktywność mukosekrecyjną (Fot. 47).



Fot. 45. Blaszki oddechowe karpia po 14. dniach ekspozycji na prochloraz. Wydłużone końce blaszek; zróżnicowane kształty i wielkość komórek nabłonka oraz obecność w nich pojedynczych mikrofałd lub ich brak (NO). 1000 x.

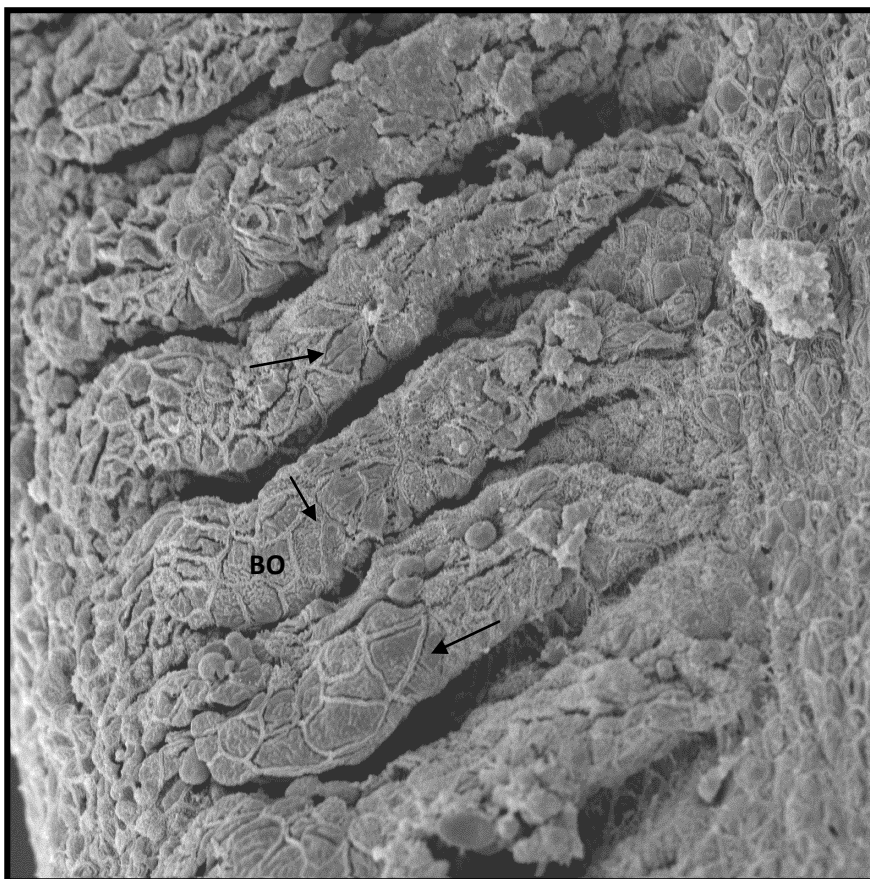


Fot. 46. Fragment powierzchni bocznej listka skrzelowego karpia po 14. dniach ekspozycji na prochloraz. Pofałdowana powierzchnia nabłonka i różne kształty komórek PVC. 3500 x.

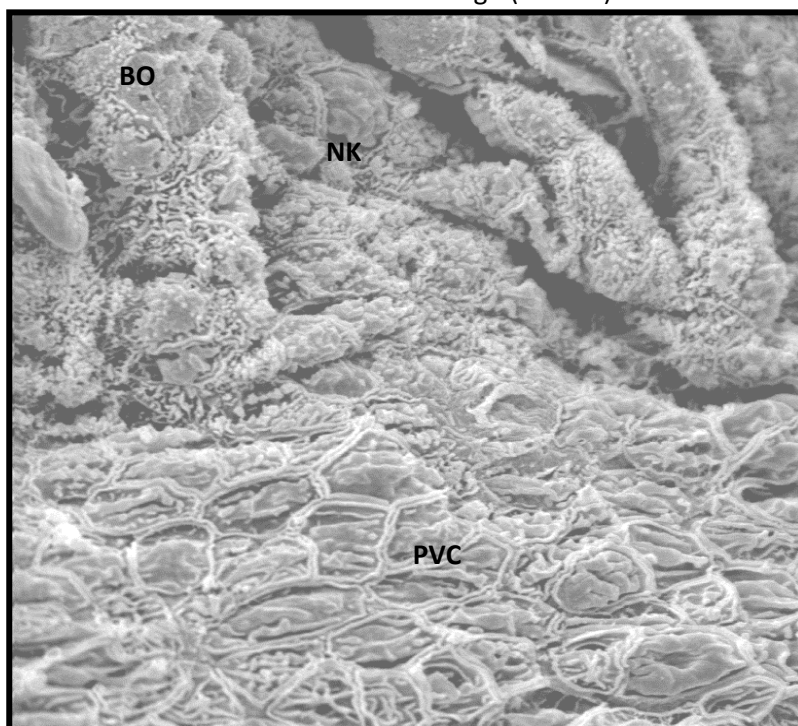


Fot. 47. Fragment powierzchni bocznej listka skrzelowego karpia po 14. dniach ekspozycji na prochloraz. Liczne komórki śluzowe (KŚ) u podstaw blaszek oddechowych (BO) w różnej fazie aktywności mukosekrecyjnej. 1000 x.

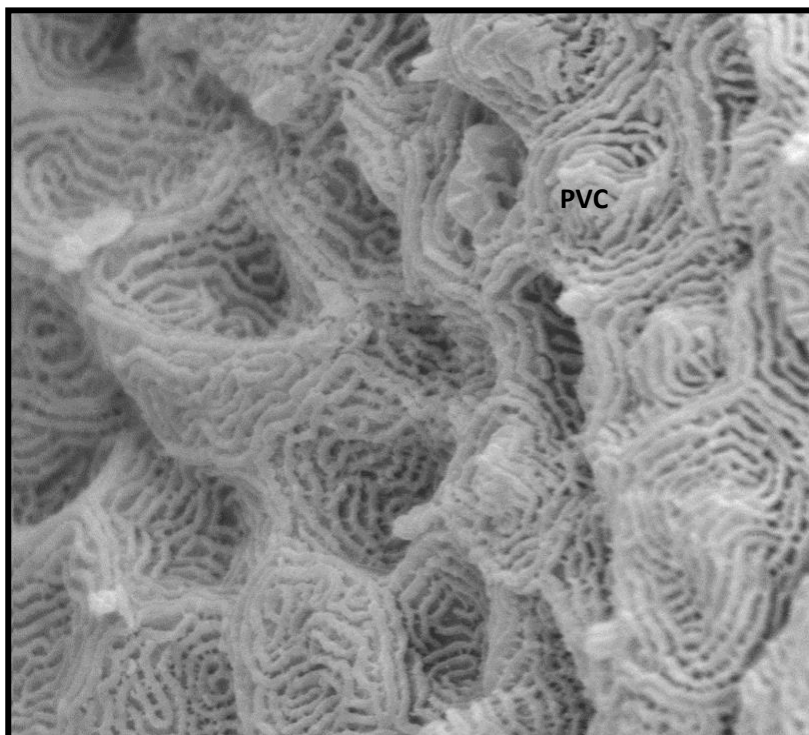
Po okresie rekonwalescencji obserwowano (Fot. 48 - 50) występowanie wyżej opisanych zmian patologicznych, wskutek których zaburzeniu uległa struktura listka skrzelowego.



Fot. 48. Blaszki oddechowe karpia po okresie rekonwalescencji po ekspozycji na prochloraz. Obrzmiałe i lekko falujące się blaszki (BO) oraz obecne na nich powiększone, płaskie i pozbawione mikrofałd komórki nabłonka oddechowego (strzałki). 750 x.



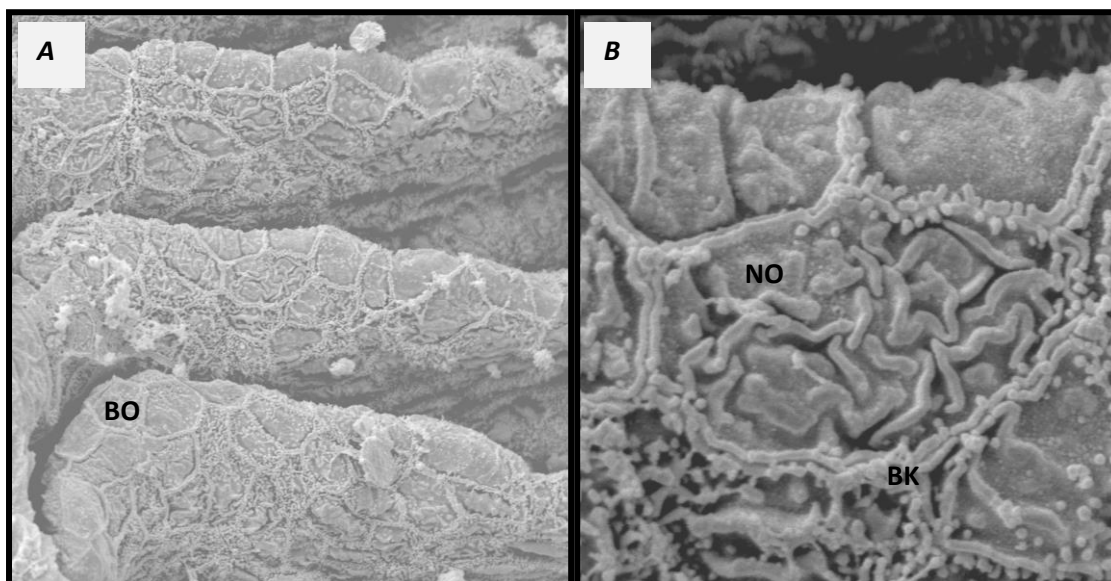
Fot. 49. Fragment listka skrzelowego karpia po okresie rekonwalescencji po ekspozycji na prochloraz. Granica pomiędzy podstawą blaszek oddechowych (BO) i powierzchnią boczną listka. Widoczny naciek komórkowy (NK) między blaszkami oraz płaskie, pozbawione mikrofałd komórki PVC. 2000 x.



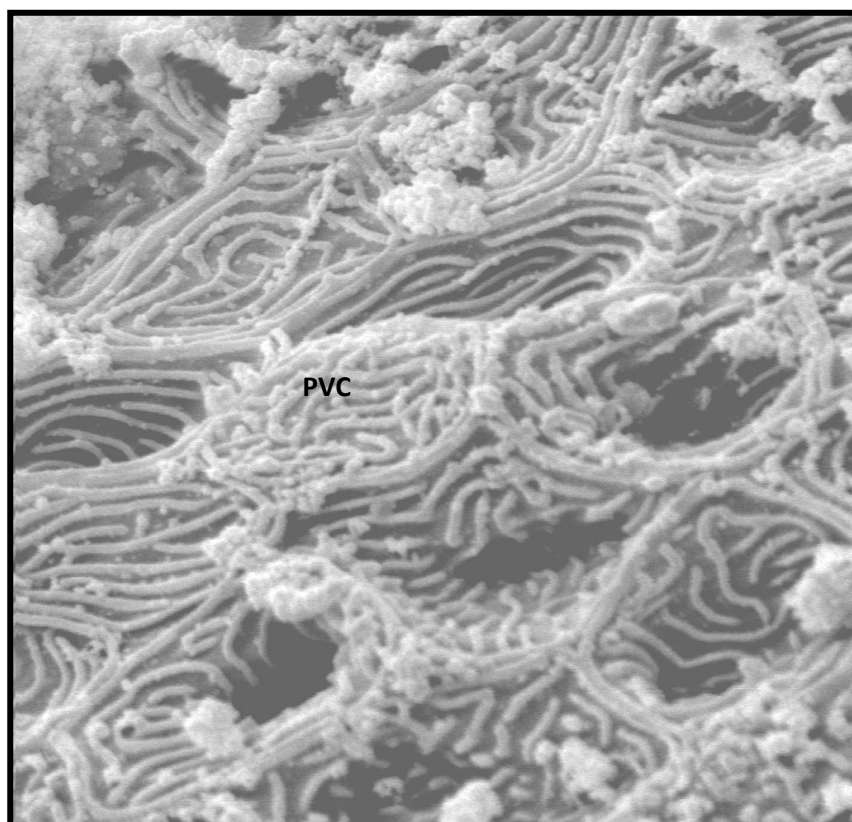
Fot. 50. Fragment powierzchni bocznej listka skrzelowego karpia po okresie rekonwalescencji po ekspozycji na prochloraz. Różne położenie komórek PVC w strukturze nabłonka. 5000 x.

TEBUKONAZOL

Po 3. dniach ekspozycji karpia na tebukonazol (Fot. 51 - 52) obserwowano zaburzenie struktury blaszek oddechowych, zwłaszcza na ich końcach. Znajdujące się w tych miejscach komórki nabłonkowe były powiększone, pozbawione charakterystycznych mikrofałd, z często pofałdowaną błoną komórkową. Pomiędzy blaszkami oddechowymi widoczne były niewielkie nacieki komórkowe. Liczne komórki PVC w strukturze nabłonka powierzchni bocznej listka skrzelowego zapadły się przyczyniając się do wytworzenia nierównej powierzchni nabłonka.

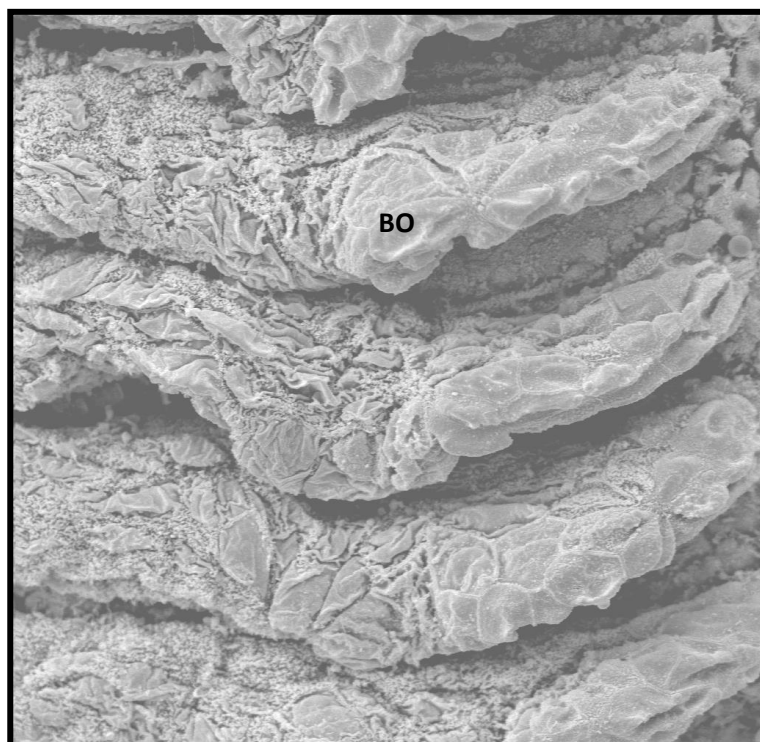


Fot. 51. Błazki oddechowe karpia po 3. dniach ekspozycji na tebukonazol. A. Obrzmiałe końce niektórych blaszek (BO) oraz obecne przestrzenie międzyblaszkowe. 1000 x. B. Zróżnicowana powierzchnia komórek nabłonka oddechowego (NO) i pofałdowanie ich błon komórkowych (BK). 5000 x.

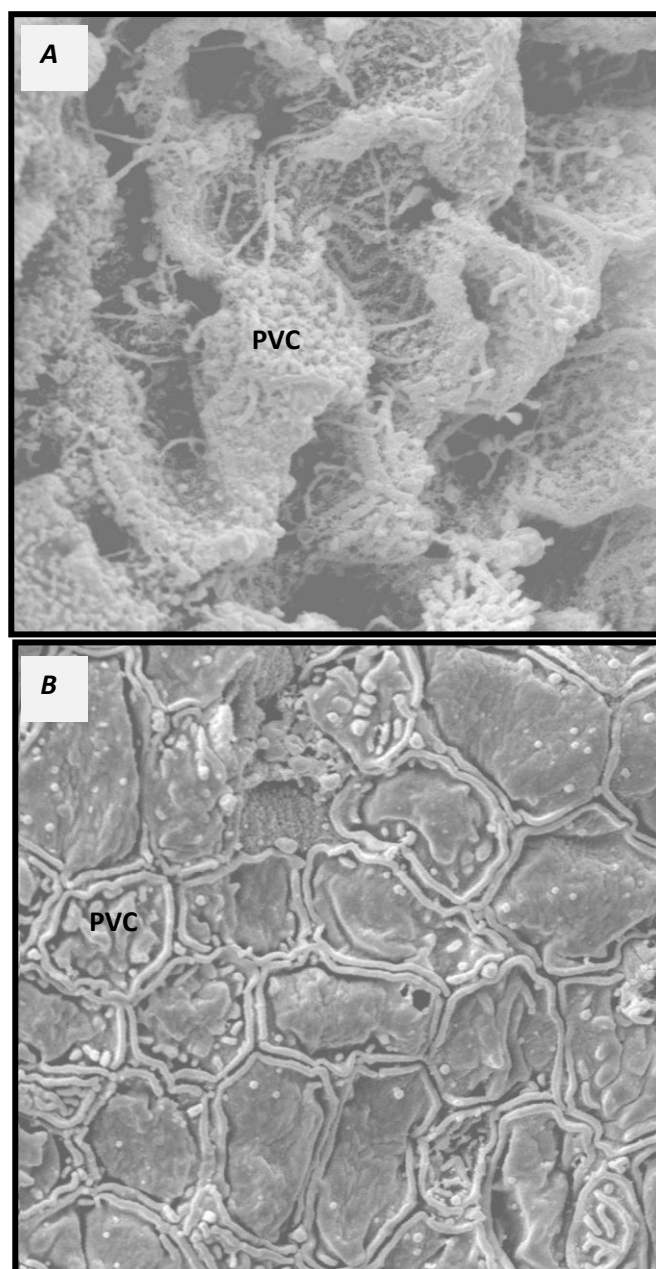


Fot. 52. Fragment powierzchni bocznej listka skrzelowego karpia po 3. dniach ekspozycji na tebukonazol. Wgłębione komórki PVC proksymalnej części listka. 5000 x.

Dalsza ekspozycja (14. dniowa) karpi (Fot. 53 - 54) pogłębiła wcześniej obserwowane zmiany. Blaszkki oddechowe były bardziej wydłużone na ich końcach, a niektóre komórki nabłonkowe uległy rozciągnięciu i utraciły charakterystyczne mikrofałdy, stając się komórkami płaskimi. Powierzchnia boczna z komórkami PVC uległa w miejscach oddalonych od blaszek pofałdowaniu wskutek zapadania się i wygrzbieciania komórek. W okolicy podstawy blaszek oddechowych komórki PVC były na ogół płaskie i pozbawione charakterystycznego wzoru mikrofałd, z pofałdowaną często błoną komórkową.



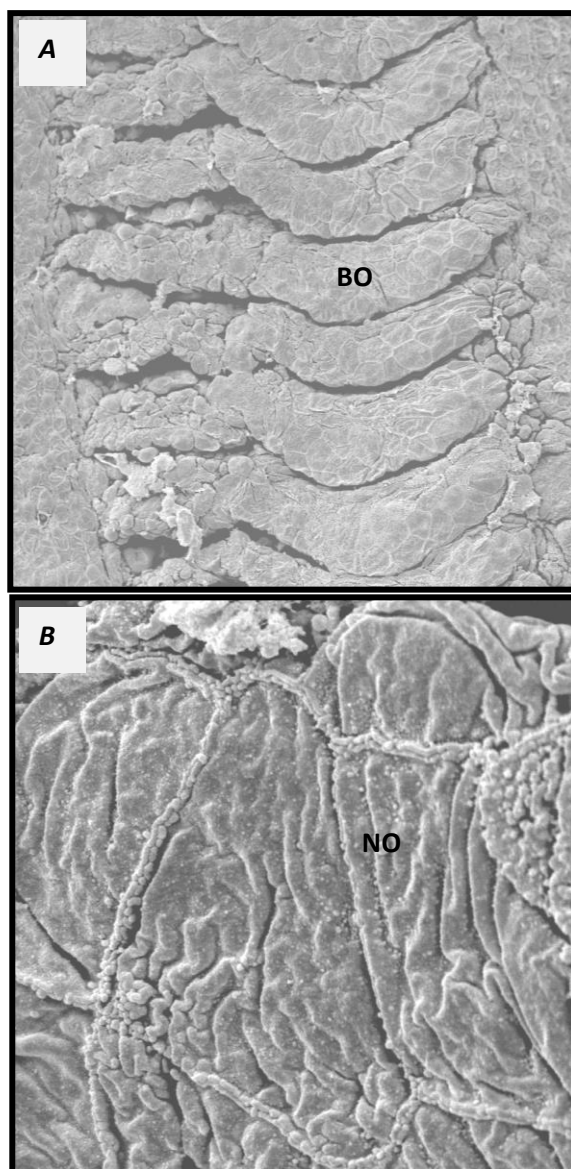
Fot. 53. Blaszkki oddechowe karpia po 14. dniach ekspozycji na tebukonazol. Wydłużone końce blaszek (BO), zmienione kształty komórek nabłonkowych i brak w nich charakterystycznych mikrofałd. 750 x.



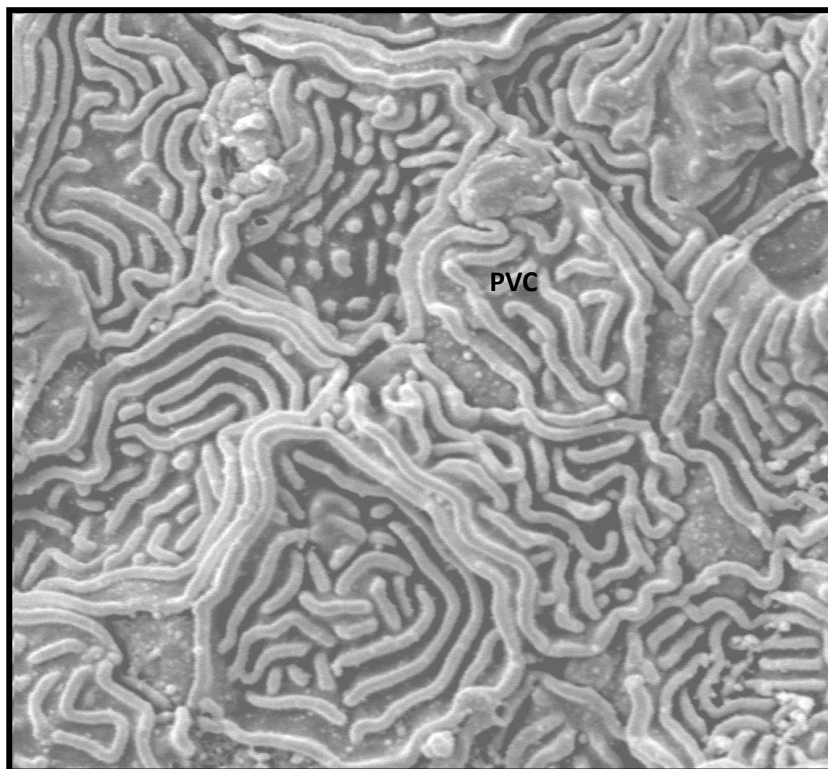
Fot. 54. Fragmenty powierzchni bocznej listka skrzelowego karpia po 14. dniach ekspozycji na tebukonazol. A. Różne położenie komórek PVC w strukturze nabłonka oddalonego od blaszek. B. Różny wygląd komórek PVC w okolicy podstawy blaszek oddechowych oraz utrata charakterystycznego wzoru mikrofałd. 3500 x.

Przetrzymywanie ryb w czystej wodzie (okres rekonwalescencji) nie przyczynił się do poprawy obrazu histopatologicznego skrzelu karpia (Fot. 55 - 56). Obserwowane po okresie ekspozycji zmiany patologiczne w tkance skrzelowej utrzymywały się. Komórki nabłonkowe blaszek oddechowych wydłużyły się, a ich powierzchnia rozprostowała. Miejscami zaobserwowano również przerwanie ciągłości ich błon.

Mikrofałdy na powierzchni komórek PVC bocznej powierzchni listka w większości zachowały się, jednak niektóre komórki zapadały się w strukturze nabłonka.



Fot. 55. Fragment listka skrzelowego z blaszkami oddechowymi karpia po okresie rekonwalescencji po ekspozycji na tebukonazol. A. Wydłużone końce i nieznaczne sfałdowanie blaszek oddechowych (BO). 350 x. B. Sfałdowanie powierzchni komórek nabłonka oddechowego (NO), brak mikrofałd. 3500 x.

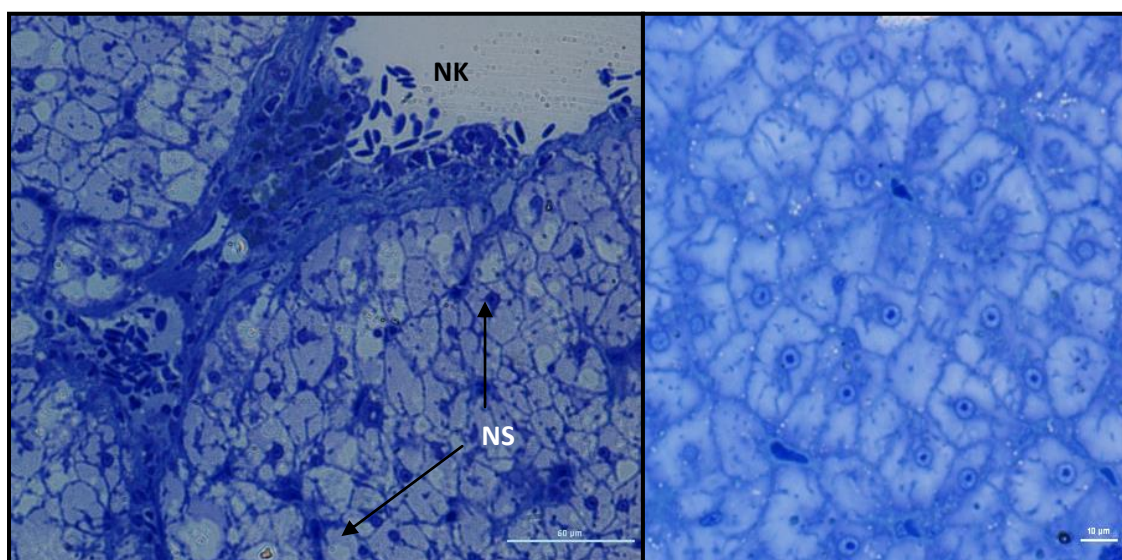


Fot. 56. Fragment powierzchni bocznej listka skrzelowego karpia po okresie rekonwalescencji po ekspozycji na tebukonazol. Komórki PVC z charakterystycznymi mikrofałdami, nieznaczne różnice w położeniu komórek w strukturze nabłonka. 5000 x.

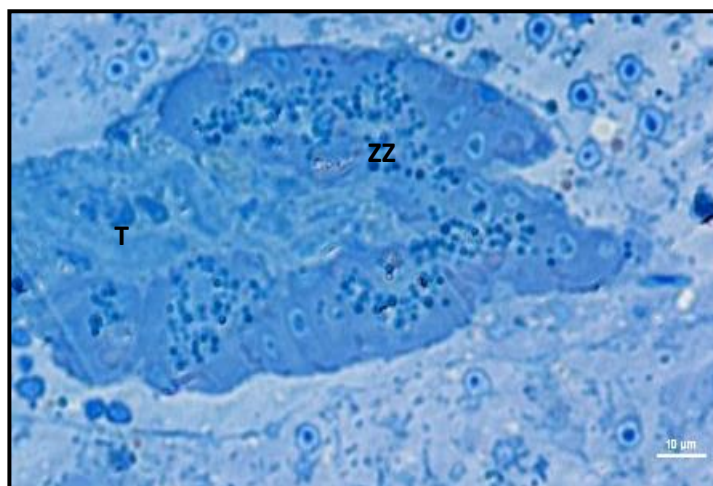
3.1.4. Obserwacje zmian histopatologicznych w wątrobotrzustce karpia w mikroskopie świetlnym (LM)

KONTROLA

W skrawkach półciennych (Fot. 57 - 58) obserwowano beleczkową strukturę wątroby karpia grupy kontrolnej. Komórki wątrobowe ściśle do siebie przylegały. W mięszu znajdowały się duże naczynia krwionośne, a czasem zaznaczały się naczynia sinusoidalne (Fot. 57). Miejscami, w okolicy okołonaczyniowej notowano pojedyncze komórki melanomakrofagowe (MM). W mięszu wątroby zlokalizowane były także wyspy trzustkowe, a w ich pęcherzykach wydzielniczych nieliczne ziarna zymogenu. Wyspy trzustkowe wraz z mięszem wątroby tworzyły zwartą całość (Fot. 58).



Fot. 57. Wątroba karpia grupy kontrolnej. Widoczna budowa komórkowa, duże naczynie krwionośne (NK) oraz naczynia sinusoidalne (NS). 400 x.

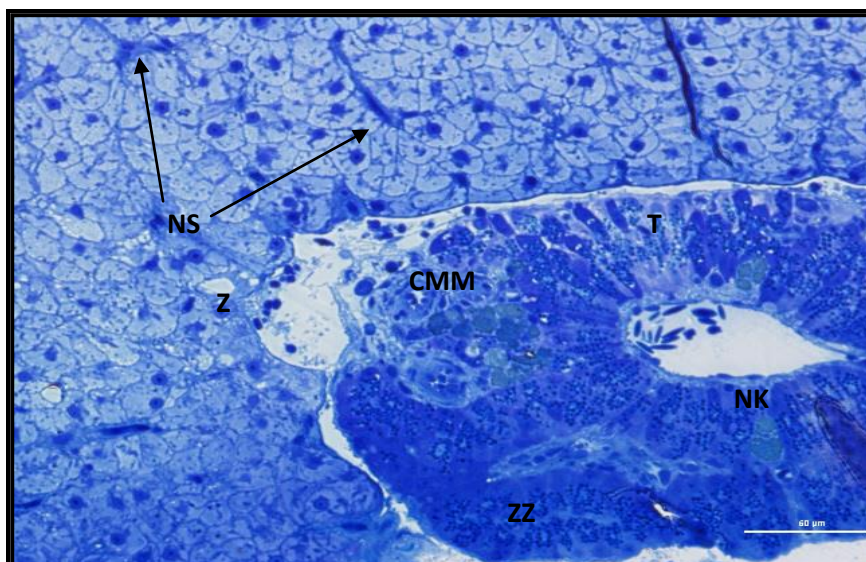


Fot. 58. Wyspa trzustkowa (T) w mięszu wątroby karpia grupy kontrolnej. W pęcherzykach wydzielniczych ziarna zymogenu (ZZ). 200 x.

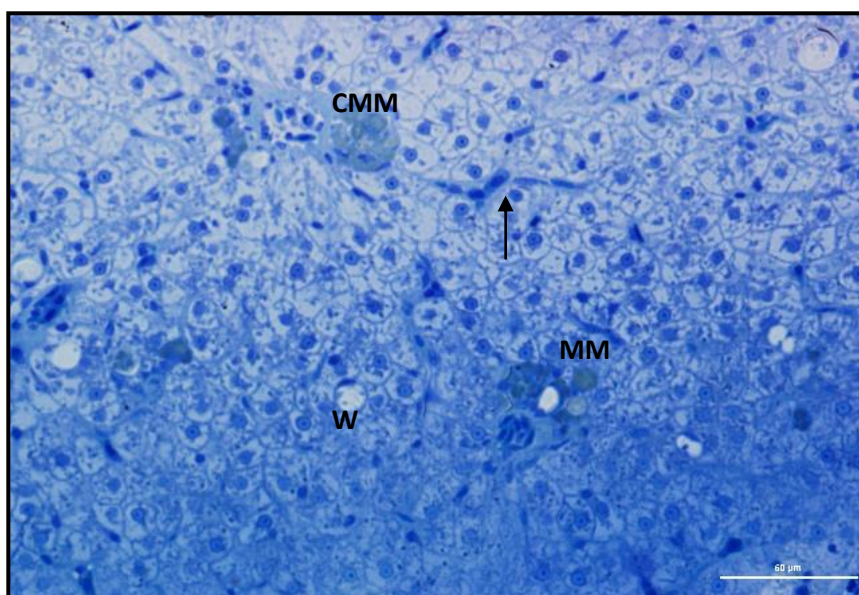
MANKOZEB

Ekspozycja (14. dniowa) karpia na mankozeb była przyczyną zmian patomorfologicznych w wątrobotrzustce (Fot. 59). W badanych fragmentach narządu obserwowano na ogół prawidłową budowę beleczkową, a komórki przylegały do siebie. Miejscowo, zwłaszcza w okolicy dużych naczyń krwionośnych struktura wątroby i trzustki była zatarta. Obserwowano też przekrwienie narządu, czego efektem były widoczne naczynia sinusoidalne, gęsto wypełnione krwinkami. Zaznaczył się proces niewielkiego odseparowania trzustki od wątroby w przypadku pojedynczych wysp. Komórki pęcherzykowe trzustki były wypełnione licznymi ziarnami zymogenu. Ogniskowo, zwłaszcza w miejscach lokalizacji skupisk komórek MM tworzyły się centra komórek melanomakrofagowych (CMM) i w tych miejscach struktura trzustki była zatarta.

Po okresie rekonwalescencji obserwowano (Fot. 60) różnobarwność narządu i początkowy etap procesu wakuolizacji w komórkach wątrobowych. Przekrwienie narządu, obserwowane po okresie ekspozycji, pogłębiło się. Wyraźnie zwiększyła się też ilość i wielkość komórek MM, które tworzyły rozległe centra w całym narządzie i skupiały się, podobnie jak po okresie ekspozycji, w pobliżu naczyń krwionośnych.



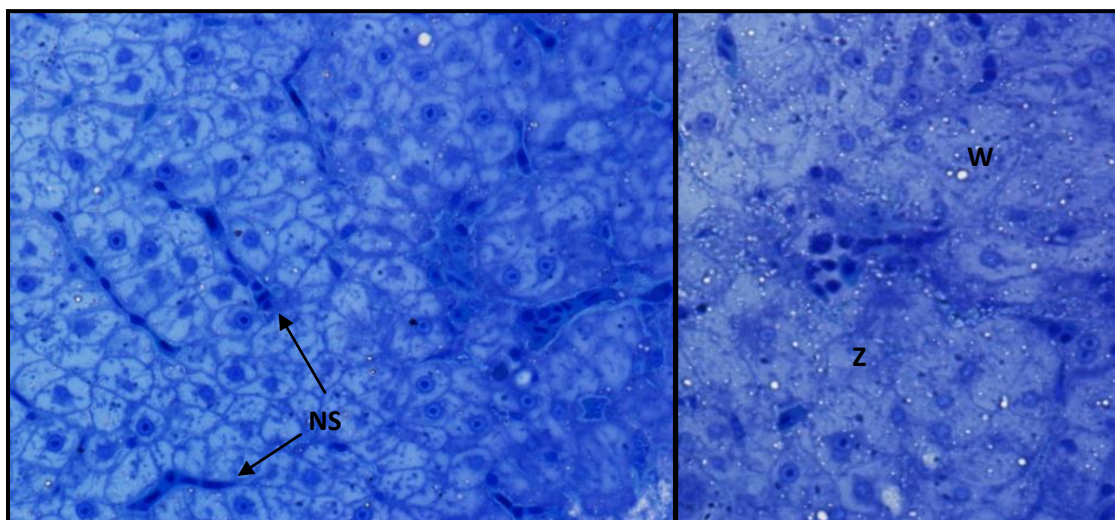
Fot. 59. Wątrobotrzustka karpia po 14. dniowej ekspozycji na mankozeb. Widoczna zwarta budowa komórkowa części wątrobowej i trzustkowej. W części wątrobowej rozszerzone naczynia sinusoidalne (NS) oraz miejscowe zatarcie jej struktury (Z). Wyspa trzustkowa (T) ogniskowo oddzielona od części wątrobowej, z widocznym naczyniem krwionośnym (NK), pęcherzykami wydzielniczymi z licznymi ziarnami zymogenu (ZZ) oraz miejscowe zatarcie struktury trzustki i duże CMM. 400 x.



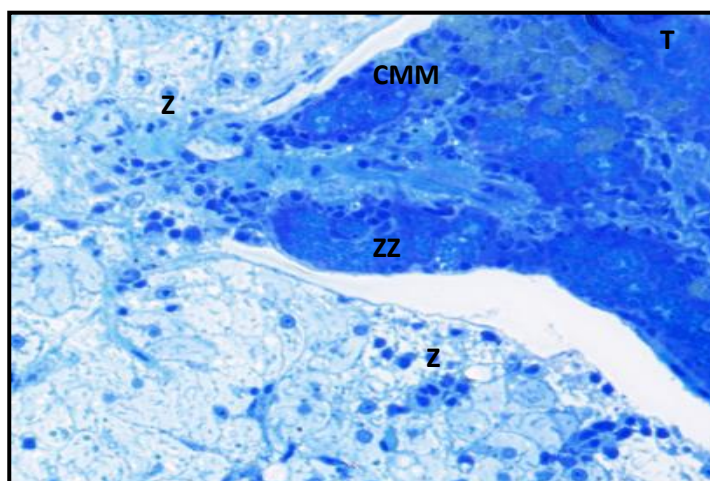
Fot. 60. Wątrobotrzustka karpia po okresie rekonwalescencji po ekspozycji na mankozeb. W części wątrobowej widoczne komórki MM i CMM oraz wakuole (W). Różnobarwność narządu. 400 x.

PROCHLORAZ

14. dniowa ekspozycja karpia na prochloraz spowodowała zmiany patologiczne w wątrobotrzustce badanych karpia (Fot. 61 - 62). Zanotowano ogniskowe zatarcie struktury komórkowej, zwłaszcza w okolicy naczyń krwionośnych. W komórkach wątrobowych zaznaczył się proces wakuolizacji. Naczynia sinusoidalne były wyraźnie poszerzone (Fot. 61). Obserwowano oddzielenie wysp trzustkowych od miększu wątroby. W trzustce obecne były skupiska komórek MM i w tych miejscach struktura narządu była zatarta (Fot. 62).

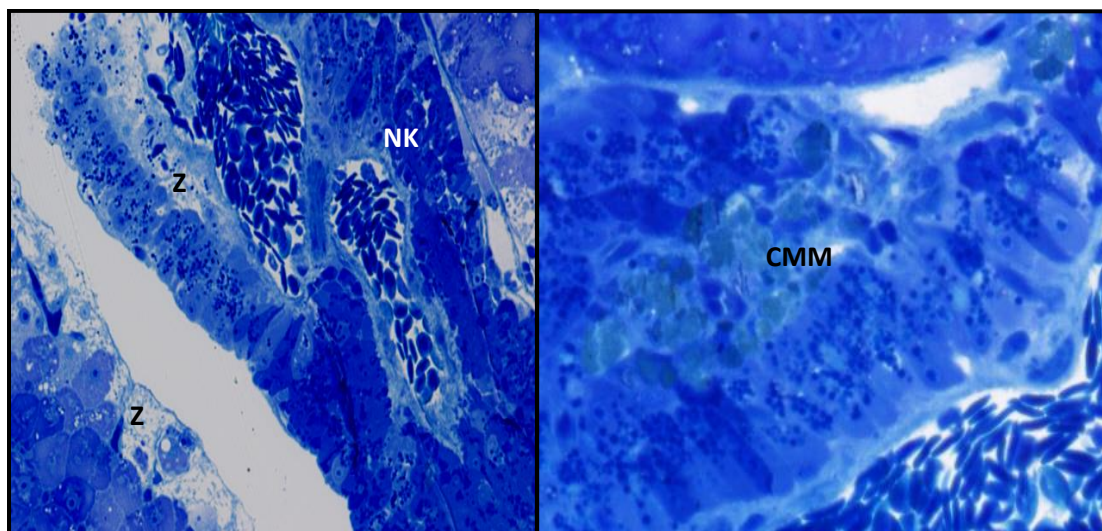


Fot. 61. Wątrobotrzustka karpia po 14. dniowej ekspozycji na prochloraz. Rozszerzenie naczyń sinusoidalnych (NS), miejscowe zatarcie struktury komórkowej (Z) i liczne wakuole (W) w miększu wątroby. 400 x.



Fot. 62. Wątrobotrzustka karpia po 14. dniowej ekspozycji na prochloraz. Przekrwienie narządu. Oddzielenie wyspy trzustkowej (T) od miększu wątroby, miejscowe zatarcie struktury wątroby i trzustki (Z). Pęcherzyki wydzielnicze z licznymi ziarnami zymogenu (ZZ) i CMM w trzustce. 400 x.

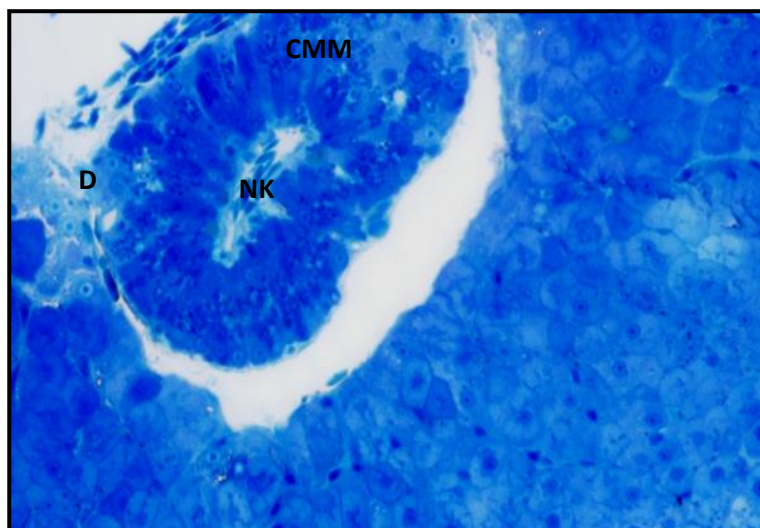
Po okresie rekonwalescencji (Fot. 63) część wątrobowa i trzustkowa wyraźnie oddzieliły się. Pogłębiło się przekrwienie narządu, w wyniku czego widoczne były naczynia sinusoidalne i większe naczynia krwionośne, wszystkie wypełnione elementami morfotycznymi. W okolicy dużych naczyń krwionośnych obserwowano zatarcie struktury wątroby i trzustki. Pęcherzyki wydzielnicze trzustki były gęsto wypełnione ziarnami zymogenu. Obecne też były CMM.



Fot. 63. Wątrobotrzustka karpia po okresie rekonwalescencji po ekspozycji na prochloraz. Przekrwienie narządu i oddzielenie wyspy trzustkowej od mięszu wątroby. Ogniskowe zatarcie struktury wątroby i trzustki (Z). Duże CMM w trzustce. 400 x.

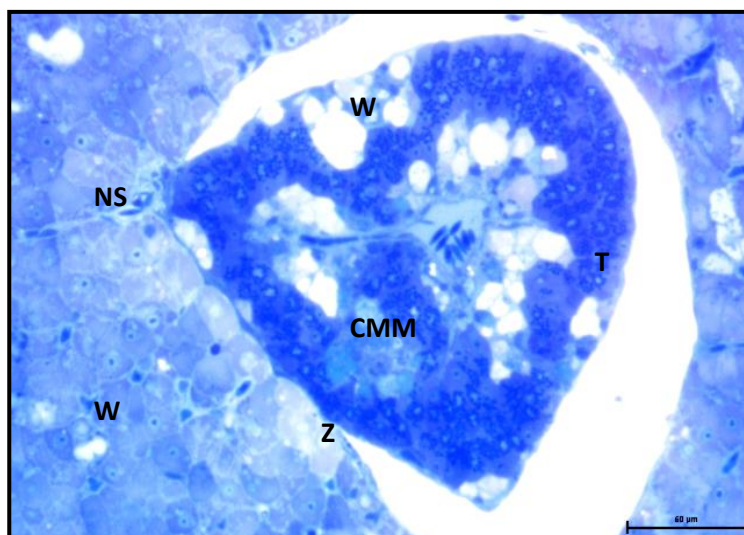
TEBUKONAZOL

Zaobserwowano zmiany histopatologiczne w wątrobotrzustce karpia w wyniku intoksykacji tebukonazolem (Fot. 64). 14. dniowa ekspozycja ryb na fungicyd spowodowała nieznaczne przekrwienie narządu i miejscową destrukcję hepatocytów. Przy naczyniach krwionośnych i przewodach żółciowych obecne były komórki MM tworzące CMM. Obserwowano również wyraźne oddzielenie wysp trzustkowych od mięszu wątroby.



Fot. 64. Wątrobotrzustka karpia po 14. dniowej ekspozycji na tebukonazol. Oddzielenie wyspy trzustkowej (T) od mięszu wątroby, ogniskowa destrukcja hepatocytów i komórek trzustki (D). Naczynie krwionośne trzustki wypełnione krwinkami (NK) i obecne pojedyncze CMM. 400 x.

Po okresie rekonwalescencji (Fot. 65) obserwowano w wątrobie rozszerzenie naczyń sinusoidalnych oraz różnobarwność i proces wakuolizacji w komórkach. Wyspy trzustkowe oddzieliły się od mięszu wątroby. W trzustce obecne były CMM zlokalizowane w miejscach zatarcia struktury. W pęcherzykach wydzielniczych obserwowano liczne ziarna zymogenu.

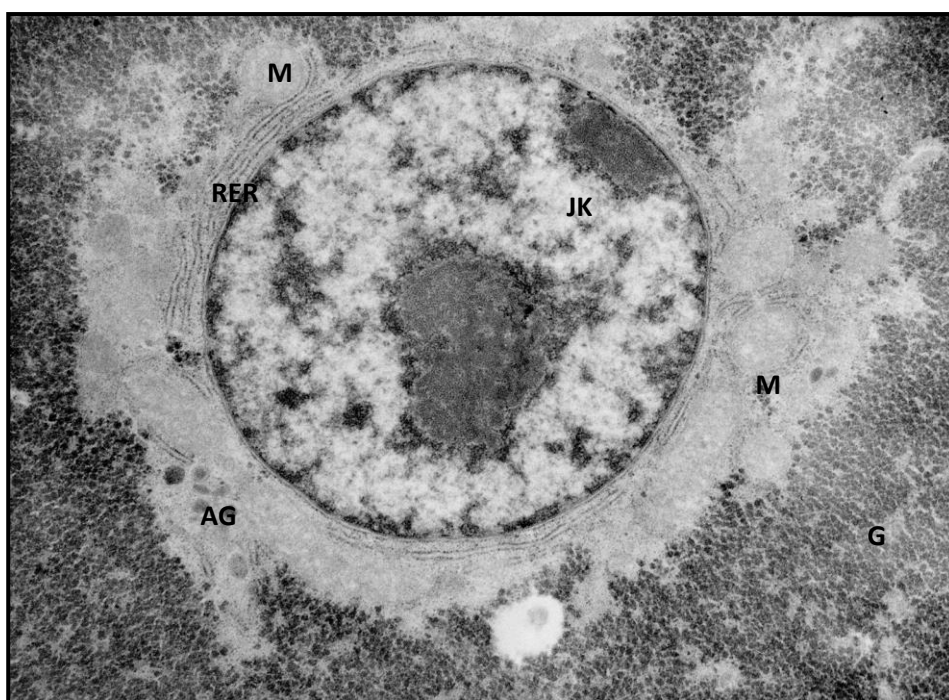


Fot. 65. Wątrobotrzustka karpia po okresie rekonwalescencji po ekspozycji na tebukonazol. Oddzielenie wyspy trzustkowej (T) od mięszu wątroby. W mięszu narządu widoczne rozszerzone naczynia sinusoidalne (NS), wakuole (W) oraz miejsca zatarcia struktury (Z); CMM w trzustce. 400 x.

3.1.5. Obserwacje zmian w ultrastrukturze hepatocytów karpia w transmisyjnym mikroskopie elektronowym (TEM)

KONTROLA

Obserwowana struktura hepatocytów ryb kontrolnych była prawidłowa (Fot. 66 - 67). Jądra komórkowe były okrągłe lub owalne, o regularnych obrysach, z dużymi jąderkami. Liczna RER wykazywała regularny przebieg wokół jądra komórki i mitochondriów (Fot. 66). Mitochondria były na ogół prawidłowe, o owalnym lub rzadziej pałeczkowatym kształcie i z wyraźnymi grzebieniami (Fot. 67). Aparat Golgiego zlokalizowany był głównie hepatocytach okolicy kanalików żółciowych, a wokół niego zlokalizowane były pęcherzyki. Obserwowano także liczne ziarna glikogenu w cytoplazmie.



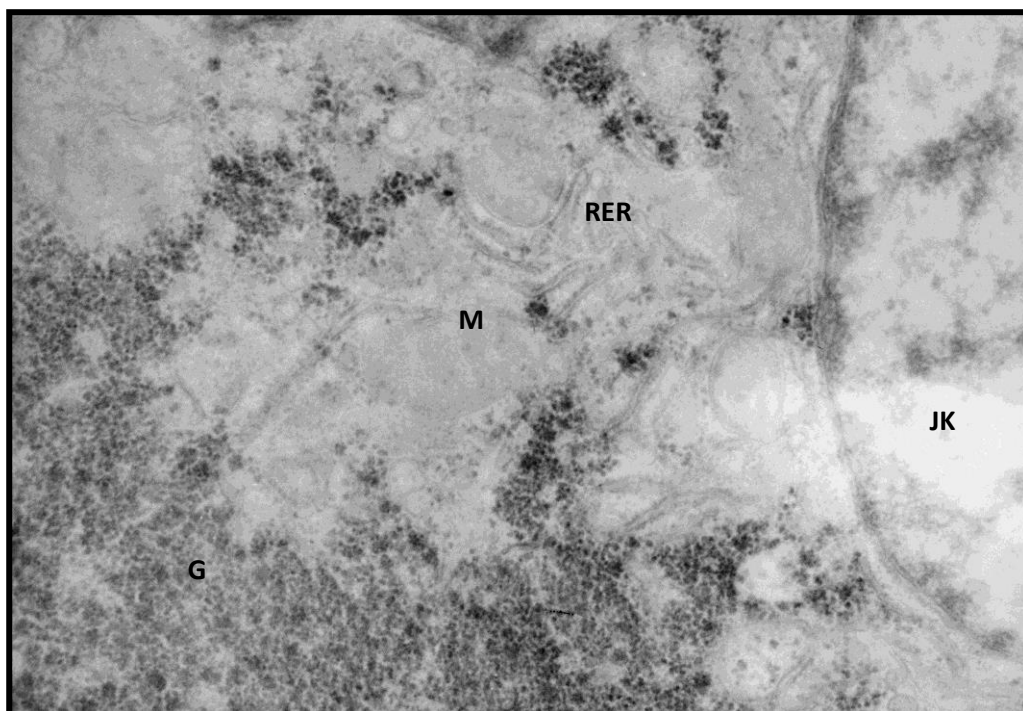
Fot. 66. Elektronogram hepatocytu karpia grupy kontrolnej: centralnie ułożone jądro komórkowe (JK) otoczone RER. Liczne mitochondria (M) z grzebieniami, aparat Golgiego i pęcherzyki wydzielnicze (AG), oraz bardzo liczne ziarna glikogenu (G). 7000 x.



Fot. 67. Elektronogram hepatocytów karpia grupy kontrolnej: pole sitowe (PS) z mitochondriami (M) i RER. 9900x.

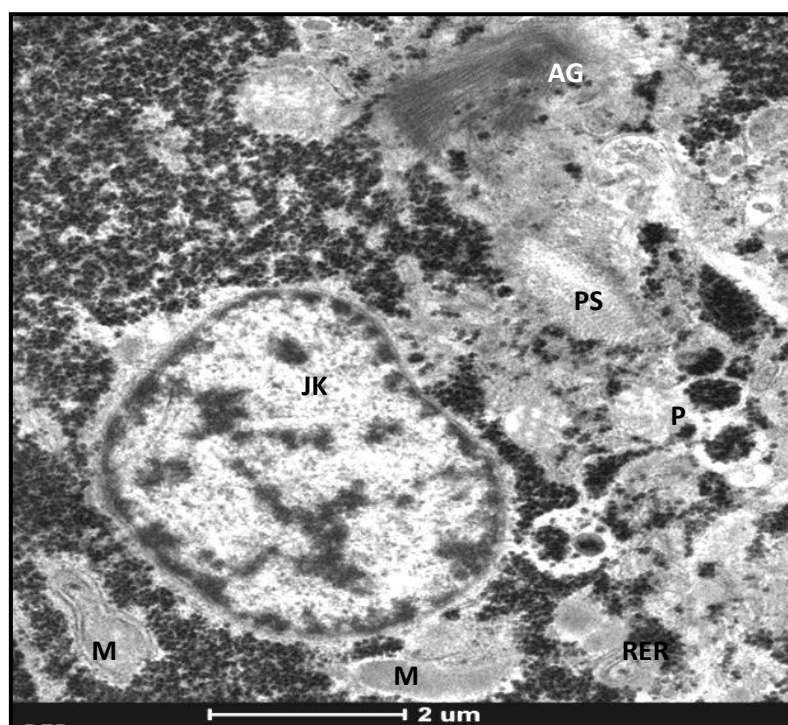
MANKOZEB

Ekspozycja (14. dniowa) karpia na mankozeb spowodowała zmiany ultrastruktury hepatocytów. Obserwowane mitochondria były silnie obrzmiałe, z zatartą strukturą wewnętrzną. W cytoplazmie zgromadzone były bardzo liczne ziarna glikogenu, miejscami spychające organella ku jądra komórkowemu (Fot. 68).

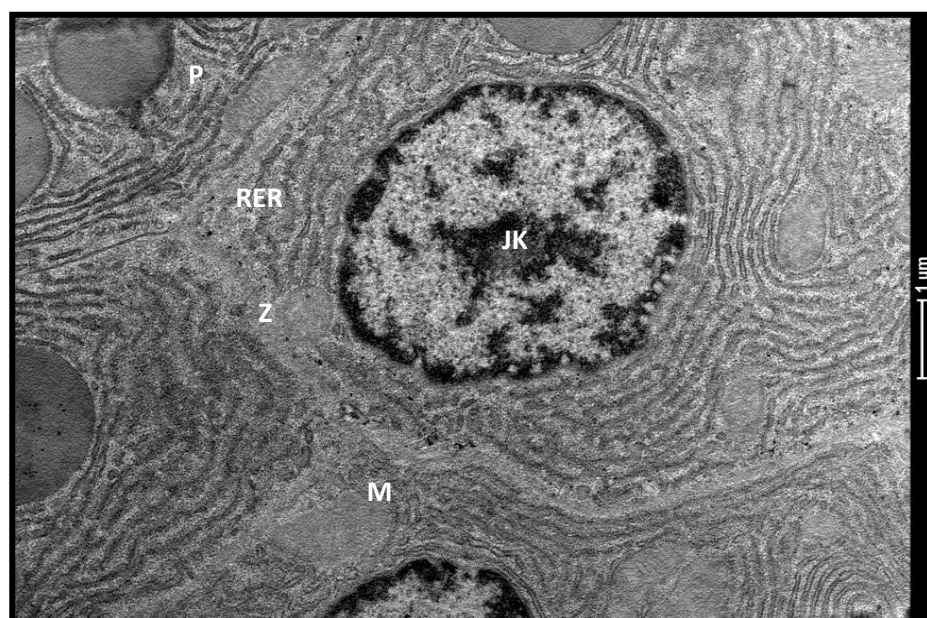


Fot. 68. Elektronogram hepatocytu karpia po 14. dniowej ekspozycji na mankozeb. Widoczne jądro komórki z nieprawidłowo rozmieszczoną chromatyną (JK), obrzmiałe i z zatartą strukturą mitochondria (M) oraz rozfragmentowana miejscami RER . Liczne ziarna glikogenu (G). 5600 x.

Hepatocyty karpia po okresie rekonwalescencji przedstawiały bardzo zróżnicowany obraz (Fot. 69 - 70). Niektóre z nich miały prawidłową strukturę: jądro komórkowe o prawidłowym kształcie, otoczone RER oraz licznymi i o prawidłowej strukturze mitochondriami. W innych komórkach występowały wyraźne zmiany patologiczne. Manifestowały się one nieprawidłowymi kształtami jąder komórkowych i zatartą strukturą mitochondriów. W cytoplazmie hepatocytów obecne były pęcherzyki o zróżnicowanej zawartości lub o jednorodnej gęstości elektronowej. Dla wszystkich obserwowanych hepatocytów charakterystyczny był rozrost RER oraz liczniejszy, w odniesieniu do kontroli i badania poprzedniego, aparat Golgiego. W niektórych aparatach Golgiego obserwowano poszerzenie przestrzeni między błonami cystern.



Fot. 69. Elektronogram hepatocytu karpia po okresie rekonwalescencji po ekspozycji na mankozeb: widoczne prawidłowe jądro komórkowe (JK), mitochondria (M) z różnym stopniem zatarcia struktury, krótkie fragmenty RER, pęcherzyki o zróżnicowanej zawartości (P), aparat Golgiego (AG) z licznymi cysternami przy polu sitowym (PS). 8000 x.

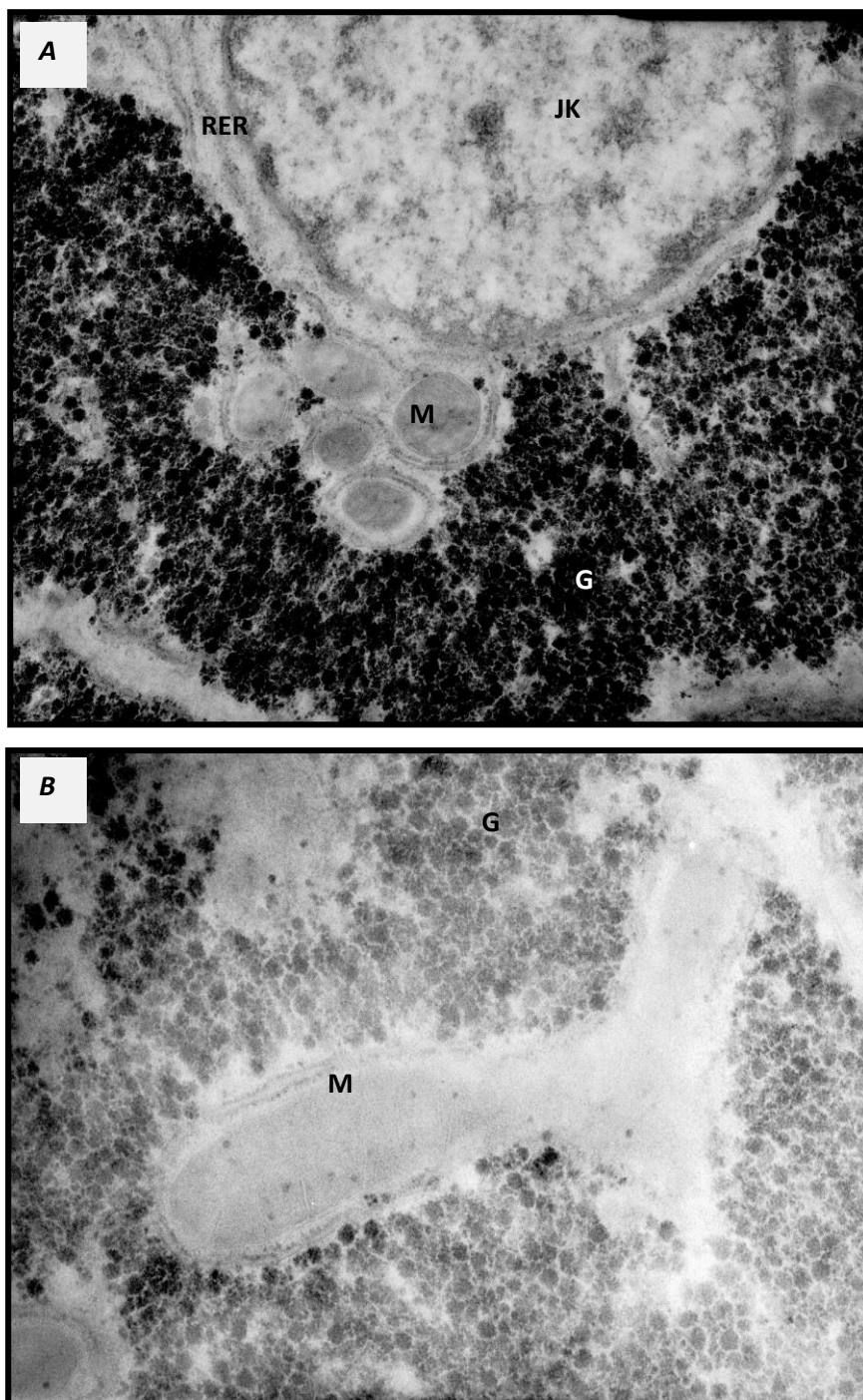


Fot. 70. Elektronogram hepatocytów karpia po okresie rekonwalescencji po ekspozycji na mankozeb - liczna i pofragmentowana RER z ogniskowo rozmytą strukturą (Z) i poszerzonymi przestrzeniami między błonami, nieprawidłowe jądro komórkowe (JK) oraz mitochondria (M) prawidłowe i o zmienionej strukturze, ciemne elektronowo pęcherzyki (P). 11500x.

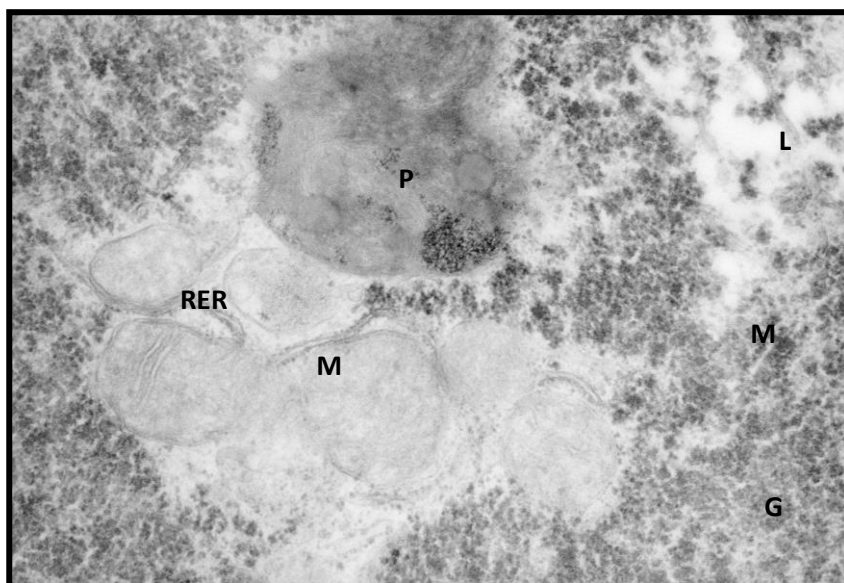
PROCHLORAZ

Po 14. dniach ekspozycji na prochloraz zaobserwowano zmiany w ultrastrukturze hepatocytów karpi (Fot. 71). W cytoplazmie bardzo gęsto rozmieszczone były ziarna glikogenu, które spychały obecne w komórce organella ku jądra komórki. Cytoplazma hepatocytów była zubożona w organella, w porównaniu do kontroli. Obserwowane mitochondria były w większości obrzmiałe, o zatartej, a niekiedy zniszczonej strukturze. Prawidłowe mitochondria występowały sporadycznie. RER znajdowała się w pobliżu jądra komórkowego i przy pojedynczych mitochondriach, i była pofragmentowana oraz niekiedy pozbawiona rybosomów. Przestrzenie między błonami siateczki były często poszerzone. Obserwowano też miejsca zatarcia struktury RER.

Po okresie rekonwalescencji (Fot. 72) w hepatocytach karpi nadal obecne były liczne ziarna glikogenu. Obserwowano bardzo zróżnicowany stan mitochondriów. Niektóre posiadały częściowo zachowaną strukturę, a częściowo zatartą. RER otaczała jądro komórkowe i mitochondria niekiedy w sposób regularny, a często, wskutek jej fragmentacji - nieregularny. Miejscami obserwowano poszerzenie przestrzeni pomiędzy błonami RER. W hepatocytach pojawiły się niekiedy miejsca elektronowo jasne jako skutek lizy cytoplazmy.



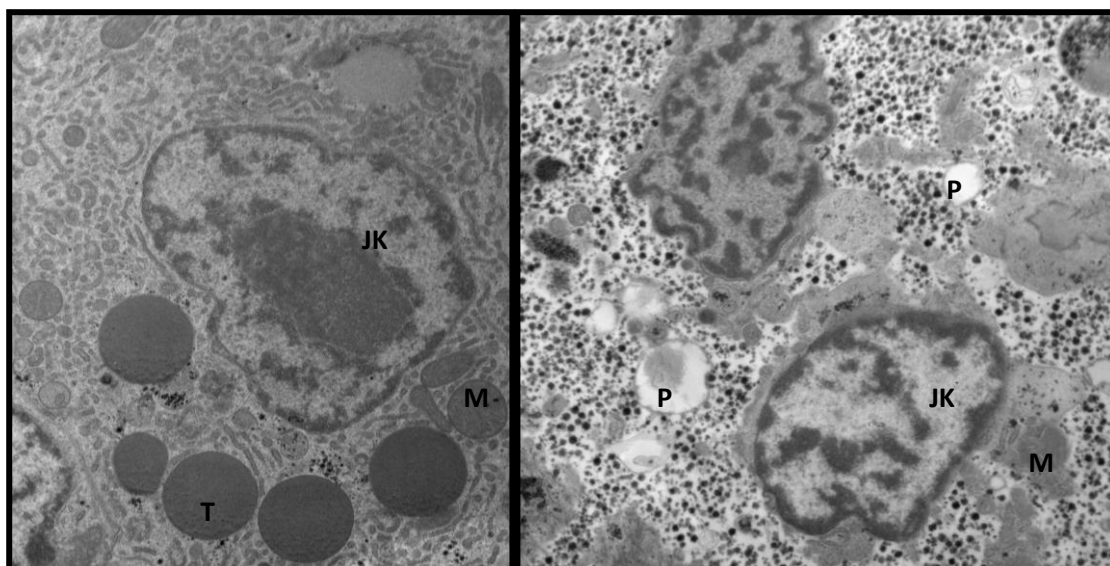
Fot. 71. Elektronogramy hepatocytów karpia po 14. dniowej ekspozycji na prochloraz. A. Widoczne jądro komórkowe (JK) z jasną elektronowo chromatyną, liczne ziarna glikogenu (G), pofragmentowana RER w okolicy jądra komórkowego i mitochondriów. Mitochondria z zatartą strukturą 10000 x; B. Mitochondria (M) obrzmiałe i z uszkodzoną strukturą. 14000 x.



Fot. 72. Elektronogram hepatocytu karpia po okresie rekonwalescencji po ekspozycji na prochloraz. Widoczne: obrzmiałe mitochondria (M), z zatartą lub destrukcją struktury wewnętrznej, fragmentacja RER i jej odstawanie od mitochondriów, ogniskowa liza cytoplazmy (L), pęcherzyk o zróżnicowanej zawartości (P), liczne ziarna glikogenu (G). 18000 x.

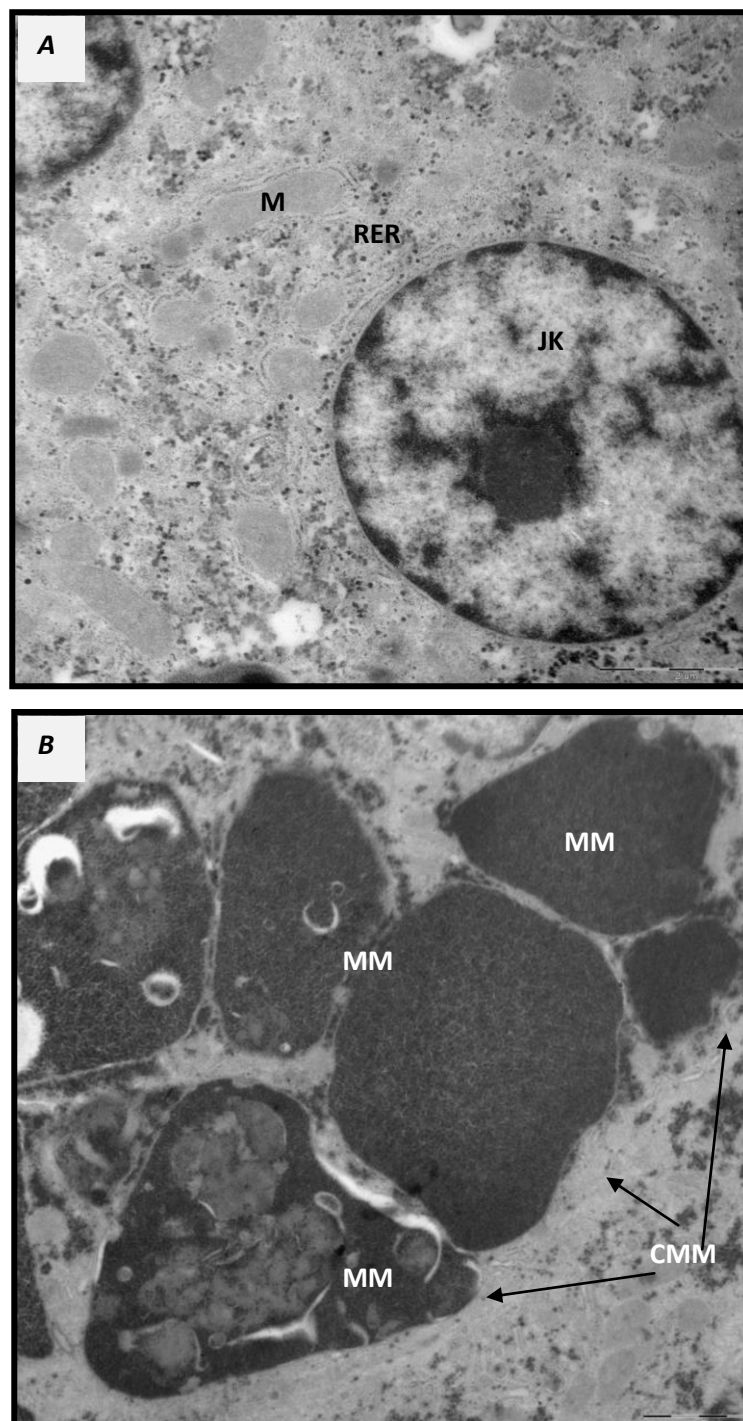
TEBUKONAZOL

Ekspozycja (14. dniowa) na tebukonazol spowodowała wystąpienie wyraźnych zmian patologicznych w hepatocytach badanych karp (Fot. 73). Obserwowane jądra komórek były zarówno prawidłowe, jak i liczne - o nieprawidłowym kształcie oraz zaburzonym układzie chromatyny. Proces segregacji cytoplazmy był przyczyną skupiania się organelli w pobliżu jądra komórkowego, a pozostała część cytoplazmy hepatocytu była jaśniejsza elektronowo. W hepatocytach obserwowano ziarna glikogenu, rozfragmentowaną RER, mitochondria o prawidłowej i zatartej strukturze. Obecne były także liczne pęcherzyki o zróżnicowanej zawartości oraz pojedyncze krople tłuszczu.



Fot. 73. Elektronogramy hepatocytów karpia po 14. dniowej ekspozycji na tebukonazol. Widoczne: prawidłowe i nieprawidłowe jądra komórkowe (JK) i mitochondria (M), zubożenie cytoplazmy w organella, krople tłuszczu (T) i pęcherzyki o zróżnicowanej gęstości elektronowej i zawartości (P). 8000 x.

Po okresie rekonwalescencji w hepatocytach karpia obserwowano zmiany ich ultrastruktury (Fot. 74). Obecne w nich mitochondria miały na ogół zatartą strukturę i otoczone były nieliczną i w wielu miejscach pofragmentowaną RER. Obserwowano też struktury charakterystyczne dla komórek melanomakrofagowych.

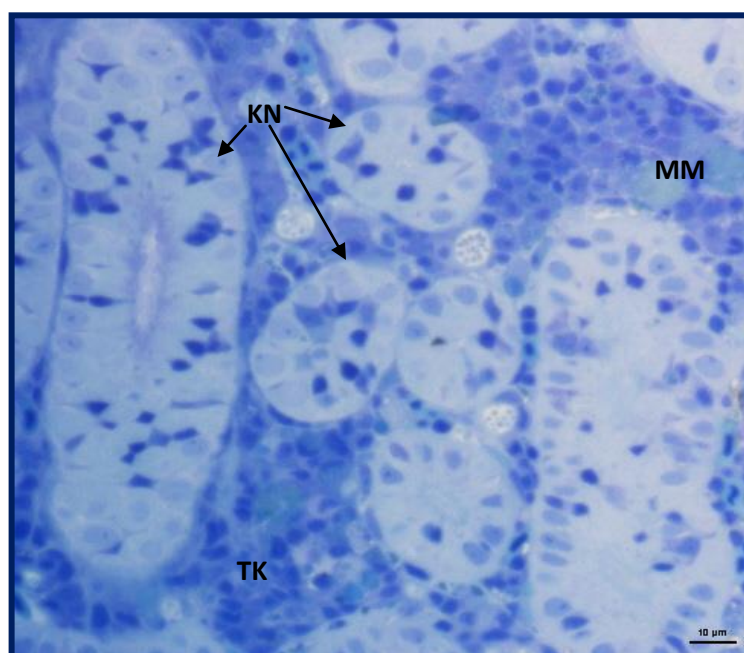


Fot. 74. Elektronogramy hepatocytów karpia po okresie rekonwalescencji po ekspozycji na tebukonazol. A. Widoczne prawidłowe jądro komórkowe (JK), mitochondria (M) z zatartą strukturą, pofragmentowana RER. 12500 x; B. Komórki MM tworzące CMM. 8000 x.

3.1.6. Obserwacje zmian histopatologicznych nerki tułowiowej karpia w mikroskopie świetlnym (LM)

KONTROLA

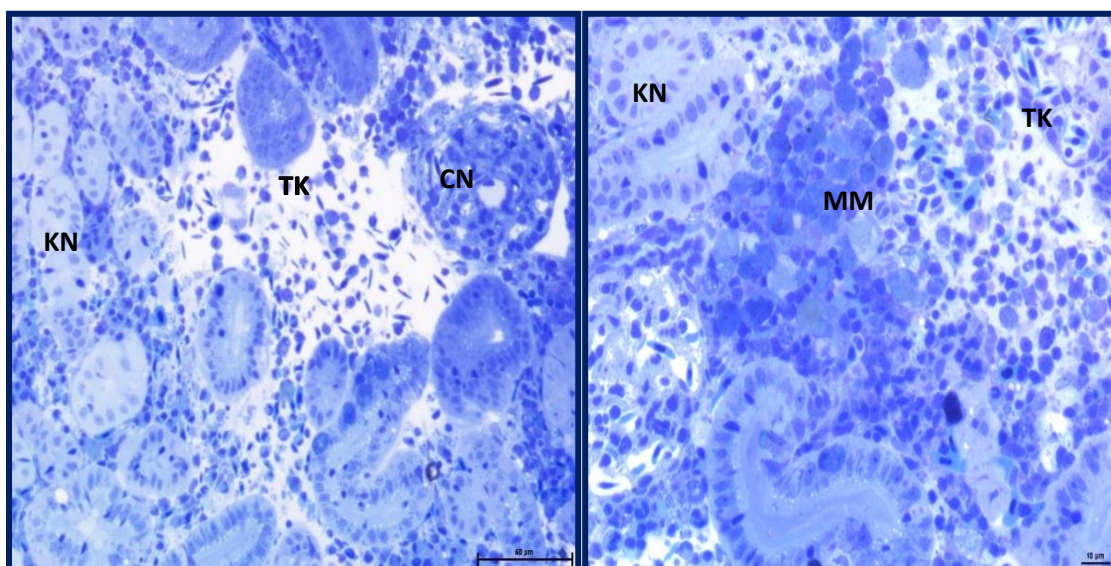
Obserwowano na ogół prawidłową strukturę nerki tułowiowej karpia, zarówno części wydalniczej, jak i krwiotwórczej (Fot. 75). W części wydalniczej nabłonek kanalików nerkowych charakteryzował się zwartą budową. Sporadycznie światło niektórych kanalików wypełniał płyn i wtedy ich struktura była nieznacznie zatarta. Pomiędzy kanalikami nerkowymi, w zrębie łącznotkankowym zlokalizowana była tkanka krwiotwórcza ze ściśle obok siebie leżącymi komórkami hematopoetycznymi. Miejscami występowały w tkance komórki melanomakrofagowe (MM): w formie rozproszonej lub skupisk, zwykle w okolicy kłębuszków nerkowych i naczyń krwionośnych.



Fot. 75. Nerka tułowiowa karpia grupy kontrolnej. Część wydalnicza z kanalikami nerkowymi (KN) i część krwiotwórcza (TK) z komórkami hematopoetycznymi. Obecne pojedyncze komórki MM.

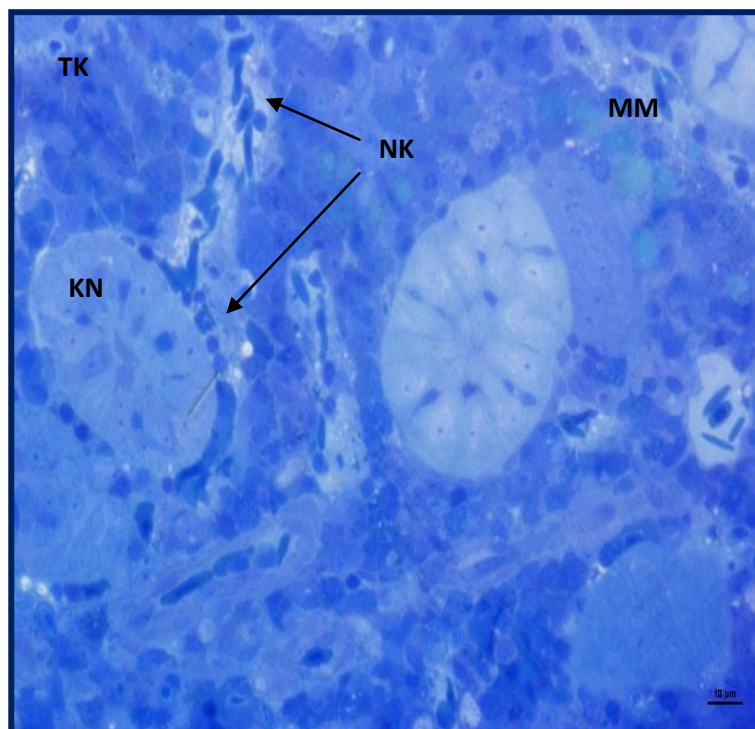
MANKOZEB

W nerce tułowiowej karpia, w wyniku 14. dniowej ekspozycji na mankozeb (Fot. 76), obserwowane komórki nabłonkowe kanalików nerkowych były często obrzmiałe, wskutek czego ich światło było zmniejszone, a czasem nieobecne. W kanalikach ze światłem obecny był często płyn. Struktura kanalików zbiorczych była wielokrotnie zatarta. Wokół niektórych kłębuszków i kanalików nerkowych obserwowano niewielki naciek komórkowy. Część krwiotwórczą nerki tułowiowej eksponowanych ryb charakteryzowało luźne utkanie zrębu łącznotkankowego. Miejscami obecne były w tkance komórki MM.

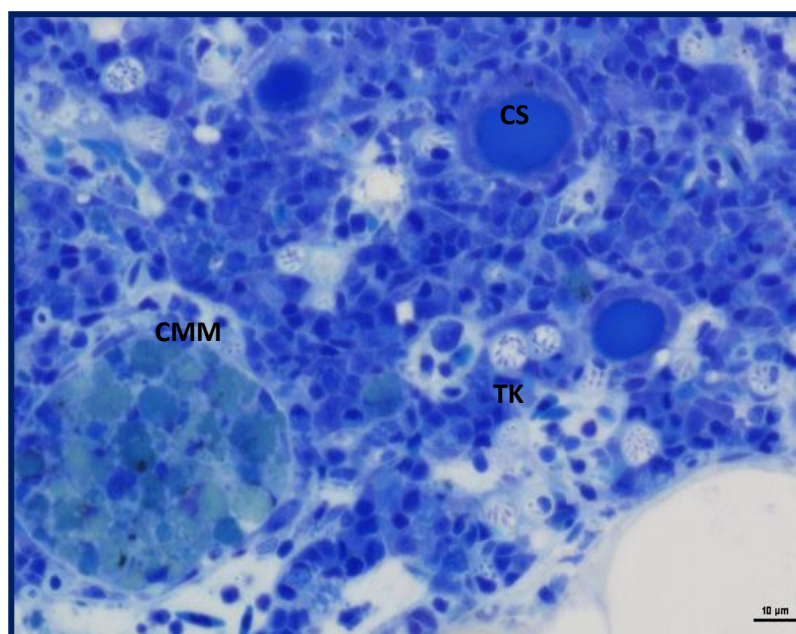


Fot. 76. Nerka tułowiowa karpia po 14. dniowej ekspozycji na mankozeb. Obrzmienie komórek nabłonkowych kanalików nerkowych (KN) i płyn w ich świetle, wypełnione elementami morfotycznymi ciała nerkowe (CN) i miejscowo uszkodzona torebka Bowmana. Luźne utkanie części krwiotwórczej (TK) i obecność w niej komórek MM.

Po okresie rekonwalescencji (Fot. 77 - 78) obserwowano w dalszym ciągu silne obrzmienie komórek nabłonkowych kanalików nerkowych, co powodowało zmniejszenie lub brak światła w ich wnętrzu. W świetle kanalików ze światłem obecny był płyn. Pojedyncze kanaliki ulegały destrukcji. Wokół niektórych kanalików nerkowych utworzył się naciek komórkowy. Pomiedzy kanalikami nerkowymi obserwowano rozplam tkanki krwiotwórczej i jednocześnie ogniskowe rozluźnienie struktury jej podścieliska (Fot. 77). W tkance krwiotwórczej obecne były też pojedyncze ciała szkliste i liczne, pojedyncze komórki MM czy utworzone z nich rozległe centra (CMM) (Fot. 78).



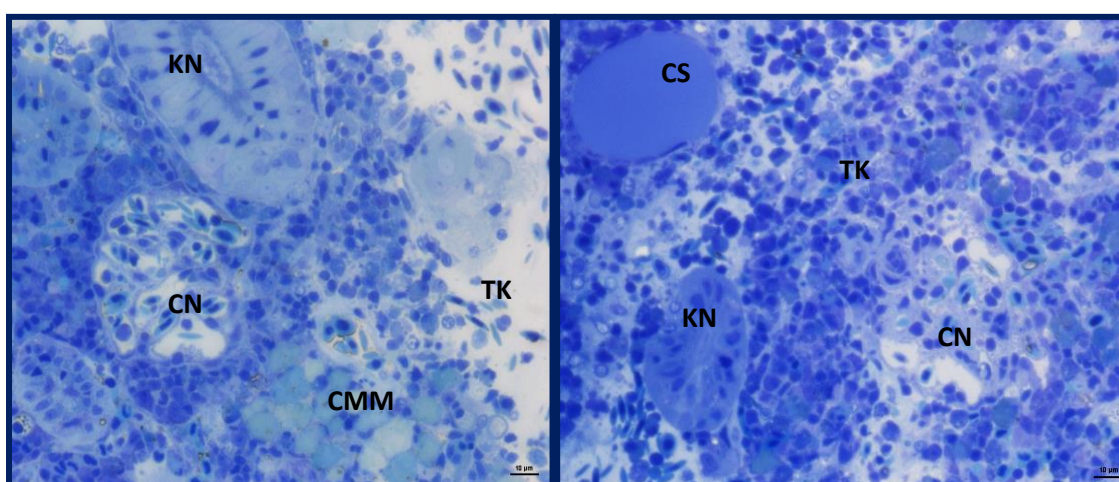
Fot. 77. Nerka tułowiowa karpia po okresie rekonwalescencji po ekspozycji na mankozeb. Kanaliki nerkowe (KN): z obrzmiałymi komórkami nabłonka i światłem wypełnionym płynem z uszkodzoną strukturą oraz otoczone naciekiem komórkowym (NK). Silny rozplem tkanki krwiotwórczej (TK), obecne w niej komórki MM.



Fot. 78. Nerka tułowiowa karpia po okresie rekonwalescencji po ekspozycji na mankozeb: centrum melanomakrofagowe (CMM) oraz ciała szkliste (CS) w części krwiotwórczej (TK). Ogniskowe rozrzedzenie podścieliska łącznotkankowego tkanki krwiotwórczej.

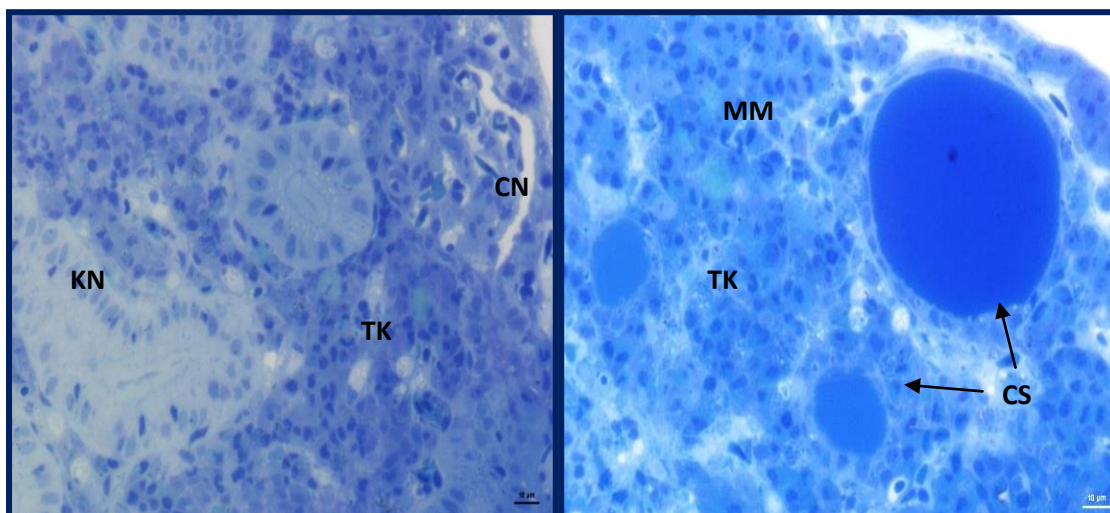
PROCHLORAZ

W nabłonku kanalików nerkowych karpia eksponowanych (14 dni) na prochloraz (Fot. 79) obserwowano silne obrzmienie komórek nabłonka, wskutek czego niektóre komórki uległy uszkodzeniu, a liczne kanaliki pozbawione były światła. Kłębuszki nerkowe nie posiadały wyraźnej granicy, a w pojedynczych miejscach torebka Bowmana uległa przerwaniu. W tkance krwiotwórczej obecne były CMM oraz ciała szkliste, a jej podścielisko łącznotkankowe w wielu miejscach wykazywało cechy rozluźnienia struktury.



Fot. 79. Nerka tułowiowa karpia po 14. dniowej ekspozycji na prochloraz. Kanaliki nerkowe z zatartą lub zniszczoną strukturą nabłonka i światłem wypełnionym płynem (KN). Ciałka nerkowe (CN): obrzmiałe, z uszkodzoną torebką Bowmana. Miejscowe rozluźnienie podścieliska tkanki krwiotwórczej (TK) i obecne w niej ciała szkliste (CS) oraz duże CMM.

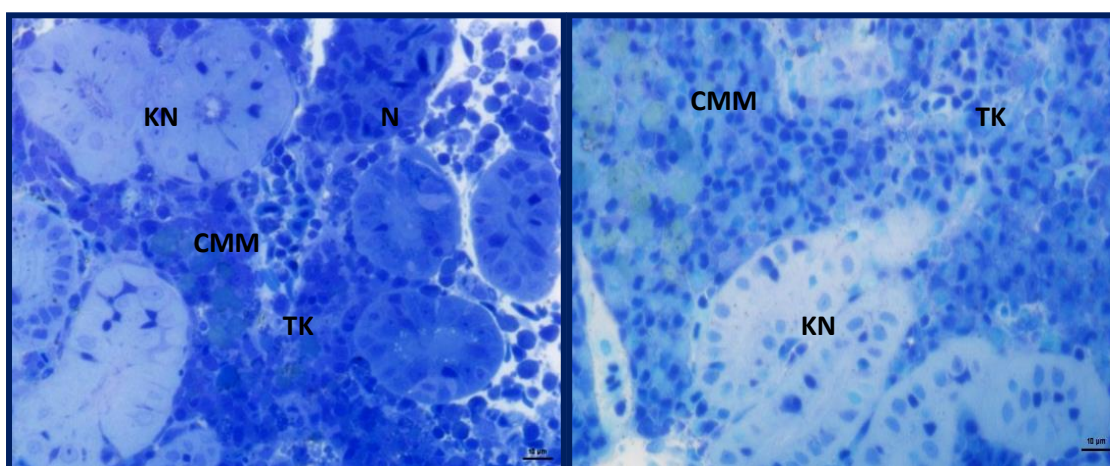
Po okresie detoksykacji (Fot. 80) struktura nabłonka kanalików nerkowych była zatarta, a światło wielu kanalików wypełniał płyn. W ciałku nerkowym obserwowano poszerzoną przestrzeń moczową. Rozplem tkanki krwiotwórczej, wciskającej się pomiędzy kanaliki nerkowe, przyczyniał się do ich zniekształcenia i destrukcji. W tkance krwiotwórczej obecne były liczne ciała szkliste oraz niewielkie skupiska komórek MM.



Fot. 80. Nerka tułowiowa karpia po okresie rekonwalescencji po ekspozycji na prochloraz. Kanaliki wydalinicze z obrzmiałymi komórkami nabłonkowymi oraz światłem wypełnionym płynem, destrukcja pojedynczych kanalików (KN). Poszerzenie przestrzeni moczowej w ciałku nerkowym (CN). Obecne ciała szkliste (CS). Silny rozplętki tkanki krwiotwórczej (TK) i pojedyncze komórki MM.

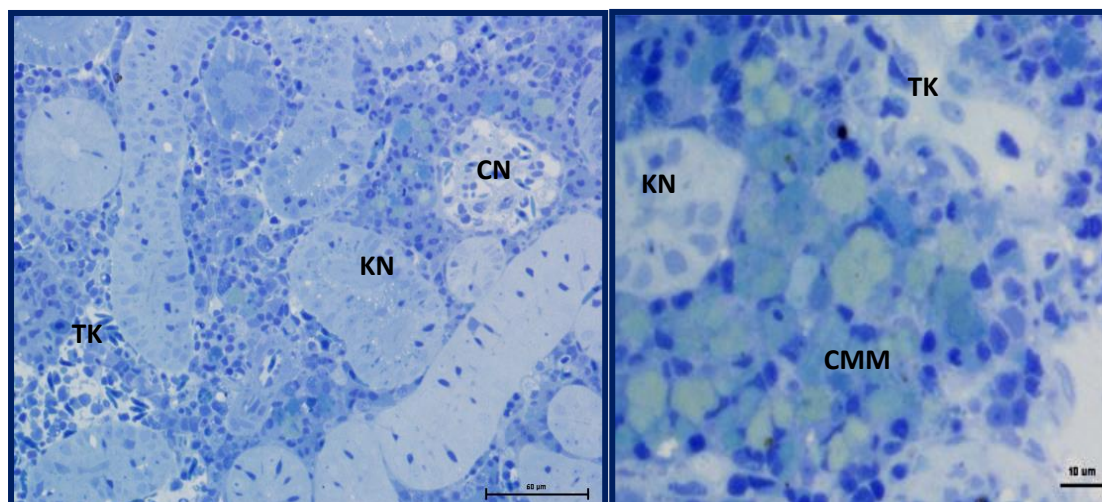
TEBUKONAZOL

W nerce tułowiowej karpia po okresie ekspozycji (14 dni) na tebukonazol (Fot. 81) obserwowano obrzmienie komórek nabłonkowych i destrukcję pojedynczych kanalików nerkowych. Światło wielu kanalików wypełniał płyn lub było ono nieobecne. Zaznaczył się rozrost tkanki krwiotwórczej, w której utworzyły się obszerne CMM oraz ogniska przejaśnienia wskutek rozrzedzenia podścieliska łącznotkankowego.



Fot. 81. Nerka tułowiowa karpia po 14. dniowej ekspozycji na tebukonazol. Obrzmienie i zatarcie struktury komórek nabłonkowych kanalików nerkowych, nekroza pojedynczych kanalików (N), obecność płynu w świetle kanalików (KN). Rozplętki tkanki krwiotwórczej (TK) i miejscowe rozluźnienie podścieliska łącznotkankowego. Duże CMM.

Po okresie rekonwalescencji (Fot. 82) komórki nabłonkowe kanalików nerkowych były w dalszym ciągu obrzmiałe, a ich struktura często zatarta. Wokół niektórych z nich obecny był naciek komórkowy. Kłębuszki nerkowe były silnie wypełnione elementami morfotycznymi, z poszerzoną przestrzenią moczową. Obserwowano też silny rozplam tkanek krwiotwórczej, w której obecne były CMM.

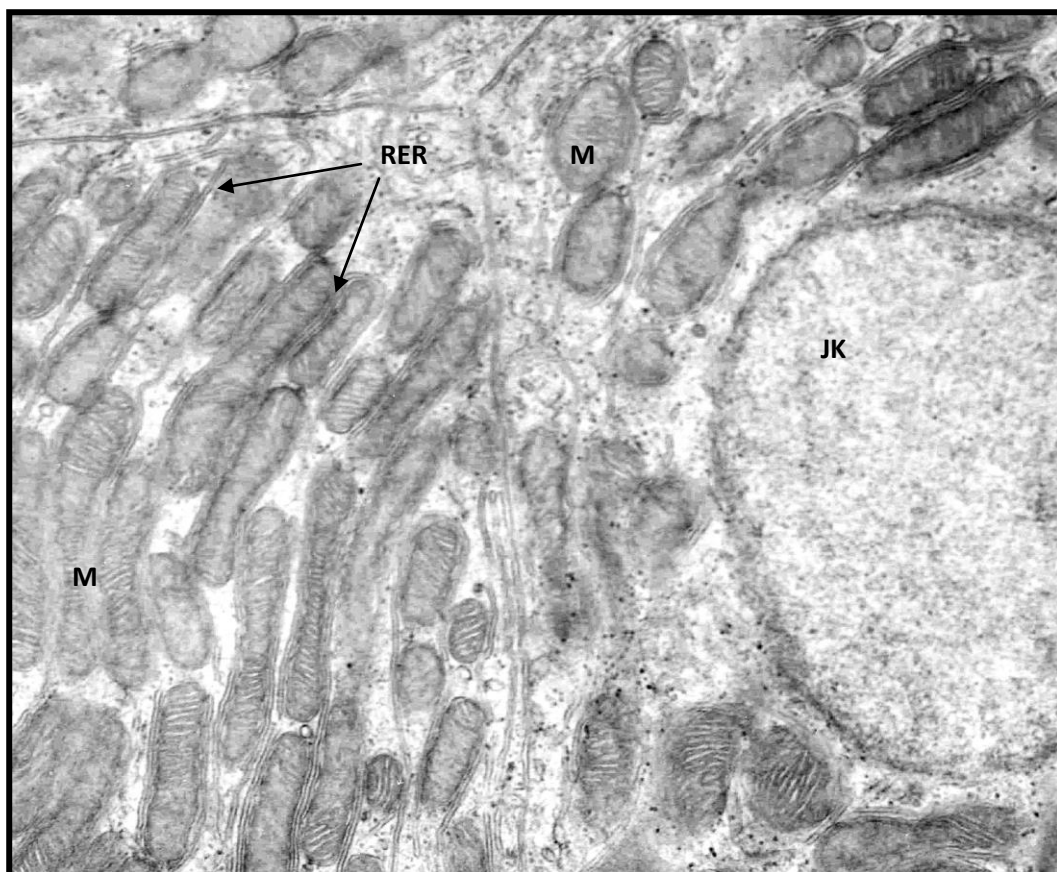


Fot. 82. Nerka tułowiowa karpia po okresie rekonwalescencji po ekspozycji na tebukonazol. Kanalik nerkowy (KN) z zatartą strukturą, światłem wypełnionym płynem, zniekształcone ciało nerkowe (CN). Silny rozplam tkanek krwiotwórczej (TK) i miejscowe rozluźnienie podścieliska, duże CMM.

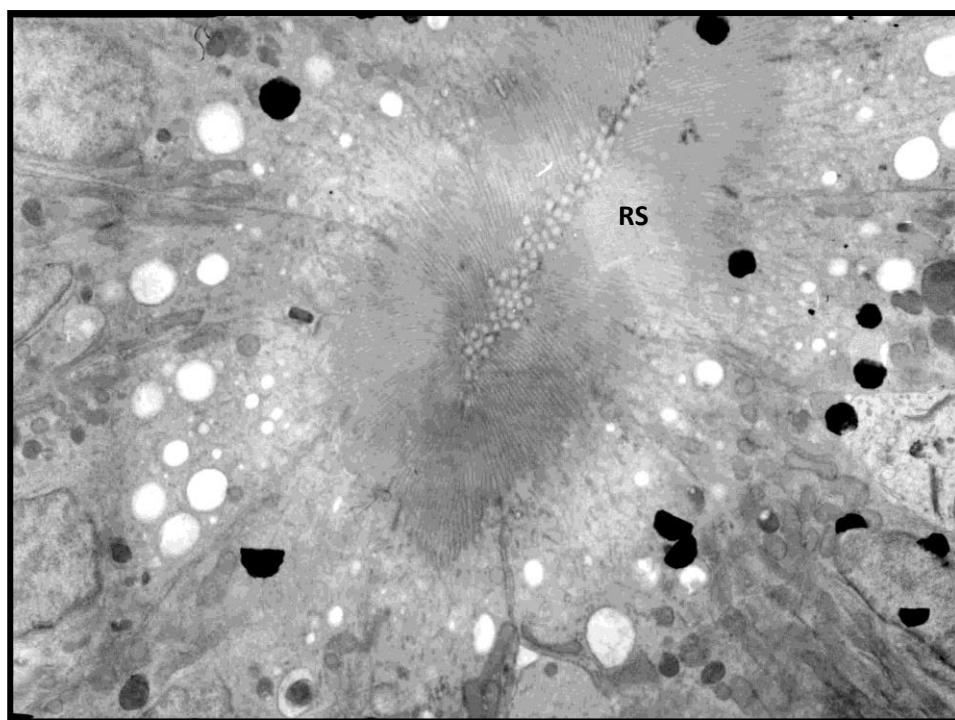
3.1.7. Obserwacje zmian w ultrastrukturze nerki tułowiowej karpia w transmisyjnym mikroskopie elektronowym (TEM)

KONTROLA

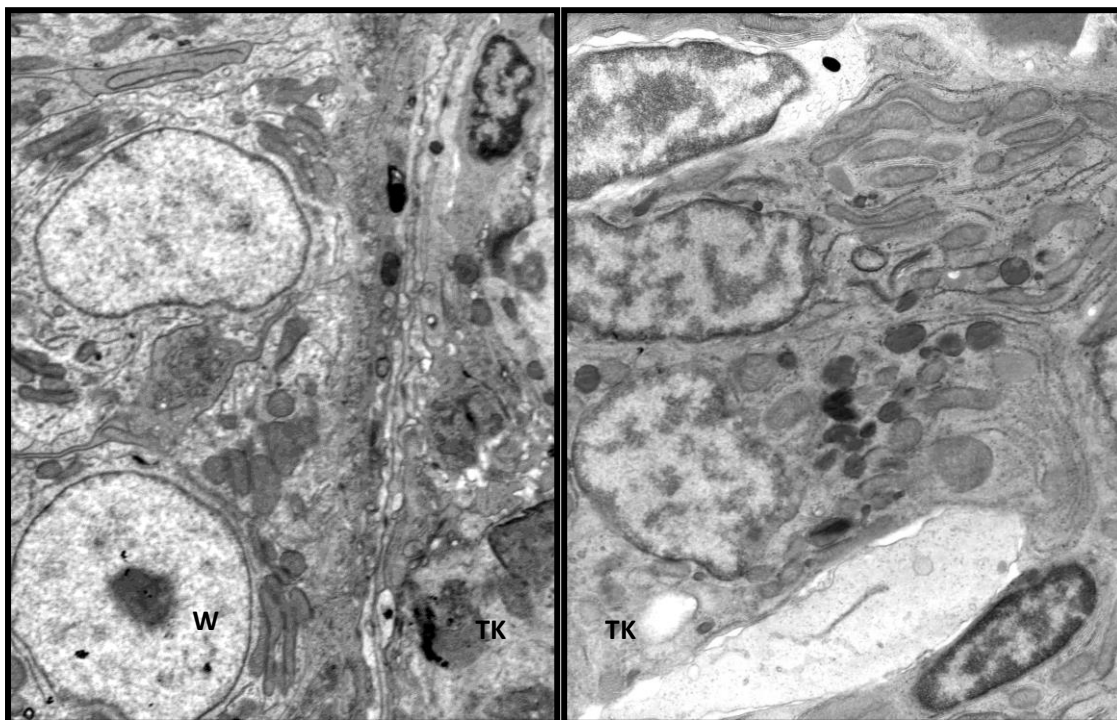
W nerce ryb kontrolnych (Fot. 83 - 85) obserwowano prawidłową ultrastrukturę komórek nabłonkowych kanalików nerkowych. Mitochondria miały regularny, wydłużony bądź owalny kształt z wyraźnie wyodrębnioną strukturą grzebieni. Pomiedzy gęstą siecią mitochondriów rozciągały się długie pasma siateczki śródplazmatycznej szorstkiej (RER) z rybosomami (Fot. 83). Rąbek szczoteczkowy z gęsto ułożonymi mikrokosmkami obserwowano w części apikalnej komórek nabłonkowych kanalików (Fot. 84). W części krwiotwórczej obserwowano niedojrzałe, młode elementy morfotyczne - komórki hematopoetyczne, które na ogół do siebie przylegały (Fot. 85).



Fot. 83. Elektronogram nabłonka kanalików nerkowych karpia grupy kontrolnej: komórki nabłonkowe z prawidłowym jądrem komórki (JK), licznymi mitochondria (M) i przylegającą do nich RER. 7000 x.



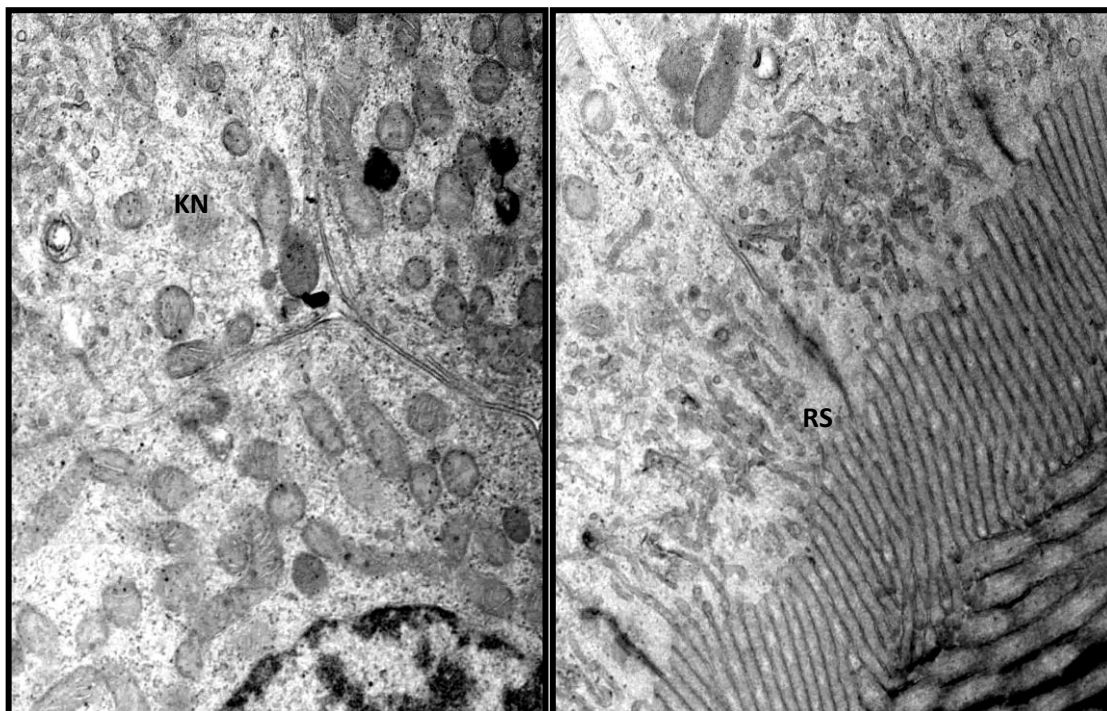
Fot. 84. Elektronogram nabłonka kanalika nerkowego karpia grupy kontrolnej - części apikalna komórek wraz z rąbkem szczoteczkowym (RS). 3500 x.



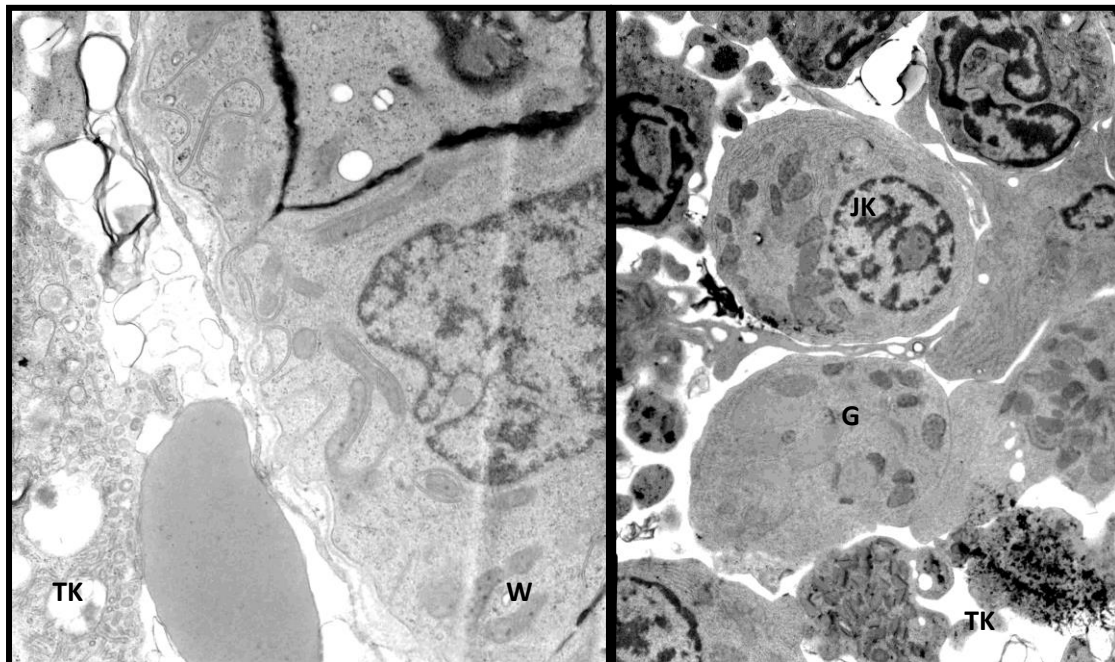
Fot. 85. Elektronogramy części krwiotwórczej nerki tułowiowej karpia grupy kontrolnej: granica pomiędzy częścią wydalniczą (W) a krwiotwórczą (TK) oraz komórki hematopoetyczne. 4200 x. i 5600 x.

MANKOZEB

W ultrastrukturze komórek nerki tułowiowej karpia eksponowanych na mankozeb (14 dni) obserwowano zmiany patologiczne (Fot. 86 - 87). W części wydalniczej komórki nabłonkowe kanalików nerkowych przylegały do siebie. Obecne były w nich mniej liczne, w porównaniu do kontroli, i zmienione mitochondria: obrzmiałe, z zatartą strukturą oraz poszerzonymi przestrzeniami między grzebieniami mitochondrialnymi. Obserwowano fragmentację RER (Fot. 86). W polu wydzielniczym, przy biegunie apikalnym komórek nabłonkowych, obecne były bardzo liczne fragmenty błon. Wewnątrz rąbka szczoteczkowego cytoplazma miała różną gęstość elektronową. Doszło do wyraźnego oddzielenia części krwiotwórczej od części wydalniczej nerki, a w wolnej przestrzeni pomiędzy nimi obecne były liczne, luźne fragmenty błonowe. Podścielisko łącznotkankowe było jasne elektronowo, a komórki hematopoetyczne nie przylegały ściśle do siebie. Komórki te posiadały nieregularne kształty i wyraźnie odrzucały zniszczone fragmenty organelli komórkowych do przestrzeni zewnątrzkomórkowej. (Fot. 87).

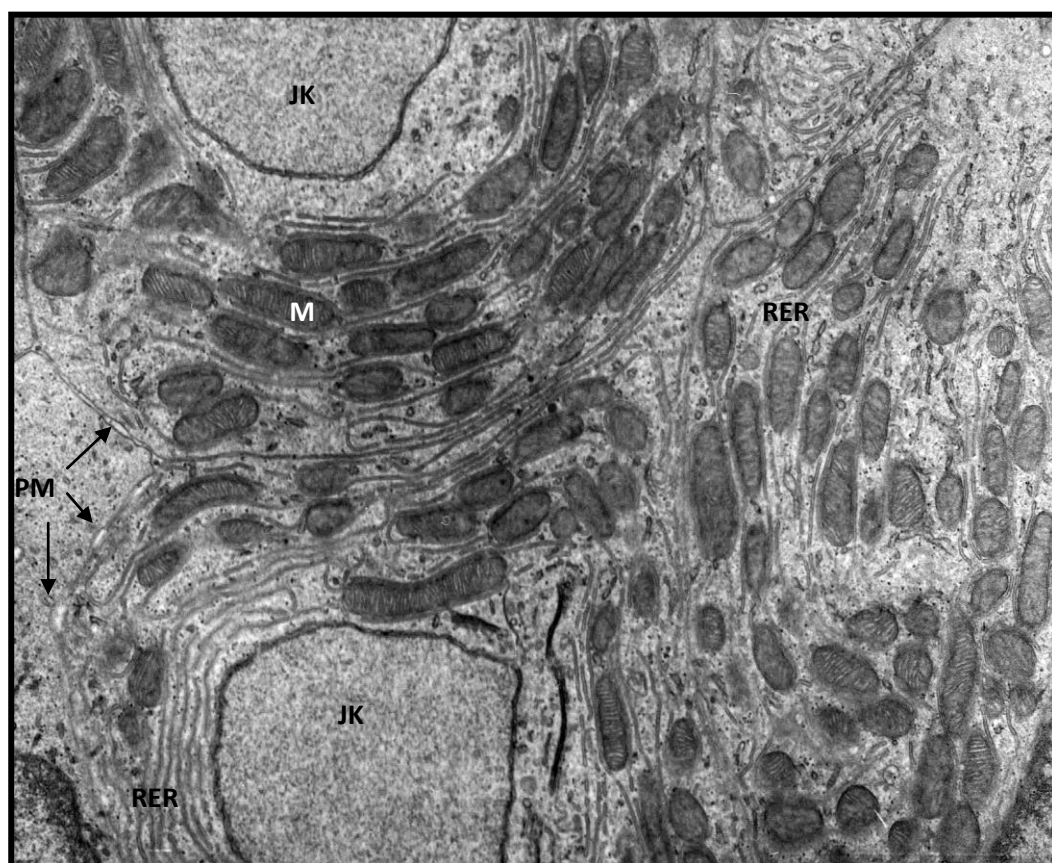


Fot. 86. Elektronogramy nabłonka kanalików nerkowych (KN) karpia po 14. dniowej ekspozycji na mankozeb: różna gęstość elektronowa cytoplazmy, mitochondria prawidłowe, z zatartą strukturą i ulegające destrukcji. Pole wydzielnicze z rąbkami szczoteczkowymi (RS) z obecnymi wewnątrz miejscami z wyraźnie mniejszą gęstością elektronową, liczne fragmenty błonowe w pobliżu bieguna apikalnego. 10000 x.

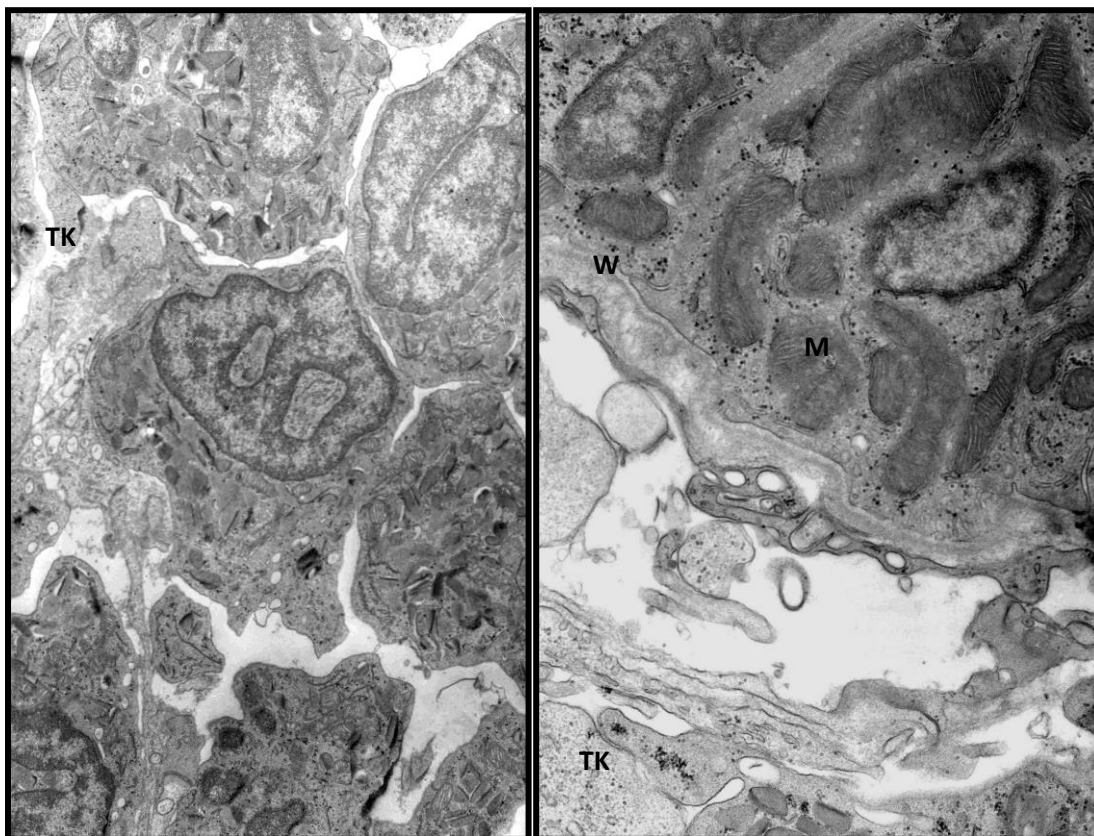


Fot. 87. Elektronogramy części krwiotwórczej nerki tułowiowej karpia po 14. dniowej ekspozycji na mankozeb: granica pomiędzy częścią wydalniczą (W) i krwiotwórczą (TK) z wyraźnie poszerzoną przestrzenią i obecnymi w niej luźnymi fragmentami błon. Jasne elektronowo podścielisko łącznotkankowe tkanki krwiotwórczej, zmienione komórki hematopoetyczne i fragmenty zniszczonych komórek, jasne elektronowo ziarna granulocytów (G) oraz nieprawidłowy układ chromatyny jądrowej w komórkach (JK). 7000 x i 4200 x.

Po okresie rekonwalescencji zmiany patologiczne w obserwowanych komórkach nabłonkowych kanalików wydaliniczych były podobne do opisanych po okresie ekspozycji na fungicyd (Fot. 88 - 89). Komórki nabłonkowe na ogół przylegały do siebie. Obserwowane w nich mitochondria były często obrzmiałe, z zatartą strukturą, a liczna RER była pofragmentowana. Jądra komórek nabłonkowych były często jasne elektronowo (Fot. 88 - 89). Część wydalinicza i krwiotwórcza nerki były w dalszym ciągu oddzielone. Elementy morfotyczne tkanki krwiotwórczej były luźno w niej ułożone i charakteryzowały się nieprawidłowym kształtem całej komórki oraz jądra komórkowego (Fot. 89).



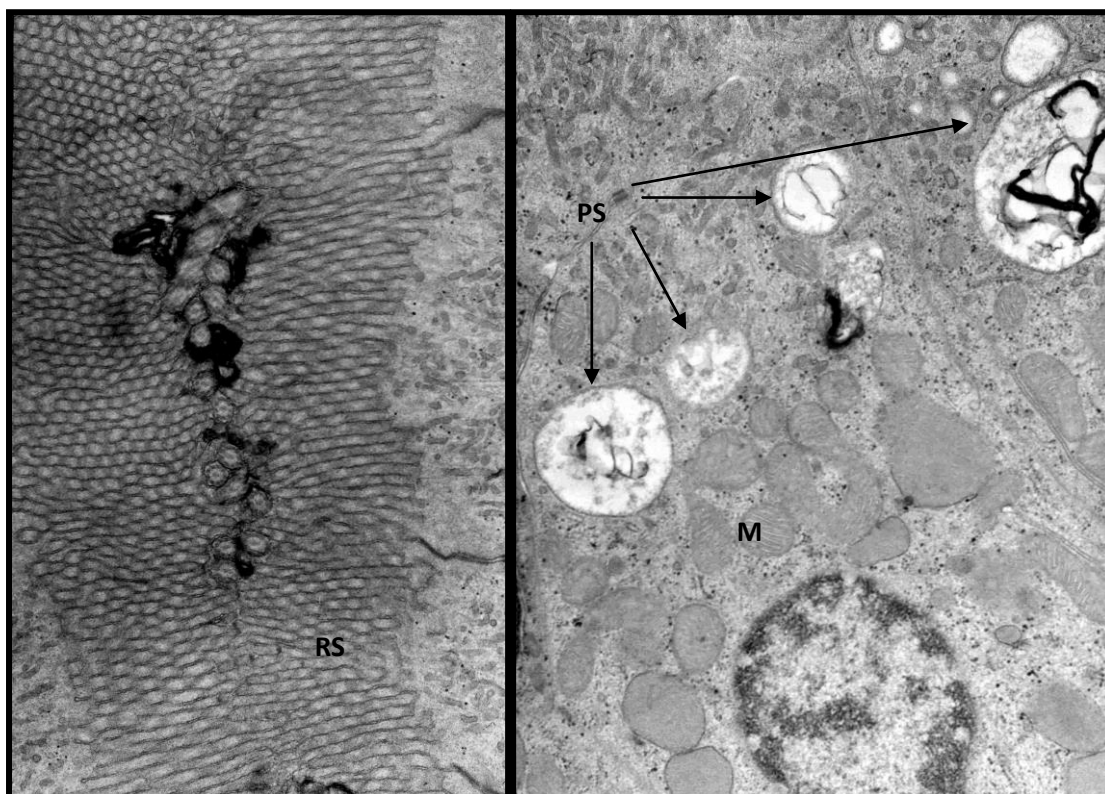
Fot. 88. Elektronogram komórek nabłonkowych kanalika nerkowego karpia po okresie rekonwalescencji po ekspozycji na mankozeb: mitochondria (M) prawidłowe i z zatartą strukturą oraz poszerzenie przestrzeni między grzebieniami; fragmentacja RER; jednolita gęstość elektronowa jąder komórek (JK). Miejscowe poszerzenie przestrzeni międzykomórkowych (PM). 5600 x.



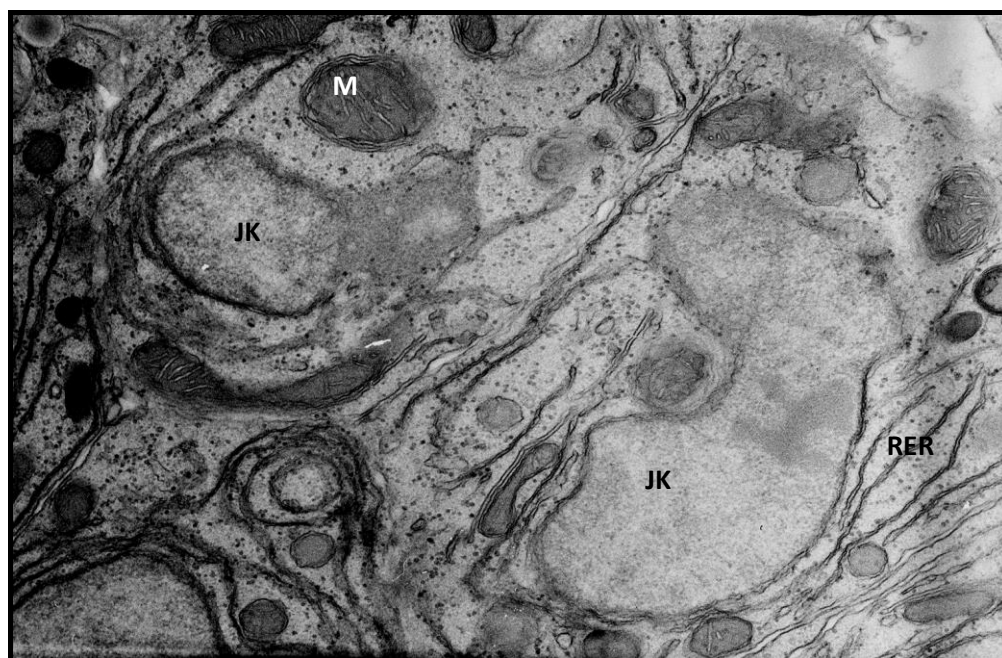
Fot. 89. Elektronogramy komórek części krwiotwórczej nerki tułowiowej karpia po okresie rekonwalescencji po ekspozycji na mankozeb. Luźne rozmieszczenie komórek hematopoetycznych oraz ich zmieniony kształt. Wolna przestrzeń pomiędzy częścią wydalniczą (W) a krwiotwórczą (TK) z obecnymi w niej licznymi strukturami błoniastymi. 5600 x i 10000 x.

PROCHLORAZ

W nerce tułowiowej karpia po 14. dniach ekspozycji na prochloraz (Fot. 90 - 91) obserwowano zmiany ultrastruktury komórek. W części wydalniczej komórki nabłonka kanalików nerkowych ściśle przylegały do siebie. Obserwowane w nich mitochondria były często powiększone w stosunku do kontroli, a struktura niektórych z nich całkowicie zatarta. RER w wielu miejscach była silnie pofragmentowana, a przestrzenie pomiędzy jej błonami często poszerzone. W jądrach niektórych komórek nabłonkowych obserwowano brak zróżnicowania chromatyny na eu- i heterochromatynę, a pojedyncze z nich miały uszkodzoną błonę jądrową. Obserwowano też liczne pęcherzyki zawierające na ogół fragmenty błon. W rąbku szczoteczkowym często występowały miejsca jasne elektronowo. W polu wydzielniczym pojawiły się liczne fragmenty struktur błoniastych (Fot. 90).



Fot. 90. Elektronogramy komórek nabłonkowych kanalików nerkowych karpia po 14. dniowej ekspozycji na prochloraz. W rąbku szczoteczkowym (RS) miejsca jasne elektronowo, a w jego części środkowej obecne struktury błoniaste. Mitochondria (M) różnej wielkości, o prawidłowej lub zatartej strukturze. Obecne pęcherzyki sekwestralne (PS) w komórkach. 10000 x.



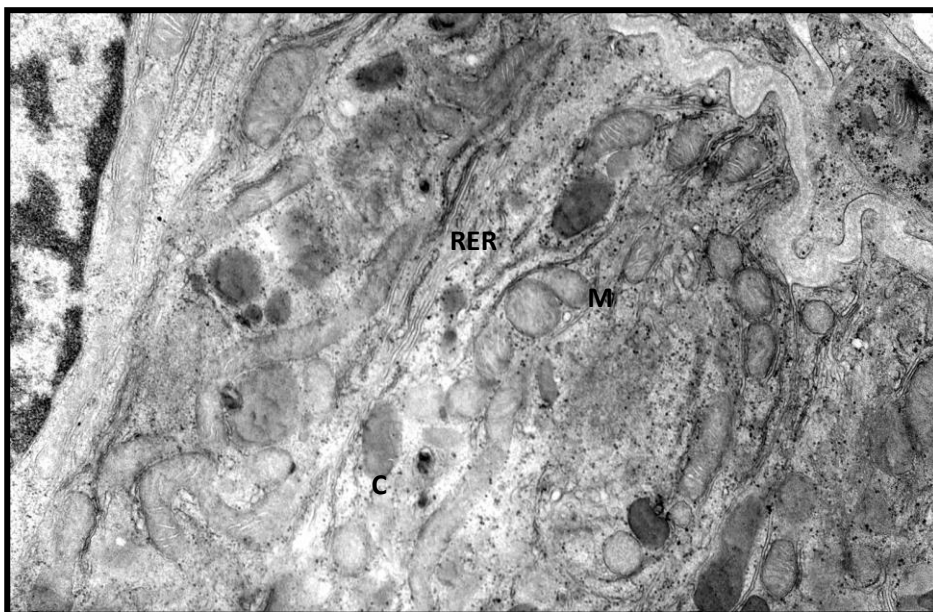
Fot. 91. Elektronogram komórek nabłonkowych nerki tułowiowej karpia po 14. dniowej ekspozycji na prochloraz. Mitochondria (M) o prawidłowej lub zatartej strukturze oraz z poszerzoną przestrzenią między grzebieniami. Poszerzone przestrzenie między błonami RER i jej fragmentacja, zmienione jądra komórkowe (JK). 10000 x.

W części krwiotwórczej nerki tułowiowej karpia po okresie ekspozycji na prochloraz komórki hematopoetyczne na ogół nie przylegały do siebie, były zniekształcone, a ich błony komórkowe pofałdowane. Liczne komórki hematopoetyczne oddzielone były fragmentami innych, zniszczonych komórek. Niektóre z krwinek posiadały jądro komórkowe o zmienionym kształcie. W granulocytach ziarna były jasne elektronowo (Fot. 92).

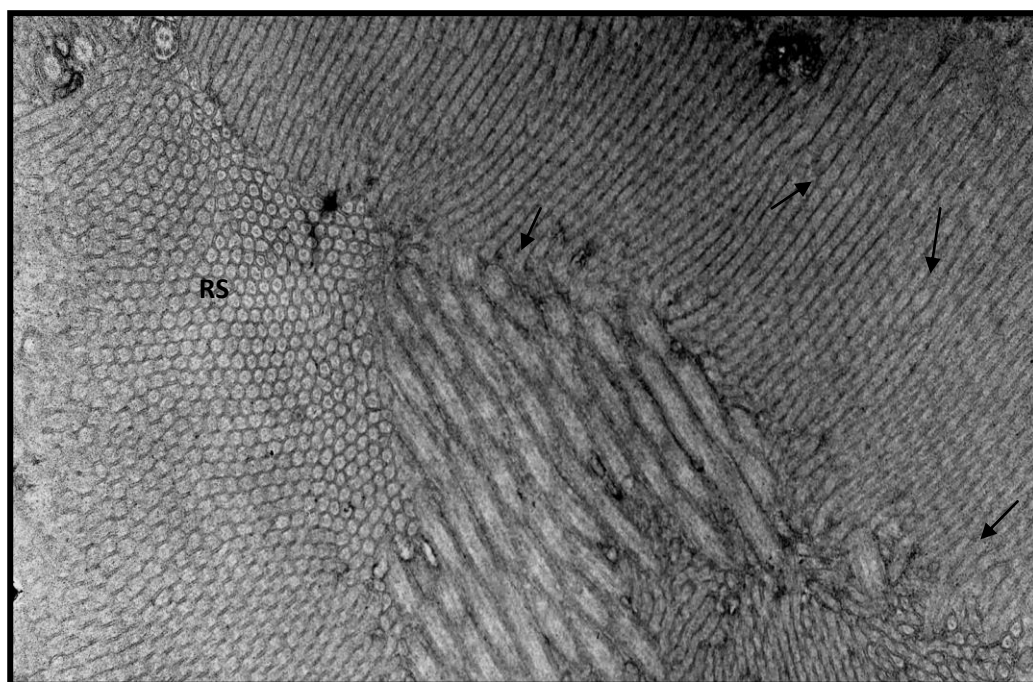


Fot. 92. Elektronogram tkanki krwiotwórczej (TK) nerki tułowiowej karpia po 14. dniowej ekspozycji na prochloraz. Rozluźnienie struktury tkanki krwiotwórczej, zmienione kształty komórek, jasne elektronowo ziarnistości granulocytów (G). 5600 x.

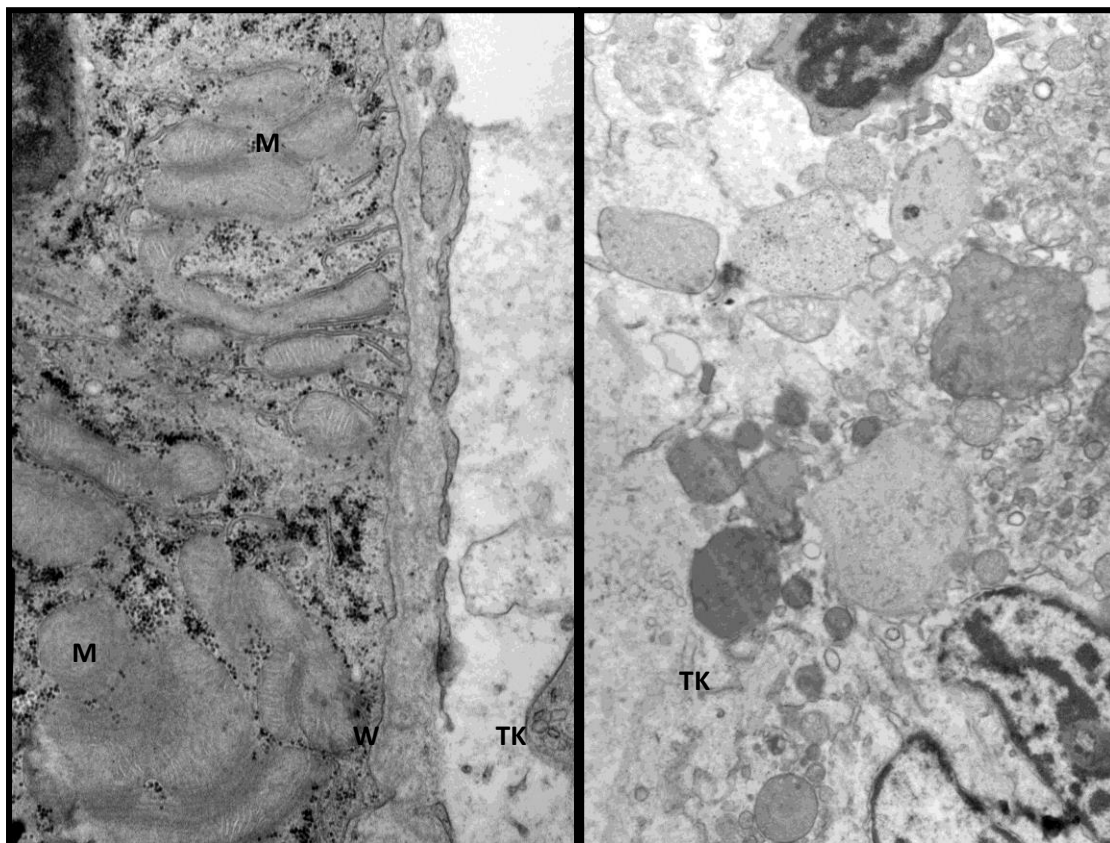
Po okresie rekonwalescencji (Fot. 93 - 95) w komórkach nabłonka części wydalniczej nerki karpia obserwowano w dalszym ciągu zmiany ultrastrukturalne podobne do wyżej opisanych. W niektórych komórkach obserwowano lizę cytoplazmy, a obecne w nich mitochondria były często obrzmiałe lub ich struktura uległa zatarciu (Fot. 93). Rąbek szczoteczkowy posiadał miejsca o zróżnicowanej gęstości elektronowej (Fot. 94). Część krwiotwórcza nerki wyraźnie oddzieliła się od części wydalniczej, a niektóre komórki hematopoetyczne uległy rozpadowi (Fot. 95).



Fot. 93. Elektronogram komórek nabłonkowych kanalik nerkowego karpia po okresie rekonwalescencji po ekspozycji na prochloraz. Przylegające do siebie komórki nabłonkowe, miejscowe rozrzedzenie ich cytoplazmy (C). Mitochondria (M) prawidłowe lub z rozmytą strukturą. Fragmentacja i rozszerzenie błon RER. 10000 x.



Fot. 94. Elektronogram komórek nabłonkowych kanalik nerki karpia po okresie rekonwalescencji po ekspozycji na prochloraz. Rąbek szczoteczkowy (RS) o zróżnicowanej gęstości elektronowej (strzałki). 7000 x.

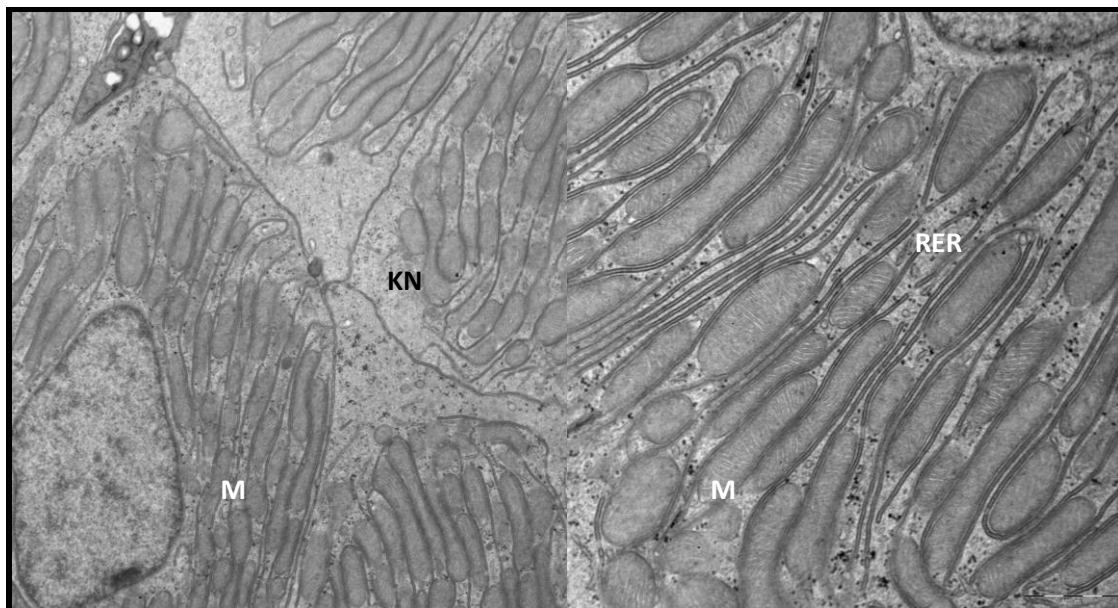


Fot. 95. Elektronogramy części wydaliniczej (W) i krwiotwórczej (TK) nerki tułowiowej karpia po okresie rekonwalescencji po ekspozycji na prochloraz - wyraźne oddzielenie obu części. W komórce nabłonka kanalikula nerkowego mitochondria (M) obrzmiałe, z częściowo zatartą strukturą. W części krwiotwórczej destrukcja komórek hematopoetycznych. 10000 x i 5600 x.

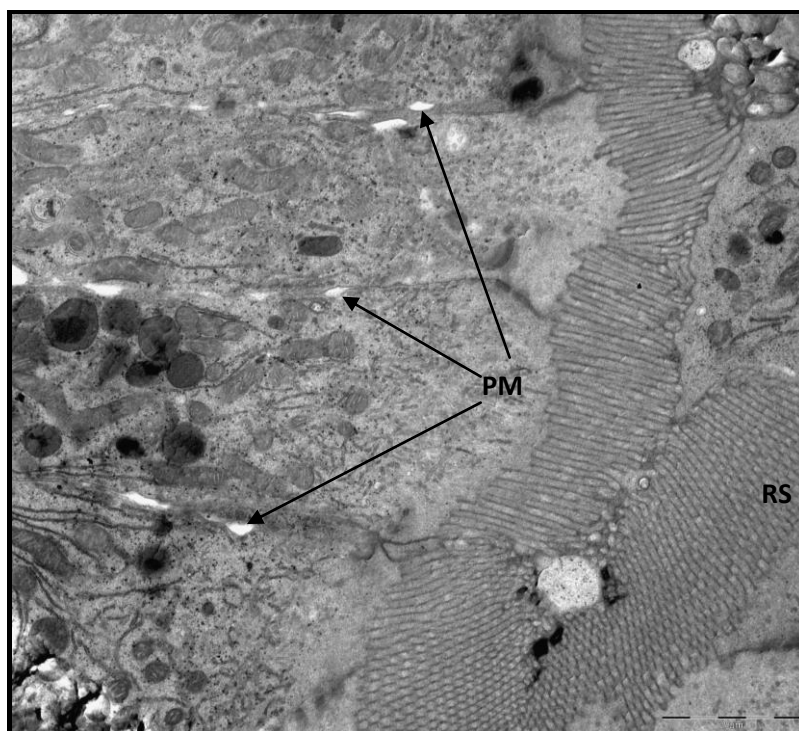
TEBUKONAZOL

Ekspozycja (14. dniowa) karpia na tebukonazol spowodowała zmiany w ultrastrukturze komórek nerki tułowiowej (Fot. 96 - 98). W kanalikule nerkowym komórki nabłonkowe w większości ściśle przylegały do siebie. Obserwowane w nich mitochondria były zwykle prawidłowe. Niektóre z nich były obrzmiałe, a ich struktura zatarta. W tym samym mitochondrium obserwowano fragment z prawidłową strukturą, z wyraźnymi grzebieniami, i część o zatartej strukturze. Obserwowano też liczną RER, w wielu miejscach pofragmentowaną, a sporadycznie - z rozmytą strukturą (Fot. 96). W rąbku szczoteczkowym obecne były miejsca o różnej gęstości elektronowej oraz liczne wydzieliny o różnym charakterze (Fot. 97). W części krwiotwórczej obserwowano miejsca z prawidłową strukturą tkanki, a miejscami - z rozluźnieniem utkania łącznotkankowego, co manifestowało się tworzeniem jasnych elektronowo, pustych przestrzeni pomiędzy komórkami hematopoetycznymi. Zwiększyły się też

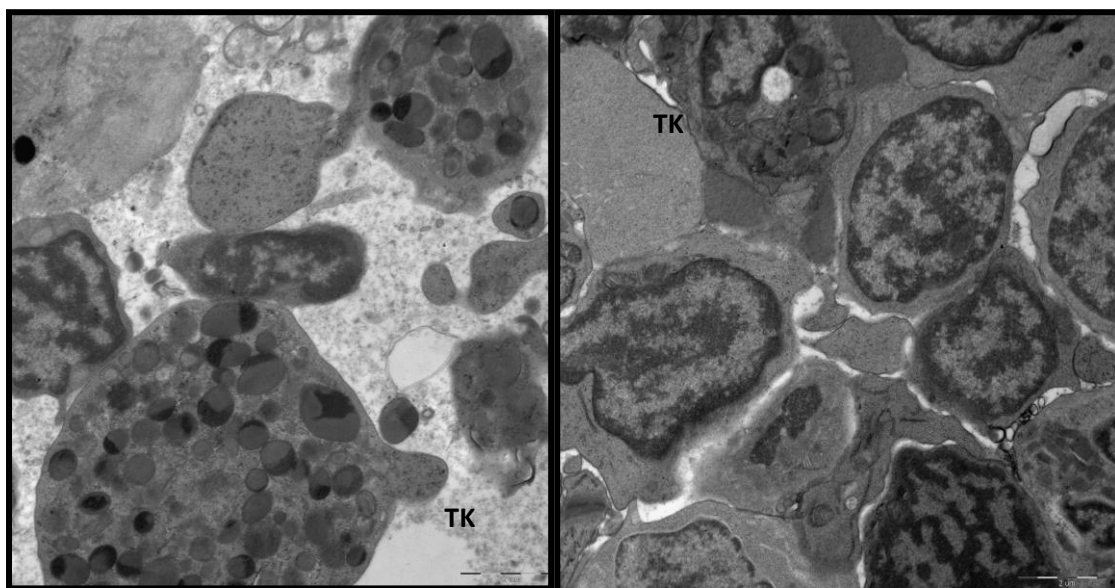
odległości między krwinkami, a powstałe przestrzenie zawierały luźno rozmieszczone organella czy ich fragmenty. Niektóre komórki hematopoetyczne posiadały zmienione, nieregularne kształty (Fot. 98).



Fot. 96. Elektronogramy komórek nabłonkowych kanalików (KN) nerki tułowiowej karpia po 14. dniowej ekspozycji na tebukonazol. Zwarta budowa tkanki; w komórce liczna RER, miejscami pofragmentowana. Mitochondria o prawidłowej i zatartej strukturze (M). 8000 x i 16000 x.

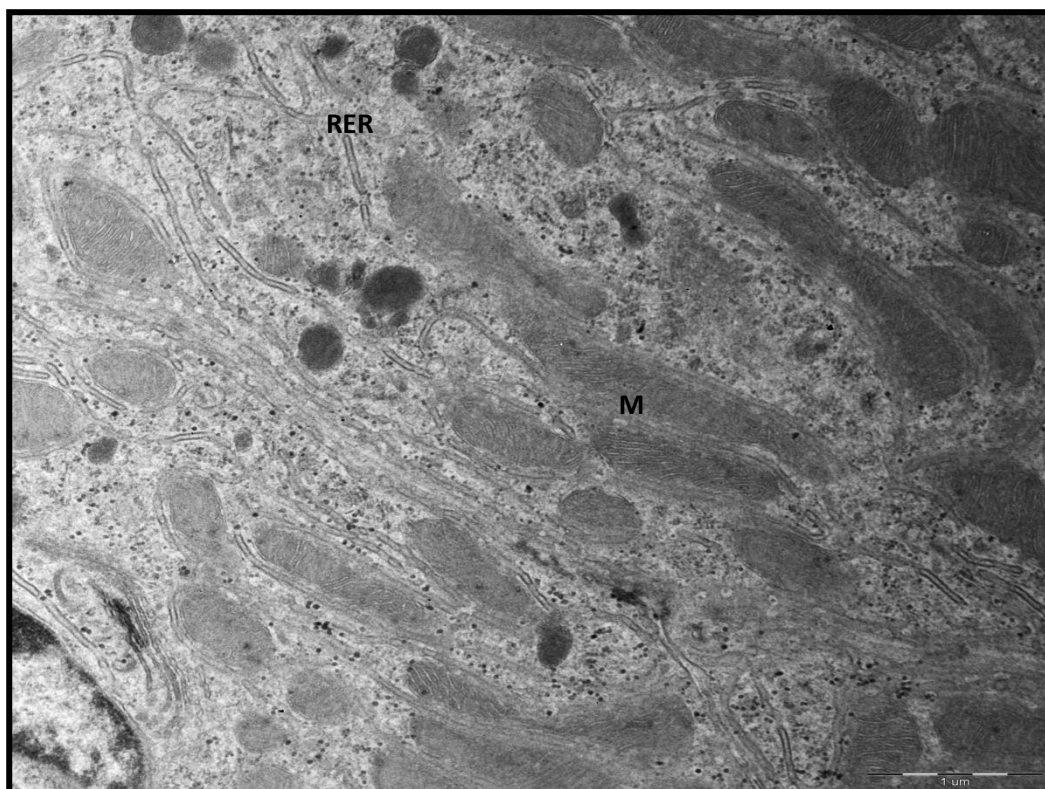


Fot. 97. Elektronogram komórek nabłonkowych kanalików nerki tułowiowej karpia po 14. dniowej ekspozycji na tebukonazol. Rąbek szczoteczki (RS) z miejscami jasnymi elektronowo oraz licznymi wydzielinami. Miejscowe poszerzenie przestrzeni międzykomórkowych (PM). 8000 x.

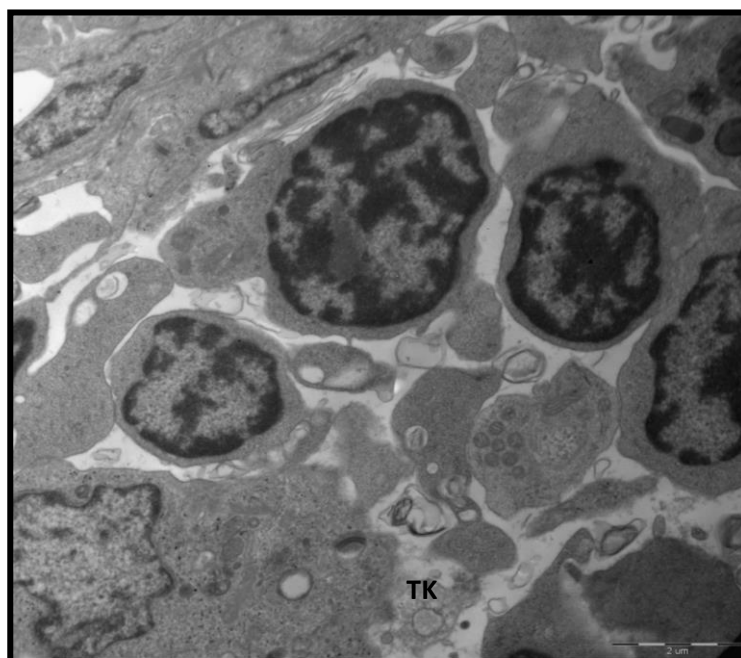


Fot. 98. Elektronogramy części krwiotwórczej (TK) nerki tułowiowej karpia po 14. dniowej ekspozycji na tebukonazol. Fragmenty o prawidłowej budowie tkanki i fragmenty ze zmianami patologicznymi: jasne elektronowo utkanie zrębu łącznotkankowego, komórki hematopoetyczne o zmienionych kształtach, destrukcja pojedynczych komórek. 8000 x.

Po okresie rekonwalescencji u karpia eksponowanych na tebukonazol obserwowano (Fot. 99 - 100) w części wydalniczej przylegające do siebie komórki nabłonka kanalików nerkowych. Obecne w nich mitochondria miały albo prawidłową budowę, albo zatartą. Liczna była też RER, jednak często pofragmentowana, a jej kanały poszerzone (Fot. 99). W części krwiotwórczej obserwowano rozluźnienie struktury. Komórki hematopoetyczne miały nieprawidłowe kształty, a niektóre uległy rozpadowi na fragmenty. Pomiędzy komórkami obecne były liczne obłonione fragmenty komórek przyjmujących formę pęcherzyków (Fot. 100).



Fot. 99. Elektronogram komórek nabłonkowych kanalików nerkowych karpia po okresie rekonwalescencji po ekspozycji na tebukonazol. Mitochondria (M) o prawidłowej lub zatartej strukturze, czy ulegające destrukcji. Fragmentacja RER i rozszerzone jej kanały. 16000 x.

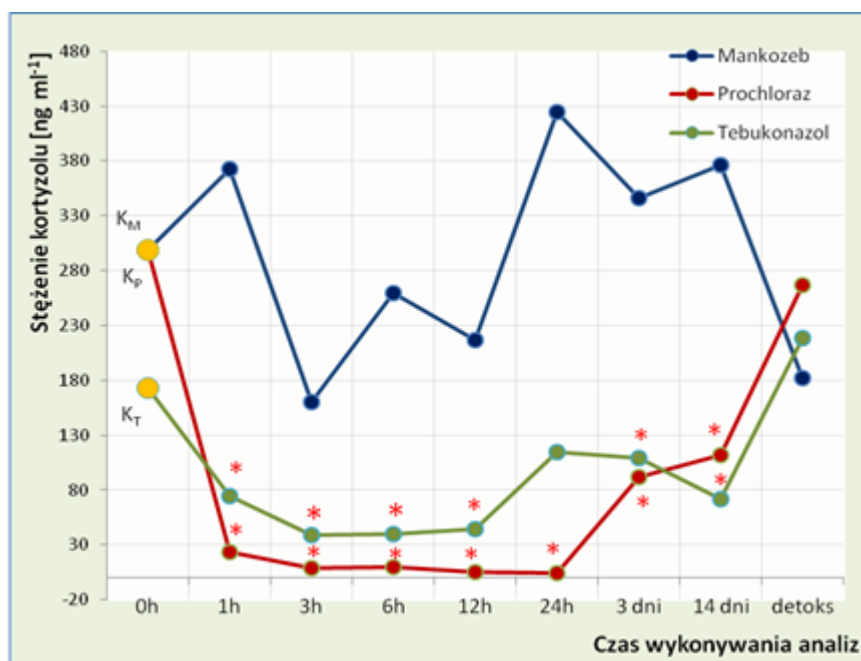


Fot. 100. Elektronogram części krwiotwórczej (TK) nerki tułowiowej karpia po okresie rekonwalescencji po ekspozycji na tebukonazol. Komórki hematopoetyczne o nieprawidłowych kształtach, ulegające fragmentacji, oddalone od siebie; rozluźnienie utkania łącznotkankowego. 8000 x.

3.2. ANALIZA WSKAŹNIKÓW METABOLICZNYCH

3.2.1. Stężenie kortyzolu w osoczu krwi

Na Ryc. 2 przedstawiono zmiany stężenia kortyzolu w osoczu krwi karpi w czasie ekspozycji na mankozeb, prochloraz i tebukonazol oraz po okresie rekonwalescencji. Stężenie hormonu oznaczono w grupach kontrolnych bezpośrednio po rozpoczęciu eksperymentu (0 h) i wynosiło ono: $299 \pm 111 \text{ ng ml}^{-1}$ (dla K_M i K_P) oraz $173 \pm 59 \text{ ng ml}^{-1}$ (dla K_T).



Ryc. 2. Zmiany stężenia kortyzolu w osoczu karpi eksponowanych na mankozeb, prochloraz i tebukonazol oraz po okresie rekonwalescencji (h – godzina; 0h – gr. kontrolna; K_M – gr. kontrolna dla mankozebu; K_P – gr. kontrolna dla prochlorazu; K_T – gr. kontrolna dla tebukonazolu; detoks – po okresie rekonwalescencji; $n=10$; * - różnice statystycznie istotne w porównaniu do gr. kontrolnej przy $\alpha=0,05$).

MANKOZEB

W czasie trwania ekspozycji karpia na mankozeb stężenie kortyzolu było zmienne (Tab. 7), w tym najniższe po 3. godzinach ($160 \pm 16 \text{ ng ml}^{-1}$) i najwyższe – po 24. godzinach ($425 \pm 118 \text{ ng ml}^{-1}$), jednakże różnice nie były istotne statystycznie w porównaniu z wartością kontrolną. Po okresie rekonwalescencji stężenie kortyzolu zmniejszyło się do wartości $182 \pm 14 \text{ ng ml}^{-1}$ osiągając poziom niższy od wartości kontrolnej.

PROCHLORAZ

W osoczu krwi karpia eksponowanych na prochloraz (Tab. 8) zanotowano statystycznie istotne zmniejszenie stężenia kortyzolu w porównaniu z wartością kontrolną ($299 \pm 111 \text{ ng ml}^{-1}$) w całym okresie ekspozycji. Po pierwszej godzinie trwania narażenia obserwowano gwałtowne zmniejszenie stężenia hormonu, trwające aż do 24. godziny ekspozycji ($4 \pm 1 \text{ ng ml}^{-1}$). Po 3. dniach ekspozycji zanotowano stopniowe zwiększanie stężenia hormonu aż do wartości $112 \pm 27 \text{ ng ml}^{-1}$ - po 14. dniach jej trwania, i następnie, do $267 \pm 147 \text{ ng ml}^{-1}$ - po okresie rekonwalescencji. Wzrost stężenia kortyzolu w tym okresie przyczynił się do osiągnięcia stężenia zbliżonego z wartością kontrolną.

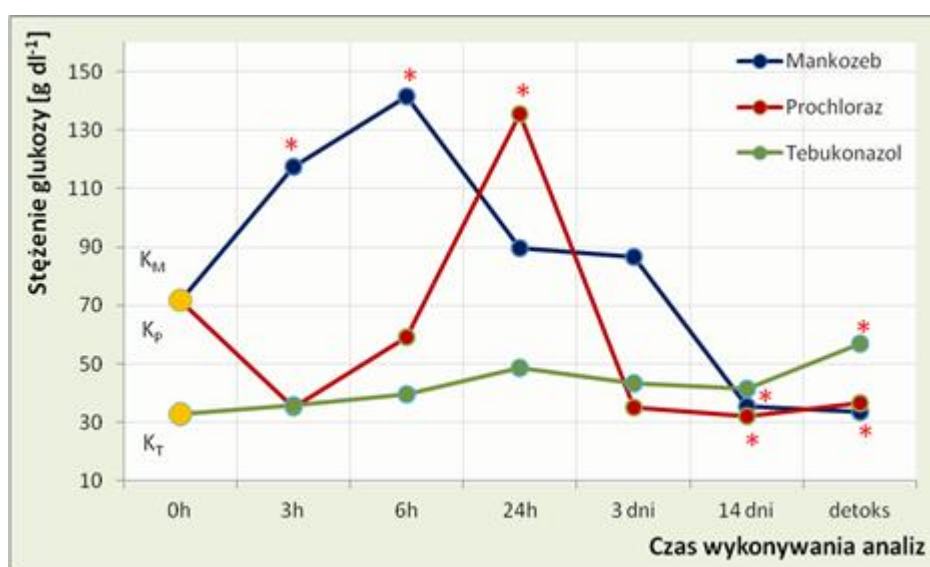
TEBUKONAZOL

W osoczu krwi karpia eksponowanych na tebukonazol (Tab. 9) zanotowano zmniejszenie stężenia kortyzolu w porównaniu z wartością kontrolną ($173 \pm 59 \text{ ng ml}^{-1}$) w całym okresie ekspozycji, osiągając najniższą wartość - $39 \pm 10 \text{ ng ml}^{-1}$ po 3. godzinach ekspozycji. Statystycznie istotne zmniejszenie stężenia kortyzolu w osoczu krwi obserwowano po 1., 3., 6. i 12. godzinie trwania narażenia. Jednakże po 3. godzinie ekspozycji karpia na działanie tebukonazolu zaczęła zaznaczać się początkowo niewielka tendencja wzrostu stężenia kortyzolu (do 12. godziny), a następnie wyraźnie zaznaczona – do 24. godziny ekspozycji, osiągając wartość $115 \pm 36 \text{ ng ml}^{-1}$. Następnie, po 3. i 14. dniach zaobserwowano ponowne statystycznie istotne zmniejszenie stężenia tego hormonu do wartości odpowiednio: $109 \pm 25 \text{ ng ml}^{-1}$ i $71 \pm 14 \text{ ng ml}^{-1}$. Po okresie rekonwalescencji stwierdzono znaczne zwiększenie stężenia kortyzolu ($218 \pm 51 \text{ ng ml}^{-1}$).

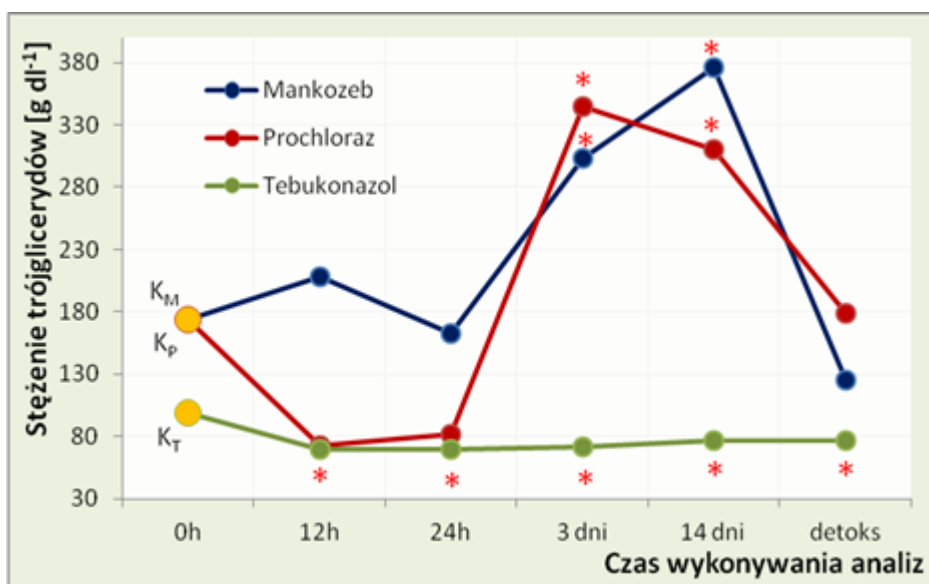
¹⁾ w odniesieniu do wartości kontrolnej, jednakże wartość ta nie miała cech istotności statystycznej.

3.2.2. Stężenie glukozy we krwi oraz trójglicerydów i białka ogólnego w osoczu krwi

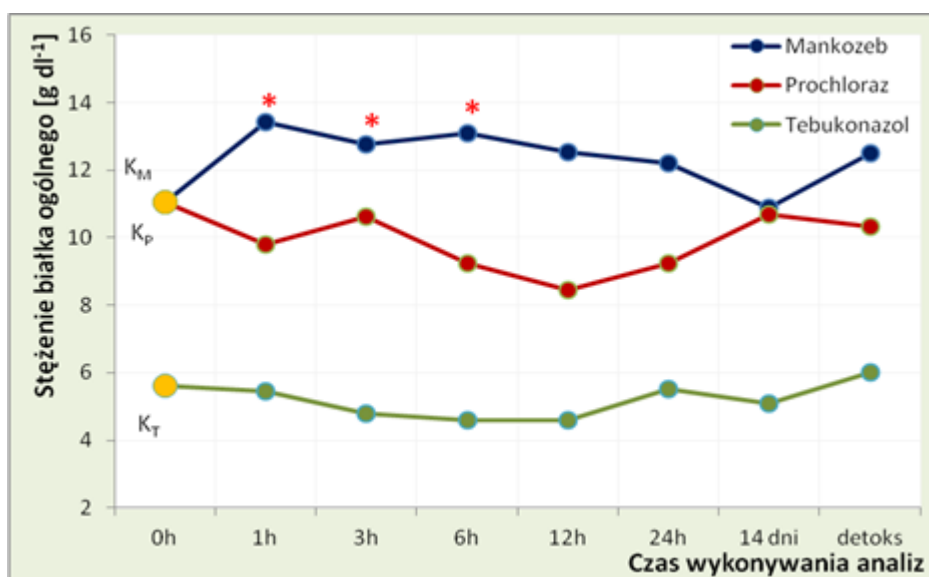
Wyniki przedstawiające zmiany stężenia glukozy we krwi oraz trójglicerydów i białka ogólnego w osoczu krwi karpi eksponowanych na mankozeb, prochloraz i tebukonazol oraz po okresie rekonwalescencji obrazują Ryc. 3 – 5.



Ryc. 3. Zmiany stężenia glukozy we krwi karpi eksponowanych na mankozeb, prochloraz i tebukonazol oraz po okresie rekonwalescencji (h – godzina; 0h – gr. kontrolna; K_M – gr. kontrolna dla mankozebu; K_P – gr. kontrolna dla prochlorazu; K_T – gr. kontrolna dla tebukonazolu; detoks – po okresie rekonwalescencji; n=10; * - różnice statystycznie istotne w porównaniu do gr. kontrolnej przy $\alpha=0,05$).



Ryc. 4. Zmiany stężenia trójglicerydów w osoczu krwi karpi eksponowanych na mankozeb, prochloraz i tebukonazol oraz po okresie rekonwalescencji (h – godzina; 0h – gr. kontrolna; K_M – gr. kontrolna dla mankozebu; K_P – gr. kontrolna dla prochlorazu; K_T – gr. kontrolna dla tebukonazolu; detoks – po okresie rekonwalescencji; n=10; * - różnice statystycznie istotne w porównaniu do gr. kontrolnej przy $\alpha=0,05$).



Ryc. 5. Zmiany stężenia białka ogólnego w osoczu krwi karpi eksponowanych na mankozeb, prochloraz i tebukonazol oraz po okresie rekonwalescencji (h – godzina; 0h – gr. kontrolna; K_M – gr. kontrolna dla mankozebu; K_P – gr. kontrolna dla prochlorazu; K_T – gr. kontrolna dla tebukonazolu; detoks – po okresie rekonwalescencji; n=10; * - różnice statystycznie istotne w porównaniu do gr. kontrolnej przy $\alpha=0,05$).

MANKOZEB

Stężenie glukozy (Tab. 7) oznaczono u ryb kontrolnych (K_M) bezpośrednio po rozpoczęciu eksperymentu (0 h) i wynosiło $72 \pm 44 \text{ g dl}^{-1}$. W trakcie trwania ekspozycji stężenie glukozy we krwi badanych karpie zwiększyło się statystycznie istotnie po 3. i 6. godzinie do wartości $118 \pm 21 \text{ g dl}^{-1}$ i $142 \pm 24 \text{ g dl}^{-1}$, odpowiednio. W następnych godzinach ekspozycji aż do jej zakończenia i zakończenia okresu rekonwalescencji stężenie glukozy we krwi wykazywało tendencję spadkową, osiągając, w porównaniu do kontroli, najniższe, statystycznie istotne wartości: $36 \pm 9 \text{ g dl}^{-1}$ po 14. dniu ekspozycji i $34 \pm 2 \text{ g dl}^{-1}$ po okresie rekonwalescencji.

Stężenie trójglicerydów (Tab. 7) w osoczu karpie po rozpoczęciu ekspozycji (0 h) wynosiło $173 \pm 28 \text{ g dl}^{-1}$ (K_M). W początkowym okresie narażenia było zmienne (12 i 24 h). Po 3. i 14. dniu narażenia stężenie trójglicerydów zwiększyło się do poziomów odpowiednio: $303 \pm 45 \text{ g dl}^{-1}$ i $376 \pm 40 \text{ g dl}^{-1}$ – statystycznie istotnych w porównaniu do wartości kontrolnej. Przebywanie ryb w czystej wodzie (okres rekonwalescencji) skutkowało powrotem badanego wskaźnika do wartości kontrolnej.

Stężenie białka ogólnego (Tab. 7) w osoczu krwi określono u ryb kontrolnych (K_M) bezpośrednio po rozpoczęciu eksperymentu (0 h) i wynosiło $11 \pm 0,6 \text{ g dl}^{-1}$. U karpie w początkowym czasie ekspozycji (1, 3 i 6 h) wykazano statystycznie istotne zwiększenie stężenia białka ogólnego – do $13 \pm 0,8 \text{ g dl}^{-1}$. Po 12. godzinach ekspozycji aż do jej zakończenia nastąpił spadek stężenia białka ogólnego, przy czym nie różniło się ono w sposób istotny statystycznie od wartości kontrolnej. Natomiast po zakończonym okresie rekonwalescencji obserwowano nieistotne statystycznie zwiększenie stężenia białka ogólnego w porównaniu z grupą kontrolną.

PROCHLORAZ

Stężenie glukozy (Tab. 8) we krwi ryb kontrolnych (K_P) bezpośrednio po rozpoczęciu eksperymentu (0 h) wynosiło $72 \pm 44 \text{ g dl}^{-1}$. Ekspozycja karpie na fungicyd spowodowała istotne zmiany tego wskaźnika. Różnice statystycznie istotne zanotowano po 24. godzinach (zwiększenie stężenia do wartości $135 \pm 50 \text{ g dl}^{-1}$) i 14. dniach ekspozycji (zmniejszenie stężenia glukozy – $32 \pm 3 \text{ g dl}^{-1}$) w stosunku do kontroli.

Po okresie rekonwalescencji stężenie glukozy we krwi karpki wynosiło $37 \pm 7 \text{ g dl}^{-1}$ i było niższe od wartości kontrolnej, jednakże różnica nie była istotna statystycznie.

W przypadku stężenia trójglicerydów (Tab. 8) w osoczu krwi wartość kontrolna (K_p) zbadana bezpośrednio po rozpoczęciu eksperymentu (0 h) wynosiła $173 \pm 28 \text{ g dl}^{-1}$. W okresie ekspozycji karpki na prochloraz obserwowano początkowo (12 i 24 h) nieistotne statystycznie zmniejszenie stężenia trójglicerydów, a następnie, po 3. i 14. dniach - statystycznie istotne zwiększenie stężenia ($344 \pm 63 \text{ g dl}^{-1}$ i $311 \pm 74 \text{ g dl}^{-1}$, odpowiednio) w porównaniu z wartością kontrolną. Po okresie rekonwalescencji stężenie trójglicerydów w osoczu krwi karpki było zbliżone do wartości kontrolnej osiągając poziom $179 \pm 35 \text{ g dl}^{-1}$.

Stężenie białka ogólnego (Tab. 8) w osoczu krwi karpki kontrolnych (K_p), zbadane bezpośrednio po rozpoczęciu doświadczenia (0 h), wynosiło $11 \pm 0,6 \text{ g dl}^{-1}$. W czasie trwania ekspozycji na prochloraz stężenie białka ogólnego ulegało zmianom. Po 3. godzinie ekspozycji zaznaczyła się wyraźna tendencja spadkowa skutkująca uzyskaniem po 12. godzinie najniższego w całym okresie doświadczenia stężenia białka ogólnego ($8,5 \pm 1,1 \text{ g dl}^{-1}$). Dalsza ekspozycja ryb spowodowała stopniowe zwiększanie stężenia, które po 14. dniu jej trwania osiągnęło wartość $10,7 \pm 0,4 \text{ g dl}^{-1}$, zbliżoną do wartości kontrolnej. Po okresie rekonwalescencji stężenie białka ogólnego pozostało na podobnym poziomie i było zbliżone do wartości kontrolnej. Wszystkie wymienione zmiany badanego wskaźnika nie były istotne statystyczne w porównaniu z wartością kontrolną.

TEBUKONAZOL

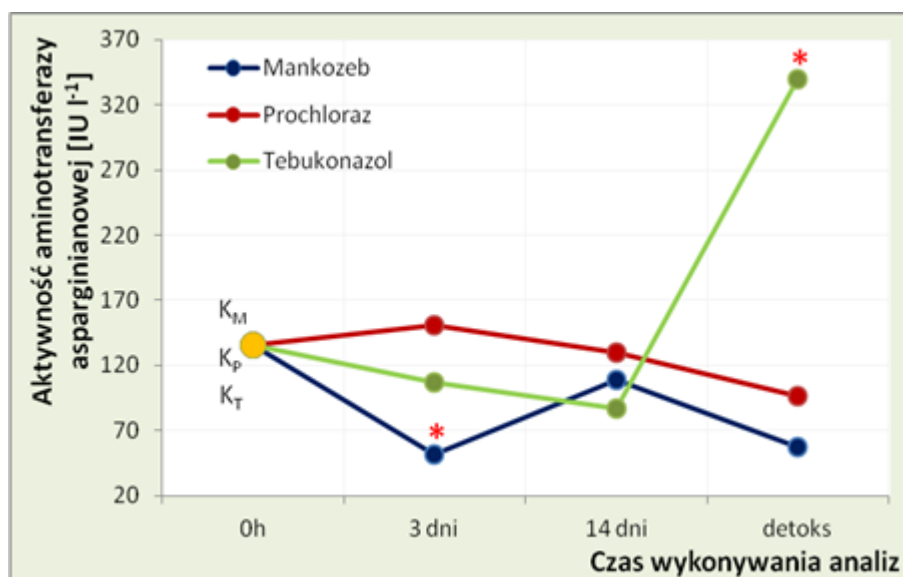
Stężenie glukozy (Tab. 9) we krwi ryb kontrolnych (K_T) bezpośrednio po rozpoczęciu eksperymentu (0 h) wynosiło $33 \pm 4 \text{ g dl}^{-1}$. W pierwszym okresie ekspozycji (do 24 h) obserwowano systematyczne i umiarkowane zwiększanie stężenia glukozy we krwi. Następnie stężenie glukozy stopniowo zmniejszało się aż do zakończenia okresu ekspozycji na tebukonazol, osiągając wartość $41 \pm 11 \text{ g dl}^{-1}$. Opisane tendencje zmian stężenia glukozy w trakcie trwania ekspozycji nie były istotne statystycznie. Osiągnięcie poziomu statystycznie istotnie wyższego ($57 \pm 17 \text{ g dl}^{-1}$) w porównaniu z kontrolą obserwowano po okresie rekonwalescencji.

Stężenie trójglicerydów (Tab. 9) w osoczu karpi kontrolnych (K_T), określone bezpośrednio po rozpoczęciu ekspozycji (0 h), wynosiło $99 \pm 28 \text{ g dl}^{-1}$. U ryb narażonych na tebukonazol stężenie trójglicerydów zmniejszyło się statystycznie istotnie w całym okresie jej trwania ekspozycji, w porównaniu z wartością kontrolną: od $69 \pm 3 \text{ g dl}^{-1}$ - po 12. godzinach ekspozycji do $76 \pm 9 \text{ g dl}^{-1}$ - po 14. dniach jej trwania. Po okresie rekonwalescencji stężenie trójglicerydów było w dalszym ciągu statystycznie istotnie zmniejszone w porównaniu z kontrolą, utrzymując się na poziomie zbliżonym do obserwowanego po okresie ekspozycji.

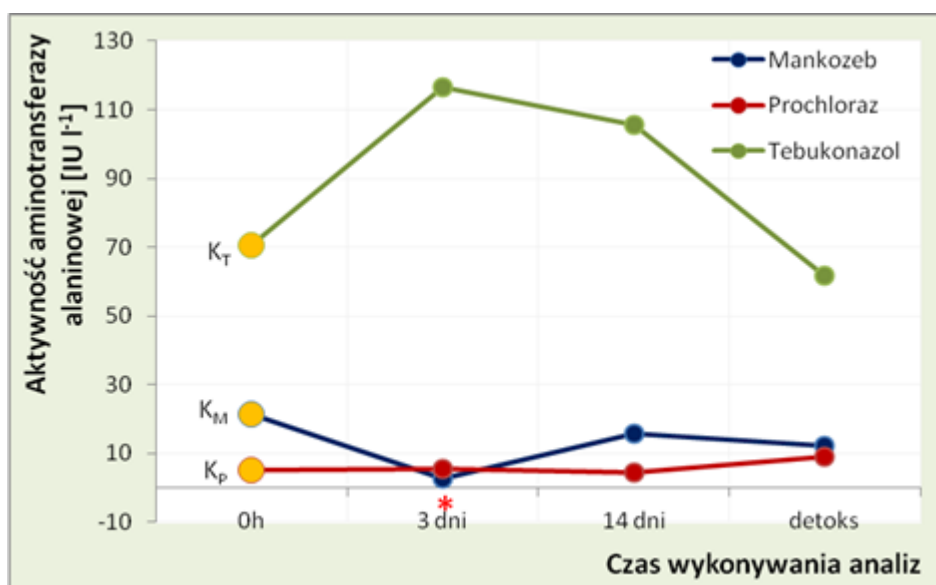
Stężenie białka ogólnego (Tab. 9) w osoczu karpi kontrolnych (K_T) zbadane bezpośrednio po rozpoczęciu doświadczenia (0 h) wynosiło $5,6 \pm 0,8 \text{ g dl}^{-1}$. Stężenie białka ogólnego w trakcie ekspozycji ryb na tebukonazol i w okresie rekonwalescencji wykazywało nieistotne statystycznie zmiany. W początkowym okresie trwania ekspozycji (do 12 h) zmniejszyło się ono do wartości $4,6 \pm 0,9 \text{ g dl}^{-1}$, by po 24. godzinach osiągnąć stężenie zbliżone do wartości kontrolnej ($5,5 \pm 1,1 \text{ g dl}^{-1}$). Nieznaczne zwiększenie stężenia białka ogólnego ($6,0 \pm 0,8 \text{ g dl}^{-1}$), nieistotne statystycznie w stosunku do kontroli, obserwowano po okresie rekonwalescencji karpi.

3.2.3. Aktywność enzymów wątrobowych - aminotransferazy asparaginianowej (AST) i aminotransferazy alaninowej (ALT)

Zmiany aktywności AST i ALT w osoczu krwi karpi w czasie trwania ekspozycji na mankozeb, prochloraz i tebukonazol oraz po okresie rekonwalescencji przedstawiają Ryc. 6 i 7.



Ryc. 6. Zmiany aktywności aminotransferazy asparaginianowej (AST) w osoczu krwi karpi eksponowanych na mankozeb, prochloraz i tebukonazol oraz po okresie rekonwalescencji (h – godzina; 0h – gr. kontrolna; K_M – gr. kontrolna dla mankozebu; K_P – gr. kontrolna dla prochlorazu; K_T – gr. kontrolna dla tebukonazolu; detoks – po okresie rekonwalescencji; $n=10$; * - różnice statystycznie istotne w porównaniu do gr. kontrolnej przy $\alpha=0,05$).



Ryc. 7. Zmiany aktywności aminotransferazy alaninowej (ALT) w osoczu krwi karpi eksponowanych na mankozeb, prochloraz i tebukonazol oraz po okresie rekonwalescencji (h – godzina; 0h – gr. kontrolna; K_M – gr. kontrolna dla mankozebu; K_P – gr. kontrolna dla prochlorazu; K_T – gr. kontrolna dla tebukonazolu; detoks – po okresie rekonwalescencji; $n=10$; * - różnice statystycznie istotne w porównaniu do gr. kontrolnej przy $\alpha=0,05$).

MANKOZEB

Aktywność AST i ALT (Tab. 7) określone u ryb kontrolnych (K_M) bezpośrednio po rozpoczęciu badania (0 h) wynosiły odpowiednio $135 \pm 56 \text{ IU l}^{-1}$ i $21 \pm 14 \text{ IU l}^{-1}$. Ekspozycja karpia na mankozeb była przyczyną modyfikacji ich aktywności. Aktywność AST i ALT była statystycznie istotnie niższa po 3. dniach ekspozycji (odpowiednio: $52 \pm 18 \text{ IU l}^{-1}$ i $2,7 \pm 1,1 \text{ IU l}^{-1}$), a następnie, po 14. dniach nastąpił nieistotny statystycznie wzrost ich aktywności (odpowiednio: $109 \pm 33 \text{ IU l}^{-1}$ i $16 \pm 3,4 \text{ IU l}^{-1}$). Po okresie rekonwalescencji obserwowano nieistotny statystycznie spadek aktywności obu enzymów w porównaniu z kontrolą.

PROCHLORAZ

Aktywność AST i ALT (Tab. 8) określone u ryb kontrolnych (K_P) bezpośrednio po rozpoczęciu badania (0 h) wynosiły odpowiednio: $135 \pm 56 \text{ IU l}^{-1}$ i $5,2 \pm 3,1 \text{ IU l}^{-1}$. Aktywność obu enzymów nie zmieniała się w sposób istotny statystycznie w czasie trwania ekspozycji karpia na prochloraz i w okresie ich rekonwalescencji, w porównaniu z grupą kontrolną. W przypadku aktywności AST zanotowano niewielki spadek do wartości $97 \pm 13 \text{ IU l}^{-1}$ po zakończonym okresie rekonwalescencji, a w przypadku ALT - wzrost do wartości $9 \pm 5,7 \text{ IU l}^{-1}$ w tym samym czasie.

TEBUKONAZOL

Aktywność AST i ALT (Tab. 9) określono u ryb kontrolnych (K_T) bezpośrednio po rozpoczęciu badania (0 h) i wynosiła ona odpowiednio: $136 \pm 11 \text{ IU l}^{-1}$ i $71 \pm 63 \text{ IU l}^{-1}$. Aktywność AST w okresie ekspozycji karpia na tebukonazol stopniowo zmniejszała się w sposób nieistotny statystycznie, osiągając najniższe wartości w ostatnim dniu narażenia ($87 \pm 29 \text{ IU l}^{-1}$). Natomiast po okresie rekonwalescencji zanotowano istotny statystycznie wzrost jej aktywności w stosunku do wartości uzyskanych w okresie ekspozycji i kontrolnej do poziomu $339 \pm 76 \text{ IU l}^{-1}$. W przypadku ALT, po początkowym (3 dni ekspozycji) wzroście do poziomu $116 \pm 36 \text{ IU l}^{-1}$, wystąpił spadek aktywności enzymatycznej (do poziomu $62 \pm 7 \text{ IU l}^{-1}$) trwający aż do zakończenia eksperymentu (po okresie rekonwalescencji), jednakże wymienione zmiany aktywności nie były statystycznie istotne.

Tab. 7. Zmiany wskaźników metabolicznych karpi w okresie ekspozycji na mankozeb i po rekonwalescencji (h – godzina; 0h – grupa kontrolna; detoks – po okresie rekonwalescencji; x – brak analizy w danym czasie trwania eksperymentu; SD – odchylenie standardowe; n=10; * - różnice statystycznie istotne w porównaniu do gr. kontrolnej przy $\alpha=0,05$).

Czas pobrania próbek do analizy	KORTYZOL [ng ml ⁻¹]		GLUKOZA [g dl ⁻¹]		TRÓJGLICERYDY [g dl ⁻¹]		BIAŁKO OGÓLNE [g dl ⁻¹]		AST [IU l ⁻¹]		ALT [IU l ⁻¹]	
	średnia	SD	średnia	SD	średnia	SD	średnia	SD	średnia	SD	średnia	SD
0h	298,9	110,9	71,8	44,2	173,4	27,9	11,1	0,6	135,3	55,6	21,5	14,1
1h	372,7	48,2	x	x	x	x	13,5*	0,8	x	x	x	x
3h	160,4	16,1	117,6*	20,6	x	x	12,8*	0,8	x	x	x	x
6h	259,9	156,8	141,7*	24,4	x	x	13,1*	0,8	x	x	x	x
12h	216,5	67,9	x	x	208,4	75,1	12,5	0,4	x	x	x	x
24h	424,9	118,0	89,8	13,2	162,4	6,0	12,2	0,9	x	x	x	x
3 dni	345,9	29,6	86,8	18,6	302,8*	44,7	x	x	51,6*	18,0	2,7*	1,1
14 dni	375,8	24,5	35,7*	8,7	376,4*	40,4	10,9	1,6	108,6	33,5	15,7	3,4
detoks	181,7	14,3	33,8*	2,3	125,0	19,2	12,5	0,8	57,3	13,5	12,2	2,4

Tab. 8. Zmiany wskaźników metabolicznych karpi w okresie ekspozycji na prochloraz i po rekonwalescencji (h – godzina; 0h – grupa kontrolna; detoks – po okresie rekonwalescencji; x – brak analizy w danym czasie trwania eksperymentu; SD – odchylenie standardowe; n=10; * - różnice statystycznie istotne w porównaniu do gr. kontrolnej przy $\alpha=0,05$).

Czas pobrania próbek do analizy	KORTYZOL [ng ml ⁻¹]		GLUKOZA [g dl ⁻¹]		TRÓJGLICERYDY [g dl ⁻¹]		BIAŁKO OGÓLNE [g dl ⁻¹]		AST [IU l ⁻¹]		ALT [IU l ⁻¹]	
	średnia	SD	średnia	SD	średnia	SD	średnia	SD	średnia	SD	średnia	SD
0h	298,9	110,9	71,8	44,2	173,4	27,9	11,1	0,6	135,3	55,6	5,2	3,1
1h	23,6*	4,2	x	x	x	x	9,8	1,0	x	x	x	x
3h	9,2*	3,7	35,3	4,3	x	x	10,6	2,0	x	x	x	x
6h	9,7*	4,9	59,3	14,8	x	x	9,2	1,9	x	x	x	x
12h	5,5*	3,6	x	x	72,5	20,9	8,5	1,1	x	x	x	x
24h	4,3*	1,1	135,4*	49,6	82,0	19,2	9,2	0,9	x	x	x	x
3 dni	92,0*	59,3	35,1	5,3	344,2*	63,4	x	x	151,2	63,8	5,4	2,0
14 dni	112,0*	27,2	32,1*	3,0	310,7*	73,8	10,7	0,4	129,9	34,6	4,3	0,5
detoks	266,8	146,6	36,8	6,8	178,7	35,5	10,3	0,9	96,6	13,5	8,9	5,7

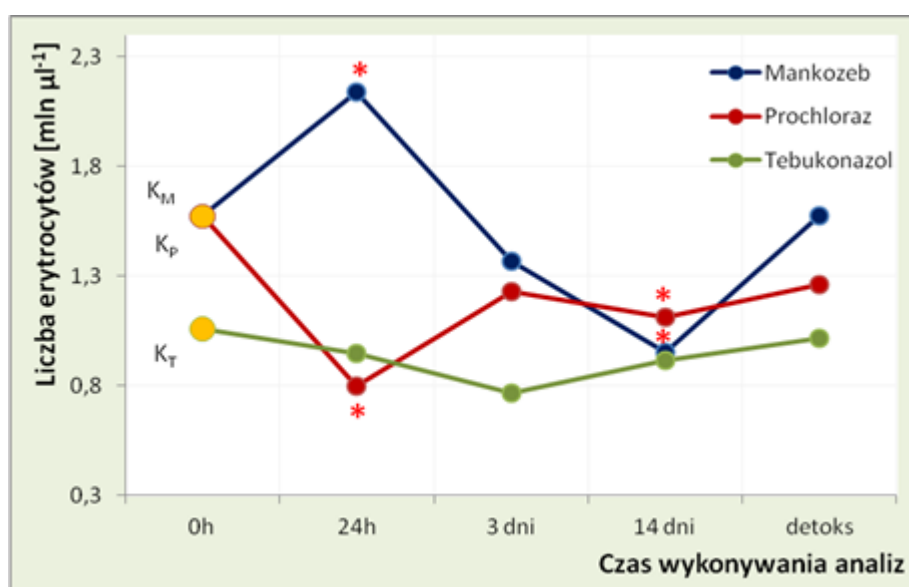
Tab. 9. Zmiany wskaźników metabolicznych karpi w okresie ekspozycji na tebukonazol i po rekonwalescencji (h – godzina; 0h – grupa kontrolna; detoks – po okresie rekonwalescencji; x – brak analizy w danym czasie trwania eksperymentu; SD – odchylenie standardowe; n=10; * - różnice statystycznie istotne w porównaniu do gr. kontrolnej przy $\alpha=0,05$).

Czas pobrania próbek do analizy	KORTYZOL [ng ml ⁻¹]		GLUKOZA [g dl ⁻¹]		TRÓJGLICERYDY [g dl ⁻¹]		BIAŁKO OGÓLNE [g dl ⁻¹]		AST [IU l ⁻¹]		ALT [IU l ⁻¹]	
	średnia	SD	średnia	SD	średnia	SD	średnia	SD	średnia	SD	średnia	SD
0h	172,8	58,9	32,8	4,4	99,3	15,10	5,6	0,8	135,8	11,0	70,6	62,7
1h	74,7*	18,1	x	x	x	x	5,5	0,9	x	x	x	x
3h	39,3*	9,8	35,9	6,2	x	x	4,8	0,6	x	x	x	x
6h	40,3*	5,7	39,8	11,7	x	x	4,6	0,5	x	x	x	x
12h	44,8*	9,0	x	x	69,4*	2,90	4,6	0,9	x	x	x	x
24h	114,9	36,3	48,8	19,0	69,9*	2,65	5,5	1,1	x	x	x	x
3 dni	109,3*	25,1	43,4	14,7	71,2*	3,30	x	x	106,7	13,7	116,4	35,6
14 dni	71,3*	14,0	41,5	11,3	76,5*	9,23	5,1	0,7	87,3	29,1	105,5	32,3
detoks	218,2	51,1	57,1*	16,6	76,5*	9,23	6,0	0,8	339,5*	76,4	61,7	7,0

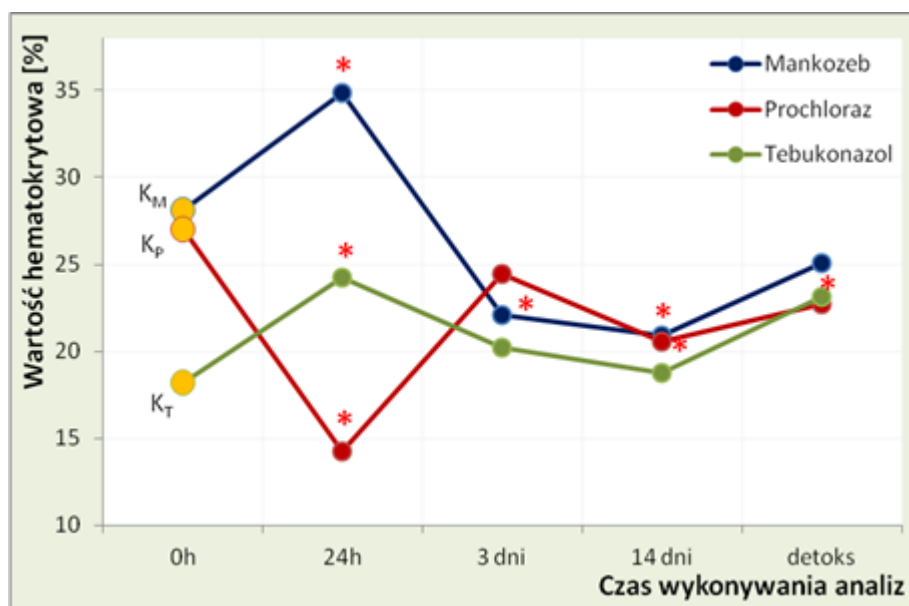
3.3. ANALIZA WSKAŹNIKÓW HEMATOLOGICZNYCH

3.3.1. Wskaźniki czerwonych krwinek: RBC, Ht, Hb, MCV, MCH, MCHC

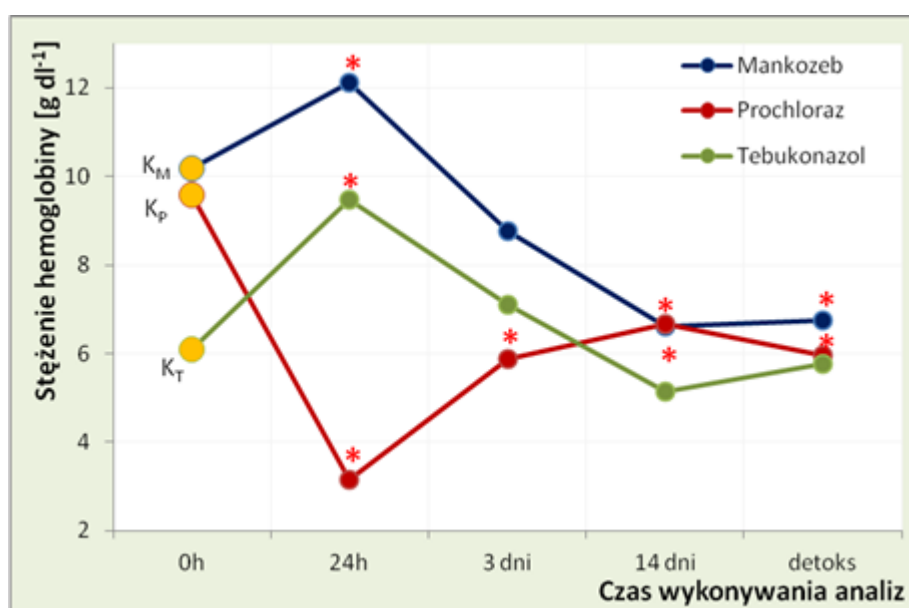
Zmiany parametrów czerwonych krwinek w okresie ekspozycji karpi na mankozeb, prochloraz i tebukonazol oraz po okresie rekonwalescencji przedstawiają Ryc. 8 – 13.



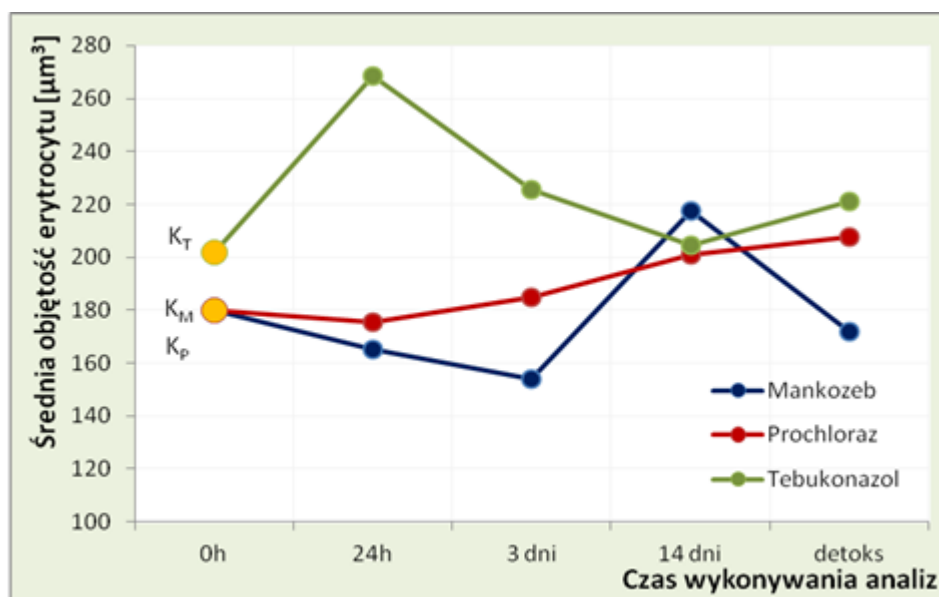
Ryc. 8. Zmiany liczby erytrocytów we krwi obwodowej karpi (RBC) w czasie trwania ekspozycji na mankozeb, prochloraz i tebukonazol oraz po okresie rekonwalescencji (h – godzina; 0h – gr. kontrolna; K_M – gr. kontrolna dla mankozebu; K_P – gr. kontrolna dla prochlorazu; K_T – gr. kontrolna dla tebukonazolu; detoks – po okresie rekonwalescencji; $n=10$; * - różnice statystycznie istotne w porównaniu do gr. kontrolnej przy $\alpha=0,05$).



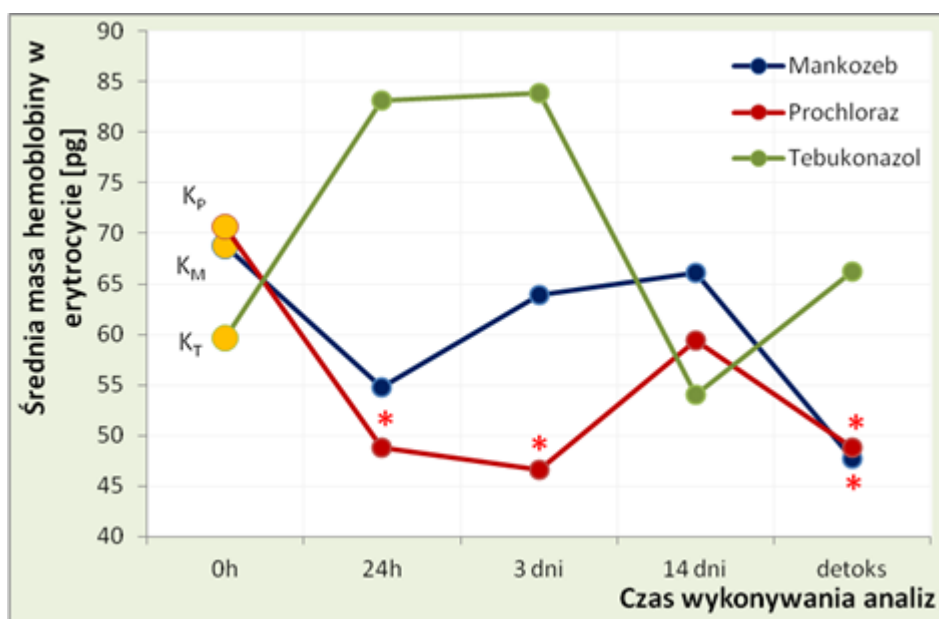
Ryc. 9. Zmiany wartości hematokrytowej (Ht) w krwi obwodowej karpi w czasie trwania ekspozycji na mankozeb, prochloraz i tebukonazol oraz po okresie rekonwalescencji (h – godzina; 0h – gr. kontrolna; K_M – gr. kontrolna dla mankozebu; K_P – gr. kontrolna dla prochlorazu; K_T – gr. kontrolna dla tebukonazolu; detoks – po okresie rekonwalescencji; n=10; * - różnice statystycznie istotne w porównaniu do gr. kontrolnej przy $\alpha=0,05$).



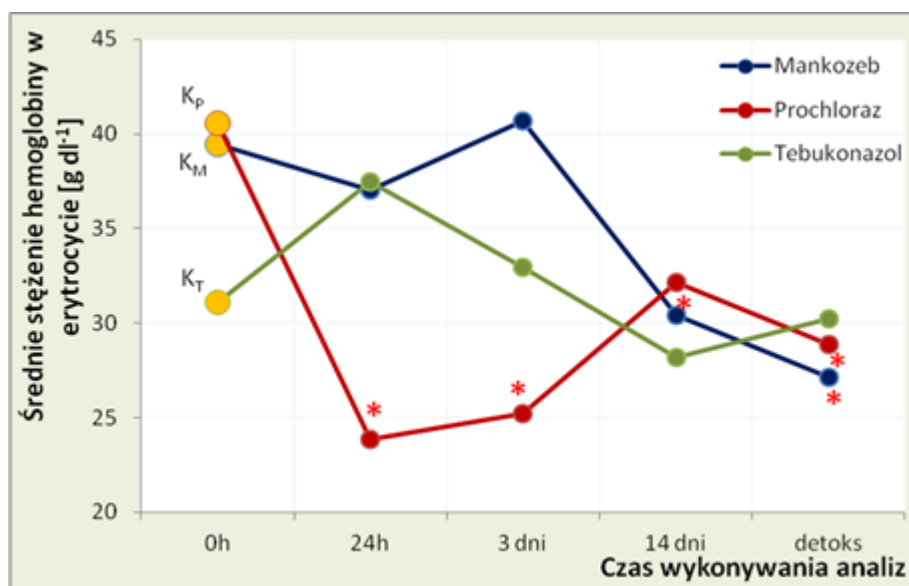
Ryc. 10. Zmiany stężenia hemoglobiny (Hb) we krwi obwodowej karpi w czasie trwania ekspozycji na mankozeb, prochloraz i tebukonazol oraz po okresie rekonwalescencji (h – godzina; 0h – gr. kontrolna; K_M – gr. kontrolna dla mankozebu; K_P – gr. kontrolna dla prochlorazu; K_T – gr. kontrolna dla tebukonazolu; detoks – po okresie rekonwalescencji; n=10; * - różnice statystycznie istotne w porównaniu do gr. kontrolnej przy $\alpha=0,05$).



Ryc. 11. Zmiany średniej objętości erytrocytu (MCV) karpi w czasie trwania ekspozycji na mankozeb, prochloraz i tebukonazol oraz po okresie rekonwalescencji (h – godzina; 0h – gr. kontrolna; K_M – gr. kontrolna dla mankozebu; K_P – gr. kontrolna dla prochlorazu; K_T – gr. kontrolna dla tebukonazolu; detoks – po okresie rekonwalescencji; n=10).



Ryc. 12. Zmiany średniej masy hemoglobiny w erytrocytach (MCH) karpi w czasie trwania ekspozycji na mankozeb, prochloraz i tebukonazol oraz po okresie rekonwalescencji (h – godzina; 0h – gr. kontrolna; K_M – gr. kontrolna dla mankozebu; K_P – gr. kontrolna dla prochlorazu; K_T – gr. kontrolna dla tebukonazolu; detoks – po okresie rekonwalescencji; n=10; * - różnice statystycznie istotne w porównaniu do gr. kontrolnej przy $\alpha=0,05$).



Ryc. 13. Zmiany średniego stężenia hemoglobiny w erytrocytach (MCHC) karpi w czasie trwania ekspozycji na mankozeb, prochloraz i tebukonazol oraz po okresie rekonwalescencji (h – godzina; 0h – gr. kontrolna; K_M – gr. kontrolna dla mankozebu; K_P – gr. kontrolna dla prochlorazu; K_T – gr. kontrolna dla tebukonazolu; detoks – po okresie rekonwalescencji; $n=10$; * - różnice statystycznie istotne w porównaniu do gr. kontrolnej przy $\alpha=0,05$).

MANKOZEB

Ekspozycja ryb na mankozeb spowodowała zmiany większości badanych wskaźników czerwonych (Ryc. 8 – 13 oraz Tab. 10).

Tab. 10. Zmiany wskaźników czerwonych karpi w okresie ekspozycji na mankozeb i po rekonwalescencji (h – godzina; 0h – grupa kontrolna; detoks – po okresie rekonwalescencji; x – brak analizy w danym czasie trwania eksperymentu; SD – odchylenie standardowe; $n=10$; * - różnice statystycznie istotne w porównaniu do gr. kontrolnej przy $\alpha=0,05$).

Czas pobrania próbek do analiz	RBC [$\text{mln } \mu\text{l}^{-1}$]		Ht [%]		Hb [g dl^{-1}]		MCV [μm^3]		MCH [pg]		MCHC [g dl^{-1}]	
	średnia	SD	średnia	SD	średnia	SD	średnia	SD	średnia	SD	średnia	SD
0h	1,57	0,31	28,14	1,57	10,18	1,14	179,73	38,78	68,75	7,70	39,44	6,47
24h	2,14*	0,34	34,89*	2,52	12,12*	1,36	165,15	29,09	54,75	11,32	37,06	5,17
3 dni	1,37	0,29	22,11*	3,22	8,76	1,57	153,91	25,51	63,90	12,18	40,71	5,58
14 dni	0,95*	0,19	20,88*	2,80	6,62*	0,88	217,70	54,42	66,09	14,41	30,40*	6,11
detoks	1,57	0,45	25,10	1,10	6,76*	0,97	171,69	55,46	47,66*	13,54	27,12*	3,67

U karpi kontrolnych (K_M) RBC zmierzone bezpośrednio po rozpoczęciu ekspozycji (0 h) wynosiło $1,6 \pm 0,3 \text{ mln } \mu\text{l}^{-1}$. Po 24. godzinach ekspozycji ryb

obserwowano statystycznie istotny wzrost RBC do poziomu $2,1 \pm 0,3 \text{ mln } \mu\text{l}^{-1}$. Dalsza ekspozycja na fungicyd, aż do jej zakończenia, była przyczyną spadku RBC, w tym statystycznie istotnego po 14. dniach jej trwania ($0,9 \pm 0,2 \text{ mln } \mu\text{l}^{-1}$). Po okresie rekonwalescencji liczba erytrocytów była zbliżona do wartości kontrolnej.

Poziom Ht u karpi kontrolnych (K_M) wyniósł $28 \pm 2\%$. Po 24. godzinach ekspozycji wartość hematokrytowa wzrosła statystycznie istotnie do $35 \pm 2\%$, a następnie, po 3. i 14. dniach - statystycznie istotnie zmniejszyła się ($22 \pm 3\%$ i $21 \pm 3\%$, odpowiednio). Po okresie rekonwalescencji wartość Ht zbliżyła się do wartości kontrolnej.

Stężenie Hb we krwi obwodowej karpi kontrolnych (K_M) zbadane bezpośrednio po rozpoczęciu doświadczenia (0 h) wynosiło $10 \pm 1 \text{ g dl}^{-1}$. U karpi po 24. godzinach ekspozycji na mankozeb stężenie Hb zwiększyło się istotnie statystycznie do poziomu $12 \pm 1 \text{ g dl}^{-1}$, a następnie, do zakończenia ekspozycji obserwowano stopniowe zmniejszanie się jej stężenia do poziomu $7 \pm 1 \text{ g dl}^{-1}$, statystycznie istotnie niższego w porównaniu z kontrolą. Po okresie rekonwalescencji stężenie hemoglobiny nieznacznie zwiększyło się pozostając jednocześnie na poziomie zbliżonym do wartości oznaczonej po 14. dniu ekspozycji. Stężenie Hb po zakończonym okresie rekonwalescencji było w dalszym ciągu statystycznie istotnie zmniejszone w porównaniu z grupą kontrolną.

Pozostałe wskaźniki czerwonokrwinkowe u ryb kontrolnych (K_M) wynosiły – MCV: $180 \pm 39 \mu\text{m}^3$, MCH: $69 \pm 8 \text{ pg}$ i MCHC: $40 \pm 7 \text{ g dl}^{-1}$. MCV w czasie trwania eksperymentu podlegała wahaniom, osiągając najniższą wartość po 3. dniach ($154 \pm 25 \mu\text{m}^3$) i najwyższą - po 14. dniach ekspozycji ($218 \pm 54 \mu\text{m}^3$), jednak zmiany te nie były istotne statystycznie. W przypadku wskaźników MCH i MCHC ulegały one zmianom osiągając najniższe, statystycznie istotne wartości po zakończonym okresie rekonwalescencji ($48 \pm 14 \text{ pg}$ i $27 \pm 4 \text{ g dl}^{-1}$, odpowiednio) w porównaniu z grupą kontrolną. W przypadku MCHC wartość parametru, w porównaniu z kontrolą, była statystycznie istotnie niższa ($30 \pm 6 \text{ g dl}^{-1}$) również po 14. dniach ekspozycji karpi na mankozeb. Najwyższą, nieistotną statystycznie w porównaniu z kontrolą, wartość MCH oznaczono u karpi po 14. dniach, a dla MCHC – po 3. dniach ekspozycji.

PROCHLORAZ

Ekspozycja karpia na prochloraz spowodowała zmiany większości parametrów układu czerwonokrwinkowego (Ryc. 8 – 13 oraz Tab. 11).

Tab. 11. Zmiany wskaźników czerwonokrwinkowych karpia w okresie ekspozycji na prochloraz i po rekonwalescencji (h – godzina; 0h – grupa kontrolna; detoks – po okresie rekonwalescencji; x – brak analizy w danym czasie trwania eksperymentu; SD – odchylenie standardowe; n=10; * – różnice statystycznie istotne w porównaniu do gr. kontrolnej przy $\alpha=0,05$).

Czas pobrania próbek do analiz	RBC [$\text{mln } \mu\text{l}^{-1}$]		Ht [%]		Hb [g dl^{-1}]		MCV [μm^3]		MCH [pg]		MCHC [g dl^{-1}]	
	średnia	SD	średnia	SD	średnia	SD	średnia	SD	średnia	SD	średnia	SD
0h	1,57	0,31	27,00	2,33	9,58	2,40	179,73	38,78	70,66	7,92	40,54	6,65
24h	0,80*	0,28	14,22*	4,41	3,15*	1,11	175,30	28,42	48,82*	23,92	23,85*	11,42
3 dni	1,23	0,29	24,44	5,34	5,89*	1,57	184,91	18,17	46,63*	9,05	25,22*	7,35
14 dni	1,11*	0,16	20,56*	2,55	6,66*	1,04	200,72	31,83	59,45	9,13	32,15	7,13
detoks	1,26	0,31	22,70	3,95	5,97*	1,69	207,81	30,07	48,74*	9,95	28,88*	9,10

RBC, Ht i Hb określone u ryb kontrolnych (K_p) bezpośrednio po rozpoczęciu eksperymentu (0 h) wynosiły odpowiednio: $1,6 \pm 0,3 \text{ mln } \mu\text{l}^{-1}$, $27 \pm 2\%$ oraz $10 \pm 2 \text{ g dl}^{-1}$. U karpia eksponowanego na fungycyd, w porównaniu do wartości kontrolnej, obserwowano zmniejszenie wartości parametrów RBC, Ht i Hb w całym okresie doświadczalnym, tj. do zakończenia okresu rekonwalescencji. Najniższe, statystycznie istotne w odniesieniu do kontroli RBC, Ht i Hb oznaczono po 24. godzinach ekspozycji ryb ($0,8 \pm 0,3 \text{ mln } \mu\text{l}^{-1}$ i $14 \pm 4\%$ oraz $3 \pm 1 \text{ g dl}^{-1}$, odpowiednio). Następnie po 3. dniach narażenia notowano zwiększenie wartości parametrów, w tym statystycznie istotne w przypadku Hb ($6 \pm 2 \text{ g dl}^{-1}$). Po 14. dniach ekspozycji obserwowano kolejne statystycznie istotne zmniejszenie RBC ($1,1 \pm 0,3 \text{ mln } \mu\text{l}^{-1}$) i Ht ($21 \pm 3\%$), a w przypadku Hb – statystycznie istotne zwiększenie ($7 \pm 1 \text{ g dl}^{-1}$) w porównaniu z kontrolą. Po zakończonym okresie rekonwalescencji w przypadku RBC i Ht zaznaczyło się nieistotne statystycznie zwiększenie, a w przypadku Hb – zmniejszenie ($6 \pm 2 \text{ g dl}^{-1}$), statystycznie istotne w porównaniu do wartości kontrolnych.

U karpia kontrolnych (K_p) pozostałe parametry czerwonokrwinkowe wynosiły - MCV: $180 \pm 39 \mu\text{m}^3$, MCH: $71 \pm 8 \text{ pg}$ i MCHC: $40 \pm 7 \text{ g dl}^{-1}$. Obserwowano, w porównaniu do kontroli, zmniejszenie MCH i MCHC w czasie trwania ekspozycji oraz po

okresie rekonwalescencji, statystycznie istotne po 24. godzinach i 3. dniach narażenia (47 ± 9 pg i 25 ± 7 g dl⁻¹, odpowiednio) oraz po okresie rekonwalescencji (49 ± 10 pg i 29 ± 9 g dl⁻¹, odpowiednio). Nie obserwowano natomiast istotnych statystycznie zmian MCV w całym okresie doświadczalnym. Po niewielkim spadku po 24. godzinie ekspozycji obserwowano stopniowy wzrost MCV do zakończenia okresu rekonwalescencji.

Najniższe wartości badanych wskaźników układu czerwonokrwinkowego: RBC, Ht, Hb, MCV, MCHC zanotowano po 24. godzinach, a w przypadku MCH – po 3. dniach ekspozycji ryb na prochloraz.

TEBUKONAZOL

W wyniku ekspozycji karpia na tebukonazol niektóre parametry czerwonokrwinkowe wykazały statystycznie istotne różnice w porównaniu z grupą kontrolną (Ryc. 8 – 13 oraz Tab. 12).

Tab. 12. Zmiany wskaźników czerwonokrwinkowych karpia w okresie ekspozycji na tebukonazol i po rekonwalescencji (h – godzina; 0h – grupa kontrolna; detoks – po okresie rekonwalescencji; x – brak analizy w danym czasie trwania eksperymentu; SD – odchylenie standardowe; n=10; * - różnice statystycznie istotne w porównaniu do gr. kontrolnej przy $\alpha=0,05$).

Czas pobrania próbek do analiz	RBC [mln μl^{-1}]		Ht [%]		Hb [g dl ⁻¹]		MCV [μm^3]		MCH [pg]		MCHC [g dl ⁻¹]	
	średnia	SD	średnia	SD	średnia	SD	średnia	SD	średnia	SD	średnia	SD
0h	1,06	0,36	18,22	2,99	6,10	1,89	202,00	49,96	59,65	10,78	31,09	5,51
24h	0,95	0,18	24,22*	2,64	9,47*	1,89	268,54	53,71	83,13	28,95	37,46	3,53
3 dni	0,77	0,11	20,22	4,89	7,11	1,65	225,52	42,14	83,88	35,24	32,95	3,75
14 dni	0,92	0,25	18,78	2,82	5,13	0,56	204,68	37,51	54,03	11,83	28,18	5,22
detoks	1,02	0,24	23,13*	2,42	5,75	1,02	221,09	31,62	66,16	20,22	30,20	7,96

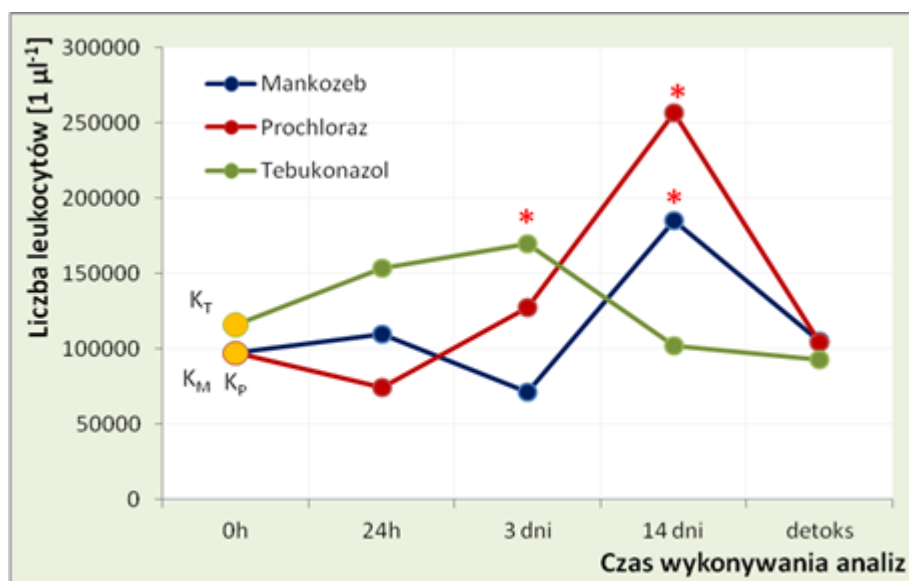
RBC, Ht i Hb określone u ryb kontrolnych (K_p) bezpośrednio po rozpoczęciu eksperymentu (0 h) wynosiły odpowiednio: $1,1 \pm 0,4$ mln μl^{-1} , $18 \pm 3\%$ oraz 6 ± 2 g dl⁻¹. W trakcie trwania doświadczenia RBC u karpia narażonych nieznacznie zmniejszyło się, zwłaszcza po 3. dniach ekspozycji ($0,8 \pm 0,3$ mln μl^{-1}), by po okresie rekonwalescencji osiągnąć wartość kontrolną. Nie były to jednak zmiany o charakterze istotności

statystycznej. Natomiast Ht i Hb we krwi obwodowej zwiększyły się statystycznie istotnie w początkowym okresie ekspozycji, tj. po 24 h ($24 \pm 3\%$ oraz $9 \pm 2 \text{ g dl}^{-1}$, odpowiednio). W pozostałych okresach badawczych (po 3. i 14. dniach ekspozycji) Ht i Hb zmniejszyły się w sposób nieistotny statystycznie w porównaniu z wartością kontrolną. Po okresie rekonwalescencji obserwowano ponowne, w porównaniu do kontroli, zwiększenie Ht i Hb, przy czym istotne statystycznie dla Ht ($23 \pm 2\%$).

Wartości kontrolne (K_T) pozostałych parametrów czerwonych wynosiły - MCV: $202 \pm 50 \mu\text{m}^3$, MCH: $70 \pm 11 \text{ pg}$ i MCHC: $31 \pm 5 \text{ g dl}^{-1}$. MCV, MCH i MCHC u karpia narażonych były zmienne i w okresie ekspozycji, i po okresie rekonwalescencji nie różniły się statystycznie istotnie w porównaniu do kontroli. Najniższe wartości wskaźników: Hb, Ht, MCV, MCH i MCHC zanotowano po zakończeniu ekspozycji (14 dni), a po okresie rekonwalescencji zaznaczyła się tendencja ich zwiększania.

3.3.2. Wskaźniki białokrwinkowe: WBC i leukogramy

Wyniki badań wskaźników układu leukocytnego karpia w czasie trwania ekspozycji na mankozeb, prochloraz i tebukonazol oraz po okresie rekonwalescencji przedstawiają: Ryc. 14 (WBC) i Tab. 13 - 15 (leukogramy).



Ryc. 14. Zmiany liczby leukocytów we krwi obwodowej karpi w czasie trwania ekspozycji na mankozeb, prochloraz i tebukonazol oraz po okresie rekonwalescencji (h – godzina; 0h – gr. kontrolna; K_M – gr. kontrolna dla mankozebu; K_P – gr. kontrolna dla prochlorazu; K_T – gr. kontrolna dla tebukonazolu; detoks – po okresie rekonwalescencji; n=10; * - różnice statystycznie istotne w porównaniu do gr. kontrolnej przy $\alpha=0,05$).

MANKOZEB

WBC określona u ryb kontrolnych (K_M) bezpośrednio po rozpoczęciu eksperymentu (0 h) wynosiła $97 \pm 11 \times 10^3 \mu\text{l}^{-3}$. Układ leukocytny karpi wykazał reakcję na ekspozycję na mankozeb. WBC, po spadku w 3. dniu ekspozycji ($71 \pm 13 \times 10^3 \mu\text{l}^{-3}$), wzrosła statystycznie istotnie do poziomu $185 \pm 49 \times 10^3 \mu\text{l}^{-3}$ po 14. dniach narażenia, a po okresie rekonwalescencji zbliżyła się do wartości kontrolnej.

Wartości kontrolne procentowego udziału poszczególnych leukocytów wynosiły: limfocyty – $87,7 \pm 7,8\%$; neutrofile (granulocyty obojętnochłonne) – $7,2 \pm 2,5\%$, monocyty – $2,5 \pm 0,9\%$. U karpi eksponowanych na fungicyd w całym okresie badawczym największy odsetek leukocytów stanowiły limfocyty (76 - 95%), następnie neutrofile (1,7 - 23%) i monocyty (do 2%). Po 14. dniach ekspozycji nastąpił wyraźny, statystycznie istotny spadek procentowego udziału limfocytów i istotny statystycznie wzrost odsetka neutrofili w porównaniu do wartości kontrolnych. W trakcie trwania całego doświadczenia (ekspozycja i rekonwalescencja) przeważały formy młodociane granulocytów obojętnochłonnych nad dojrzałymi. Ich udział w puli wszystkich neutrofili był zmienny w trakcie trwania ekspozycji, osiągając najwyższy, istotny statystycznie

odsetek po 24. godzinach - $37,5 \pm 8,7\%$, po czym uległ obniżeniu do wartości $15,2 \pm 3,8\%$ po zakończeniu narażenia. Po okresie rekonwalescencji wzrost udziału neutrofili dojrzałych w puli wszystkich granulocytów obojętnochłonnych był statystycznie istotny i wyniósł $27,9 \pm 9,0\%$. Odsetek monocytów wynoszący w grupie kontrolnej $2,5 \pm 0,9\%$ w grupie doświadczalnej systematycznie zmniejszał się w trakcie trwania ekspozycji, a najniższą wartość osiągnął po okresie rekonwalescencji – $0,8 \pm 0,5\%$ (Tab. 13).

Tab. 13. Leukogramy karpki eksponowanych na mankozeb i po rekonwalescencji (h – godzina; 0h – grupa kontrolna; detoks – po okresie rekonwalescencji; SD – odchylenie standardowe; n=10; * - różnice statystycznie istotne w porównaniu do gr. kontrolnej przy $\alpha=0,05$).

	0h		24h		3 dni		14 dni		detoks	
	średnia	SD	średnia	SD	średnia	SD	średnia	SD	średnia	SD
WBC $\times 10^3 \mu\text{l}^{-3}$	96,94	11,4	109,65	16,1	71,44	13,0	185,08*	48,9	105,05	26,6
LIMFOCYTY %	87,70	7,8	94,98	3,4	91,95	2,1	76,41*	8,3	92,10	9,5
NEUTROFILE %	7,23	2,5	2,17	0,9	6,00	1,9	23,31*	6,1	1,73	0,7
dojrzałe %	12,19	6,9	37,51*	8,7	22,30	8,0	15,18	3,8	27,90*	9,0
młodościane %	87,81	6,9	62,49*	8,7	77,70	8,0	84,82	3,8	72,10*	9,0
MONOCYTY %	2,54	0,9	2,06	1,4	1,86	0,7	1,88	1,3	0,78	0,5

PROCHLORAZ

WBC określona u ryb kontrolnych (K_p) bezpośrednio po rozpoczęciu eksperymentu (0 h) wynosiła $97 \pm 11 \times 10^3 \mu\text{l}^{-3}$. Ekspozycja karpki na prochloraz spowodowała początkowo nieistotny statystycznie spadek (24 h), a następnie wzrost WBC. Najwyższy, istotnie statystyczny wzrost WBC odnotowano po zakończeniu okresu ekspozycji (14 dni) i wyniósł on $257 \pm 55 \times 10^3 \mu\text{l}^{-3}$. Po okresie rekonwalescencji WBC zbliżyła się do wartości kontrolnej.

Wartości kontrolne procentowego udziału poszczególnych leukocytów przedstawiały się następująco: limfocyty – $87,7 \pm 7,8\%$; neutrofile – $7,2 \pm 2,5\%$, monocyty – $2,5 \pm 0,9\%$. W leukogramach karpki eksponowanych na prochloraz obserwowano, po początkowym (24 h) istotnym statystycznie spadku odsetka limfocytów ($71 \pm 9\%$), ciągły jego wzrost w trakcie narażenia ryb i okresu rekonwalescencji, osiągając wartość 90 - 91%. Towarzyszył temu statystycznie istotny spadek liczby neutrofili: z 26,5% (24 h), do 5 - 7% (14 dni i okres rekonwalescencji).

Wśród granulocytów obojętnochłonnych, w okresie ekspozycji na prochloraz, dominowały młodociane formy granulocytów stanowiąc około 80% wszystkich neutrofili. Natomiast odsetek monocytów utrzymywał się na poziomie 1 - 2%, wykazując istotny statystycznie spadek po 14. dniach ekspozycji i po rekonwalescencji (Tab. 14).

Tab. 14. Leukogramy karpki eksponowanych na prochloraz i po rekonwalescencji (h – godzina; 0h – grupa kontrolna; detoks – po okresie rekonwalescencji; SD – odchylenie standardowe; n=10; * - różnice statystycznie istotne w porównaniu do gr. kontrolnej przy $\alpha=0,05$).

		0h		24h		3 dni		14 dni		detoks	
		średnia	SD	średnia	SD	średnia	SD	średnia	SD	średnia	SD
WBC	$\times 10^3 \mu\text{l}^{-3}$	96,94	11,4	73,88	25,9	127,50	38,1	256,90*	55,0	103,94	18,0
LIMFOCYTY	%	87,70	7,8	71,00*	9,9	86,75	2,5	90,73	6,4	91,33	3,5
NEUTROFILE	%	7,23	2,5	26,50*	5,9	11,19	2,5	5,31	1,5	7,25	1,3
	dojrzałe %	12,19	6,9	19,04	2,9	16,73	6,7	16,33	5,1	17,80	4,3
	młodociane %	87,81	6,9	80,96	2,9	83,27	6,7	83,67	5,1	82,20	4,3
MONOCYTY	%	2,54	0,9	1,00	0,5	2,06	0,7	1,26*	0,6	1,22*	0,8

TEBUKONAZOL

WBC określona u ryb kontrolnych (K_T) bezpośrednio po rozpoczęciu eksperymentu (0 h) wynosiła $116 \pm 29 \times 10^3 \mu\text{l}^{-3}$. U karpki eksponowanych na fungicyd obserwowano wzrost WBC w początkowym (do 3. dni) okresie ekspozycji na tebukonazol, w tym statystycznie istotny po 3. dniu jej trwania ($169 \pm 55 \times 10^3 \mu\text{l}^{-3}$). Po tym okresie aż do zakończenia rekonwalescencji WBC była statystycznie nieistotnie niższa w porównaniu z wartością kontrolną, osiągając najniższą wartość po okresie rekonwalescencji ($102 \pm 35 \times 10^3 \mu\text{l}^{-3}$).

Wartości kontrolne procentowego udziału poszczególnych leukocytów przedstawiały się następująco: limfocyty – $94,3 \pm 1,8\%$; neutrofile – $2,8 \pm 1,5\%$, monocyty – $2,3 \pm 1,4\%$. U karpki eksponowanych na tebukonazol obserwowano zmiany w leukocytoqramach. Główny % leukocytów stanowiły limfocyty – 73 - 93%, następnie neutrofile – 6 - 18% oraz monocyty – 4 - 7%. Udział limfocytów w puli leukocytów

zmniejszył się statystycznie istotnie w początkowej fazie ekspozycji (24 h) do $73 \pm 10\%$, podczas gdy procentowy udział neutrofili i monocytów w tym czasie zwiększył się w sposób istotny statystycznie do wartości odpowiednio: $18 \pm 5\%$ i $7 \pm 3\%$. W dalszych okresach narażenia karpi udział limfocytów w puli leukocytów sukcesywnie zwiększał się, przy jednoczesnym zmniejszeniu odsetka neutrofili i monocytów. Jednakże po okresie przebywania ryb w czystej wodzie zanotowano ponowny, statystycznie istotny wzrost odsetka granulocytów obojętnochłonnych. W okresie ekspozycji karpi wśród neutrofili przeważały formy młodociane. Największy % udział form młodocianych w tym okresie stwierdzono po 24. godzinach ($83 \pm 6\%$). Następnie obserwowano stopniowy spadek ich procentowego udziału w puli granulocytów obojętnochłonnych, jednakże w dalszym ciągu ich odsetek był statystycznie istotnie wyższy w porównaniu z wartością kontrolną, do której poziomu zbliżył się po okresie rekonwalescencji.

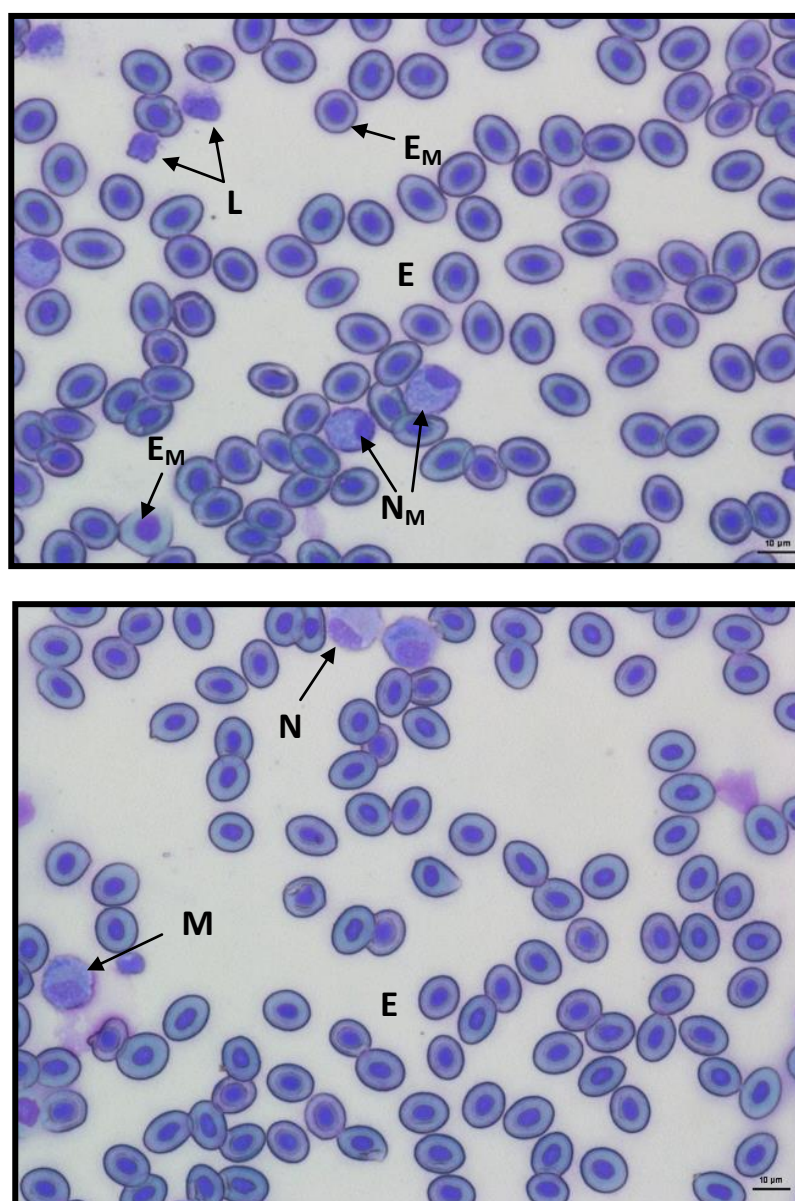
Tab. 15. Leukogramy karpi eksponowanych na tebukonazol i po rekonwalescencji (h – godzina; 0h – grupa kontrolna; detoks – po okresie rekonwalescencji; SD – odchylenie standardowe; n=10; * - różnice statystycznie istotne w porównaniu do gr. kontrolnej przy $\alpha=0,05$).

	0h		24h		3 dni		14 dni		detoks	
	średnia	SD	średnia	SD	średnia	SD	średnia	SD	średnia	SD
WBC $\times 10^3 \mu l^{-3}$	115,75	28,6	153,13	53,9	169,44*	47,1	102,17	34,8	92,50	11,0
LIMFOCYTY %	94,33	1,8	72,84*	9,9	87,17	6,8	91,65	2,1	86,56	4,5
NEUTROFILE %	2,80	1,5	18,28*	4,6	5,78	1,9	5,44	2,1	12,46*	4,5
dojrzałe %	41,84	5,2	16,98*	6,0	20,10*	5,6	29,27*	6,6	42,91	9,1
młodociane %	58,16	5,2	83,02*	6,0	79,90*	5,6	70,73*	6,6	57,09	9,1
MONOCYTY %	2,33	1,4	7,13*	3,0	5,92	3,1	3,92	1,4	1,06	0,9

3.4. ANALIZA ZMIAN PATOMORFOLOGICZNYCH W ELEMENTACH MORFOTYCZNYCH KRWI OBWODOWEJ KARPI

Obserwowane w rozmazach krwi obwodowej elementy morfotyczne ryb kontrolnych i eksponowanych na mankozeb, prochloraz i tebukonazol oraz po okresie rekonwalescencji przedstawiają Fot. 101 – 108.

KONTROLA

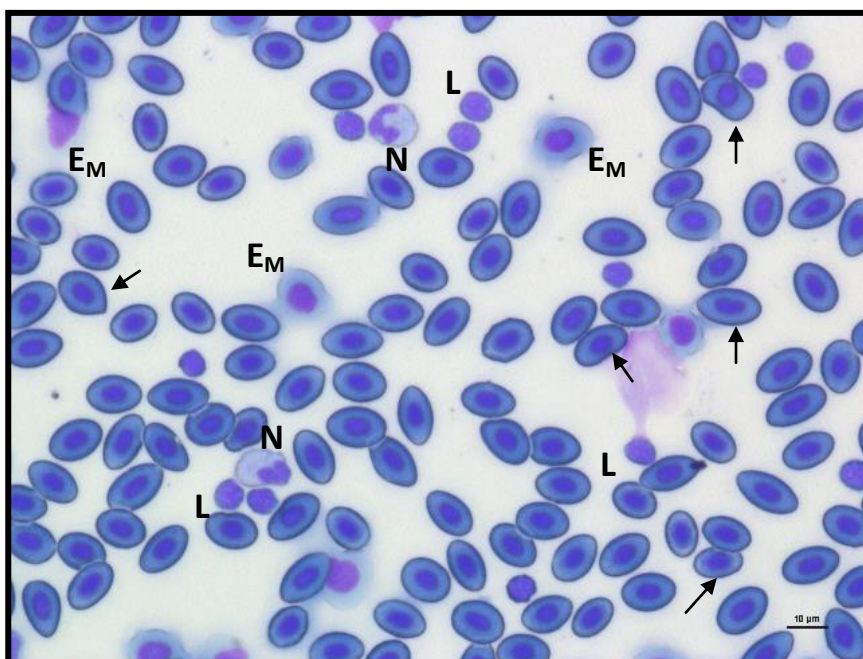


Fot. 101. Elementy morfotyczne krwi obwodowej karpi grupy kontrolnej; widoczne dojrzałe erytrocyty (E) i neutrofil (N) oraz ich formy młodociane (E_M – erytrocyt młodociany i N_M – neutrofil niedojrzały) oraz limfocyty (L) i monocyt (M).

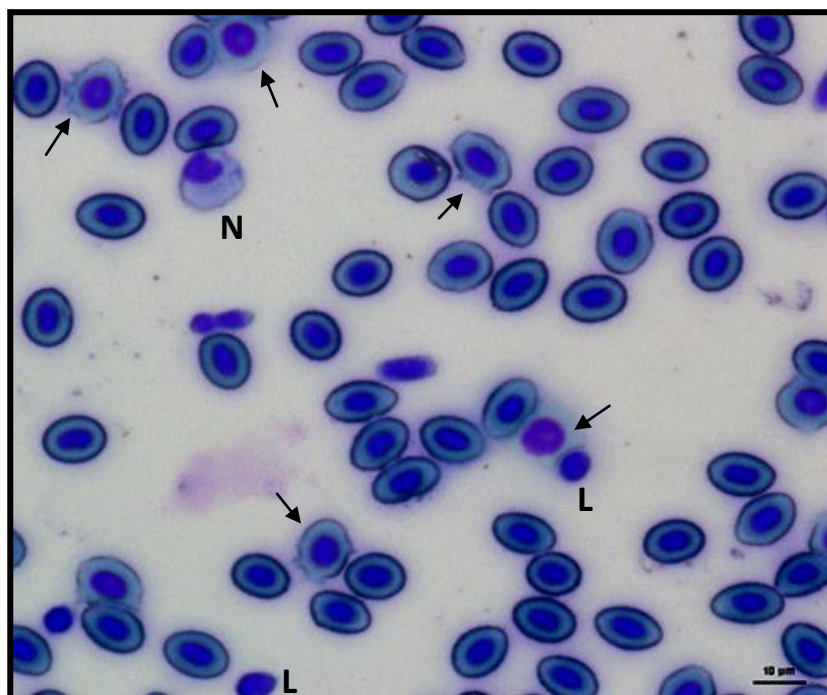
MANKOZEB

W erytrocytach karpi eksponowanych na mankozeb (Fot. 102 - 105) obserwowano zmiany patologiczne. W wielu krwinkach, w czasie trwania ekspozycji (24 h, 3 dni, 14 dni) i po okresie rekonwalescencji, obserwowano zniekształcone i ulegające przewężeniu jądra komórkowe, niekiedy niedobarwliwe (hipochromatyczne). W trakcie narażenia karpi obecne były we krwi obwodowej liczne młodociane formy erytrocytów, których nie obserwowano po okresie rekonwalescencji.

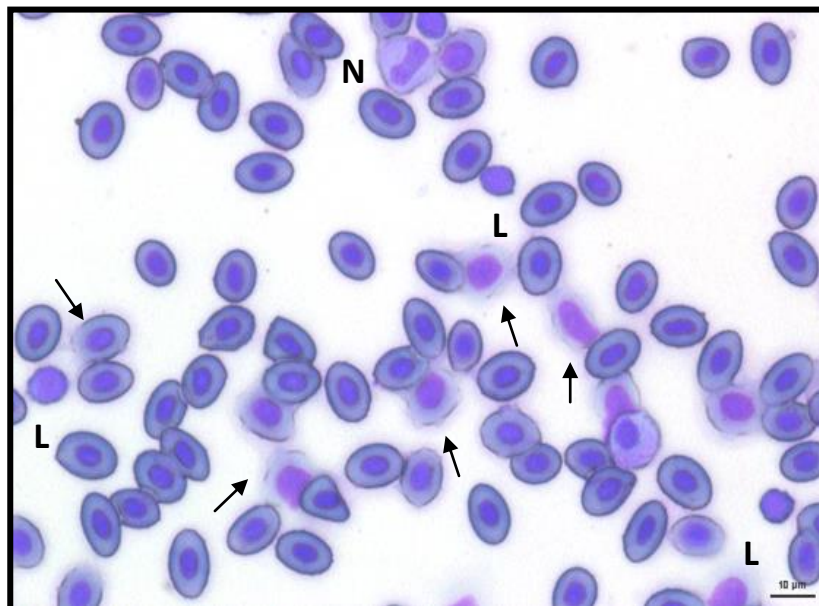
Analiza mikroskopowa komórek leukocytnych (Fot. 102 - 105) wykazała obecność licznych zdeformowanych limfocytów w całym okresie badawczym, zwłaszcza w początkowym okresie ekspozycji. Zmieniał się też obraz neutrofili w trakcie ekspozycji karpi. Po 24. godzinach obserwowano zarówno dojrzałe, jak i młodociane formy granulocytów obojętnochłonnych, niektóre z nich miały zniekształcone jądra komórkowe. Po 3. dniach ekspozycji aż do jej zakończenia nasiliły się zmiany w jądrach neutrofili: były one obrzmiałe i zniekształcone.



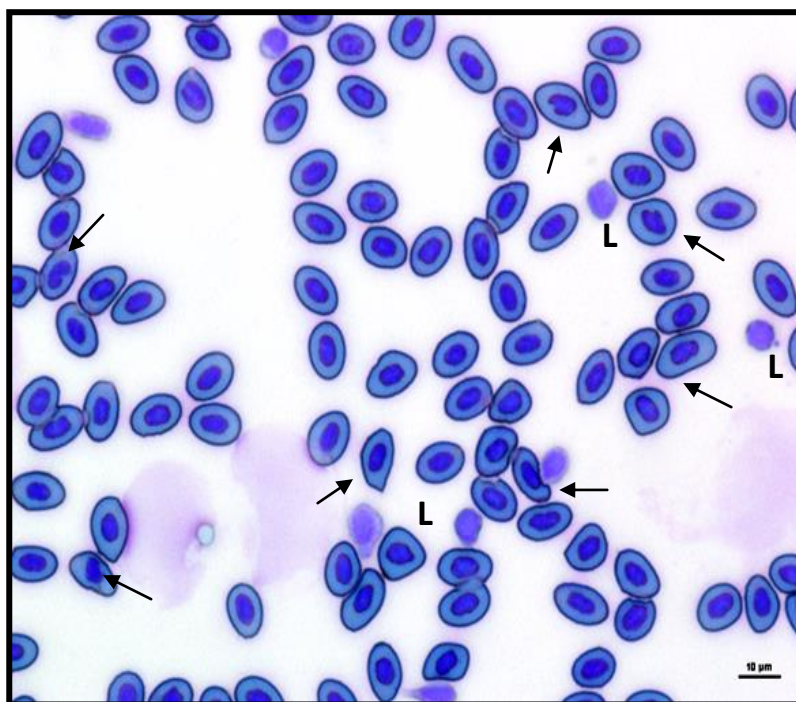
Fot. 102. Elementy morfotyczne krwi obwodowej karpi po 24. godzinach ekspozycji na mankozeb. Widoczne zniekształcone jądra neutrofili (N), prawidłowe limfocyty (L), erytrocyty prawidłowe oraz o zmienionych kształtach (strzałki), uszkodzone młodociane formy erytrocytów (E_M).



Fot. 103. Elementy morfotyczne krwi obwodowej karpi po 3. dniach ekspozycji na mankozeb. Zmieniony kształt jądra komórkowego neutrofila (N), ulegające lizie młodociane erytrocyty (strzałki), prawidłowe limfocyty (L).



Fot. 104. Elementy morfotyczne krwi obwodowej karpi po 14. dniach ekspozycji na mankozeb. Zmienione jądro neutrofila (N), ulegające lizie młodociane erytrocyty, hipochromatyczne jądra erytrocytów (strzałki), limfocyty (L).

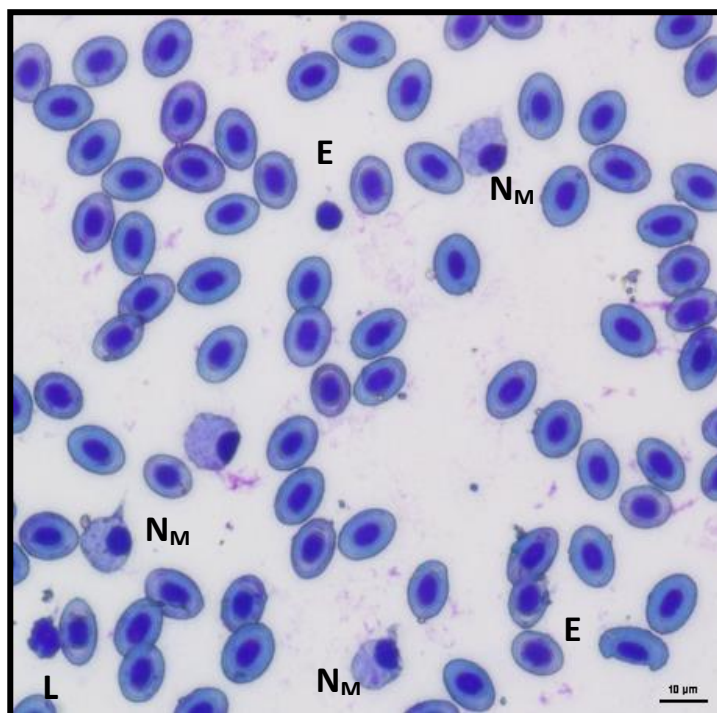


Fot. 105. Elementy morfotyczne krwi obwodowej karpi po okresie rekonwalescencji po ekspozycji na mankozeb. Zmienione kształty erytrocytów, hipochromia jąder erytrocytów oraz dzielące się ich jądra (strzałki); limfocyt jasny, dzielący się, z rozrzedzoną chromatyną (L).

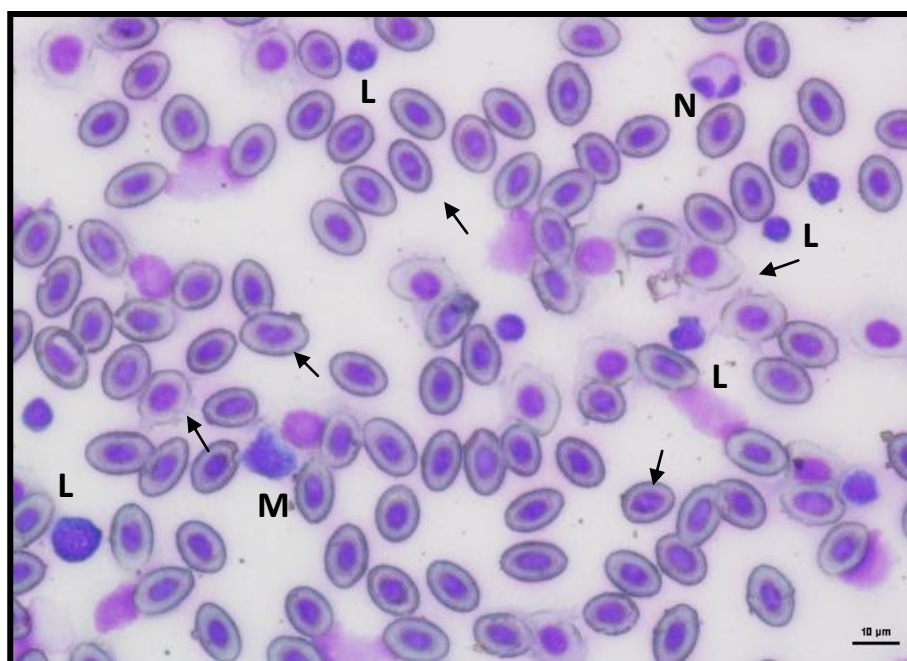
PROCHLORAZ

Analiza patomorfologiczna erytrocytów karpi eksponowanych na prochloraz wykazała obecność zmian (Fot. 106 – 109). Jądra erytrocytów były hipochromatyczne, szczególnie po 3. dniach ekspozycji, a po jej zakończeniu i zakończeniu okresu rekonwalescencji były one często przewężone. Obserwowano także niedobarwliwość cytoplazmy erytrocytów w trakcie trwania ekspozycji ryb i po okresie rekonwalescencji.

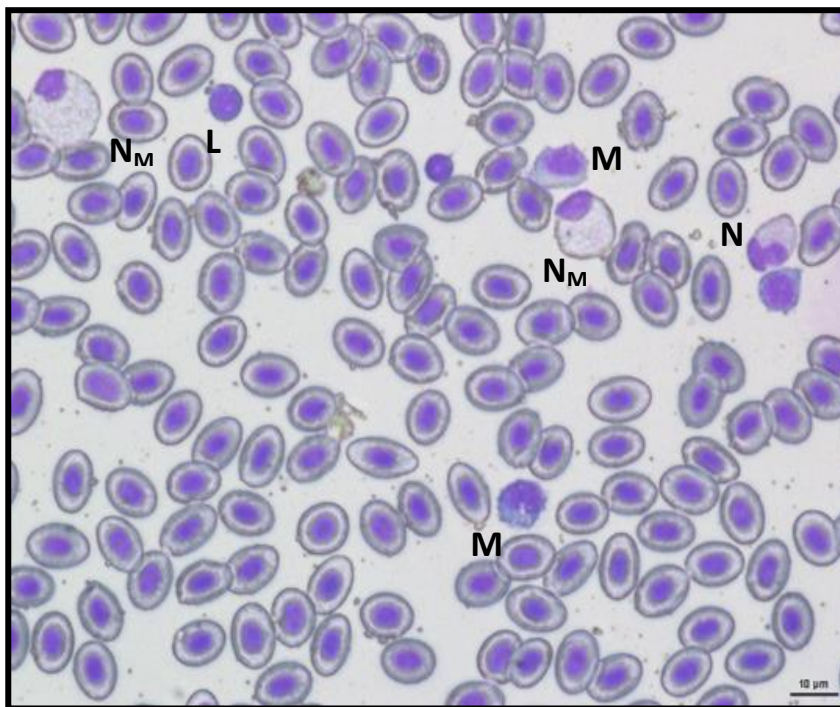
W komórkach leukocytnych również obserwowano zmiany patologiczne (Fot. 106 - 109). Pojedyncze limfocyty miały zmienione kształty; jądra wielu limfocytów były przewężone lub miały anormalny kształt. Jądra komórkowe w neutrofilach były niekiedy obrzmiałe oraz charakteryzowały się często zmienionym kształtem. Po okresie rekonwalescencji obserwowano leukocyty zarówno o prawidłowej budowie, jak i zmienione patologicznie.



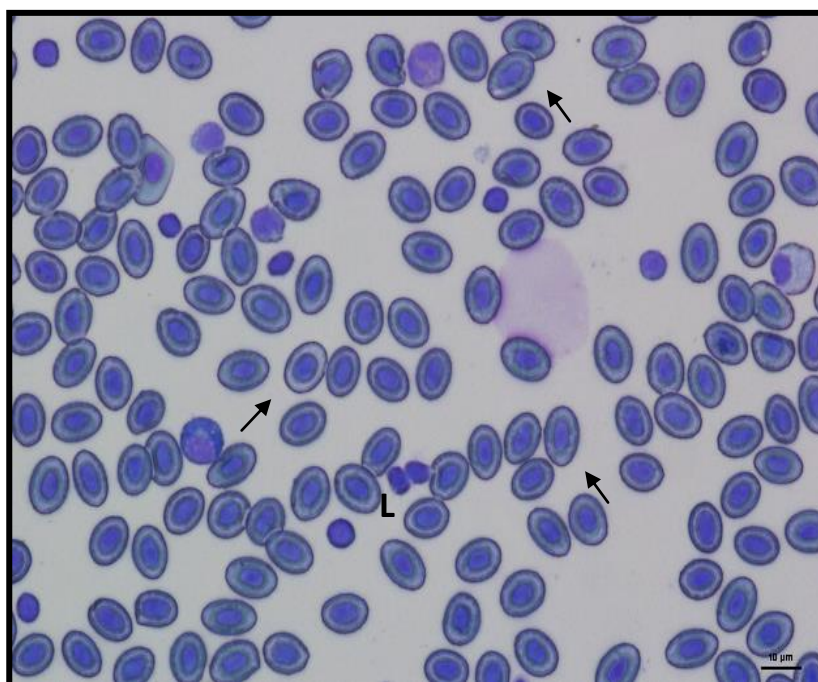
Fot. 106. Elementy morfotyczne krwi obwodowej karpia po 24. godzinach ekspozycji na prochloraz. Zmienione jądra obrzmiatych niedojrzałych neutrofilów (N_M), zniekształcony limfocyt (L), hipochromia cytoplazmy erytrocytów (E).



Fot. 107. Elementy morfotyczne krwi obwodowej karpia po 3. dniach ekspozycji na prochloraz. Zmieniony kształt neutrofila i obrzmiatę płytę jądra komórkowego (N), zniekształcone limfocyty (L), monocyt z bardzo dużym jądrem komórkowym (M), hipochromia jąder erytrocytów (strzałki) oraz obrzmiatę młodocianą formę erytrocytów z uszkodzoną błoną komórkową (strzałki).



Fot. 108. Elementy morfotyczne krwi obwodowej karpi po 14. dniach ekspozycji na prochloraz. Zmienione kształty jądra komórkowego, obrzmienie niedojrzałych neutrofili (N_M), zmieniony kształt monocytu (M), zmieniony kształt limfocytu (L), niedobarwliwa cytoplazma erytrocytów.

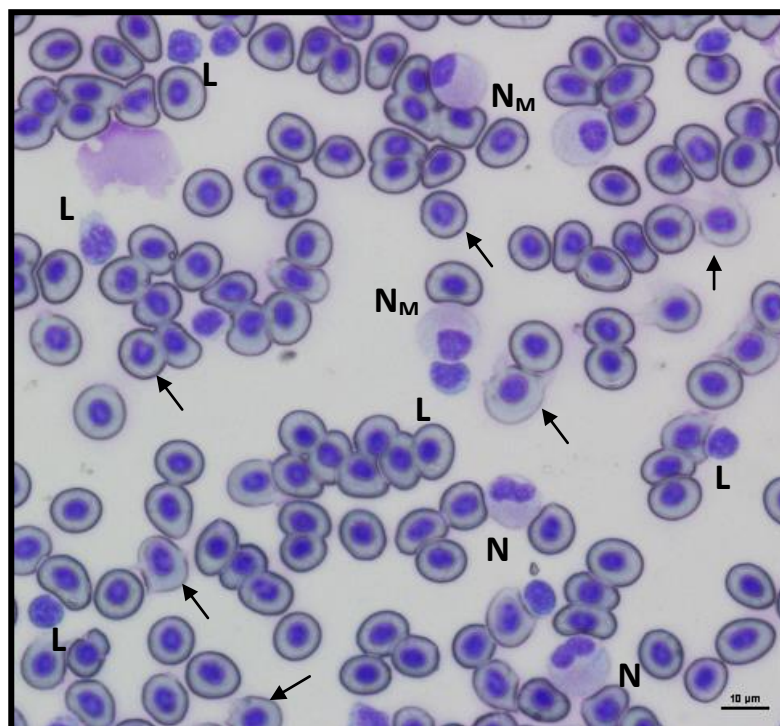


Fot. 109. Elementy morfotyczne krwi obwodowej karpi po okresie rekonwalescencji po ekspozycji na prochloraz. Pojedyncze erytrocyty z hipochromią (strzałki), dzielący się limfocyt (L).

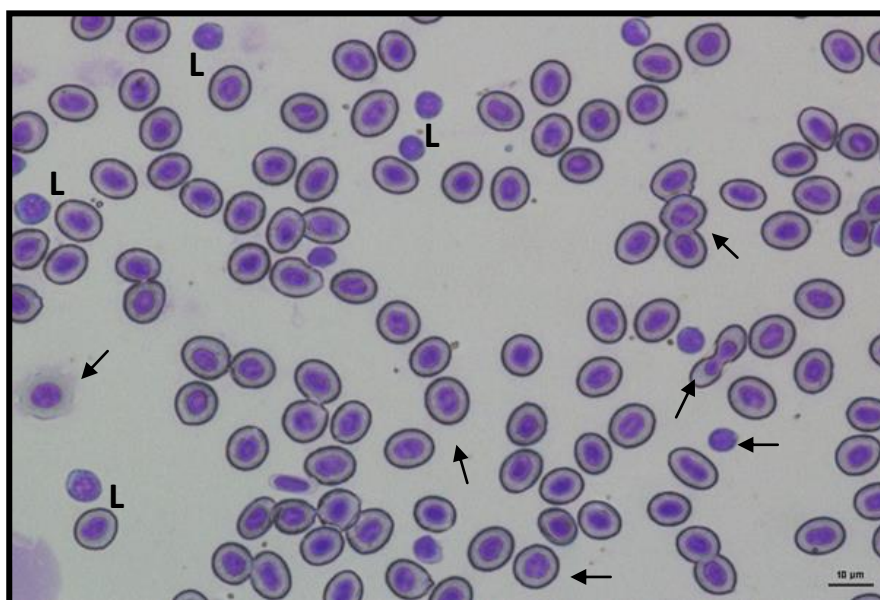
TEBUKONAZOL

Po 24. godzinach i 3. dniach ekspozycji na tebukonazol (Fot. 110 – 113) obserwowano w rozmazach niekiedy erytrocyty o zmienionym kształcie jądra komórkowego, które wykazywały również cechy hipochromii. Po 14. dniach ekspozycji zmiany patologiczne w erytrocytach nasiliły się. Większość erytrocytów wykazywała zmiany kształtu jądra i ich niedobarwliwość; czasami zmieniał się też kształt całej krwinki. Obserwowano również niedobarwliwość cytoplazmy komórek. Pojawiły się także w tym czasie młodociane formy erytrocytów, a ich błony komórkowe były często uszkodzone, co prowadziło do lizy komórek. Po okresie rekonwalescencji zaobserwowano zmiany kształtu jąder komórkowych, jak i całych komórek.

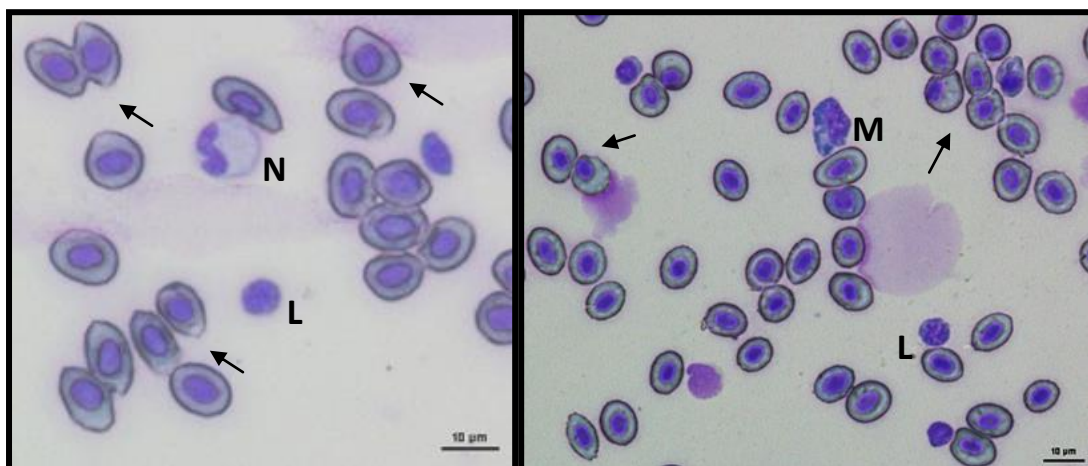
W całym okresie ekspozycji karpia na tebukonazol (Fot. 110 – 113) obserwowano patologicznie zmienione limfocyty: często miały one zmieniony kształt, ulegając znacznej deformacji. Główne zmiany dotyczyły jądra komórkowego, które często było przewężone. Po okresie rekonwalescencji obserwowane limfocyty były na ogół prawidłowe, a tylko nieliczne posiadały zdeformowane jądra komórkowe. Granulocyty obojętnochłonne obserwowano sporadycznie. Najwięcej tego typu leukocytów, a szczególnie form młodocianych, zanotowano po 24. godzinach ekspozycji i po okresie rekonwalescencji. Stosunkowo często występowały także monocyty, zwłaszcza po 24. godzinach i 14. dniach ekspozycji. Liczne z nich charakteryzowały się nieprawidłowym kształtem komórki i jej jądra.



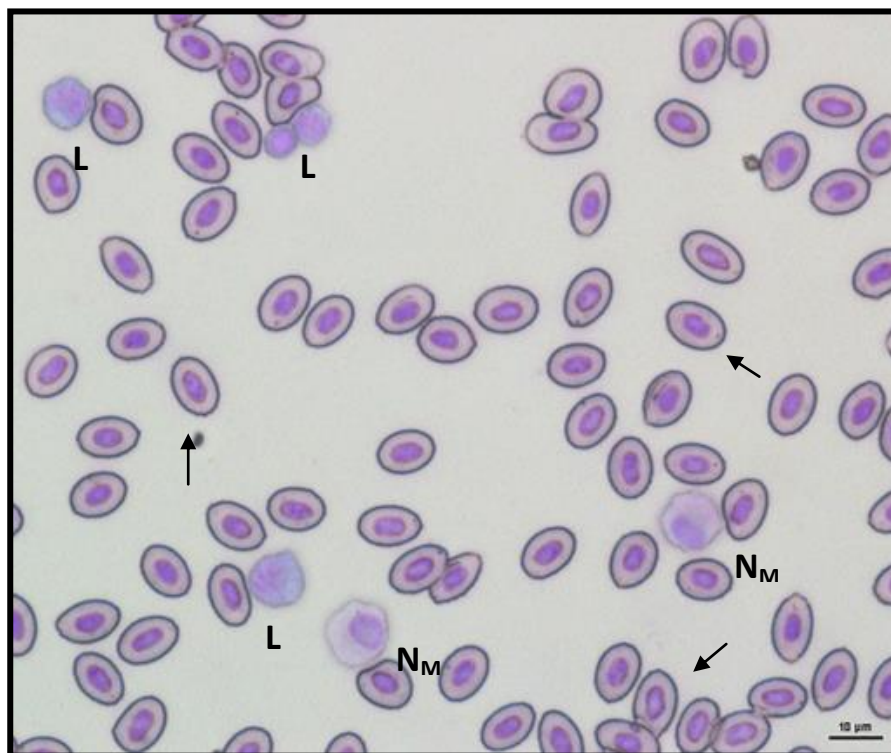
Fot. 110. Elementy morfotyczne krwi obwodowej karpia po 24. godzinach ekspozycji na tebukonazol. Obrzmiałe płaty jądra neutrofile (N), obrzmiałe niedojrzałe neutrofile (N_M), nieprawidłowy układ chromatinowy w jądrach limfocytów oraz ich obrzmienie (L), uszkodzone młodociane erytrocyty (strzałki), hipochromia jąder erytrocytów (strzałki).



Fot. 111. Elementy morfotyczne krwi obwodowej karpia po 3. dniach ekspozycji na tebukonazol. Erytrocyt w podziale (strzałka) i hipochromia jąder erytrocytów oraz uszkodzona młodociana forma erytrocytu (strzałka); rozluźnienie chromatinu w limfocycie (L) oraz przewężenie jądra limfocyty (strzałka).



Fot. 112. Elementy morfotyczne krwi obwodowej karpi po 14. dniach ekspozycji na tebukonazol. Zmieniony kształt jądra neutrofila (N), niedobarwliwość i zmienione kształty komórek erytrocytów (strzałki), obrzmiały monocyt (M), dzielące się jądro limfocytu (L).



Fot. 113. Elementy morfotyczne krwi obwodowej karpi po okresie rekonwalescencji po ekspozycji na tebukonazol. Hipochromia jąder komórkowych erytrocytów oraz zmienione kształty erytrocytów (strzałki), obrzmiałe komórki leukocytarne (L i N_M).

IV. DYSKUSJA WYNIKÓW

Niekorzystne warunki środowiska, uszkodzenia mechaniczne lub niewłaściwa dieta znacząco wpływają na kondycję i stan zdrowotny ryb. Ma to bezpośredni związek z rozwojem w organizmie zespołu zmian określanych terminem "stres polietologiczny" (Siwicki i wsp., 2007). Jednym z czynników powodujących rozwój w organizmie reakcji stresowej może być zanieczyszczenie środowiska pestycydami.

Pod wpływem działania stresorów w organizmie wyzwalane są reakcje obronne, będące nieodzownym elementem adaptacji ryb do zmienionych warunków środowiskowych. W pierwszej kolejności pobudzony zostaje centralny układ nerwowy i układ współczulny. Następuje aktywacja wydzielania hormonu adaptacyjnego adrenokortykotropowego (ACTH), który pobudza komórki międzynerkowe (odpowiednik kory nadnerczy ssaków) do zwiększenia produkcji i wydzielania glikokortykoidów, a w szczególności kortyzolu. Równocześnie pobudzenie układu współczulnego powoduje zwiększoną produkcję katecholamin, głównie epinefryny i norepinefryny przez ciała chromochłonne (odpowiednik rdzenia nadnerczy ssaków) (Antychowicz, 2007; Iwama, 1998; Siwicki i wsp., 2007).

Kortyzol, zwany hormonem stresu, jest uważany za jeden z bardziej czułych wskaźników oddziaływania stresora na ryby. Zbyt duże wydzielanie tego hormonu w tym czasie może doprowadzić do immunosupresji, co sprzyja rozwojowi chorób infekcyjnych. Zaburzenie sekrecji kortyzolu podczas przewlekłego narażenia na ksenobiotyki może wpłynąć na zdolność zwierzęcia do radzenia sobie ze stresorami środowiskowymi i ostatecznie doprowadzić do zmniejszenia przeżywalności ryb.

W badaniach własnych, w trakcie ekspozycji karpia na fungicydy, nie zaobserwowano wyraźnej reakcji stresowej ryb w postaci wzrostu stężenia kortyzolu (Ryc. 2). W przypadku grupy karpia narażonych na mankozeb stężenie hormonu w osoczu krwi było zmienne, ale wszystkie zaobserwowane zmiany były statystycznie nieistotne, co prawdopodobnie wynikało ze znacznego odchylenia standardowego otrzymanych wyników (Tab. 7). Natomiast ekspozycja na pozostałe fungicydy (prochloraz i tebukonazol) spowodowała istotne statystycznie zmniejszenie stężenia kortyzolu, zwłaszcza w początkowych jej godzinach (do 12 h), w porównaniu z wartościami kontrolnymi. Okres rekonwalescencji przyczynił się do powrotu badanego wskaźnika do wartości kontrolnych (Tab. 8 i 9).

Według Cericato i wsp. (2008), ekspozycja ryb na subletalne stężenia tebukonazolu nie wpłynęła na poziom kortyzolu u ryb eksperymentalnych, nie przyczyniła się też do zablokowania sekrecji hormonu na dodatkowy stresor. W przypadku długotrwałego wpływu agrochemikaliów na ryby żyjące głównie w naturalnych zbiornikach, obserwuje się zaburzenia osi przysadka-podwzgórze-nadnercza (HPI) (Hontela, 1998), co powoduje spadek stężenia kortyzolu wraz z towarzyszącą mu atrofią przysadki mózgowej. Takie zmiany obserwuje się również w stanach wyczerpania, którym towarzyszy wzmożona i wydłużona aktywność osi HPI (Hontela i wsp., 1992). Antychowicz (2007) podkreśla, iż nagły wzrost poziomu kortyzolu obserwuje się w wyniku ostrego, krótkotrwałego stresu, trwającego kilka minut, a jego powrót do normy następuje po około godzinie. Obserwowany w badaniach własnych spadek poziomu kortyzolu we krwi narażonych karpia może być wypadkową powyższych sytuacji, gdyż największą sekrecję hormonu notowano w pierwszych godzinach narażenia, wskazując na fakt, iż niskie stężenia badanych fungicydów mogą przyczynić się do rozwoju krótkotrwałej reakcji stresowej. O przejściowym jednocześnie charakterze tej reakcji wydaje się świadczyć powrót wartości wskaźnika do poziomu kontrolnego.

W typowej reakcji na czynnik stresowy konsekwencją neurohormonalnej stymulacji narządów są zmiany w przemianie materii. Manifestują się one zmianami wskaźników metabolicznych w organizmie. Glikokortykoidy oddziałują na metabolizm węglowodanów, białek i tłuszczów w tkankach całego organizmu. W wyniku rozpadu glikogenu i glukoneogenezy powstają duże ilości glukozy, która jest łatwo dostępnym źródłem energii dla organizmu ryb.

Przeprowadzone badania własne wskazują, że w stanie stresu chemicznego zmienia się metabolizm węglowodanów i tłuszczu u karpia. Wzrost zapotrzebowania na energię obserwowano w trakcie ekspozycji na badane fungicydy, najsilniej wyrażony w przypadku narażenia na mankozeb i prochloraz (Ryc. 3 i 4; Tab. 7 i 8). Manifestowało się to znacznym podwyższeniem stężenia glukozy we krwi w pierwszym okresie ekspozycji (do 24 h), a w dalszym - znacznym zmniejszeniem jej stężenia. Okres rekonwalescencji na ogół nie przyczynił się do osiągnięcia wartości kontrolnych tego wskaźnika. Największym spadkiem stężenia glukozy towarzyszył największy wzrost stężenia trójglicerydów (po 3. i 14. dniach ekspozycji). W okresie rekonwalescencji stężenie trójglicerydów było zbliżone do wartości kontrolnych. Wskazuje to na szybkie uruchomienie zasobów energetycznych w postaci wyrzutu cukru do krwi w chwili wystąpienia stresu chemicznego, a w późniejszej fazie zastąpienie ich lipidowym źródłem energii. W przypadku karpia eksponowanych na tebukonazol nie zaobserwowano tak

silnych wahań poziomów zarówno glukozy, jak i trójglicerydów (Tab. 9). Istotny statystycznie wzrost stężenia glukozy notowano dopiero po okresie rekonwalescencji. Natomiast poziom trójglicerydów był statystycznie istotnie niższy w całym okresie doświadczalnym. Obserwowane w badaniach własnych fluktuacje stężenia glukozy we krwi ryb eksponowanych na tebukonazol wydają się świadczyć o zapotrzebowaniu organizmu na energię, jednak nie jest ono tak gwałtowne, jak w przypadku ekspozycji karpia na mankozeb i prochloraz. Nie obserwowano również mechanizmu kompensacyjnego wykorzystującego jako źródło energii metabolizm tłuszczu. Z przeprowadzonych obserwacji mikroskopowych hepatocytów (TEM) wynika, że zasoby glikogenu w wątrobie ryb eksponowanych na mankozeb i prochloraz były znaczne (Fot. 68, 69, 71 i 72). Przypuszcza się więc, że po początkowym uruchomieniu węglowodanowych zasobów energetycznych (Ryc. 3), w dłuższym okresie czasu organizm ryb nie był w stanie z nich korzystać, stąd też może wynikać konieczność uruchomienia źródeł lipidowych. W przypadku tebukonazolu w hepatocytach obserwowano znacznie mniejsze, w stosunku do wymienionych wyżej grup doświadczalnych, zasoby glikogenu (Fot. 73 i 74). Jednak pozwoliło to organizmowi na korzystanie z nich podczas całego okresu doświadczalnego, a przede wszystkim do 24 godzin ekspozycji i jednocześnie systematyczne wykorzystywanie zapasów lipidowych, zwłaszcza po 24 godzinach narażenia (Ryc.4).

W przypadku badania stężenia białka ogólnego nie obserwowano wyraźnej reakcji tego wskaźnika na stres chemiczny (Ryc. 5). Obserwowane zmniejszanie czy zwiększanie jego stężenia podczas ekspozycji ryb na fungicydy miało na ogół charakter przejściowy, gdyż po okresie rekonwalescencji notowano wartości wskaźnika zbliżone do kontrolnych. Dowodzi to faktu, iż organizm ryb nie był zmuszony do korzystania z zasobów białka jako alternatywnego źródła energii.

Podobne jak w badaniach własnych, zmiany w zakresie stężenia glukozy i białka ogólnego zanotowali Toni i wsp. (2011b) w wyniku ekspozycji na tebukonazol. Wzrost ilości glukozy we krwi ryb eksponowanych na pestycyd w początkowych fazach ekspozycji (5 i 10 dni), a po dwóch tygodniach powrót do wartości wyjściowej obserwował także Silbergeld (1974). Potwierdza to mobilizację organizmu w chwili wystąpienia czynnika stresowego, a także jego adaptację do zaistniałych warunków. W doświadczeniach Li i wsp. (2011a i 2011b) ostra toksyczność fungicydu triazolowego - propikonazolu, spowodowała znaczny wzrost ilości glukozy we krwi, natomiast poziom trójglicerydów był porównywalny z wartością kontrolną. Ekspozycja ryb zarówno na tebukonazol, jak i tricyklazol - zamiennik prochlorazu (odpowiednio 230 i 142 $\mu\text{g l}^{-1}$, 7 i 14 dni) spowodowała statystycznie istotne zwiększenie poziomu glukozy

oraz trójglicerydów we krwi danio pręgowanego (Sancho i wsp., 2009 i 2010). Nie wpływało to natomiast na poziom białka ogólnego w osoczu ryb doświadczalnych. Na zakończenie okresu rekonwalescencji poziom glukozy był porównywalny z kontrolnym, przy jednoczesnym ciągłym wzroście poziomu trójglicerydów w osoczu eksponowanych ryb. Inne badania dowodzą braku reakcji ze strony trójglicerydów i białka ogólnego po 5. tygodniowej ekspozycji ryb na subletalne dawki benomylu (Min i Kang, 2008). Udowodniono także, że długotrwała mobilizacja bądź zbyt wczesne wyczerpanie się zasobów energii może mieć swoje konsekwencje we wzroście zapotrzebowania na białko, które jest również potrzebne do budowania nowych, w miejsce zniszczonych elementów strukturalnych. Dalszymi konsekwencjami długotrwałej mobilizacji organizmu mogą być zaburzenia wzrostu, reprodukcji, a także zdolności przetrwania w zanieczyszczonym środowisku (Roex i wsp., 2003; Toni i wsp., 2011b), czego nie zaobserwowano w badaniach własnych, gdyż uzyskiwane po okresie rekonwalescencji wartości badanych wskaźników metabolicznych były na ogół zbliżone do kontrolnych

Oceniając wyniki badań innych autorów i własne, wydaje się, iż wykorzystanie markera kontaminacji wód powierzchniowych fungicydami jakim jest poziom glukozy we krwi eksponowanych ryb może być przydatnym wskaźnikiem zwłaszcza dla początkowej fazy narażenia.

Wątroba jest narządem metabolizującym ksenobiotyki. Warunkiem sprawnej czynności wątroby jest prawidłowa budowa i skład enzymatyczny jej komórek, a także nie zaburzony kontakt krwi żyły wrotnej z miąższem. Ważnym wskaźnikiem w ocenie toksycznego działania fungicydów jest aktywność enzymów wątrobowych: aminotransferazy asparaginianowej i alaninowej (Przybylska-Wojtyszyn i wsp., 1992). W badaniach własnych (Ryc. 6 i 7) nie wykazano istotnego wpływu mankozebu i prochlorazu na aktywność AST i ALT w okresie doświadczalnym. Natomiast istotny wzrost aktywności AST odnotowano po okresie rekonwalescencji karpia narażonych na tebukonazol. Było to zapewne wynikiem z jednej strony stymulacji syntezy AST, a z drugiej oddziaływania fungicydu na błony mitochondrialne, prowadząc do ich uszkodzenia (Fot. 74: A). Określono, że około 80% aktywności AST w wątrobie związana jest z mitochondriami, a reszta - z częścią cytozolową. Według Przybylska-Wojtyszyn i wsp. (1992) podczas procesów detoksykacyjnych zwiększa się ilość kwasu pirogronowego prowadząc do zwiększenia tempa rozkładu asparaginy, a proces ten związany jest z mitochondrialną AST. Tak również można tłumaczyć zanotowane w badaniach własnych zwiększenie aktywności AST w okresie rekonwalescencji po narażeniu karpia na tebukonazol.

Odmienne do otrzymanych wyników badań aktywności aminotransferaz uzyskali inni autorzy. Wzrost aktywności enzymów wątrobowych podczas chronicznej ekspozycji na propikonazol zanotowali Li i wsp. (2011a i 2011b). Podobne zmiany obserwowali Sancho i wsp. (2009 i 2010) w trakcie ekspozycji ryb na tebukonazol i tricyklazol, a zwiększona aktywność enzymów utrzymywała się również i w okresie rekonwalescencji w grupie ryb eksponowanych na tricyklazol. Udowodniono także (van der Oost i wsp., 2003), że niektóre substancje toksyczne mogą prowadzić do inhibicji aktywności bądź syntezy obu enzymów. W badaniach własnych notowano również przejściowy spadek aktywności AST i ALT, jednak trudno jednoznacznie stwierdzić czy inhibicja sugerowana przez van der Oost i wsp. (2003) była przyczyną spadku aktywności obu enzymów w badaniach własnych. Aktywność AST i ALT wzrasta zarówno w uszkodzeniu, jak i martwicy hepatocytów i zależy od rodzaju i rozległości ich uszkodzenia. Wzrasta również i w nieuszkodzonych jeszcze hepatocytach, ale z uszkodzoną błoną komórkową. W obserwacjach mikroskopowych hepatocytów (TEM) nie obserwowano tego typu zmian patologicznych i prawdopodobnie przyczyniło się to do wystąpienia przejściowych tylko wahań w aktywności aminotransferaz.

Substancje toksyczne (metale ciężkie, detergenty, pestycydy) stosunkowo łatwo przedostają się z otaczającego środowiska wodnego, poprzez skrzel, do krwi ryb. Stąd skład krwi ryb jest bardzo czułym wskaźnikiem jakości wody (Atamanalp i Yanik, 2014; Drastichová i wsp., 2004; Svobodová i wsp., 2003; Witeska i wsp., 2010; Wojtaszek i wsp., 1992). Przyjmuje się, że wskaźniki hematologiczne mogą być miarodajnym kryterium oceny stanu zdrowotnego ryb (Antychowicz, 2007; Siwicki i wsp., 2007).

Wskaźniki czerwonekrwinkowe reagują na obecność bodźców stresowych u karpia poprzez: wzrost liczby erytrocytów krążących we krwi, wzrost hematokrytu oraz zwiększenie hemoglobiny we krwi. Zmiany te mają wspomagać organizm ryb w zaopatrywaniu w tlen (Antychowicz, 2007; van der Oost i wsp., 2003). Wyniki przeprowadzonych badań własnych (Ryc. 8 - 10; Tab. 10 - 13) wykazały wpływ badanych fungicydów na niektóre parametry czerwonekrwinkowe. W przypadku mankozebu reakcja ze strony układu czerwonekrwinkowego była natychmiastowa, manifestująca się istotnym statystycznie wzrostem parametrów RBC, Ht i Hb w początkowych godzinach ekspozycji, co wydaje się być klasyczną reakcją na obecność stresora w środowisku. Podobne zmiany obserwowano u ryb eksponowanych na tebukonazol, jednak reakcja tych parametrów nie była aż tak znacząca. Następnie, w przypadku ekspozycji na mankozeb i tebukonazol, parametry te ulegały systematycznemu spadkowi, a okres rekonwalescencji pozwolił na powrót RBC i Ht do wartości

zbliżonych do kontrolnych, co wydaje się wskazywać na przywrócenie równowagi po stresie w zakresie wymienionych parametrów. W przypadku stężenia Hb we krwi obserwowano nieco inną sytuację, gdyż wskaźnik ten był statystycznie istotnie niższy od wartości kontrolnej po okresie rekonwalescencji po ekspozycji na mankozeb. Jednocześnie w tym okresie obserwowano statystycznie istotnie zmniejszone wartości MCH i MCHC (Ryc. 12 - 13). Można przypuszczać więc, że narażony organizm nie miał potencjału do wyrównania zawartości hemoglobiny we krwi. Dodatkowym wyjaśnieniem takiej sytuacji jest również obserwacja erytrocytów w rozmazach krwi (Fot. 105). Obserwowano w nich zmienione kształty jąder komórkowych oraz ich hipochromię, a także i dzielące się erytrocyty, co wskazuje na wykorzystywanie mechanizmu kompensacyjnego, nie do końca wyrównującego zarówno liczbę krążących we krwi obwodowej erytrocytów, jak i stężenie Hb. Podobne zmiany patologiczne w erytrocytach (Fot. 108 i 109) i zmiany wartości wskaźników: Hb, MCH i MCHC obserwowano również we krwi ryb narażonych na prochloraz, ale znacznie później (po okresie ekspozycji i rekonwalescencji).

Atamanalp i Yanik (2014) po 3. tygodniowej (z 24-godziennymi interwałami) ekspozycji pstrągów tęczowych na dawkę mankozebu stanowiącą $\frac{1}{2}$ LC₅₀ zanotowali nieznaczny wzrost liczby erytrocytów oraz spadek pozostałych parametrów czerwonekrwinkowych. Jedynie spadek zawartości Hb we krwi oraz MCV wyrażał wartości statystycznie istotne. Taki znaczny spadek zawartości Hb we krwi może znacząco obniżyć zasilanie w tlen różnych tkanek, w wyniku czego może zmniejszyć się tempo przemiany materii. Deficyt Hb może być również spowodowany wzrostem szybkości, z jaką jej cząsteczki są niszczone lub zmniejszeniem tempa jej syntezy. Nieznany jest jak dotąd mechanizm oddziaływania mankozebu na Hb. Odmienna była natomiast reakcja układu czerwonekrwinkowego karasia złocistego eksponowanego na mankozeb. Ht i Hb nie zmieniły się pod wpływem narażenia ryb na toksykant (Kubrak i wsp., 2012). Podobnie chroniczna, 3. tygodniowa ekspozycja na subtoksyczne dawki benomylu nie wpłynęła na Hb we krwi oraz na MCV, MCH i MCHC, a nieznacznemu tylko obniżeniu uległy RBC i Ht (Min i Kang, 2008). Również chroniczne narażenie ryb na propikonazol przyczyniło się do zaburzeń parametrów hematologicznych, manifestując się głównie obniżeniem RBC, Ht i Hb oraz podwyższeniem MCH i MCHC (Li i wsp., 2011b i 2013). Badania własne i innych autorów wskazują na reakcję wskaźników czerwonekrwinkowych ryb na obecność stresora chemicznego w środowisku. Jednak reakcja ta jest bardzo zróżnicowana, niepowtarzalna i trudna do jednoznacznej oceny.

W przypadku parametrów białokrwinkowych karpi (Tab. 13 - 15; Ryc. 14) w trakcie ekspozycji na fungicydy ulegały one zmniejszaniu lub zwiększaniu, w zależności od badanego wskaźnika, ale zmiany te dotyczyły różnych okresów doświadczenia dla różnych fungicydów. WBC najszybciej statystycznie istotnie zwiększyło się u karpi eksponowanych na tebukonazol (po 3. dniach), a w późniejszym okresie ekspozycji - u ryb narażonych na mankozeb i prochloraz. Podobnie, niezależnie od rodzaju fungicydu, zmieniał się udział poszczególnych rodzajów leukocytów. Obserwowano zwiększanie liczby neutrofili, przy jednoczesnym zmniejszaniu liczby limfocytów, już po 24. godzinach ekspozycji karpi na prochloraz i tebukonazol oraz po 14. dniach - na mankozeb. Natomiast ilość monocytów wykazywała różne tendencje zmian, zależne od rodzaju fungicydu. Po okresie rekonwalescencji większość badanych parametrów osiągnęła wartości zbliżone do kontrolnych.

Odmienne niż w badaniach własnych, Atamanalp i Yanik (2014) po 3. tygodniowej (z 24-godzinnyymi interwałami) ekspozycji pstrągów tęczowych na dawkę mankozebu, stanowiącą $\frac{1}{2}$ LC_{50} , zanotowali zmniejszenie liczby leukocytów. Podobne zmiany spadkowe WBC zanotowali Li i wsp. (2011b i 2013) po chronicznej ekspozycji ryb na propikonazol. U karasia złocistego zaobserwowano natomiast limfopenię oraz wzrost ilości neutrofili dojrzałych w wyniku ekspozycji na mankozeb (Kubrak i wsp., 2012).

Wyniki badań innych autorów i własne sugerują wpływ zanieczyszczonego fungicydami środowiska wodnego na wskaźniki białokrwinkowe ryb. Podobnie jak w przypadku parametrów czerwokrwinkowych, reakcja ze strony układu leukocytnego nie wydaje się być swoista. Reakcja badanych parametrów hematologicznych wydaje się zależeć od wielu czynników, między innymi od: rodzaju stosowanego pestycydu, jego stężenia, czasu i warunków ekspozycji, gatunku i masy ciała ryb (Murty, 1986; van der Oost i wsp., 2003). Zastosowane w badaniach własnych fungicydy modyfikują te parametry, jednakże reakcja ta jest bardzo zróżnicowana i niejednoznaczna. Obserwowane zmniejszenie lub zwiększenie wartości wskaźników hematologicznych nie wykazuje jednej wspólnej tendencji zmian. Niemniej jednak wskaźniki hematologiczne wydają się wyraźnie reagować na ekspozycję ryb na czynnik toksyczny, jednak reakcja ta może każdorazowo wyrażać się w bardzo różny, swoisty sposób. Wydaje się, że można przyjąć je jako czułe wskaźniki aktualnego stanu zdrowotnego ryb, a nie ekspozycji na daną substancję toksyczną. Bardziej jednorodne w charakterze były zmiany patologiczne obserwowane w rozmazach krwi obwodowej ryb eksponowanych na badane fungicydy. Obserwowano w nich (Fot. 102 - 113) zniekształcone jądra krwinek i hipochromatyczne jądra erytrocytów, lizę młodych erytrocytów, dzielące się erytrocyty i limfocyty, zniekształcone krwinki. Wymienione zmiany patologiczne świadczą z jednej strony o

destrukcyjnym wpływie badanych związków na elementy morfotyczne krwi, a z drugiej - o mechanizmie kompensacyjnym poprzez amitotyczne podziały komórek. Podobne spostrzeżenia wynikają z badań wpływu substancji toksycznych na ryby innych autorów (Roberts, 2012; Witeska i wsp., 2011), w których obserwuje się głównie anemię i leukemię, krwinki o zaburzonym kształcie i z nieprawidłowymi jądrami komórkowymi i/lub układem chromatyny oraz wakuolami w cytoplazmie, a także hemolizę krwinek.

Ryby są szczególnie wrażliwe na niekorzystne zmiany parametrów środowiska, a te z kolei mogą przyczyniać się do rozwoju zmian patomorfologicznych w ich narządach. Narządem szczególnie na nie podatnym są skrzela, ponieważ są bezpośrednio i wielokrotnie omywane przez zanieczyszczoną wodę. Poza kluczową funkcją wymiany gazowej, są one narządem niezbędnym do utrzymania homeostazy organizmu – odpowiadają za wymianę jonową, utrzymują równowagę kwasowo-zasadową oraz wydalają produkty przemiany materii. Poszczególne funkcje narządu korespondują ze strukturą blaszek oddechowych i nabłonka oddechowego (Bettex-Galland, 1973; Evans i wsp., 2005; Fernandes i wsp., 2007; Olson, 1996; Solid i wsp., 2005; Sundin, 1995 za: Fernandes i wsp., 2007). W badaniach własnych obserwowano zmiany patologiczne w strukturze blaszek oddechowych i nabłonka oddechowego. Manifestowały się one zwiększaniem rozmiarów komórek nabłonkowych i rozszerzeniem naczyń włosowatych z obecnymi w nich licznymi elementami morfotycznymi, co skutkowało naruszeniem konstrukcji podporowej i w konsekwencji - i całej blaszki oddechowej. Pomiędzy blaszkami oddechowymi obecne były duże nacieki komórkowe. W sytuacji stresu u ryb krążące we krwi katecholaminy sprzyjają zwiększonemu dopływowi krwi do blaszek oddechowych. Taka sytuacja może prowadzić do rozszerzenia blaszek, powodując ich wydłużenie i zwiększenie jej powierzchni, co ma służyć zmniejszeniu dystansu pomiędzy krwią i wodą (Fernandes i wsp., 2007). Powyższe zmiany obserwowane w badaniach własnych mogą wynikać z takiego właśnie mechanizmu kompensacyjnego, jak i ewentualnego drażniącego działania fungicydów.

W badaniu toksyczności ostrej przeprowadzonym przez Boran i wsp. (2012) wykazano wpływ kaptanu na pstrągi tęczowe. Stwierdzono hipertrofię komórek nabłonkowych, oddzielenie nabłonka od blaszki oddechowej, nekrozę komórek a także miejscową hiperplazję. Wyżej wymienione zmiany oraz zwiększoną mukosekrecję obserwowali także Schwaiger i wsp. (1998) u ryb pochodzących z zanieczyszczonych strumieni. Wielu autorów (Ba Omar i wsp., 2011; Bothelo i wsp. 2012; Capkin i wsp., 2010; Dutta i wsp., 1996; Jayachandron i Pugazhendy, 2009) opisuje podobne obserwacje jako skutek ekspozycji ryb na bardzo różne pestycydy. Z przeglądu piśmiennictwa i wyników badań własnych wydaje się wynikać, że zmiany

patologiczne rozwijające się wskutek ekspozycji ryb na pestycydy są bardzo podobne. Nie zależą one od rodzaju pestycydu, czy gatunku ryby oraz warunków ekspozycji. Raczej jest to kolejny mechanizm kompensujący niedostatek Hb czy erytrocytów, a wskazujący na niedotlenienie ryb. Opisane zmiany patologiczne w skrzelach wymagają dalszej, wnikliwej analizy.

Wątroba ryb wydaje się być interesującym modelem do badań interakcji między czynnikami środowiskowymi a strukturą i funkcją wątroby. Analiza mikroskopowa wątroby eksponowanych karpia wykazała powstawanie takich zmian patologicznych jak: przekrwienie, miejscowe czy ogniskowe zatarcie struktury przy większych naczyniach krwionośnych, odstawanie trzustki od miększu wątroby i powstawanie centrów CMM. Badając ultrastrukturę hepatocytów karpia eksponowanych na fungicydy obserwowano głównie dużą ilość glikogenu w hepatocytach, obecność pęcherzyków o różnej zawartości, mitochondria z zatartą lub zniszczoną strukturą oraz fragmentację RER. Obecność pęcherzyków zawierających często fragmenty zniszczonych organelli oraz komórek i centrów MM wydaje się świadczyć o nasileniu procesu "uprzątnięcia" i regeneracji w hepatocytach.

Plastyczność morfologii wątroby ryb wywołanej czynnikami środowiskowymi była stwierdzana przez autorów (Ferreira i wsp., 2010; Hejduk i Svobodová, 1980; van Leeuwen i wsp., 1986). Według wielu autorów (Biagiatti-Risbourg i Bastide, 1995; Capkin i wsp., 2010; Ferreira i wsp., 2010; Oulmi i wsp., 1995; Poleksić i Karan, 1999) ekspozycja różnych gatunków ryb na bardzo różne pestycydy była przyczyną przekrwienia, zastoju żółci, wakuolizacji i nekrozy narządu. W hepatocytach zaś obserwowano małą ilość RER i jej fragmentację, reorganizację chromatyny w jądrach komórkowych, obecność bądź brak glikogenu czy uszkodzenie błon komórkowych. Czasem obecne były też krople tłuszczu reorganizujące hepatocyt.

Zmiany patologiczne w wątrobie opisywane przez wymienionych autorów oraz obserwacje własne wskazują na podatność narządu na uszkodzenia spowodowane zanieczyszczeniem wód powierzchniowych pestycydami. Charakter zmian, ich nasilenie oraz regeneracja narządu wydają się zależeć od rodzaju pestycydu i jego stężenia, czasu ekspozycji, gatunku ryb i od parametrów środowiska, a także podatności osobniczej, chociaż obserwowane w badaniach własnych zmiany patologiczne to przede wszystkim zaburzona struktura mitochondriów, niezależnie od rodzaju fungicydu.

Nerka tułowiowa ryb odgrywa decydującą rolę w usuwaniu z organizmu metabolitów ksenobiotyków. W badaniach własnych obserwowano najczęściej zmiany w nabłonku

kanalików nerkowych, a w komórkach tych - zatarcie struktury mitochondriów, fragmentację RER i w okolicy rąbka szczoteczkowego obecność licznych fragmentów błonowych. W strukturze nerki tułowiowej ryb znajduje się również tkanka krwiotwórcza. Wpływ fungicydów na tę tkankę manifestował się początkowym jej rozplemem, a następnie rozluźnieniem jej podścieliska łącznotkankowego i odseparowaniem się od części wydalniczej. Komórki hematopoetyczne były zmienione patologicznie pod względem kształtu, struktury oraz często ich jąder.

W dostępnej literaturze rzadko ocenia się wpływ fungicydów na nerkę tułowiową ryb. Obserwacje innych autorów wskazują na wpływ różnych pestycydów na wymieniony narząd (Capkin i wsp., 2010; Gomez i wsp., 1998; Oulmi i wsp., 1995; Poleksić i wsp. 1999). Najczęściej obserwowano: degenerację komórek kanalików nerkowych, zniekształcony kłębuszek z rozszerzoną przestrzenią moczową, zwiększoną ilość CMM, ogniskową nekrozę oraz degenerację tkanki krwiotwórczej. W komórkach nabłonkowych kanalików nerkowych obserwowano wzrost wielkości jądra i obecnej w nim heterochromatyny, proliferację aparatu Golgiego, reorganizację RER i jej fragmentację, zmniejszenie ilości mitochondriów oraz peroksosomów, a także występowanie atypowych lizosomów. W części krwiotwórczej niektóre granulocyty miały jasne elektronowo granule.

Wydaje się, że wpływ pestycydów, w tym fungicydów, na strukturę nerki tułowiowej ryb jest bezsprzeczny, a charakter, nasilenie zmian i czas regeneracji zależy od rodzaju pestycydów, jego stężenia i wrażliwości osobniczej.

Na podstawie przeglądu literatury i wyników badań własnych wydaje się, że efekty końcowe wpływu badanych fungicydów i innych pestycydów na organizm ryb są trudne do przewidzenia. Nie wykazują charakterystycznych cech i zależą od bardzo wielu czynników, stąd trudno doszukać się typowych biomarkerów ekspozycji.

V. WNIOSKI

Z przeprowadzonych badań wynikają następujące wnioski:

1. Ekspozycja karpia na subtoksyczne stężenia wybranych fungicydów jest przyczyną dłużej utrzymujących się zmian patologicznych w strukturze badanych narządów ryb, które manifestują się:

- w skrzelach - hiperplazją i hipertrofią blaszek oddechowych oraz rozszerzeniem naczyń krwionośnych;
- w wątrobie - zatarciem struktury mitochondriów i fragmentacją RER oraz odseparowaniem trzustki od mięszu wątroby;
- w nerce - zatarciem struktury kanalików nerkowych, oddzieleniem części wydalniczej od krwiotwórczej oraz zmianami w komórkach hematopoetycznych.

2. Ekspozycja karpia na subtoksyczne stężenia wybranych fungicydów wywołuje reakcję stresową w organizmie eksponowanych ryb. Wyraża się ona przejściowymi zmianami w zakresie badanych wskaźników metabolicznych i hematologicznych.

3. Powrót wskaźników metabolicznych do wartości kontrolnych wskazuje na uruchomienie procesów adaptacyjnych, a obecność CMM i pęcherzyków z różną zawartością w badanych narządach mięsowych świadczy o toczącym się procesie naprawy i regeneracji w organizmie karpia.

4. Zastosowanie w ocenie toksycznego wpływu fungicydów na organizm karpia wielu parametrów pozwala ocenić wpływu danego fungicydu na cały organizm ryb.

VI. STRESZCZENIE

Fungicydy są ważną grupą środków ochrony roślin stanowiącą drugą, pod względem ilości sprzedawanych preparatów, klasę pestycydów. Szeroka skala stosowania tych związków stwarza potencjalne niebezpieczeństwo wystąpienia niekorzystnych skutków dla środowiska i żyjących w nim organizmów. Fungicydy dostają się do wód powierzchniowych w sposób niezamierzony, głównie w wyniku znoszenia kropli cieczy opryskowej w czasie wykonywania zabiegów agrochemicznych oraz na drodze spływu powierzchniowego. Pomimo niewielkiej toksyczności dla ssaków, fungicydy stanowią realne zagrożenie dla fauny wodnej, w tym ryb. Celem pracy było zbadanie wpływu wybranych, często stosowanych w rolnictwie fungicydów na organizm karpia.

Badania zostały wykonane na rybach z gatunku karp (*Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758), o masie ciała 60 ± 10 g, w warunkach akwaryjnych. Ryby podzielono na trzy grupy doświadczalne (eksponowane na wybrane fungicydy) i jedną kontrolną. Ryby eksponowano przez okres 14 dni na mankozeb, prochloraz i tebukonazol w stężeniu 1 mg l^{-1} , 1 mg l^{-1} i $2,5 \text{ mg l}^{-1}$, odpowiednio. Następnie ryby przeniesiono do czystej wody na 30-dniowy okres rekonwalescencji. Po uprzedniej dekapitacji ryb, pobierano próbki narządów po 3. dniach (skrzela) i 14. dniach ekspozycji (skrzela, wątrobę i nerkę tułowiową) oraz po okresie rekonwalescencji (skrzela, wątrobę i nerkę tułowiową). Przyżyciowo próbki krwi obwodowej pobierano do analiz wielokrotnie w trakcie trwania ekspozycji oraz po 30. dniach rekonwalescencji. Wykonano szereg oznaczeń parametrów metabolicznych i hematologicznych. W osoczu krwi oznaczono stężenia: kortyzolu, glukozy, trójglicerydów oraz białka ogólnego. Ponadto oznaczono aktywność aminotransferazy asparaginianowej (AST) i alaninowej (ALT). We krwi pobranej z serca zwierząt oznaczono liczbę krwinek czerwonych (RBC) i białych (WBC), stężenie hemoglobiny (Hb), hematokryt (Ht) oraz wyliczono wskaźniki czerwonek: MCV, MCH, MCHC. Natomiast w badaniu mikroskopowym oceniono rozmazy krwi obwodowej ryb oraz wyznaczono leukogramy. Uzyskane wyniki poddano analizie

statystycznej przy użyciu programu STATISTICA 10.0 PL. W ocenie statystycznej przyjęto poziom istotności statystycznej $\alpha = 0,05$.

Na podstawie wyników badań wykazano przejściowy na ogół wpływ wybranych fungicydów na większość badanych wskaźników fizjologicznych w okresie doświadczalnym. Najistotniejsze zmiany obserwowano w przypadku stężenia glukozy i trójglicerydów. Wykazano również wpływ wybranych fungicydów, w subtoksycznych ich stężeniach, głównie na: liczbę krwinek czerwonych i białych, poziom hematokrytu oraz stężenie hemoglobiny. Przeprowadzone badania aktywności AST i ALT oraz badania histopatologiczne wątroby wykazały, że wybrane fungicydy, w zastosowanych stężeniach, nie wykazują wyraźnego działania hepatotoksycznego. W hepatocytach obserwowano wpływ badanych fungicydów na mitochondria i RER komórek.

W oparciu o uzyskane wyniki obserwacji zmian patologicznych wykazano, że fungicydy wpływają destrukcyjnie na strukturę blaszek oddechowych listka skrzelowego, a przede wszystkim na komórki nabłonka oddechowego. Działanie fungicydów na tkankę manifestowało się obrzmieniem komórek nabłonka oddechowego i zanikiem w nich mikrofałd oraz znacznym rozszerzeniem naczyń włosowatych. W nerce tułowiowej obserwowano wpływ fungicydów przede wszystkim na nabłonek kanalików nerkowych w formie obrzmienia komórek. W tkance krwiotwórczej nerki tułowiowej obserwowano rozluźnienie podścieliska łącznotkankowego i destrukcję pojedynczych komórek hematopoetycznych.

Ekspozycja ryb na badane fungicydy wydaje się być przyczyną przejściowych zmian fizjopatologicznych w organizmie karpia, niezależnie od zastosowanego fungicydu. Wpływ pestycydów na zmiany poszczególnych parametrów metabolicznych, hematologicznych i patomorfologicznych oraz czas ich utrzymywania się wydają się zależeć od rodzaju zastosowanego fungicydu.

SUMMARY

Toxicological evaluation of fungicides on common carp.

Fungicides are an important group of plant protection, constituting a second class of pesticides in terms of quantities sold preparations. As they are used in large amounts in agriculture, the evaluation of their toxic effects is of major concern to environmental safety. Fungicides may enter the aquatic environment via drops drift and runoff. Fungicides are usually non-toxic or mild toxic to mammals; however they can produce toxic effects in aquatic organisms, including fish. The aim of the present study was to investigate the toxic effect of chosen fungicides to common carp.

The experiments were conducted on individuals of common carp (*Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758), with a mean weight of 60 ± 10 g in aquaria condition. Fish were divided into 3 equinumerous experimental groups and the control group. Fish were exposed for 14 days on mancozeb, prochloraz and tebuconazole in following concentrations: 1 mg l^{-1} , 1 mg l^{-1} and $2,5 \text{ mg l}^{-1}$, respectively. After that, fish were transferred to water without fungicides for 30 days of recovery period. Samples of tissue were collected from fish after 3 days (gill), 14 days of exposure (gill, liver and posterior kidney) and the end of recovery period (gill, liver and posterior kidney). Peripheral blood of treated fish was collected many times during exposure and also at the end of recovery period. Following biomarkers of metabolism were measured: glucose, triglycerides, total proteins, activities of and aspartate aminotransferase (AST) alanine aminotransferase (ALT). As well as hematological parameters such as the total number of erythrocytes (RBC), total number of leukocytes (WBC), hematocrit value (Hct), total hemoglobin concentration (Hb), mean corpuscular hemoglobin (MCH), mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC) and leukograms were determined at once. Microscopy study of blood cell were also performed. Results were analyzed at the level of significance $\alpha = 0.05$ using STATISTICA 10 program.

Exposure to fungicides affected physiological parameters of common carp; however it was a temporary state. The main changes were determined in glucose and

triglycerides fluctuations as well as RBC, WBC, Hct and Hb alternations. Results of AST and ALT activities and liver histopathology showed that chosen fungicides are not acting strictly hepatotoxic. In hepatocytes of treated fish there were observed disruptions of RER and mitochondria structure. Based on the results of gill lesions, it has been determined destruction of the gill epithelium and the lamellae structure. The most adverse effect of fungicides were the hypertrophy, disruption of pavement cells microridges and capillary dilatation. At kidney the prominent effect was an enlargement of renal epithelial, dysfunction of hematopoietic structure and destruction of hematopoietic cells.

The fish exposure to tested fungicides seems to cause temporary changes on common carp physiology, regardless of the kind of fungicides. The effects of pesticides on changes and the time of their persistence in metabolic or hematological parameters alternations and pathomorphology seem to depend on the type of fungicide.

Spis fotografii:

Fot. 1. Fragment listka skrzelowego karpia grupy kontrolnej wraz z blaszkami oddechowymi (BO). Widoczne kapilary wypełnione krwinkami (K). Nacieki komórkowe pomiędzy blaszkami oddechowymi (NK).....	30
Fot. 2. Fragment listka skrzelowego z blaszkami oddechowymi karpia po 3. dniowej ekspozycji na mankozeb. Kapilary (K) wypełnione elementami morfotycznymi. Nacieki komórkowe (NK) pomiędzy blaszkami oddechowymi (BO) i obecność komórek chlorkowych (KCH). Destrukcja nabłonka oddechowego (D) na końcach blaszek.	31
Fot. 3. Fragment listka skrzelowego z blaszkami oddechowymi (BO) karpia po 14. dniowej ekspozycji na mankozeb. Nieco rozchwiana struktura podporowa (strzałki), przekrwienie blaszek, destrukcja nabłonka oddechowego (D).....	32
Fot. 4. Fragment listka skrzelowego z blaszkami oddechowymi karpia po okresie rekonwalescencji po ekspozycji na mankozeb. Bardzo duże nacieki komórkowe (NK) pomiędzy blaszkami oddechowymi (BO). Rozszerzone i uszkodzone końce blaszek oddechowych (D).....	32
Fot. 5. Fragment listka skrzelowego z blaszkami oddechowymi karpia po 3. dniowej ekspozycji na prochloraz. Silne przekrwienie narządu rujnujące strukturę blaszek (BO), odstawanie nabłonka oddechowego od struktury podporowej (strzałki), miejscowa destrukcja blaszek oddechowych (D).	33
Fot. 6. Fragment listka skrzelowego z blaszkami oddechowymi karpia po 14. dniowej ekspozycji na prochloraz. Rozchwianie struktury podporowej (strzałki) blaszek oddechowych (BO) oraz miejscowa ich destrukcja (D).	34
Fot. 7. Fragment listka skrzelowego z blaszkami oddechowymi karpia po okresie rekonwalescencji po ekspozycji na prochloraz. Rozszerzone końce blaszek (BO), częściowa destrukcja nabłonka oddechowego (D) i rozchwiana struktura podporowa(strzałki).....	34
Fot. 8. Fragment listka skrzelowego z blaszkami oddechowymi karpia po okresie rekonwalescencji po ekspozycji na prochloraz. Obrzmienie (strzałki) i uszkodzenie nabłonka oddechowego blaszek (BO). Rozszerzone i wypełnione elementami morfotycznymi kapilary (K).	35
Fot. 9. Fragment listka skrzelowego z blaszkami oddechowymi karpia po 3. dniowej ekspozycji na tebukonazol. Rozchwiana struktura (strzałki) oraz częściowa destrukcja (D) odcinków końcowych blaszek oddechowych (BO). Obecne pojedyncze komórki chlorkowe (KCH).	35
Fot. 10. Fragment listka skrzelowego z blaszkami oddechowymi karpia po 14. dniowej ekspozycji na tebukonazol. Obrzmiałe końce blaszek (BO) z destrukcją nabłonka oddechowego (D) i rozszerzonymi kapilarami (K).....	36
Fot. 11. Fragment listka skrzelowego z blaszkami oddechowymi karpia po okresie rekonwalescencji po ekspozycji na tebukonazol. Obecność różnej wielkości nacieków komórkowych (NK) pomiędzy blaszkami (BO). Rozchwiana struktura podporowa blaszek (strzałka), obrzmienie i destrukcja nabłonka oddechowego (D).....	37
Fot. 12. Elektronogramy nabłonka oddechowego blaszki oddechowej karpia grupy kontrolnej. Ścisłe na ogół przyleganie do siebie różnych komórek blaszki. Obecna komórka chlorkowa (KCH) i granulocyt (G). 9900 x i 8200 x.	38
Fot. 13. Elektronogramy nabłonka oddechowego blaszki oddechowej karpi grupy kontrolnej. A. Komórka śluzowa (KŚ). 6000 x. B. Komórka chlorkowa (KCH) z licznymi mitochondriami (M). 11500 x.	39

Fot. 14. Elektronogram blaszki oddechowej karpia grupy kontrolnej. Widoczne komórki nabłonkowe (NO) ściśle przylegające do komórki podporowej (KP) i kapilary (K). 6000 x.....	40
Fot. 15. Elektronogramy blaszek oddechowych karpia po 3. dniowej ekspozycji na mankozeb. Rozluźnienie struktury blaszki. Widoczne: zniekształcone i ulegające fragmentacji komórki nabłonka oddechowego (NO) oraz komórki podporowe (KP), pojedynczy granulocyt (G) i rozszerzone kapilary (K) ze zmienionymi patologicznie krwinkami. 8200 x.....	41
Fot. 16. Elektronogram nabłonka oddechowego karpia po 3. dniowej ekspozycji na mankozeb. W rozluźnionej strukturze nabłonka oddechowego (NO) widoczna komórka śluzowa (KŚ) wypełniona wydzieliną i neutrofil (N). 8200 x.....	41
Fot. 17. Elektronogram blaszki oddechowej karpia po 14. dniowej ekspozycji na mankozeb. Rozluźnienie struktury blaszki, fragmentacja i złuszczenie się komórek nabłonkowych (NO), zniszczona komórka podporowa (KP), rozszerzone kapilary (K) wypełnione zmienionymi patologicznie krwinkami. 6000 x.....	42
Fot. 18. Elektronogram nabłonka blaszki oddechowej karpia po 14. dniowej ekspozycji na mankozeb. Zwarta struktura nabłonka z obecnymi komórkami chlorkowymi (KCH) przy jego powierzchni oraz granulocytem obojętnochłonnym (G). W komórce nabłonkowej obecne pojedyncze pęcherzyki z fragmentami organelli (P). 6000 x.....	43
Fot. 19. Elektronogramy nabłonka blaszki oddechowej karpia po rekonwalescencji po ekspozycji na mankozeb. Widoczna zwarta i rozluźniona struktura tkanki, w komórkach nabłonka obecne pęcherzyki (P), a pomiędzy nimi komórki chlorkowe (KCH). 6000 x.....	44
Fot. 20. Elektronogram blaszki oddechowej karpia po okresie rekonwalescencji po ekspozycji na mankozeb. Widoczne pojedyncze granulocyty (G) w rozluźnionej strukturze nabłonka (NO). 4200 x.....	44
Fot. 21. Elektronogram nabłonka blaszki oddechowej karpia po 3. dniowej ekspozycji na prochloraz. W rozluźnionej strukturze nabłonka oddechowego (NO) obecne komórki śluzowe (KŚ) w różnej fazie tworzenia śluzu. 4200 x.....	45
Fot. 22. Elektronogramy blaszek oddechowych karpia po 3. dniowej ekspozycji na prochloraz. Rozluźnienie struktury blaszek, miejscowe odstawanie komórek nabłonka oddechowego (NO) od rusztowania podporowego. Zmienione patologicznie i przemieszczone komórki podporowe (KP). Silnie rozszerzone kapilary (K) z licznymi, obrzmiałymi i prawidłowymi erytrocytami (E). 2550 x i 6000 x.....	46
Fot. 23. Elektronogram blaszki oddechowej karpia po 14. dniowej ekspozycji na prochloraz. Kapilary (K) rozszerzone i wypełnione obrzmiałymi erytrocytami (E). 9900 x.....	47
Fot. 24. Elektronogram nabłonka oddechowego karpia po 14. dniowej ekspozycji na prochloraz. Zwarta struktura nabłonka (NO); pomiędzy komórkami liczne komórki śluzowe (KŚ) w różnym stadium tworzenia śluzu. 2550 x.....	47
Fot. 25. Elektronogramy nabłonka oddechowego karpia po rekonwalescencji po ekspozycji na prochloraz. Silnie wyrażone i umiarkowane rozluźnienie struktury, destrukcja pojedynczych komórek nabłonkowych (D). 9900 x i 6000 x.....	48
Fot. 26. Elektronogramy nabłonka oddechowego karpia po rekonwalescencji po ekspozycji na prochloraz. W komórkach chlorkowych widoczne aparaty Golgiego (AG) wraz z pęcherzykami i mitochondriami (M) o prawidłowej i zatartej strukturze. 16500 x i 9900 x.....	48
Fot. 27. Elektronogramy blaszek oddechowych karpia po 3. dniowej ekspozycji na tebukonazol. Rozluźnienie struktury blaszek, obecny w nabłonku granulocyt (G) oraz komórka śluzowa (KŚ),	

rozszerzone i wypełnione krwinkami kapilary (K) rujnące strukturę podporową blaszki oddechowej. 6000 x i 4200 x.....	49
Fot. 28. Elektronogram blaszki oddechowej karpia po 3. dniowej ekspozycji na tebukonazol. Zwarta struktura nabłonka oddechowego (NO). Rozszerzone i połączone kapilary (K) z obecnymi w nich prawidłowymi i zmienionymi patologicznie erytrocytami (E). 2550 x.....	50
Fot. 29. Elektronogramy nabłonka oddechowego karpia po 14. dniowej ekspozycji na tebukonazol. Zwarta struktura nabłonka (NO), obecne granulocyty (G), pojedyncza komórka śluzowa (KŚ) oraz komórka chlorkowa (KCH). 6000 x.....	50
Fot. 30. Elektronogram blaszki oddechowej karpia po 14. dniowej ekspozycji na tebukonazol. Rozszerzone i szczelnie wypełnione elementami morfotycznymi kapilary (K) otoczone zwartym nabłonkiem oddechowym (NO). 6000 x.....	51
Fot. 31. Elektronogramy: blaszki oddechowej i nabłonka karpia po rekonwalescencji po ekspozycji na tebukonazol. Tkanka nabłonkowa (NO) o zwartej budowie, z licznymi granulocytami (G), komórkami śluzowymi (KŚ) i chlorkowymi (KCH). Kapilary (K) silnie rozszerzone i wypełnione obrzmiałymi erytrocytami (E). 4200 x.....	52
Fot. 32. Fragment listka skrzelowego z blaszkami oddechowymi karpia grupy kontrolnej. A Ułożenie blaszek oddechowych (BO) na listku skrzelowym (PVC). 500 x. B. Widoczne komórki nabłonka oddechowego (NO) i komórki PVC powierzchni bocznej. Niewielkie nacieki komórkowe (NK) pomiędzy blaszkami oddechowymi. 1500 x.....	53
Fot. 33. Fragment blaszki oddechowej karpia grupy kontrolnej. Widoczne komórki nabłonka oddechowego (NO) z ich charakterystycznymi mikrofałdami. 5000 x.....	54
Fot. 34. Komórki PVC nabłonka bocznej powierzchni listka skrzelowego karpia grupy kontrolnej. Charakterystyczny układ mikrofałd na ich powierzchni. Niewielkie ilości śluzu na nabłonku (Ś). 3500 x.....	54
Fot. 35. Fragment listka skrzelowego z blaszkami oddechowymi karpia po 3. dniach ekspozycji na mankozeb. Pogrubione blaszki oddechowe (BO) i zmniejszone przestrzenie międzyblaszkowe. Blaszki oddechowe pokryte dużą ilością śluzu (Ś). 750 x.....	55
Fot. 36. Fragment blaszki oddechowej karpia po 3. dniach ekspozycji na mankozeb. W komórkach nabłonkowych widoczne miejsca obrzmienia (O), utraty mikrofałd i sfałdowania błon komórkowych. 3500 x.....	56
Fot. 37. Blaszki oddechowe karpia po 14. dniowej ekspozycji na mankozeb. Zmienione patologicznie komórki nabłonkowe: z nielicznymi lub pozbawione mikrofałd, o zwiększonych rozmiarach, płaskie lub ze sfałdowaną i wygrzbieconą powierzchnią (strzałki). 750 x.....	57
Fot. 38. Fragment blaszki oddechowej karpia po 14. dniowej ekspozycji na mankozeb. Różny stopień obrzmienia komórek nabłonka (O). 5000 x.....	57
Fot. 39. Fragment powierzchni bocznej listka skrzelowego karpia po 14. dniowej ekspozycji na mankozeb. Zapadanie się i wygrzbiecanie powierzchni komórek PVC w skutek ich obrzmienia (O). Niewielkie zaburzenie układu mikrofałd. 3500 x.....	58
Fot. 40. Blaszki oddechowe karpia po okresie rekonwalescencji po ekspozycji na mankozeb. Zróżnicowany kształt komórek nabłonka oddechowego (NO) z różnym stopniem utraty mikrofałd. 1500 x.....	59
Fot. 41. Fragment powierzchni bocznej listka skrzelowego karpia po okresie rekonwalescencji po ekspozycji na mankozeb. Pole mukosekrecyjne z licznymi komórkami śluzowymi (KŚ). 350 x.....	59

Fot. 42. Fragment powierzchni bocznej listka skrzelowego karpia po okresie rekonwalescencji po ekspozycji na mankozeb. Pofałdowana powierzchnia komórek PVC. 3500 x.....	60
Fot. 43. Fragment listka skrzelowego z blaszkami oddechowymi karpia po 3. dniach ekspozycji na prochloraz. Obecność dużych nacieków komórkowych (NK) między blaszkami (BO) i całkowity brak przestrzeni międzyblaszkowych. 350 x.	61
Fot. 44. Blaszkki oddechowe karpia po 3. dniach ekspozycji na prochloraz. Obecny śluz (Ś) pokrywający blaszki (BO). 750 x.	61
Fot. 45. Blaszkki oddechowe karpia po 14. dniach ekspozycji na prochloraz. Wydłużone końce blaszek; zróżnicowane kształty i wielkość komórek nabłonka oraz obecność w nich pojedynczych mikrofałd lub ich brak (NO). 1000 x.	62
Fot. 46. Fragment powierzchni bocznej listka skrzelowego karpia po 14. dniach ekspozycji na prochloraz. Pofałdowana powierzchnia nabłonka i różne kształty komórek PVC. 3500 x.	63
Fot. 47. Fragment powierzchni bocznej listka skrzelowego karpia po 14. dniach ekspozycji na prochloraz. Liczne komórki śluzowe (KŚ) u podstaw blaszek oddechowych (BO) w różnej fazie aktywności mukosekrecyjnej. 1000 x.....	63
Fot. 48. Blaszkki oddechowe karpia po okresie rekonwalescencji po ekspozycji na prochloraz. Obrzmiałe i lekko falujące się blaszki (BO) oraz obecne na nich powiększone, płaskie i pozbawione mikrofałd komórki nabłonka oddechowego (strzałki). 750 x.	64
Fot. 49. Fragment listka skrzelowego karpia po okresie rekonwalescencji po ekspozycji na prochloraz. Granica pomiędzy podstawą blaszek oddechowych (BO) i powierzchnią boczną listka. Widoczny naciek komórkowy (NK) między blaszkami oraz płaskie, pozbawione mikrofałd komórki PVC. 2000 x.	64
Fot. 50. Fragment powierzchni bocznej listka skrzelowego karpia po okresie rekonwalescencji po ekspozycji na prochloraz. Różne położenie komórek PVC w strukturze nabłonka. 5000 x. ...	65
Fot. 51. Blaszkki oddechowe karpia po 3. dniach ekspozycji na tebukonazol. A. Obrzmiałe końce niektórych blaszek (BO) oraz obecne przestrzenie międzyblaszkowe. 1000 x. B. Zróżnicowana powierzchnia komórek nabłonka oddechowego (NO) i pofałdowanie ich błon komórkowych (BK). 5000 x.	66
Fot. 52. Fragment powierzchni bocznej listka skrzelowego karpia po 3. dniach ekspozycji na tebukonazol. Wgłębione komórki PVC proksymalnej części listka. 5000 x.....	66
Fot. 53. Blaszkki oddechowe karpia po 14. dniach ekspozycji na tebukonazol. Wydłużone końce blaszek (BO), zmienione kształty komórek nabłonkowych i brak w nich charakterystycznych mikrofałd. 750 x.	67
Fot. 54. Fragmenty powierzchni bocznej listka skrzelowego karpia po 14. dniach ekspozycji na tebukonazol. A. Różne położenie komórek PVC w strukturze nabłonka oddalonego od blaszek. B. Różny wygląd komórek PVC w okolicy podstawy blaszek oddechowych oraz utrata charakterystycznego wzoru mikrofałd. 3500 x.	68
Fot. 55. Fragment listka skrzelowego z blaszkami oddechowymi karpia po okresie rekonwalescencji po ekspozycji na tebukonazol. A. Wydłużone końce i nieznaczne sfalowanie blaszek oddechowych (BO). 350 x. B. Sfalowanie powierzchni komórek nabłonka oddechowego (NO), brak mikrofałd. 3500 x.	69
Fot. 56. Fragment powierzchni bocznej listka skrzelowego karpia po okresie rekonwalescencji po ekspozycji na tebukonazol. Komórki PVC z charakterystycznymi mikrofałdami, nieznaczne różnice w położeniu komórek w strukturze nabłonka. 5000 x.	70

Fot. 57. Wątroba karpia grupy kontrolnej. Widoczna budowa komórkowa, duże naczynie krwionośne (NK) oraz naczynia sinusoidalne (NS). 400 x.....	71
Fot. 58. Wyspa trzustkowa (T) w mięszu wątroby karpia grupy kontrolnej. W pęcherzykach wydzielniczych ziarna zymogenu (ZZ). 200 x.....	72
Fot. 59. Wątrobotrzustka karpia po 14. dniowej ekspozycji na mankozeb. Widoczna zwarta budowa komórkowa części wątrobowej i trzustkowej. W części wątrobowej rozszerzone naczynia sinusoidalne (NS) oraz miejscowe zatarcie jej struktury (Z). Wyspa trzustkowa (T) ogniskowo oddzielona od części wątrobowej, z widocznym naczyniem krwionośnym (NK), pęcherzykami wydzielniczymi z licznymi ziarnami zymogenu (ZZ) oraz miejscowe zatarcie struktury trzustki i duże CMM. 400 x.	73
Fot. 60. Wątrobotrzustka karpia po okresie rekonwalescencji po ekspozycji na mankozeb. W części wątrobowej widoczne komórki MM i CMM oraz wakuole (W). Różnobarwność narządu. 400 x.	73
Fot. 61. Wątrobotrzustka karpia po 14. dniowej ekspozycji na prochloraz. Rozszerzenie naczyń sinusoidalnych (NS), miejscowe zatarcie struktury komórkowej (Z) i liczne wakuole (W) w mięszu wątroby. 400 x.....	74
Fot. 62. Wątrobotrzustka karpia po 14. dniowej ekspozycji na prochloraz. Przekrwienie narządu. Oddzielenie wyspy trzustkowej (T) od mięszu wątroby, miejscowe zatarcie struktury wątroby i trzustki (Z). Pęcherzyki wydzielnicze z licznymi ziarnami zymogenu (ZZ) i CMM w trzustce. 400 x.	74
Fot. 63. Wątrobotrzustka karpia po okresie rekonwalescencji po ekspozycji na prochloraz. Przekrwienie narządu i oddzielenie wyspy trzustkowej od mięszu wątroby. Ogniskowe zatarcie struktury wątroby i trzustki (Z). Duże CMM w trzustce. 400 x.	75
Fot. 64. Wątrobotrzustka karpia po 14. dniowej ekspozycji na tebukonazol. Oddzielenie wyspy trzustkowej (T) od mięszu wątroby, ogniskowa destrukcja hepatocytów i komórek trzustki (D). Naczynie krwionośne trzustki wypełnione krwinkami (NK) i obecne pojedyncze CMM. 400 x.	76
Fot. 65. Wątrobotrzustka karpia po okresie rekonwalescencji po ekspozycji na tebukonazol. Oddzielenie wyspy trzustkowej (T) od mięszu wątroby. W mięszu narządu widoczne rozszerzone naczynia sinusoidalne (NS), wakuole (W) oraz miejsca zatarcia struktury (Z); CMM w trzustce. 400 x.	76
Fot. 66. Elektronogram hepatocytu karpia grupy kontrolnej: centralnie ułożone jądro komórkowe (JK) otoczone RER. Liczne mitochondria (M) z grzebieniami, aparat Golgiego i pęcherzyki wydzielnicze (AG). oraz bardzo liczne ziarna glikogenu (G). 7000 x.	77
Fot. 67. Elektronogram hepatocytów karpia grupy kontrolnej: pole sitowe (PS) z mitochondriami (M) i RER. 9900x.	78
Fot. 68. Elektronogram hepatocytu karpia po 14. dniowej ekspozycji na mankozeb. Widoczne jądro komórki z nieprawidłowo rozmieszczoną chromatyną (JK), obrzmiałe i z zatartą strukturą mitochondria (M) oraz rozfragmentowana miejscami RER. Liczne ziarna glikogenu (G). 5600 x.	79
Fot. 69. Elektronogram hepatocytu karpia po okresie rekonwalescencji po ekspozycji na mankozeb: widoczne prawidłowe jądro komórkowe (JK), mitochondria (M) z różnym stopniem zatarcia struktury, krótkie fragmenty RER, pęcherzyki o zróżnicowanej zawartości (P), aparat Golgiego (AG) z licznymi cysternami przy polu sitowym (PS). 8000 x.....	80
Fot. 70. Elektronogram hepatocytów karpia po okresie rekonwalescencji po ekspozycji na mankozeb - liczna i pofragmentowana RER z ogniskowo rozmytą strukturą (Z) i poszerzonymi	

przestrzeniami między błonami, nieprawidłowe jądro komórkowe (JK) oraz mitochondria (M) prawidłowe i o zmienionej strukturze , ciemne elektronowo pęcherzyki (P). 11500x.	80
Fot. 71. Elektronogramy hepatocytów karpia po 14. dniowej ekspozycji na prochloraz. A. Widoczne jądro komórkowe (JK) z jasną elektronowo chromatyną, liczne ziarna glikogenu (G), pofragmentowana RER w okolicy jądra komórkowego i mitochondriów. Mitochondria z zatartą strukturą 10000 x; B. Mitochondria (M) obrzmiałe i z uszkodzoną strukturą. 14000 x.	82
Fot. 72. Elektronogram hepatocytu karpia po okresie rekonwalescencji po ekspozycji na prochloraz. Widoczne: obrzmiałe mitochondria (M), z zatartą lub destrukcją struktury wewnętrznej, fragmentacja RER i jej odstawanie od mitochondriów, ogniskowa liza cytoplazmy (L), pęcherzyk o zróżnicowanej zawartości (P), liczne ziarna glikogenu (G). 18000 x.	83
Fot. 73. Elektronogramy hepatocytów karpia po 14. dniowej ekspozycji na tebukonazol. Widoczne: prawidłowe i nieprawidłowe jądra komórkowe (JK) i mitochondria (M), zubożenie cytoplazmy w organella, krople tłuszczu (T) i pęcherzyki o zróżnicowanej gęstości elektronowej i zawartości (P). 8000 x.	84
Fot. 74. Elektronogramy hepatocytów karpia po okresie rekonwalescencji po ekspozycji na tebukonazol. A. Widoczne prawidłowe jądro komórkowe (JK), mitochondria (M) z zatartą strukturą, pofragmentowana RER. 12500 x; B. Komórki MM tworzące CMM. 8000 x.	85
Fot. 75. Nerka tułowiowa karpia grupy kontrolnej. Część wydalinicza z kanalikami nerkowymi (KN) i część krwiotwórcza (TK) z komórkami hematopoetycznymi. Obecne pojedyncze komórki MM.	86
Fot. 76. Nerka tułowiowa karpia po 14. dniowej ekspozycji na mankozeb. Obrzmienie komórek nabłonkowych kanalików nerkowych (KN) i płyn w ich świetle, wypełnione elementami morfotycznymi ciała nerkowe (CN) i miejscowo uszkodzona torebka Bowmana. Luźne utkanie części krwiotwórczej (TK) i obecność w niej komórek MM.	87
Fot. 77. Nerka tułowiowa karpia po okresie rekonwalescencji po ekspozycji na mankozeb. Kanaliki nerkowe (KN): z obrzmiałymi komórkami nabłonka i światłem wypełnionym płynem z uszkodzoną strukturą oraz otoczone naciekiem komórkowym (NK). Silny rozplam tkanki krwiotwórczej (TK), obecne w niej komórki MM.	88
Fot. 78. Nerka tułowiowa karpia po okresie rekonwalescencji po ekspozycji na mankozeb: centrum melanomakrofagowe (CMM) oraz ciała szkliste (CS) w części krwiotwórczej (TK). Ogniskowe rozrzedzenie podścieliska łącznotkankowego tkanki krwiotwórczej.	88
Fot. 79. Nerka tułowiowa karpia po 14. dniowej ekspozycji na prochloraz. Kanaliki nerkowe z zatartą lub zniszczoną strukturą nabłonka i światłem wypełnionym płynem (KN). Ciała nerkowe (CN): obrzmiałe, z uszkodzoną torebką Bowmana. Miejscowe rozluźnienie podścieliska tkanki krwiotwórczej (TK) i obecne w niej ciała szkliste (CS) oraz duże CMM.	89
Fot. 80. Nerka tułowiowa karpia po okresie rekonwalescencji po ekspozycji na prochloraz. Kanaliki wydalinicze z obrzmiałymi komórkami nabłonkowymi oraz światłem wypełnionym płynem, destrukcja pojedynczych kanalików (KN). Poszerzenie przestrzeni moczowej w ciałku nerkowym (CN). Obecne ciała szkliste (CS). Silny rozplam tkanki krwiotwórczej (TK) i pojedyncze komórki MM.	90
Fot. 81. Nerka tułowiowa karpia po 14. dniowej ekspozycji na tebukonazol. Obrzmienie i zatarcie struktury komórek nabłonkowych kanalików nerkowych, nekroza pojedynczych kanalików (N), obecność płynu w świetle kanalików (KN). Rozplam tkanki krwiotwórczej (TK) i miejscowe rozluźnienie podścieliska łącznotkankowego. Duże CMM.	90

Fot. 82. Nerka tułowiowa karpia po okresie rekonwalescencji po ekspozycji na tebukonazol. Kanaliki nerkowe (KN) z zatartą strukturą, światłem wypełnionym płynem, zniekształcone ciało nerkowe (CN). Silny rozplam tkanki krwiotwórczej (TK) i miejscowe rozluźnienie podścieliska, duże CMM.....	91
Fot. 83. Elektronogram nabłonka kanalików nerkowych karpia grupy kontrolnej: komórki nabłonkowe z prawidłowym jądrem komórki (JK), licznymi mitochondria (M) i przylegającą do nich RER. 7000 x.	92
Fot. 84. Elektronogram nabłonka kanalik nerkowego karpia grupy kontrolnej - części apikalna komórek wraz z rąbkem szczoteczkowym (RS). 3500 x.	92
Fot. 85. Elektronogramy części krwiotwórczej nerki tułowiowej karpia grupy kontrolnej: granica pomiędzy częścią wydalniczą (W) a krwiotwórczą (TK) oraz komórki hematopoetyczne. 4200 x. i 5600 x.	93
Fot. 86. Elektronogramy nabłonka kanalików nerkowych (KN) karpia po 14. dniowej ekspozycji na mankozeb: różna gęstość elektronowa cytoplazmy, mitochondria prawidłowe, z zatartą strukturą i ulegające destrukcji. Pole wydzielnicze z rąbkem szczoteczkowym (RS) z obecnymi wewnątrz miejscami z wyraźnie mniejszą gęstością elektronową, liczne fragmenty błonowe w pobliżu bieguna apikalnego. 10000 x.	94
Fot. 87. Elektronogramy części krwiotwórczej nerki tułowiowej karpia po 14. dniowej ekspozycji na mankozeb: granica pomiędzy częścią wydalniczą (W) i krwiotwórczą (TK) z wyraźnie poszerzoną przestrzenią i obecnymi w niej luźnymi fragmentami błon. Jasne elektronowo podścielisko łącznotkankowe tkanki krwiotwórczej, zmienione komórki hematopoetyczne i fragmenty zniszczonych komórek, jasne elektronowo ziarna granulocytów (G) oraz nieprawidłowy układ chromatyny jądrowej w komórkach (JK). 7000 x i 4200 x.	94
Fot. 88. Elektronogram komórek nabłonkowych kanalik nerkowego karpia po okresie rekonwalescencji po ekspozycji na mankozeb: mitochondria (M) prawidłowe i z zatartą strukturą oraz poszerzenie przestrzeni między grzebieniami; fragmentacja RER; jednolita gęstość elektronowa jąder komórek (JK). Miejscowe poszerzenie przestrzeni międzykomórkowych (PM). 5600 x.	95
Fot. 89. Elektronogramy komórek części krwiotwórczej nerki tułowiowej karpia po okresie rekonwalescencji po ekspozycji na mankozeb. Luźne rozmieszczenie komórek hematopoetycznych oraz ich zmieniony kształt. Wolna przestrzeń pomiędzy częścią wydalniczą (W) a krwiotwórczą (TK) z obecnymi w niej licznymi strukturami błoniastymi. 5600 x i 10000 x.	96
Fot. 90. Elektronogramy komórek nabłonkowych kanalików nerkowych karpia po 14. dniowej ekspozycji na prochloraz. W rąbku szczoteczkowym (RS) miejsca jasne elektronowo, a w jego części środkowej obecne struktury błoniaste. Mitochondria (M) różnej wielkości, o prawidłowej lub zatartej strukturze. Obecne pęcherzyki sekwestralne (PS) w komórkach. 10000 x.	97
Fot. 91. Elektronogram komórek nabłonkowych nerki tułowiowej karpia po 14. dniowej ekspozycji na prochloraz. Mitochondria (M) o prawidłowej lub zatartej strukturze oraz z poszerzoną przestrzenią między grzebieniami. Poszerzone przestrzenie między błonami RER i jej fragmentacja, zmienione jądra komórkowe (JK). 10000 x.	97
Fot. 92. Elektronogram tkanki krwiotwórczej (TK) nerki tułowiowej karpia po 14. dniowej ekspozycji na prochloraz. Rozluźnienie struktury tkanki krwiotwórczej, zmienione kształty komórek, jasne elektronowo ziarnistości granulocytów (G). 5600 x.	98

Fot. 93. Elektronogram komórek nabłonkowych kanalikula nerkowego karpia po okresie rekonwalescencji po ekspozycji na prochloraz. Przylegające do siebie komórki nabłonkowe, miejscowe rozrzedzenie ich cytoplazmy (C). Mitochondria (M) prawidłowe lub z rozmytą strukturą. Fragmentacja i rozszerzenie błon RER. 10000 x.....	99
Fot. 94. Elektronogram komórek nabłonkowych kanalikula nerki karpia po okresie rekonwalescencji po ekspozycji na prochloraz. Rąbek szczoteczkowy (RS) o zróżnicowanej gęstości elektronowej (strzałki). 7000 x.....	99
Fot. 95. Elektronogramy części wydalinowej (W) i krwiotwórczej (TK) nerki tułowiowej karpia po okresie rekonwalescencji po ekspozycji na prochloraz - wyraźne oddzielenie obu części. W komórce nabłonka kanalikula nerkowego mitochondria (M) obrzmiałe, z częściowo zatartą strukturą. W części krwiotwórczej destrukcja komórek hematopoetycznych. 10000 x i 5600 x.	100
Fot. 96. Elektronogramy komórek nabłonkowych kanalików (KN) nerki tułowiowej karpia po 14. dniowej ekspozycji na tebukonazol. Zwarta budowa tkanki; w komórce liczna RER, miejscami pofragmentowana. Mitochondria o prawidłowej i zatartej strukturze (M). 8000 x i 16000 x.	101
Fot. 97. Elektronogram komórek nabłonkowych kanalików nerki tułowiowej karpia po 14. dniowej ekspozycji na tebukonazol. Rąbek szczoteczkowy (RS) z miejscami jasnymi elektronowo oraz licznymi wydzielinami. Miejscowe poszerzenie przestrzeni międzykomórkowych (PM). 8000 x.....	101
Fot. 98. Elektronogramy części krwiotwórczej (TK) nerki tułowiowej karpia po 14. dniowej ekspozycji na tebukonazol. Fragmenty o prawidłowej budowie tkanki i fragmenty ze zmianami patologicznymi: jasne elektronowo utkanie zrębu łącznotkankowego, komórki hematopoetyczne o zmienionych kształtach, destrukcja pojedynczych komórek. 8000 x.	102
Fot. 99. Elektronogram komórek nabłonkowych kanalików nerkowych karpia po okresie rekonwalescencji po ekspozycji na tebukonazol. Mitochondria (M) o prawidłowej lub zatartej strukturze, czy ulegające destrukcji. Fragmentacja RER i rozszerzone jej kanały. 16000 x.	103
Fot. 100. Elektronogram części krwiotwórczej (TK) nerki tułowiowej karpia po okresie rekonwalescencji po ekspozycji na tebukonazol. Komórki hematopoetyczne o nieprawidłowych kształtach, ulegające fragmentacji, oddalone od siebie; rozluźnienie utkania łącznotkankowego. 8000 x.	103
Fot. 101. Elementy morfotyczne krwi obwodowej karpia grupy kontrolnej; widoczne dojrzałe erytrocyty (E) i neutrofil (N) oraz ich formy młodociane (E_M – erytrocyt młodociany i N_M – neutrofil niedojrzały) oraz limfocyty (L) i monocyt (M).	126
Fot. 102. Elementy morfotyczne krwi obwodowej karpia po 24. godzinach ekspozycji na mankozeb. Widoczne zniekształcone jądra neutrofilii (N), prawidłowe limfocyty (L), erytrocyty prawidłowe oraz o zmienionych kształtach (strzałki), uszkodzone młodociane formy erytrocytów (E_M).	127
Fot. 103. Elementy morfotyczne krwi obwodowej karpia po 3. dniach ekspozycji na mankozeb. Zmieniony kształt jądra komórkowego neutrofila (N), ulegające lizie młodociane erytrocyty (strzałki), prawidłowe limfocyty (L).	128
Fot. 104. Elementy morfotyczne krwi obwodowej karpia po 14. dniach ekspozycji na mankozeb. Zmienione jądro neutrofila (N), ulegające lizie młodociane erytrocyty, hipochromatyczne jądra erytrocytów (strzałki), limfocyty (L).	128

Fot. 105. Elementy morfotyczne krwi obwodowej karpi po okresie rekonwalescencji po ekspozycji na mankozeb. Zmienione kształty erytrocytów, hipochromia jąder erytrocytów oraz dzielące się ich jądra (strzałki); limfocyt jasny, dzielący się, z rozrzedzoną chromatyną (L).....	129
Fot. 106. Elementy morfotyczne krwi obwodowej karpi po 24. godzinach ekspozycji na prochloraz. Zmienione jądra obrzmiałych niedojrzałych neutrofili (N_M), zniekształcony limfocyt (L), hipochromia cytoplazmy erytrocytów (E)	130
Fot. 107. Elementy morfotyczne krwi obwodowej karpi po 3. dniach ekspozycji na prochloraz. Zmieniony kształt neutrofila i obrzmiałe płaty jądra komórkowego (N), zniekształcone limfocyty (L), monocyt z bardzo dużym jądrem komórkowym (M), hipochromia jąder erytrocytów (strzałki) oraz obrzmiałe młodociane formy erytrocytów z uszkodzoną błoną komórkową (strzałki).....	130
Fot. 108. Elementy morfotyczne krwi obwodowej karpi po 14. dniach ekspozycji na prochloraz. Zmienione kształty jądra komórkowego, obrzmienie niedojrzałych neutrofili (N_M), zmieniony kształt monocytu (M), zmieniony kształt limfocytu (L), niedobarwliwa cytoplazma erytrocytów.	131
Fot. 109. Elementy morfotyczne krwi obwodowej karpi po okresie rekonwalescencji po ekspozycji na prochloraz. Pojedyncze erytrocyty z hipochromią (strzałki), dzielący się limfocyt (L).....	131
Fot. 110. Elementy morfotyczne krwi obwodowej karpi po 24. godzinach ekspozycji na tebukonazol. Obrzmiałe płaty jądra neutrofili (N), obrzmiałe niedojrzałe neutrofile (N_M), nieprawidłowy układ chromatyny w jądrach limfocytów oraz ich obrzmienie (L), uszkodzone młodociane erytrocyty (strzałki), hipochromia jąder erytrocytów (strzałki).	133
Fot. 111. Elementy morfotyczne krwi obwodowej karpi po 3. dniach ekspozycji na tebukonazol. Erytrocyt w podziale (strzałka) i hipochromia jąder erytrocytów oraz uszkodzona młodociana forma erytrocytu (strzałka); rozluźnienie chromatyny w limfocycie (L).oraz przewężenie jądra limfocytu (strzałka).....	133
Fot. 112. Elementy morfotyczne krwi obwodowej karpi po 14. dniach ekspozycji na tebukonazol. Zmieniony kształt jądra neutrofila (N), niedobarwliwość i zmienione kształty komórek erytrocytów (strzałki), obrzmiały monocyt (M), dzielące się jądro limfocytu (L).	134
Fot. 113. Elementy morfotyczne krwi obwodowej karpi po okresie rekonwalescencji po ekspozycji na tebukonazol. Hipochromia jąder komórkowych erytrocytów oraz zmienione kształty erytrocytów (strzałki), obrzmiałe komórki leukocytarne (L i N_M).	134

Spis rycin:

Ryc. 1. Liczenie leukocytów metodą dwupolową meandrową (za: Bomski, 1995).	29
Ryc. 2. Zmiany stężenia kortyzolu w osoczu karpi eksponowanych na mankozeb, prochloraz i tebukonazol oraz po okresie rekonwalescencji (h – godzina; 0h – gr. kontrolna; K_M – gr. kontrolna dla mankozebu; K_P – gr. kontrolna dla prochlorazu; K_T – gr. kontrolna dla tebukonazolu; detoks – po okresie rekonwalescencji; n=10; * - różnice statystycznie istotne w porównaniu do gr. kontrolnej przy $\alpha=0,05$).	104
Ryc. 3. Zmiany stężenia glukozy we krwi karpi eksponowanych na mankozeb, prochloraz i tebukonazol oraz po okresie rekonwalescencji (h – godzina; 0h – gr. kontrolna; K_M – gr. kontrolna dla mankozebu; K_P – gr. kontrolna dla prochlorazu; K_T – gr. kontrolna dla	

tebukonazolu; detoks – po okresie rekonwalescencji; n=10; * - różnice statystycznie istotne w porównaniu do gr. kontrolnej przy $\alpha=0,05$).	106
Ryc. 4. Zmiany stężenia trójglicerydów w osoczu krwi karpi eksponowanych na mankozeb, prochloraz i tebukonazol oraz po okresie rekonwalescencji (h – godzina; Oh – gr. kontrolna; K _M – gr. kontrolna dla mankozebu; K _P – gr. kontrolna dla prochlorazu; K _T – gr. kontrolna dla tebukonazolu; detoks – po okresie rekonwalescencji; n=10; * - różnice statystycznie istotne w porównaniu do gr. kontrolnej przy $\alpha=0,05$).	107
Ryc. 5. Zmiany stężenia białka ogólnego w osoczu krwi karpi eksponowanych na mankozeb, prochloraz i tebukonazol oraz po okresie rekonwalescencji (h – godzina; Oh – gr. kontrolna; K _M – gr. kontrolna dla mankozebu; K _P – gr. kontrolna dla prochlorazu; K _T – gr. kontrolna dla tebukonazolu; detoks – po okresie rekonwalescencji; n=10; * - różnice statystycznie istotne w porównaniu do gr. kontrolnej przy $\alpha=0,05$).	107
Ryc. 6. Zmiany aktywności aminotransferazy asparaginianowej (AST) w osoczu krwi karpi eksponowanych na mankozeb, prochloraz i tebukonazol oraz po okresie rekonwalescencji (h – godzina; Oh – gr. kontrolna; K _M – gr. kontrolna dla mankozebu; K _P – gr. kontrolna dla prochlorazu; K _T – gr. kontrolna dla tebukonazolu; detoks – po okresie rekonwalescencji; n=10; * - różnice statystycznie istotne w porównaniu do gr. kontrolnej przy $\alpha=0,05$).	111
Ryc. 7. Zmiany aktywności aminotransferazy alaninowej (ALT) w osoczu krwi karpi eksponowanych na mankozeb, prochloraz i tebukonazol oraz po okresie rekonwalescencji (h – godzina; Oh – gr. kontrolna; K _M – gr. kontrolna dla mankozebu; K _P – gr. kontrolna dla prochlorazu; K _T – gr. kontrolna dla tebukonazolu; detoks – po okresie rekonwalescencji; n=10; * - różnice statystycznie istotne w porównaniu do gr. kontrolnej przy $\alpha=0,05$).	111
Ryc. 8. Zmiany liczby erytrocytów we krwi obwodowej karpi (RBC) w czasie trwania ekspozycji na mankozeb, prochloraz i tebukonazol oraz po okresie rekonwalescencji (h – godzina; Oh – gr. kontrolna; K _M – gr. kontrolna dla mankozebu; K _P – gr. kontrolna dla prochlorazu; K _T – gr. kontrolna dla tebukonazolu; detoks – po okresie rekonwalescencji; n=10; * - różnice statystycznie istotne w porównaniu do gr. kontrolnej przy $\alpha=0,05$).	114
Ryc. 9. Zmiany wartości hematokrytowej (Ht) w krwi obwodowej karpi w czasie trwania ekspozycji na mankozeb, prochloraz i tebukonazol oraz po okresie rekonwalescencji (h – godzina; Oh – gr. kontrolna; K _M – gr. kontrolna dla mankozebu; K _P – gr. kontrolna dla prochlorazu; K _T – gr. kontrolna dla tebukonazolu; detoks – po okresie rekonwalescencji; n=10; * - różnice statystycznie istotne w porównaniu do gr. kontrolnej przy $\alpha=0,05$).	115
Ryc. 10. Zmiany stężenia hemoglobiny (Hb) we krwi obwodowej karpi w czasie trwania ekspozycji na mankozeb, prochloraz i tebukonazol oraz po okresie rekonwalescencji (h – godzina; Oh – gr. kontrolna; K _M – gr. kontrolna dla mankozebu; K _P – gr. kontrolna dla prochlorazu; K _T – gr. kontrolna dla tebukonazolu; detoks – po okresie rekonwalescencji; n=10; * - różnice statystycznie istotne w porównaniu do gr. kontrolnej przy $\alpha=0,05$).	115
Ryc. 11. Zmiany średniej objętości erytrocytu (MCV) karpi w czasie trwania ekspozycji na mankozeb, prochloraz i tebukonazol oraz po okresie rekonwalescencji (h – godzina; Oh – gr. kontrolna; K _M – gr. kontrolna dla mankozebu; K _P – gr. kontrolna dla prochlorazu; K _T – gr. kontrolna dla tebukonazolu; detoks – po okresie rekonwalescencji; n=10).	116
Ryc. 12. Zmiany średniej masy hemoglobiny w erytrocycie (MCH) karpi w czasie trwania ekspozycji na mankozeb, prochloraz i tebukonazol oraz po okresie rekonwalescencji (h – godzina; Oh – gr. kontrolna; K _M – gr. kontrolna dla mankozebu; K _P – gr. kontrolna dla	

prochlorazu; K _T – gr. kontrolna dla tebukonazolu; detoks – po okresie rekonwalescencji; n=10; * - różnice statystycznie istotne w porównaniu do gr. kontrolnej przy $\alpha=0,05$).	116
Ryc. 13. Zmiany średniego stężenia hemoglobiny w erytrocycie (MCHC) karpi w czasie trwania ekspozycji na mankozeb, prochloraz i tebukonazol oraz po okresie rekonwalescencji (h – godzina; 0h – gr. kontrolna; K _M – gr. kontrolna dla mankozebu; K _P – gr. kontrolna dla prochlorazu; K _T – gr. kontrolna dla tebukonazolu; detoks – po okresie rekonwalescencji; n=10; * - różnice statystycznie istotne w porównaniu do gr. kontrolnej przy $\alpha=0,05$).	117
Ryc. 14. Zmiany liczby leukocytów we krwi obwodowej karpi w czasie trwania ekspozycji na mankozeb, prochloraz i tebukonazol oraz po okresie rekonwalescencji (h – godzina; 0h – gr. kontrolna; K _M – gr. kontrolna dla mankozebu; K _P – gr. kontrolna dla prochlorazu; K _T – gr. kontrolna dla tebukonazolu; detoks – po okresie rekonwalescencji; n=10; * - różnice statystycznie istotne w porównaniu do gr. kontrolnej przy $\alpha=0,05$).	122

Spis tabel:

Tab. 1. Sprzedaż środków grzybobójczych w przeliczeniu na substancję aktywną (w tonach) w Polsce w latach 2005 - 2012 (opracowanie własne na podstawie danych uzyskanych od producentów i importerów zawartych na stronie internetowej MRiRW).	7
Tab. 2. Podział fungicydów na klasy, rodzaje substancji aktywnej oraz ich toksyczność dla ssaków (opracowanie własne na podstawie dostępnej literatury).	8
Tab. 3. Trwałość w środowisku niektórych substancji aktywnych i ich toksyczność dla organizmów wodnych (opracowanie własne na podstawie dostępnej literatury).	14
Tab. 4. Właściwości fizykochemiczne wybranych fungicydów (opracowanie własne na podstawie e-Pesticide Manuals).	18
Tab. 5. Układ grup doświadczalnych z rodzajem i stężeniem zastosowanych fungicydów.	22
Tab. 6. Schemat pobierania krwi oraz badania wskaźników stanu fizjologicznego ryb (h – godzina; detoks – okres rekonwalescencji).	24
Tab. 7. Zmiany wskaźników metabolicznych karpi w okresie ekspozycji na mankozeb i po rekonwalescencji (h – godzina; 0h – grupa kontrolna; detoks – po okresie rekonwalescencji; x – brak analizy w danym czasie trwania eksperymentu; SD – odchylenie standardowe; n=10; * - różnice statystycznie istotne w porównaniu do gr. kontrolnej przy $\alpha=0,05$).	113
Tab. 8. Zmiany wskaźników metabolicznych karpi w okresie ekspozycji na prochloraz i po rekonwalescencji (h – godzina; 0h – grupa kontrolna; detoks – po okresie rekonwalescencji; x – brak analizy w danym czasie trwania eksperymentu; SD – odchylenie standardowe; n=10; * - różnice statystycznie istotne w porównaniu do gr. kontrolnej przy $\alpha=0,05$).	113
Tab. 9. Zmiany wskaźników metabolicznych karpi w okresie ekspozycji na tebukonazol i po rekonwalescencji (h – godzina; 0h – grupa kontrolna; detoks – po okresie rekonwalescencji; x – brak analizy w danym czasie trwania eksperymentu; SD – odchylenie standardowe; n=10; * - różnice statystycznie istotne w porównaniu do gr. kontrolnej przy $\alpha=0,05$).	113
Tab. 10. Zmiany wskaźników czerwono krwinkowych karpi w okresie ekspozycji na mankozeb i po rekonwalescencji (h – godzina; 0h – grupa kontrolna; detoks – po okresie rekonwalescencji; x – brak analizy w danym czasie trwania eksperymentu; SD – odchylenie standardowe; n=10; * - różnice statystycznie istotne w porównaniu do gr. kontrolnej przy $\alpha=0,05$).	117

Tab. 11. Zmiany wskaźników czerwonokrwinkowych karpi w okresie ekspozycji na prochloraz i po rekonwalescencji (h – godzina; 0h – grupa kontrolna; detoks – po okresie rekonwalescencji; x – brak analizy w danym czasie trwania eksperymentu; SD – odchylenie standardowe; n=10; * - różnice statystycznie istotne w porównaniu do gr. kontrolnej przy $\alpha=0,05$).	119
Tab. 12. Zmiany wskaźników czerwonokrwinkowych karpi w okresie ekspozycji na tebukonazol i po rekonwalescencji (h – godzina; 0h – grupa kontrolna; detoks – po okresie rekonwalescencji; x – brak analizy w danym czasie trwania eksperymentu; SD – odchylenie standardowe; n=10; * - różnice statystycznie istotne w porównaniu do gr. kontrolnej przy $\alpha=0,05$).	120
Tab. 13. Leukogramy karpi eksponowanych na mankozeb i po rekonwalescencji (h – godzina; 0h – grupa kontrolna; detoks – po okresie rekonwalescencji; SD – odchylenie standardowe; n=10; * - różnice statystycznie istotne w porównaniu do gr. kontrolnej przy $\alpha=0,05$).	123
Tab. 14. Leukogramy karpi eksponowanych na prochloraz i po rekonwalescencji (h – godzina; 0h – grupa kontrolna; detoks – po okresie rekonwalescencji; SD – odchylenie standardowe; n=10; * - różnice statystycznie istotne w porównaniu do gr. kontrolnej przy $\alpha=0,05$).	124
Tab. 15. Leukogramy karpi eksponowanych na tebukonazol i po rekonwalescencji (h – godzina; 0h – grupa kontrolna; detoks – po okresie rekonwalescencji; SD – odchylenie standardowe; n=10; * - różnice statystycznie istotne w porównaniu do gr. kontrolnej przy $\alpha=0,05$).	125

PIŚMIENNICTWO

- Allen J.W., Wolf D.C., George M.H., Hester S.D., Sun G., Thai S.F., Delker D.A., Moore T., Jones C., Nelson G., Roop B.C., Leavitt S., Winkfield E., Ward W.O., Nesnow S. 2006. *Toxicity profiles in mice treated with hepatotumorigenic and non-hepatotumorigenic triazole conazole fungicides: propiconazole, triadimefon, and myclobutanil*. Toxicologic Pathology 34, 853–862.
- Almli B., Egaas E., Christiansen A., Eklo O.M., Lode O., Källqvist T. 2002. *Effects of three fungicides alone and in combination on glutathione S-transferase activity (GST) and cytochrome P-450 (CYP 1A1) in the liver and gill of brown trout (Salmo trutta)*. Marine Environmental Research, 237-240.
- Andreu-Sánchez O., Carrasco J.M. 2007. *Surface water monitoring of the fungicides tebuconazole and tricyclazole in the Albufera Natural Park (Valencia, Spain)*. Book of abstracts of 14th International Symposium on Environmental Pollution and its Impact on Life in the Mediterranean Region. Sevilla, Spain: Mediterranean Scientific Association of Environmental Protection (MESAEP).
- Andreu-Sánchez O., Paraíba L.C., Jonsson C.M., Carrasco J.M. 2012. *Acute toxicity and bioconcentration of fungicide tebuconazole in zebrafish (Danio rerio)*. Environmental Toxicology 27, 109-116.
- Ankley G.T., Bencic D.C., Cavallin J.E., Jensen K.M., Kahl M.D., Makynen E.A., Martinović D., Mueller N.D., Wehmas L.C., Villeneuve D.L. 2009. *Dynamic nature of alternations in the endocrine system of fathead minnows exposed to the fungicide prochloraz*. Toxicological Sciences 112, 344-353.
- Ankley G.T., Jensen K.M., Durhan E.J., Makynen E.A., Butterworth B.C., Kahl M.D., Villeneuve D.L., Linnam A., Gray L.E., Cardon M. 2005. *Effects of two fungicides with multiple modes of action on reproductive endocrine function in the fathead minnow (Pimephales promelas)*. Toxicological Sciences 86, 300-308.

- Annual Report 2012. *Global market performance. Our farmers our food our future*. CropLife International. http://www.croplife.org/annual_reports (styczeń 2014 r.)
- Antychowicz J. 2007. *Choroby ryb śródlądowych*. Powszechne Wydawnictwo Rolnicze i Leśne. Warszawa 2007.
- Atamaniuk T.M., Kubrak O.I., Husak V.V., Storey K.B., Lushchak V.I. 2014. *The mancozeb-containing carbamate fungicide tattoo induces mild oxidative stress in goldfish brain, liver and kidney*. Environmental Toxicology 29, 1227-1235.
- Ba-Omar T.A., Al-Jardani S., Victor R. 2011. *Effects of pesticide temephos on the gills of Aphanis dispar (Pisces: Cyprinodontidae)*. Tissue and Cell. 43, 29-38.
- Bettex-Galland M. 1973. *Contractile filamentous material in the pillar cells of fish gills*. Journal of Cell Science, 359-370.
- Biagianti-Risbourg S., Bastide j. 1995. *Hepatic perturbations induced by a herbicide (atrazine) in juvenile grey mullet Liza ramada (Mugilidae, Teleostei): an ultrastructural study*. Aquatic Toxicology 31, 217-229.
- Bjergager M.-B.A., Hanson M.L., Lissemore L., Henriquez N., Solomon K.R., Cedergreen N. 2011. *Synergy in microcosms with environmentally realistic concentrations of prochloraz and esfenvalerate*. Aquatic Toxicology 101, 412-422.
- Bomski H. 1995. *Podstawowe laboratoryjne badania hematologiczne*. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa, 59-185.
- Boran H., Capkin E., Altinok I., Terzi E. 2012. *Assessment of acute toxicity and histopathology of the fungicide captan in rainbow trout*. Experimental and Toxicologic Pathology 64, 175-179.
- Borecki Z. 1984. *Fungicydy stosowane w ochronie roślin*. Państwowe Wydawnictwo Naukowe, Warszawa.
- Botelho R.G., dos Santos J.B., Fernandes K.M., Neves C.A. 2012. *Effects of atrazine and picloram on grass carp: acute toxicity and histological assessment*. Toxicological & Environmental Chemistry 94, 121-127.

- Campbell T.W. 2012. *Hematology of fish*. W: Veterinary Hematology and Clinical Chemistry, (Eds.) Thrall M.A., Weiser G., Allison R.W., Campbell T.W. Wiley-Blackwell, 2012.
- Canton J.H. 1976. *The toxicity of benomyl, thiophanatemethyl, and BCM to four freshwater organisms*. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 16, 214–218.
- 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.
- Cedergreen N., Kamper A., Streibig J.C. 2006. *Is prochloraz a potent synergist across aquatic species? A study on bacteria, daphnia, algae and higher plants*. Aquatic Toxicology 78, 243-252.
- Cericato L., Machado Neto J.G., Fagundes M., Kreutz L.K., Quevedo R.M., Finco J., Santos da Rosa J.G., Koakoski G., Centenaro L., Pottker E., Anziliero D., Gil Barcellos L.J. 2008. *Cortisol response to acute stress in jundiá Rhamdia quelen acutely exposed to sub-lethal concentrations of agrichemicals*. Comparative Biochemistry and Physiology, Part C 148, 281-286.
- Chen P.-J., Padgett W.T., Moore T., Winnik W., Lambert G.R., Thai S-F., Hester S.D., Nesnow S. 2009. *Three conazoles increase hepatic microsomal retinoic acid metabolism and decrease mouse hepatic retinoic acid levels in vivo*. Toxicology and Applied Pharmacology 234, 143-155.
- Colin M.-E., Belzunces L.P. 1992. *Evidence of synergy between prochloraz and deltamethrin in Apis mellifera L.: a convenient biological approach*. Pesticides Science 36, 115-119.
- Crestani M., Menezes C., Glusczak L., dos Santos Miron D., Spanevello R., Silveira A., Gonçalves F.F., Zanella R., Loro V.L. 2007. *Effect of clomazone herbicide on biochemical and histological aspects of silver catfish (Rhamdia quelen) and recovery pattern*. Chemosphere 67, 2305-2311.
- Delp C.J. 1995. *Benzimidazole and related fungicides*. W: H.Lyr (Ed.) Modern Selective Fungicides - Properties, Applications, Mechanisms of Action. Longman, London, 291-303.

- Dojlido J.R. 1995. *Chemia wód powierzchniowych*. Wydawnictwo Ekonomia i Środowisko, Białystok, 220-233.
- Drastichová J., Svobodová Z., Lusková V., Máchová J. 2004. *Effect of cadmium on hematological indices of common carp (Cyprinus carpio L.)*. Bull Environ Contam Toxicol 72, 725-732.
- Dutta H.M., Munshi J.S.D., Roy P.K., Singh N.K., Adhikari S., Killius J. 1996. *Ultrastructural changes in the respiratory lamellae of the catfish, Heteropneustes fossilis after sublethal exposure to malathion*. Environmental Pollution 92, 329-341.
- DYREKTYWA 2000/60/WE PARLAMENTU EUROPEJSKIEGO I RADY z dnia 23 października 2000 r. ustanawiająca ramy wspólnotowego działania w dziedzinie polityki wodnej.
- Elsaesser D., Schulz R. 2008. *Mitigation of fungicide pollution in vegetated agricultural surface waters: GIS modelling and monitoring in the field*. SETAC, Warsaw, extended abstract, 406-407.
- Evans D.H., Piermarini P.M., Choe K.P. 2005. *The multifunctional fish gill; dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste*. Physiol Rev 85, 97-177.
- Fernandes M.N., Moron S.E., Sakuragni M.M. 2007. *Gill morphological adjustments to environment and the gas exchange function*. W: Fernandes M.N. (Ed.) Fish respiration and Environment. Science Publishers, USA.
- Ferreira D., Motta A.C., Kreutz L.C., Toni C., Loro V.L., Barcellos L.J.G. 2010. *Assessment of oxidative stress in Rhamdia quelen exposed to agrichemicals*. Chemosphere 79, 914-921.
- Fishel F.M. 2013a. *Pesticide toxicity profile: triazole pesticides*. The Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida. http://edis.ifas.ufl.edu/departments/pesticide_information_office (styczeń 2014 r.)
- Fishel F.M. 2013b. *Pesticide toxicity profile: ethylenebis (dithiocarbamate) pesticides*. The Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida. http://edis.ifas.ufl.edu/departments/pesticide_information_office (styczeń 2014 r.)

- Gosiewski G., Socha M., Nowak E., Kuchinka J., Sokołowska-Mikołajczyk M. 2012. *Influence of short- and long-term exposition to Roundup on the spontaneous and hormonally stimulated LH secretion and gills condition in Prussian carp (Carassius gibelio)*. AES Bioflux 4, 146-152.
- Gómez L., Masot J., Martinez S., Durán E., Soler F., Roncero V. 1998. *Acute 2,4-D poisoning in tench (Tinca tinca L.): lesions in the hematopoietic portion of the kidney*. Arch Environ Contam Toxicol 35, 479-483.
- Haendel M.A., Tilton F., Bailey G.S., Tanguay R.L. 2004. *Developmental toxicity of the dithiocarbamate pesticide sodium metam in zebrafish*. Toxicological Science 81, 390-400.
- Hejduk J., Svobodova Z. 1980. *Acute toxicity of carbamate-based pesticides for fish*. Acta Vet Brno 49, 251-257.
- Hontela A., Rasmussen J.B., Audet C., Chevalier G. 1992. *Impaired cortisol stress response in fish from environments polluted by PAHs, PCBs, and mercury*. Arch Environ Contam Toxicol 22, 278-283.
- Hontela A. 1998. *Interrenal dysfunction in fish from contaminated sites: in vivo and in vitro assessment*. Environmental Toxicology and Chemistry 17, 44-48.
- Hrubec T.C., Smith S.A. 2010. *Hematology of Fishes*. W: Schalm's Veterinary Hematology (6th edition). (Eds.) Weiss D.J., Wardrop K.J. Willey-Blackwell, Iowa, USA.
- Induski J.A. 1994. *Pestycydy ditiokarbaminianowe, etylenomocznik i propylenotiomocznik. Wprowadzenie ogólne*. Kryteria zdrowotne środowiska tom 78. Instytut Medycyny Pracy, Łódź, 19-65.
- Iwama G. 1998. *Stress In Fish*. Annals New York Academy of Science, 304-310.
- Jayachandron K., Pugazhendy K. 2009. *Histopathological changes in the gill of Labeo rohita (Hamilton) fingerlings exposed to atrazine*. American-Eurasian Journal of Scientific Research 4, 219-221.

- Kaleta J. 2004. *Pestycydy w środowisku wodnym*. Zeszyty naukowe Politechniki Rzeszowskiej. Budownictwo i Inżynieria Środowiska z.38, nr 218, 23-36.
- Kamrin M.A. 1997. *Pesticide Profiles. Toxicity, Environmental Impact, and Fate*. CRC Lewis Publishers, New York.
- Karmen A., Wróblewski F., Laude J.S. 1955. *Transaminase activity in human blood*. Journal of Clinical Investigation 34, 126-131.
- Karnovsky M.J. 1965. *A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy*. Journal of Cell Biology 27, 137-138.
- Konwick B.J., Garrison A. W., Avants J.K., Fisk A.T. 2006. *Bioaccumulation and biotransformation of chiral triazole fungicides in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss)*. Aquatic Toxicology 80, 372-381.
- Krzysztofik B., Orzechowska M., Chęciński J. 1994. *Podstawy chemii ogólnej i środowiska przyrodniczego*. Oficyna Wydawnicza Politechniki Warszawskiej, Warszawa.
- Kubrak O.I., Atamaniuk T.M., Husak V.V., Drohomyska I.Z., Storey J.M., Storey K.B., Lushchak V.I. 2012. *Oxidative stress response in blood and gills of Carassius auratus exposed to the mancozeb-containing carbamate fungicide Tattoo*. Ecotoxicology and Environmental Safety 85, 37-43.
- Kuck, K.H., Scheinpflug, H., Pontzen, R. 1995. *DMI fungicides*. W: H.Lyr (Ed.) Modern Selective Fungicides - Properties, Applications, Mechanisms of Action. Longman, London, 205-279.
- Larson S.J., Capel P.D., Goolsby D.A. 1995. *Relations between pesticide use and riverine flux in the Mississippi river basin*. Chemosphere 31, 3305-3321.
- Laskowski R., Migula R. 2004. *Ekotoksykologia. Od komórki do ekosystemu*. Państwowe Wydawnictwo Rolnicze i Leśne, Warszawa.
- Lee R.G., Foerster J., Jukens F., Paraskevas F., Greer J.P., Rodgers G.M. 1998. *Wintrobe's Clinical Hematology*. 10th Edn., Lippincott Williams and Wilkins, New York, USA.

- Leonard R.A. 1990. *Movement of pesticides into surface waters*. W: H.H. Cheng (Ed.) *Pesticides in the Soil Environment: Processes, Impacts, and Modelling*. Soil Science Society of America Publishers, Madison, Wisconsin, 303-349.
- Li Z.-H., Zlabek V., Velíšek J., Grabic R., Machová, Kolarová J., Li P., Randák T. 2011a. *Antioxidant responses and plasma biochemical characteristics in the freshwater rainbow trout, Oncorhynchus mykiss, after acute exposure to the fungicide propiconazole*. Czech J Anim Sci 56, 61-69.
- Li Z.-H., Zlabek V., Velíšek J., Grabic R., Kolarová J., Li P., Randák T. 2011b. *Use of haematological and plasma biochemical parameters to assess the chronic effects of a fungicide propiconazole on a freshwater teleost*. Chemosphere 83, 572-578.
- Li Z.-H., Zlabek V., Velíšek J., Grabic R., Machova J., Kolarová J., Li P., Randák T. 2013. *Multiple biomarkers responses in juvenile rainbow trout, Oncorhynchus mykiss, after acute exposure to a fungicide propiconazole*. Environ Toxicol 28, 119-126.
- Lyr H. 1995. *Modern Selective Fungicides - Properties, Applications, Mechanisms of Action*. Longman, Londyn.
- Łomnicki A. 2010. *Wprowadzenie do statystyki dla przyrodników*. Wydawnictwo Naukowe PWN. Warszawa.
- Mercer E.H., Birbeck M.S.C. 1970. *Mikroskopia elektronowa*. Państwowe Wydawnictwo Naukowe, Warszawa, 11-62.
- Mi E.Y, Kang J-C. 2008. *Effect of waterborne benomyl on the hematological and antioxidant parameters of the Nile tilapia, Oreochromis niloticus*. Pesticide Biochemistry and Physiology 92, 138-143.
- Murty A.S. 1986. *Toxicity of pesticides to fish*. Florida FCRC Press Inc., Boca Raton, 75-77.
- Natt P.M., Herrick C.A. 1952. *A new blood diluent for counting the erythrocytes and leucocytes of chicken*. Poultry Science 31: 735-738.
- Olson K.R. 1996. *Scanning electron microscopy of the fish gill*. In: Fish Morphology. Eds. J.S. Datta Munshi and H.M. Dutta. Balkema, Rotterdam.

- Oulmi Y., Negele R-D., Braunbeck T. 1995. *Cytopathology of liver and kidney in rainbow trout Oncorhynchus mykiss after long-term exposure to sublethal concentrations of linuron*. Diseases of Aquatic Organisms 21, 35-52.
- Padovani L., Carpi E., Padovani C., Puglisi E., Trevisan M. 2006. *Monitoring tricyclazole residues in rice paddy watersheds*. Chemosphere 62, 303-314.
- Palawski D.U., Knowles C.O. 1986. *Toxicological studies of benomyl and carbendazim in rainbow trout, channel catfish and bluegills*. Environmental Toxicology and Chemistry 5, 1039-1046.
- Poleksić V., Karan V. 1999. *Effects of trifluralin on carp: biochemical and histological evaluation*. Ecotoxicology and Environmental Safety 43, 213-221.
- Przybylska-Wojtyszyn M., Łozińska-Grabska M., Łakota S., Raszka A., Wojtaszek J. 1992. *Wpływ deltametryny na narybek karpia. Cz. I. Wpływ subletalnych dawek deltametryny na aktywność aminotransferazy alaninowej i asparaginianowej w narządach wewnętrznych i surowicy karpia (Cyprinus carpio L.)*. Archiwum Ochrony Środowiska 1, 107-120.
- PubChem 2014. *The PubChem Compound Database* <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pccompound/>, (kwiecień – maj 2014).
- Rand G.M., Petrocell S.R. 1985. *Fundamentals of Aquatic Toxicology*. Hemisphere, Washington DC, 25-26.
- Roberts R.J. 2012. *Fish pathology*. John Wiley & Sons, New Jersey, 62-144.
- Roex E.W.M., Keijzers R., Van Gestel C.A.M. 2003. *Acetylcholinesterase and increased food consumption rate in zebrafish, Danio rerio, after chronic exposure to parathion*. Aquat. Toxicol. 64, 451-460.
- Róžański L. 1992. *Przemiany pestycydów w organizmach żywych i środowisku*. Państwowe Wydawnictwo Rolnicze i Leśne, Warszawa.
- Russel P.E. 2005. *A century of fungicide evolution*. Journal of Agricultural Science 143, 11-25.
- Rynek środków produkcji i usług dla rolnictwa 2011. Analizy Rynkowe 38, 16-18.

- Sadowski J., Kucharski M. 2007. *Monitorowanie stanu zanieczyszczeń herbicydowych w wodach powierzchniowych i gruntowych na terenach rolniczych*. Studia i Raporty IUNG – PIB 8, Puławy.
- Sancho E., Villarroel M.J., Andreu E., Ferrando M.D. 2009. *Disturbance in energy metabolism of Daphnia magna after exposure to tebuconazole*. Chemosphere 74, 1171-1178.
- Sancho E., Villarroel M.J., Fernández C., Andreu E., Ferrando M.D. 2010. *Short-term exposure to sublethal tebuconazole induces physiological impairment in male zebrafish (Danio rerio)*. Ecotoxicological Environmental Safety 73, 370-376.
- Schmidt-Nielsen K. 2008. *Fizjologia zwierząt. Adaptacja do środowiska*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.
- Schriever C.A., Liess M. 2007. *Mapping ecological risk of agricultural pesticide runoff*. Science of the Total Environment 384, 264-279.
- Schwaiger J., Wanke R., Adam S., Pawert M., Honnen W., Tribskorn R. 1997. *The use of histopathological indicators to evaluate contaminant-related stress in fish*. Journal of Aquatic Ecosystem Stress and recovery 6, 75-86.
- Silbergeld E.K., 1974. *Blood glucose: a sensitive indicator of environmental stress in fish*. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 11, 20-25.
- Silveira-Coffigny R., Prieto-Trujillo A., Ascencio-Valle F. 2004. *Effects of different stressors in haematological variables in cultured Oreochromis aureus S*. Comparative Biochemistry and Physiology, Part C 139; 245-250.
- Siwicki A.K., Głąbski E., Kazuń B. 2007. *Wpływ odłowu, transportu i warunków przetrzymywania w basenach na stan kondycyjny i zdrowotny karpia*. W: Wybrane zagadnienia dobrostanu karpia. A. Lirski (Red.) Instytut Rybactwa Śródlądowego, Olsztyn.
- Sitarek K. 2004. *Karbendazym*. Podstawy i Metody Oceny Środowiska Pracy 1. 45-46.
- Soldatov A.A. 2005. *Peculiarities of organization and functioning of the fish red blood system*. Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology 41, 272-281.

- Solid J., Kjærnsli A., de Angelis P.M., Rohr A.K., Nilsson G.E. 2005. *Cell proliferation and gill morphology in anoxic crucian carp*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 289, 1196-1201.
- Sopińska A. 1983. *Effect of physiological factors, stress, and disease on hematological parameters of carp, with a particular reference to leukocyte pattern. Variability of hematological indices of carp in relation to age and gonad maturity state*. Acta Ichthyologica et Piscatoria 8, 59-81.
- Sprzedaż i zapasy środków ochrony roślin – dane od producentów i importerów, 2005, 2006, 2007, 2008, 2009, 2010, 2011, 2012; <http://www.bip.minrol.gov.pl> (styczeń 2014 r.)
- Sun G., Thai S.F., Tully D.B., Lambert G.R., Goetz A.K., Wolf D.C., Dix D.J., Nesnow S., 2005. *Propiconazole-induced cytochrome P450 gene expression and enzymatic activities in rat and mouse liver*. Toxicology Letters 155, 277–287.
- Sundin L.I. 1995. *Responses of the branchial circulation to hypoxia in the Atlantic cod, Gadus morhua*. American Journal of Physiology 268, 771-778.
- Svobodová Z., Lusková V., Drastichová J., Svoboda M., Žlábek V. 2003. *Effect of deltamethrin on haematological indices of common carp (Cyprinus carpio L.)*. Acta Vet. Brno 72, 79-85.
- Svobodová Z., Pravda D., Modra H. 2012. *Jednotné metody hematologické hovyšetřování ryb*. W: Metody hematologické hovyšetřování ryb. Vodňany, 2012.
- Ślebodziński A, Brzezińska-Ślebodzińska E, Lipczak W, Rosa E. 1982. *Prosty, kliniczny test poziomu kompleksu immunogammaglobulinowego i białka całkowitego surowicy noworodków zwierząt użytkowych*. Med. Wet. 34, 442-445.
- Tilton F., La Du J.K., Vue M., Alzarban N., Tanguay R.L. 2006; *Dithiocarbamates have a common toxic effect on zebrafish body axis formation*. Toxicology and Applied Pharmacology 216, 55-68.
- Thorpe K.L., Benstead R., Hutchinson T.H., Tyler C.R. 2007. *Associations between altered vitellogenin concentrations and adverse health effects in fathead minnow (Pimephales promelas)*. Aquatic Toxicology 85, 176-183.

- Tomlin C.D.S. 2003. *The e-Pesticide Manual*. 13th ed. British Crop Protection Council, Surrey, UK.
- Toni C., Loro V.L., Santi A., Cavalheiro de Menezes C., Cattaneo R., Clasen B.E., Zanella R. 2011a. *Exposure to tebuconazole in rice field and laboratory conditions induces oxidative stress in carp (Cyprinus carpio)*. Comparative Biochemistry and Physiology, Part C 153, 128-132.
- Toni C., Ferreira D., Kreutz L.C., Loro V.L., Barcellos L.J.G. 2011b. *Assessment of oxidative stress and metabolic changes in common carp (Cyprinus carpio) acutely exposed to different concentrations of the fungicide tebuconazole*. Chemosphere 83, 579-584.
- Van Boxtel A.L., Kamstra J.H., Fluitsma D.M., Legler J. 2010. *Dithiocarbamates are teratogenic to developing zebrafish through inhibition of lysyl oxidase activity*. Toxicology and Applied Pharmacology 244, 156-161.
- Van den Brink P.J., Hattink J., Bransen F., Van Donk E., Brock T.C.M. 2000. *Impact of the fungicide carbendazim in freshwater microcosms. II. Zooplankton, primary producers and final conclusions*. Aquatic Toxicology 48, 251-264.
- Van der Oost R., Beyer J., Vermeulen N.P.E. 2003. *Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review*. Environmental Toxicology and Pharmacology 13, 57-149.
- Van Leeuwen C.J., Maas-Diepeveen J.L., Overbeek H.C.M. 1986. *Sublethal effects of teramethylthiuram disulfide (thiram) in rainbow trout (Salmo gairdneri)*. Aquatic Toxicology 9, 13-19.
- Van Wijngaarden R.P.A., Crum S.J.H., Decraene K., Hattink J., van Kammen A. 1998. *Toxicity of Derosal (active ingredient carbendazim) to aquatic invertebrates*. Chemosphere 37, 673-683.
- WHO International Programme on Chemical Safety (IPCS), 1993. *Biomarkers and risk assessment: concepts and principles*. Environmental Health Criteria 155, World Health Organization, Geneva.

- Witeska M., Kondera E., Szymańska M., Ostysz M. 2010. *Hematological changes in common carp (Cyprinus carpio L.) after short-term lead (Pb) exposure*. Polish Journal of Environmental Studies 19, 825-831.
- Witeska M., Kondera E., Szczygielska K. 2011. *The effects of cadmium on common carp erythrocyte morphology*. Polish Journal of Environmental Studies 20, 783-788.
- Wojtaszek J., Łakota S., Łozińska-Grabska M., Przybylska-Wojtyszyn M., Raszka A. 1992. *Wpływ deltametryny na narybek karpia (Cyprinus carpio L.). Część IV. Zmiany wybranych parametrów hematologicznych pod wpływem subletalnych stężeń deltametryny*. Archiwum Ochrony Środowiska 2, 91-101.
- Zubrod J.P., Bundschuh M., Schulz R. 2010. *Effects of subchronic fungicide exposure on the energy processing of Gammarus fossarum (Crustacea; Amphipoda)*. Ecotoxicology and Environmental Safety 73, 1674-1680.
- Zarn J.A., Bruschweiler B.J., Schlatter J.R. 2003. *Azole fungicides affect mammalian steroidogenesis by inhibiting sterol 14 alpha-demethylase and aromatase*. Environmental Health Perspectives 111, 255-261.