

Triklosanın Zebra Balığı (*Danio rerio*) İnce Bağırsağı Üzerinde Histopatolojik Etkileri

Cansu AKBULUT 

ÖZET

Bir bisfenol çeşidi olan triklosan, antibakteriyel sabun, deodorant, diş macunu, el kremi gibi kişisel bakım ürünlerinin yanı sıra kumaşlarda, oyuncak, diş fırçası sapı, mutfakta kullanılan plastikler gibi pek çok ürünün yapısında koruyucu, antiseptik, antimikrobiyal ve dezenfektan olarak kullanılmaktadır. Önemli biyositlerden ve çevresel kirleticilerden biri olan triklosan, yer altı suları aracılığı ile ekosisteme karışmakta ve sucul canlıların yaşamını tehdit etmektedir. Bu çalışma kapsamında triklosanın zebra balığı ince bağırsak dokularında yarattığı histopatolojik etkilerin incelenmesi amaçlanmıştır. Balıklara, 5 gün boyunca 34, 85 and 170 µg/L'lik triklosan uygulaması yapılmıştır. 5 günlük maruziyet süresinin sonunda ince bağırsak dokuları disekte edilmiştir. Dokular Bouin fiksatif ile 24 saat boyunca fikse edilmiş, ardından rutin histolojik teknikler uygulanmıştır. Dokulardan mikrotom yardımı ile 5 µm kalınlığında kesitler alındıktan sonra Hematoksilen&Eozin boyaması yapılmıştır. Boyanan kesitler ışık mikroskobu altında değerlendirilerek histopatolojik değişimler gözlenmiştir. Kontrol grubunda normal ince bağırsak dokusu gözlenirken deney gruplarında villus yapısında dejenerasyon, villuslarda birleşme, inflamasyona bağlı olarak enterosit ve lenfosit sayısında artış, Goblet hücrelerinde hiperplazi ve muskularis externada kalınlaşma tespit edilmiştir.

Histopathological Effects of Triclosan on Zebrafish (*Danio rerio*) Intestine

ABSTRACT

Triclosan, a type of bisphenol, is used as a preservative, antiseptic, antimicrobial and disinfectant in the structure of many products such as antibacterial soap, deodorant, toothpaste, hand cream, as well as personal care products such as fabrics, toys, toothbrush handles, and plastics used in the kitchen. Triclosan, which is one of the important biocides and environmental pollutants, mixes with the ecosystem through groundwater and threatens the life of aquatic organisms. In this study, it was aimed to examine the histopathological effects of triclosan on zebrafish intestinal tissues. Fish were treated with 34, 85 and 170 µg/L triclosan for 5 days. At the end of the 5-days of exposure period, the intestinal tissues were dissected. Tissues were fixed with Bouin's fixative for 24 hours, followed by routine histological techniques. Hematoxylin & Eosin staining was performed after 5 µm thick sections were taken from the tissues with a microtome. Stained sections were evaluated under a light microscope and histopathological changes were observed. While normal intestinal tissue was observed in the control group, degeneration in the villus structure, fusion of the villi, an increase in the number of enterocytes and lymphocytes due to inflammation, hyperplasia in the goblet cells and thickening of the muscularis externa were detected in the experimental groups.

Article Info

*Corresponding author:

e-mail: cansua@sakarya.edu.tr

Institution: Sakarya University
Science Faculty, Department of
Biology Sakarya, TÜRKİYE

Article history

Received: 21.07.2022

Accepted: February 02.09.2022

Available online: 30.09.2022

Anahtar Kelimeler:

Triklosan, ince bağırsak, Zebra
balığı, Histopatoloji

Keywords:

Triclosan, Intestine, Zebrafish,
Histopathology

How to Cite: C Akbulut,

"Triklosanın Zebra Balığı (*Danio
rerio*) İnce Bağırsağı Üzerinde
Histopatolojik Etkileri",
*Environmental Toxicology and
Ecology*, cilt 2, sayı 2, ss. 98-106,
2022.

1. GİRİŞ

1960'lı yılların başında geniş spektrumlu antibiyotik olarak üretilen triklosan (TCS; 2,4,4'-trikloro-2'-hidroksidifenil eter), kişisel bakım ürünleri, mutfak eşyaları, oyuncaklar, kumaşlar ve plastik ürünler gibi pek çok üründe koruyucu ve antimikrobiyal olarak kullanılan bir kimyasaldır [1,2]. Birçok bakteri ve mantar türüne karşı etkili olan TCS, bakterilerin hücre duvarına nüfuz ettikten sonra, RNA sentezi ve makromolekül üretimi dahil olmak üzere birçok sitoplazmik ve membran bölgesini hedefleyerek bakterinin ölümüne yol açar [3].

TCS, fenol, difenil eter ve poliklorlu bifenil fonksiyonel grupları içeren halojenli aromatik hidrokarbon olarak sınıflandırılabilir [4]. Halojenli bir bifenil eter olan TCS'nin kimyasal yapısı iki aromatik halkalı molekül içermesi sebebiyle poliklorlu bifeniller (PCB'ler), polibromlu difenil eterler (PBDE'ler), bisfenol A, dioksinler ve tiroid hormonlarına benzer [2,5-7].

Yüksek kullanım oranına bağlı olarak TCS, yer altı sularına karışarak sucul ekosisteme ulaşmaktadır [2]. Bu kimyasalın sucul canlılar için oldukça toksik olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle triklosanın çevreye yüksek düzeyde deşarj edilmesi durumunda ekosistemin dengesini tahrip edeceği beklenmektedir [8]. TCS'in ekosisteme deşarjı sonucu biyolojik ve fotolitik bozunma, metiltriklosan ve diğer klorlu fenoller gibi yan ürünlerin oluşmasına yol açar. Bu yan ürünler, bozunmaya karşı daha dirençli ve ana bileşiğe göre daha yüksek toksisiteye sahip olabilir. Suda yaşayan organizmaların sürekli olarak TCS'ye maruz kalması, biyolojik birikim potansiyeline yol açmaktadır. TCS yüzey sularında, sedimentlerde, topraklarda, su türlerinde ve insanlarda tespit edilmiştir [2, 9-11].

Önemli biyositlerden biri olması nedeniyle triklosanın toksisitesi pek çok sucul organizmada araştırılmıştır. Zebra balığı (*Danio rerio*), *Lepomis macrochirus*, gökkuşuğu alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*), Japon pirinç balığı (medaka) (*Oryzias latipes*) ve *Pimephales promelas* gibi birçok balıkta medyan öldürücü konsantrasyonunun (LC_{50}) 270-602 $\mu\text{g/L}$ arasında olduğu bulunmuştur [8, 12-15]. Zebra balıklarında 96 saatlik LC_{50} değeri 0.34 mg/L olarak tespit edilmiştir [16].

Zebra balığı, biyolojik ve genetik gelişim aşamalarından insan hastalıklarına kadar birçok alanda yaygın olarak kullanılan bir omurgalı hayvan modelidir. Laboratuvarında bakımının kolay olması, yaşam döngüsünün kısa olması ve değişken çevre koşullarına dayanıklı olması nedeniyle özellikle çevresel toksikoloji çalışmalarında tercih edilmektedir. Toksikoloji çalışmalarının ön saflarında yer alan zebra balığı, endokrin bozucu kimyasallar, ağır metaller ve bu kirleticilerin neden olduğu hastalıklar gibi çevresel kontaminantların mekanizmalarını araştırmak için su örneklerinde kontaminantların kalitatif veya kantitatif taranmasında bir araç olarak yaygın olarak kullanılmaktadır [17-19]. Bu çalışmada triklosanın subletal konsantrasyonlarının, zebra balığı ince bağırsak dokularında yarattığı histopatolojik değişimlerin incelenmesi amaçlanmıştır.

2. MATERYAL VE METOD

2.1. Test Kimyasalı

Çalışma kapsamında kullanılan triklosan (CAS No: 3380-34-5) Sigma Aldrich (Almanya)'den temin edilmiştir.

2.2. Deneş Düzenegİ

Çalışma kapsamında bir kontrol ve 3 deneş grubu olmak üzere 4 grup oluşturulmuştur. Her grupta 10 adet erişkin zebra balığı kullanılmıştır. Balıklar 30 L kapasiteli akvaryumlarda, 12 saat aydınlık:12 saat karanlık fotoperiyodunda ve $28\pm1^{\circ}\text{C}$ su sıcaklığında tutulmuştur. Deneş gruplarına 96 saatlik LC50 konsantrasyonları göz önünde bulundurularak sırasıyla 34, 85 ve 170 $\mu\text{g/L}$ 'lik TCS uygulanmıştır. Triklosan, uygulanmadan önce asetonda çözülerek stok solüsyon oluşturulmuştur. 250 $\mu\text{l/L}$ 'lik aseton konsantrasyonu ile en yüksek aseton konsantrasyonu kontrol grubunda yer almıştır.

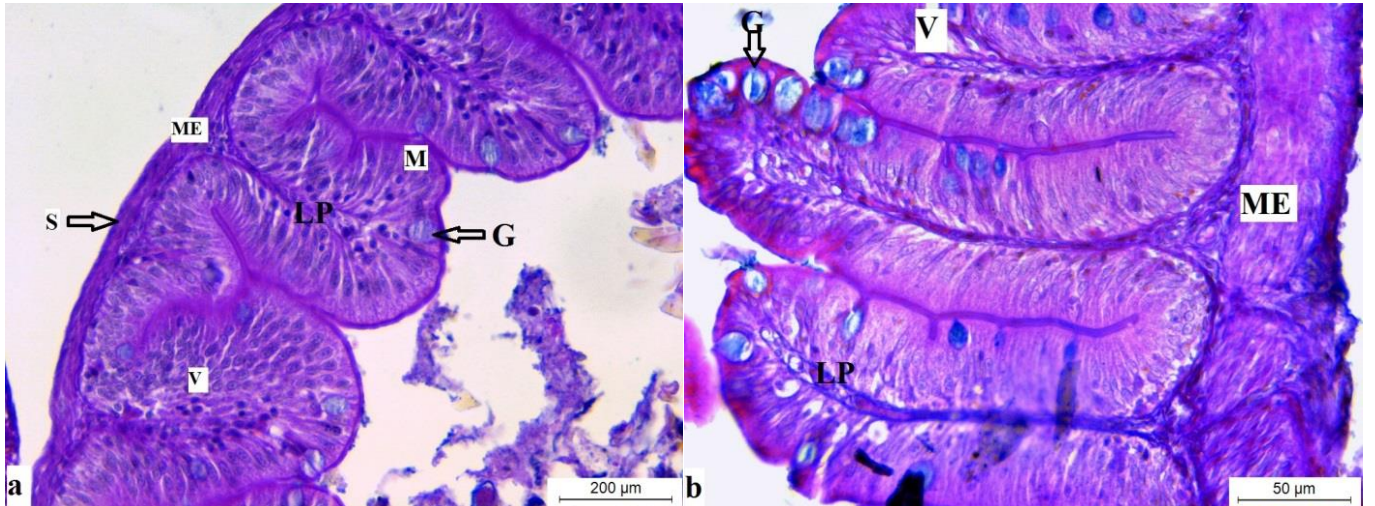
2.3. Histolojik İşlemler

5 günlük maruziyet süresinin ardından ince bağırsak dokuları disekte edilerek çıkarılmıştır. Dokular Bouin fiksatif ile 24 saat boyunca fikse edilmiştir. Fiksasyon süresinin ardından, dokular yükselen etil alkol serilerinden geçirilip ksilol ile şeffaflaştırılmıştır. Parafine gömülmüş olan ince bağırsak dokularından mikrotom ile kesitler alınmış ve H&E boyaması yapıldıktan sonra dokular ışık mikroskobu ile değerlendirilmiştir.

3. BULGULAR

3.1. Kontrol Grubu

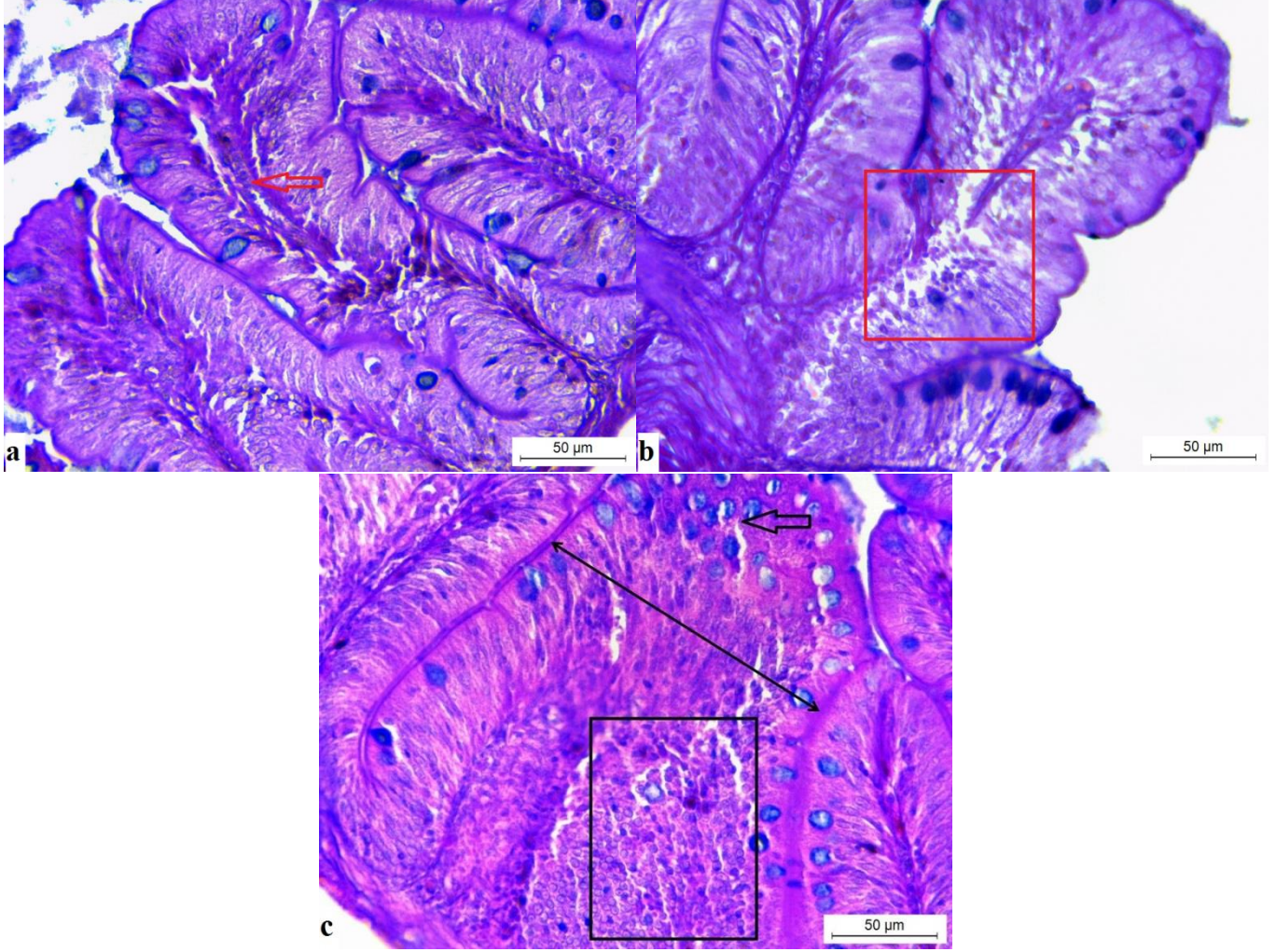
Kontrol grubuna ait örnekler incelendiğinde normal ince bağırsak histolojisi gözlenmiştir. İnce bağırsak dokusundan alınan enine kesitler incelendiğinde villus yapıları ve katmanları net bir şekilde gözlenmiştir. Seroza, muskularis eksterna ve mukoza tabakaları ışık mikroskobu altında ayırt edilmiştir. Mukozanın lümene bakan kısmında yer alan yer alan silindirik epitel hücreleri, bu hücrelerin arasında tek tek yer alan Goblet hücreleri ve epitel tabakasının hemen altında yer alan lamina propria görüntülenmiştir (Şekil 1a, 1b).



Şekil 1. Kontrol grubu ince bağırsak histolojisi, S: seroza, ME: muskularis eksterna, M: mukoza, G: Goblet hücresi, V: villus, LP: lamina propria.

3.2. 34 µg/L TCS Uygulamasını Yapılmış Grup

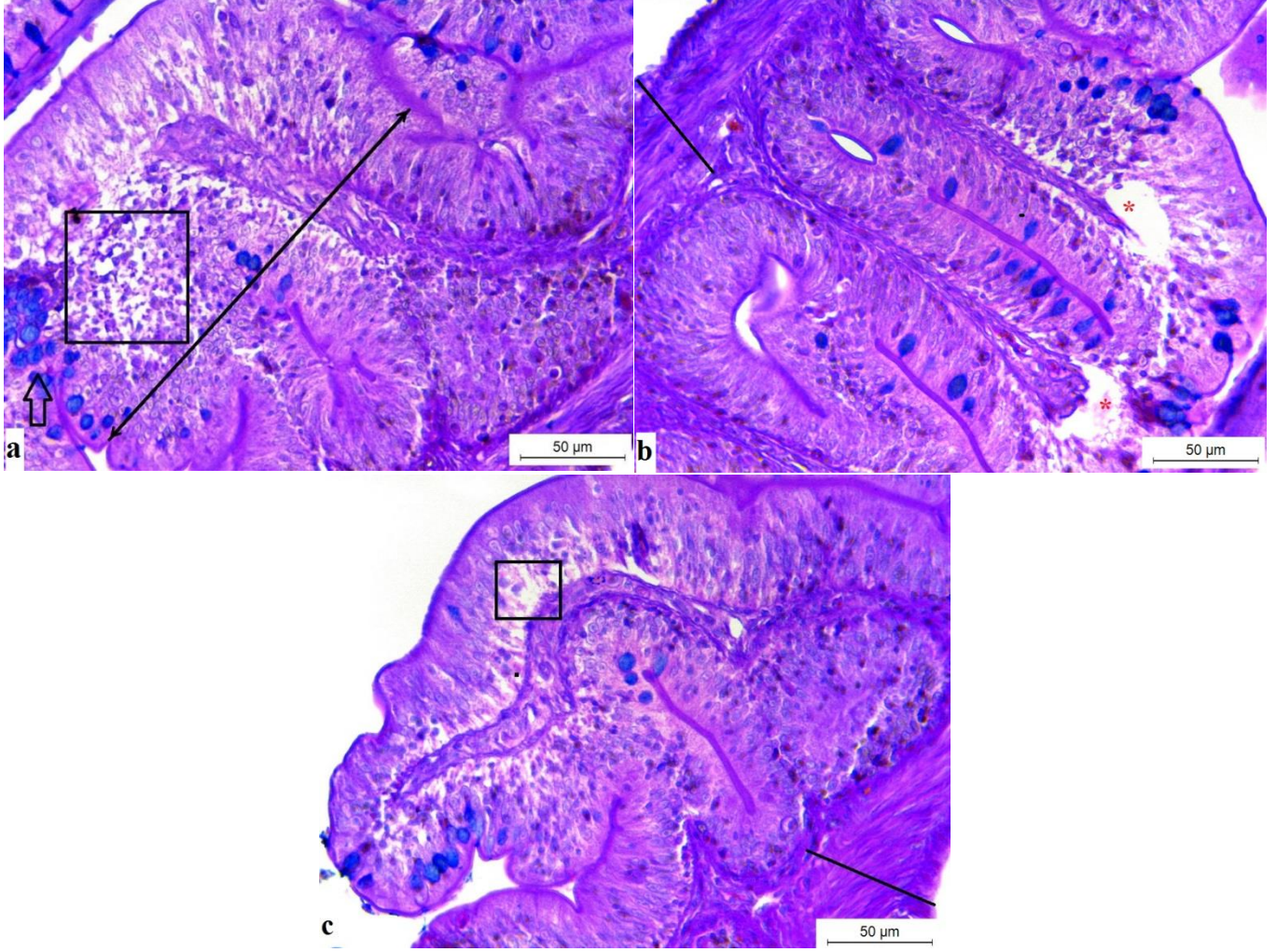
Kontrol grubu ile kıyaslandığında, 34 µg/L TCS uygulamasını yapılmış grupta lamina propriada parçalanmalar ve dejenerasyonlar tespit edilmiştir (Şekil 2a, 2b). Goblet hücrelerinde hiperplazi izlenmiştir (Şekil 2c). Bunun yanı sıra villus yapısında genişleme ile enterosit ve lenfosit sayısında artış gözlenmiştir (Şekil 2c).



Şekil 2. 34 µg/L TCS uygulamasını yapılmış gruptaki ince bağırsak histolojisi, kırmızı ok: lamina propriada dejenerasyon, siyah ok: Goblet hücrelerinde hiperplazi, kırmızı kare: lamina propriada parçalanma, siyah dörtgen: enterosit ve lenfosit sayısında artış, çift taraflı ok: villus yapısında genişleme.

3.3. 85 µg/L TCS Uygulamasını Yapılmış Grup

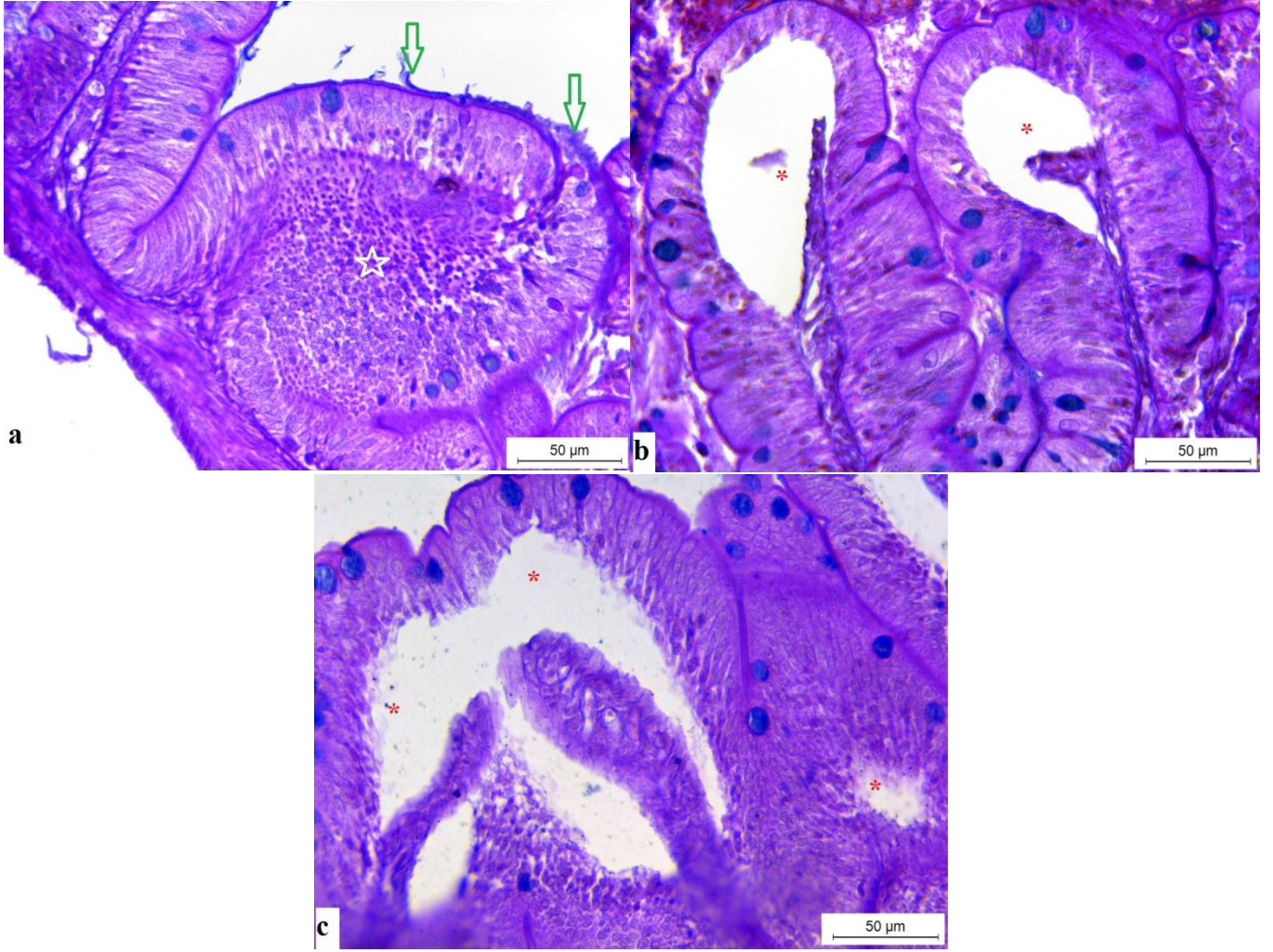
85 µg/L TCS uygulamasını yapılmış grupta, 34 µg/L'lik gruba benzer olarak lamina propriada parçalanma ve dejenerasyonlar gözlenmiştir (Şekil 3a, 3c). Villuslarda birleşme ve Goblet hücrelerinde hiperplazi dikkat çekmiştir (Şekil 3a). Bazı villuslarda ödem görülmüştür (Şekil 3b). Muskularis eksternada kalınlaşma görüntülenmiştir (Şekil 3c).



Şekil 3. 85 µg/L TCS uygulaması yapılmış gruptaki ince bağırsak histolojisi, kare: lamina propriada dejenerasyon ve parçalanma, siyah ok: Goblet hücrelerinde hiperplazi, asteriks: villuslarda ödem, çizgi: muskularis eksternada genişleme, çift taraflı ok: villuslarda birleşme.

3.4. 170 µg/L TCS Uygulaması Yapılmış Grup

170 µg/L TCS uygulaması yapılan grupta histopatolojik etkilerin daha şiddetli olduğu gözlenmiştir. Bu gruptaki ince bağırsak villus epitelleri incelendiğinde fırça kenar yapısında bozulma izlenmiştir (Şekil 4a). İnflamasyona bağlı olarak enterosit ve lenfositlerde hiperplazi tespit edilmiştir (Şekil 4a). Villuslarda belirgin vakuolizasyon görülmüştür (Şekil 4b, 4c). Bazı villuslarda birleşme gözlenmiştir (Şekil 4c).



Şekil 4. µg/L TCS uygulaması yapılmış gruptaki ince bağırsak histolojisi, ok: fırça kenar yapısında bozulma, yıldız: enterosit ve lenfositlerde hiperplazi, asteriks: ödem.

3. TARTIŞMA

Günümüzde kişisel bakım ürünlerinin ve plastiklerin kullanımı oldukça yaygındır. Bu ürünler, çeşitli yollarla sucul organizmaları etkileme potansiyeline sahip kimyasallar içermektedir. Şüphesiz ki triklosan da bunlardan biridir. Triklosanın zebra balığı solungaç, karaciğer, testis ve ovaryum dokularında histopatolojik etkilere yol açtığı tespit edilmiştir [19, 20]. Çeşitli çalışmalar, triklosanın canlılarda endokrin bozucu potansiyelinin de olduğunu göstermektedir [20-25]. Endokrin bozucu potansiyeli olan pestisitlerden biri olan imidaklopridin [26] zebra balığı ince bağırsak dokusunda villus yapısında ve fırça kenar yapısında dejenerasyon, enterosit sayısında artış ve lamina propria parçalanma gibi etkiler gözlenmiştir [27]. Benzer etkiler bu çalışmada da mevcuttur. İnflamasyona bağlı olarak enterosit ve lenfosit sayısında artış gözlenmiştir. Triklosanın farelerde inflamasyonla karakterize kolite sebep olduğu gösterilmiştir [28].

Endokrin bozucu kimyasallar, farklı balıkların ince bağırsak dokularında da benzer histopatolojik etkilere sebep olmaktadır. Önemli endokrin bozuculardan nonilfenolün alabalık (*Salmo trutta caspius*) ince bağırsak dokusunda histopatolojik etkilerinin incelendiği bir çalışmada villus boyutunda kısalma,

villuslarda birleşme, Goblet hücrelerinde hipertrofi ve hiperplazi gözlenmiştir [29]. Bu çalışmada farklı olarak, Goblet hücrelerinde hipertrofi ve villuslarda kısalmaya rastlanmamıştır. Tarımda sıklıkla kullanılan pestisitlerden biri olan thiodanın (endosülfan) sivrisinek balığı (*Gambusia affinis*) ince bağırsak dokusunda lamina propriada lenfosit birikimi, ödem, dejenerasyon, villus parçalanması, piknotik çekirdek ve nekroz tespit edilmiştir [30]. Lamina propriada lenfosit artışı ve villus dejenerasyonu bulguları benzer olarak bu çalışmada da izlenmiştir. Lindanın ot sazanı (*Ctenopharyngodon idella*) ince bağırsak dokusunda, villus yapısında dejenerasyon, ve vakuolizasyon gözlenmiştir. Buna ek olarak epitel hücrelerinde tahribat ve deformasyon tespit edilmiştir [31].

Sonuç olarak, endokrin bozucu özelliği olan çeşitli kimyasalların ve pestisitlerin balıkların ince bağırsak dokularında inflamasyona ve dejenerasyona neden olduğu açıktır. Gelecekteki çalışmalar, özellikle endokrin bozucu potansiyeli olan çevresel kirleticilerin sucul canlılardaki akut ve kronik etkilerinin daha detaylı araştırılması üzerine odaklanmalıdır. Bu kimyasalların ve de bu kimyasalları içeren ürünlerin dikkatli bir şekilde kullanılması ve geri dönüştürülmesi, çevreyi korumak ve suda yaşayan organizmaların yaşamlarını sürdürmesi için çok önemlidir.

Teşekkür

Materyal temini ve desteklerinden dolayı Dr. Sezen TOKSOY KÖSEOĞLU ve Dr. Sezgi ARMAN'a teşekkür ederim.

Finansman

Yazar bu çalışmanın araştırılması, yazarlığı veya yayınlanması için herhangi bir maddi destek almamıştır.

Çıkar Çatışması/Ortak Çıkar Beyanı

Yazar tarafından herhangi bir çıkar çatışması veya ortak çıkar beyan edilmemiştir.

Araştırma ve Yayın Etiği Bildirgesi

Yazarlar, makalenin tüm süreçlerinde Environmental Toxicology and Ecology Dergisinin bilimsel, etik ve alıntı kurallarına uyduklarını ve toplanan veriler üzerinde herhangi bir tahrifat yapmadıklarını beyan ederler. Ayrıca karşılaşılabilecek etik ihlallerden Environmental Toxicology and Ecology ve yayın kurulunun hiçbir sorumluluğu olmadığını ve bu çalışmanın Environmental Toxicology and Ecology dışında herhangi bir akademik yayın ortamında değerlendirilmediğini beyan ederler.

KAYNAKÇA

- [1] R. D. Jones, H. B. Jampani, J. L. Newman, A. S. Lee, "Triclosan: A review of effectiveness and safety in health care settings," American Journal of Infection Control, vol 28, no 2, 184-196, 2000.
- [2] A. B. Dann, A. Hontela, "Triclosan: environmental exposure, toxicity and mechanisms of action," Journal of Applied Toxicology, vol 31, no 4, 285-311, 2011.
- [3] A. D. Russell, "Whither triclosan?" Journal of Antimicrobial Chemotherapy, vol 53, no 5, 693-695, 2004.
- [4] K. C. Ahn, B. Zhao, J. Chen, G. Cherednichenko, E. Sanmarti, M. S. Denison, B. Lasley, I. N. Pessah, D. Kültz, D. P. Y. Chang, S. J. Gee, B. D. Hammock, "In vitro biologic activities of the antimicrobials triclocarban, its analogs, and triclosan in bioassay screens: receptor-based bioassay screens," Environmental Health Perspectives, vol 116, no 9, 1203-1210, 2008.

- [5] N. Veldhoen, R. C. Skirrow, H. Osachoff, H. Wigmore, D. J. Clapson, M. P. Gunderson, G. van Aggelen, C. C. Helbing, "The bactericidal agent triclosan modulates thyroid hormone-associated gene expression and disrupts postembryonic anuran development," *Aquatic Toxicology*, vol 80, no 3, 217–227, 2006.
- [6] K. M. Crofton, K. B. Paul, M. J. De Vito, J. M. Hedge, "Short-term in vivo exposure to the water contaminant triclosan: evidence for disruption of thyroxine," *Environmental Toxicology and Pharmacology*, vol 24, no 2, 194–197, 2007.
- [7] M. Allmyr, F. Harden, L. M. L. Toms, J. F. Mueller, M. S. McLachlan, M. Adolfsson-Erici, G. Sandborgh-Englund, "The influence of age and gender on triclosan concentrations in Australian human blood serum," *Science of the Total Environment*, vol 393, no 1, 162–167, 2008.
- [8] N. Tatarazako, H. Ishibashi, K. Teshima, K. Kishi, K. Arizono, "Effects of triclosan on various aquatic organisms," *Environmental Sciences: an International Journal of Environmental Physiology and Toxicology*, vol 11, no 2, 133-140, 2004.
- [9] S. Chu, C. D. Metcalfe, "Simultaneous determination of triclocarban and triclosan in municipal biosolids by liquid chromatography tandem mass spectrometry," *Journal of Chromatography A*, vol 1164, no 1-2, 212–218, 2007.
- [10] T. E. A. Chalew, R. U. Halden, "Environmental exposure of aquatic and terrestrial biota to triclosan and triclocarban," *Journal of the American Water Resources Association*, vol 45, no 1, 4–13, 2009.
- [11] R. Reiss, G. Lewis, J. Griffin, "An ecological risk assessment for triclosan in the terrestrial environment," *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol 28, no 7, 1546–1556, 2009.
- [12] D. R. Orvos, D. J. Versteeg, J. Inauen, M. Capdevielle, A. Rothenstein, V. Cunningham, "Aquatic toxicity of triclosan," *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol 21, no 7, 1338-1349, 2002.
- [13] T. E. A. Chalew, R. U. Halden, "Environmental exposure of aquatic and terrestrial biota to triclosan and triclocarban," *Journal of the American Water Resources Association*, vol 45, 4-13, 2009.
- [14] N. Nakada, M. Yasojima, Y. Okayasu, K. Komori, Y. Suzuki, "Mass balance analysis of triclosan, diethyltoluamide, crota-miton and carbamazepine in sewage treatment plants," *Water Science and Technology*, vol 61, 1739-1747, 2010.
- [15] G. S. Dhillon, S. Kaur, R. Pulicharla, S. K. Brar, M. Cledón, M. Verma, R. Y. Surampalli, "Triclosan: current status, occurrence, environmental risks and bioaccumulation potential," *International Journal of Environmental Research and Public Health*, vol 12, no 5, 5657-5684, 2015.
- [16] R. Oliveira, I. Domingues, C. K. Grisolia, A. M. Soares, "Effects of triclosan on zebrafish early-life stages and adults," *Environmental Science and Pollution Research*, vol 16, 679-688, 2009.
- [17] F. E. Kayhan, H. E. Esmer Duruel, Ş. Kızılkaya, S. K. Dinç, G. Kaymak, C. Akbulut, N. D. Yön, "Toxic effects of herbicide tribenuron-methyl on liver tissue of zebrafish (*Danio rerio*)," *Fresenius Environmental Bulletin*, vol 29, 11175-11179, 2020.
- [18] S. Arman, S. I. Ucuncu, "Impact of acute fonofos exposure on skeletal muscle of zebrafish: Histopathological and biometric analyses," *International Journal of Limnology*, 57, vol 25, 2021.
- [19] S. Arman, "Effects of acute triclosan exposure on gill and liver tissues of zebrafish (*Danio rerio*)" *International Journal of Limnology*, vol 57, no 6, 2021.
- [20] C. Akbulut, "Histopathological and apoptotic examination of zebrafish (*Danio rerio*) gonads exposed to triclosan," *Archives of Biological Sciences*, vol 73, no 4, 465-472, 2021.
- [21] H. Ishibashi, N. Matsumura, M. Hirano, M. Matsuoka, H. Shirat-suchi, Y. Ishibashi, Y. Takao, K. Arizono, "Effects of triclosan on the early life stages and reproduction of medaka *Oryzias latipes* and induction of hepatic vitellogenin," *Aquatic Toxicology*, vol 67, no 2, 167-179, 2004.
- [22] S. A. Raut, R. A. Angus, "Triclosan has endocrine-disrupting effects in male western mosquitofish, *Gambusia affinis*," *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol 29, no 6, 1287-1291, 2010.
- [23] E. S. Koeppe, K. K. Ferguson, J. A. Colacino, J. D. Meeker, "Relationship between urinary triclosan and paraben concentrations and serum thyroid measures in NHANES 2007-2008," *Science of the Total Environment*, vol 445-446, 299-305, 2013.

- [24] C. F. Wang, Y. Tian, “Reproductive endocrine-disrupting effects of triclosan: Population exposure, present evidence and potential mechanisms,” *Environmental Pollution*, vol 206, 195-201. 2015.
- [25] G. W. Louis, D. R. Hallinger, M. J. Braxton, A. Kamel, T. E. Stoker, “Effects of chronic exposure to triclosan on reproductive and thyroid endpoints in the adult Wistar female rat,” *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, vol 80, no 4, 236-249, 2017.
- [26] C. Akbulut, “Acute Exposure to the Neonicotinoid Insecticide Imidacloprid of Zebrafish (*Danio rerio*) Gonads: A Histopathological Approach,” *International Journal of Limnology*, vol 57, 23. 2021.
- [27] C. Akbulut, N. D. Yön Ertuğ, “Histopathological Evaluation of Zebrafish (*Danio rerio*) Intestinal Tissue After Imidacloprid Exposure,” *Acta Aquatica Turcica*, vol 16, no 3, 360-365, 2019.
- [28] J. Zhang, M. E. Walker, K. Z. Sanidad, H. Zhang, Y. Liang, E. Zhao, K. Chacon-Vargas, V. Yeliseyev, J. Parsonnet, T. D. Haggerty, G. Wang, J. B. Simpson, P. B. Jariwala, V. V. Beaty, J. Yang, H. Yang, A. Panigrahy, L. M. Minter, D. Kim, J. G. Gibbons, L. Liu, Z. Li, H. Xiao, V. Borlandelli, H. S. Overkleeft, E. W. Cloer, M. B. Major, D. Goldfarb, Z. Cai, M. R. Redinbo, G. Zhang, “Microbial enzymes induce colitis by reactivating triclosan in the mouse gastrointestinal tract,” *Nature Communications*, vol 13, 136, 2022.
- [29] I. Shirdel, M. R. Kalbassi, “Effects of nonylphenol on key hormonal balances and histopathology of the endangered Caspian brown trout (*Salmo trutta caspius*),” *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, vol 183-184, 28-35, 2016.
- [30] E. İ. Cengiz, E. Ünlü, K. Balcı, “The histopathological effects of thiodan on the liver and gut of mosquitofish, *Gambusia affinis*,” *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, vol 36, no 1, 75-85, 2001.
- [31] M. F. Vajargah, J. I. Namin, Mohsenpour R, A. M. Yalsuyi, M. D. Prokić, C. Faggio, “Histological effects of sublethal concentrations of insecticide Lindane on intestinal tissue of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Veterinary Research Communications*, 45, 373–380. 2021.