



Cıva toksisitesi üzerine selenyumun koruyucu rolünün *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758)'ta katalaz, süperoksit dismutaz ve malondialdehit parametreleri ile değerlendirilmesi

Evaluation of protective role of selenium on mercury toxicity by superoxide dismutase, catalase and malondialdehyde parameters in *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758)

Özgür Fırat^{1*} • Özlem Kaya²

¹Adıyaman Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Adıyaman, Türkiye  <https://orcid.org/0000-0002-9683-8945>

²Adıyaman Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Adıyaman, Türkiye  <https://orcid.org/0000-0002-2885-1865>

*Corresponding author: ofirat@adiyaman.edu.tr

Received date: 25.01.2019

Accepted date: 17.06.2019

How to cite this paper:

Fırat, Ö. & Kaya, Ö. (2019). Evaluation of protective role of selenium on mercury toxicity by superoxide dismutase, catalase and malondialdehyde parameters in *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758). *Ege Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 36(3), 245-253. DOI: [10.12714/egejfas.2019.36.3.05](https://doi.org/10.12714/egejfas.2019.36.3.05)

Öz: Bu araştırmada cıva (Hg) toksisitesini ve bu toksite üzerine selenyumun (Se) koruyucu rolünü belirlemek için *Oreochromis niloticus*'un dokularındaki oksidatif stres parametreleri çalışılmıştır. Bu amaçla balıklar 4 ve 21 günlük sürelerle 0.01 ve 0.05 ppm Hg ile 0.01+0.01 ve 0.05+0.05 ppm Hg+Se karışımlarının etkisine bırakılmış ve solungaç ve karaciğer süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT) aktiviteleri ile malondialdehit (MDA) düzeyleri belirlenmiştir. Hg'nin tek başına ve Se ile birlikte etkisinde incelenen oksidatif stres parametrelerinde dokuya, ortam derişimine ve etki süresine bağlı olarak önemli değişimlerin meydana geldiği belirlenmiştir. Cıvanın tek başına ve cıva+selenyum karışımının etkisinde özellikle de yüksek ortam derişimlerinde solungaç ve karaciğer SOD ve CAT aktiviteleri, 4 günlük süre sonunda anlamlı bir artış gösterirken (P<0.05); 21 günlük süre sonunda ise anlamlı bir azalma göstermiştir (P<0.05). Hg ve Hg+Se karışımının etkisinde her iki dokuda 4 günlük süre sonunda tüm ortam derişimlerinde önemli bir değişim göstermeyen (P>0.05) MDA düzeyinin, 21 günlük süre sonunda yüksek ortam derişimlerinde anlamlı bir artış gösterdiği saptanmıştır (P<0.05). Sonuç olarak *O. niloticus*'ta belirlenen SOD ve CAT aktiviteleri ile MDA düzeylerindeki artış veya azalışların cıva+selenyum karışımına oranla cıvanın tek başına etkisinde daha fazla olduğu ve selenyumun cıvanın oksidatif toksisitesi üzerine koruyucu bir etkiye sahip olduğu belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Oreochromis niloticus*, cıva, selenyum, antioksidan enzimler, malondialdehit

Abstract: In this research, to determine toxicity of mercury (Hg) and whether selenium (Se) has any role in protection of this toxicity, it was investigated the alterations in oxidative stress parameters in tissues of *Oreochromis niloticus*. For this purpose, fish were exposed to 0.01 and 0.05 ppm Hg and 0.01 ppm Hg+0.01 ppm Se and 0.05 ppm Hg+0.05 ppm Se for 4 and 21 days and activities of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) and levels of malondialdehyde (MDA) in gill and liver were determined. It was observed significant changes in all analyzed parameters due to tissue, medium concentration and exposure period in the exposure of mercury alone and Hg+Se mixtures. In Hg alone, and in combination with Se especially in their higher medium concentrations, activities of SOD and CAT in the gill and liver significantly increased at 4 days (P<0.05), while they significantly decreased at 21 days (P<0.05). In the exposure of Hg and Hg+Se and in the both tissues, it not determined significant alteration in the MDA levels at 4 days (P>0.05), while they elevated in their higher concentrations at 21 days (P<0.05). In conclusion, it was determined the increases or decreases in activities of SOD and CAT and levels of MDA in *O. niloticus* were higher in the Hg alone than Hg+Se mixtures and selenium has a protective effect on oxidative toxicity of mercury.

Keywords: *Oreochromis niloticus*, mercury, selenium, antioxidant enzymes, malondialdehyde

GİRİŞ

Günümüzde canlıların doğal yaşam alanları çevresel kirlenmelerden ciddi boyutta etkilenmektedir. Bu kirlenmeler arasında ağır metaller önemli bir yer tutmaktadır. Ağır metaller, suda kolay çözünmeleri, kalıcılıkları, organizma tarafından alınabilmeleri, vücutta birikebilmeleri ve parçalanma ile atılmalarının zor olması nedeniyle sucul organizmalar için oldukça toksiktirler (Van Dyk vd., 2007). Genel olarak metaller biyolojik fonksiyonlardaki rollerine göre iki ana gruba ayrılabilir. Hg, kadmiyum, kurşun, gibi metaller organizmada herhangi bir rolü olmayan ve düşük düzeylerde bile toksik olduğundan toksik metaller olarak adlandırılırken; bakır, demir, çinko ve selenyum gibi metaller ise önemli biyolojik fonksiyonlara sahip ve eser düzeyleri canlılar için oldukça gerekli olduğundan esansiyel metaller olarak ifade edilebilmektedir.

Cıva (Hg), dünyadaki en toksik 20 maddeden biri olarak ifade edilmektedir (ATSDR, 2018). Hg günümüzde fungusid olarak tarımsal uygulamalarda ve klor-alkali endüstrisi, elektrikli cihazların imalatı, ilaç sanayisi, selüloz ve kağıt endüstrisi ve plastik üretiminde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Hg hem inorganik hem de organik formda tüm canlılar için eser düzeylerde bile oldukça toksik olan bir metaldir (Plessi vd., 2001). Sucul ekosistemlerdeki uzun kalıcılıkları ve yüksek hareketlilikleri nedeniyle Hg akuatik organizmalarda birikmekte ve besin zinciri aracılığıyla üst trofik düzeydeki canlılara hatta insanlara kadar ulaşmaktadır. Cıvanın insanlar ve diğer canlılar için güçlü bir nörotoksik ajan olduğu iyi bilinmektedir (Diez, 2008). Cıva ayrıca serbest oksijen türlerinin oluşumuna ve oksidatif strese neden olarak hücrelerin önemli savunma mekanizmalarını baskılayabilmekte ve lipid peroksidasyonuna neden olacak etkiler gösterebilmektedir (Berntssen vd., 2003). Cıva hücrel biyomoleküllerin -SH gruplarına karşı yüksek bir ilgiye sahiptir. Bu nedenle vücuda alındıktan sonra cıva, sistein ve glutatyon gibi düşük moleküler ağırlıklı tiyollere ve tiyol içeren proteinlere bağlanarak doku ve organlarda çok uzun süre kalabilmekte lipid, protein ve DNA oksidasyonuna neden olan serbest radikallerin oluşmasına neden olabilmektedir (Perottoni vd., 2004).

Selenyum (Se) besinsel olarak oldukça gerekli bir eserelement olup hücrede önemli fonksiyonları olan 20-35 enzimin aktivitesinde doğrudan ya da dolaylı olarak rol oynamaktadır (Rayman, 2000). Bu enzimler özellikle de beyinde ve endokrin organlarda işlevsel olup diğer Se içeren moleküllerle birlikte sayısız antioksidan fonksiyonlarda, kanserin önlenmesinde ve sağlıklı bir immün sistemin desteklenmesinde görev almaktadırlar (Rahman, 2000; Beck vd., 2003). Selenyumun canlılar için önemli bazı biyolojik fonksiyonları şunlardır; normal gelişim, büyüme ve homeostazinin korunması; antioksidan, antikanser ve immün sistem düzenleyicisi;

tiroid hormon metabolizması ve spermatogenezdeki rolleridir (Chien vd., 2003; Monteiro vd., 2009). Selenyumun önemli fonksiyonlarından biri de canlılar için oldukça toksik olan ağır metallerle etkileşime girerek bu metallerin toksik etkilerine karşı koruyucu bir rol oynamasıdır. Selenyum özellikle de balıklarda cıva toksitesinin engellenmesinde işlevseldir. Hem inorganik hem de organik cıvanın etkilerinin nötralize edilmesinde selenyum hayati bir rol oynamaktadır (Plessi vd., 2001).

Çoğu ksenobiyotiklerin sucul organizmalarda hücre ve doku hasarına neden olan reaktif oksijen türlerini (ROT) ürettiği bilinmektedir. Ksenobiyotiklerin süperoksit anyon, singlet oksijen, hidroksil radikali ve hidrojen peroksit gibi ROT'ları oluşturduğuna dair güçlü kanıtlar farklı çalışmalarda gösterilmiştir (Firat vd., 2011; Fridin vd. 2015). Oksidatif strese neden olan ROT'ları oluşturan ksenobiyotikler içerisinde ağır metallerde önemli bir yer tutmaktadır. Bakır, demir, cıva, kurşun, kadmiyum ve çinko gibi metallerin, antioksidan enzim aktivitelerinde değişimlere, lipid, DNA ve protein oksidasyonuna ve sonuçta da hücre ölümüne bile yol açacak ROT'ları doğrudan ya da dolaylı olarak oluşturduğu iyi bilinmektedir (Hu, 2000).

Hücreler oksidatif stresle baş etmek ve hasar gören makromolekülleri tamir etmek için farklı mekanizmalara sahiptir. Bu mekanizmalardan en önemlisi ROT'ları temizleyen/engellenen enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlardır (Verma vd., 2007). Enzimatik antioksidanlar süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon-S-transferaz (GST), glutatyon redüktaz (GR) gibi enzimlerden oluşurken; enzimatik olmayanlar glutatyon, metallothionein, vitaminler (E ve C gibi) gibi moleküllerden oluşmaktadır. Diğer omurgalılar gibi balıklarda oksidatif stresle mücadele edebilmek için bu antioksidan savunma sistemlerine sahiptirler. Hem enzimatik hem de non-enzimatik antioksidanlar balık hücrelerinin redoks durumunun korunmasında yararlıdır ve de oksidatif strese karşı biyolojik savunmada önemlidir (Monteiro vd., 2009).

Ağır metal stresi altındaki organizmalarda CAT ve SOD aktivitelerindeki değişimler gibi lipid peroksidasyonu da önemli bir oksidatif stres belirteçidir. Ağır metalleri de içeren çevresel kirlenmeler, balıkların hücre zarlarında lipid peroksidasyonunu başlatma yeteneğine sahiptirler. En yaygın olarak kullanılan lipid peroksidasyon belirteci malondialdehidtir (MDA). MDA, lipid peroksidasyonun son ürünü olup akuatik organizmalardaki ağır metal toksitesinin neden olduğu lipid peroksidasyonun bir biyobelirteci olarak sıklıkla kullanılmaktadır (Nogueira vd., 2003).

Nil tilapyası *O. niloticus* çevresel kirlenmelere karşı dayanıklı bir tür olup akuatik kirliliğin değerlendirilmesi çalışmalarında sıklıkla kullanılan uygun bir indikatör türüdür (Pathiratne vd., 2009; Firat ve Şahin İnanlı,

2016). *O. niloticus* güçlü bir immün sisteme sahip olduğu için biyotik ve abiyotik stresörleri iyi bir şekilde tolere edebilecek kapasiteye sahiptir. *O. niloticus* Dünya’da geniş şekilde kültürü yapılan bir tatlı su balığı olup toksikolojik çalışmalar ve akuatik ekosistemlerin izlenmesi ve değerlendirilmesi için uygun bir organizma olarak kullanıldığından (Min ve Kang, 2008) sunulan çalışmada model organizma olarak seçilmiştir.

Akuatik ortamlardaki en önemli kirleticiler olan ağır metallerin nehirler, göller ve denizlerdeki gittikçe artan konsantrasyonları dünya genelinde endişe uyandıracak düzeylere ulaşmıştır. Cıva da kontamine olmuş sulardaki yüksek düzeyleri ve canlılara olan nörotoksik, teratojenik ve mutajenik etkileri nedeniyle her zaman izlenmesi gereken toksik bir metaldir. Hem ekosistemin geleceği ve hem de balıklar ve onlarla beslenen canlıların sağlığı için cıva toksisitesine karşı koruyucu mekanizmalar bu bağlamda oldukça önem arz etmektedir. Bu nedenle sunulan bu çalışmada balıklardaki cıva toksisitesi üzerine selenyumun koruyucu etkisinin ve bu etkinin oksidatif stres parametreleriyle değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla *O. niloticus* tatlı su balıkları hem cıvanın tek başına hem de cıva+selenyum karışımlarının etkisine bırakılarak solungaç ve karaciğer dokularındaki SOD ve CAT aktiviteleri ile MDA düzeylerindeki değişimler araştırılmıştır.

MATERYAL VE YÖNTEM

Sunulan çalışma için gerekli Etik Kurul onayı Çukurova Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu’ndan alınmıştır (Karar No:5, Tarih: 29.09.2014). Çalışmamızda araştırma materyali olarak *Oreochromis niloticus* kullanılmıştır. Balıklar, Çukurova Üniversitesi (Ç.Ü.) Su Ürünleri Fakültesi bünyesindeki balık yetiştirme havuzlarından alınmış ve Ç.Ü. Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Hayvan Ekofizyoloji laboratuvarına getirilerek içerisinde 120 L bekletilmiş çeşme suyu bulunan 40x140x40 cm ebatlarındaki 14 stok cam akvaryumda ortam koşullarına uyumları için üç ay süre ile bırakılmışlardır. Bu süre içerisinde balıklar 10.21 ± 0.5 cm boy ve 27.36 ± 0.7 g ağırlığa ulaşmıştır. Deneyler 25±1 °C’de yürütülmüş, günde sekiz saat aydınlanma periyodu uygulanmıştır. Merkezi havalandırma sistemiyle akvaryumların havalandırılması sağlanmıştır. Laboratuvar koşullarına uyumları sırasında balıklar, hazır balık yemi kullanılarak (Pınar Sazan Yavru yemi, İzmir) beslenmiştir. Kullanılan balık yemi çinko, mangan, magnezyum, demir, bakır ve kobalt gibi mikro elementler; kalsiyum, sodyum ve fosfor gibi makro elementler ile en az % 40 düzeyinde ham protein içermektedir. Denemelerden 48 saat öncesinde yem kesilmiş ve denemeler boyunca günde iki defa olmak üzere vücut ağırlıklarının %2’si kadar yem ile balıklar beslenmiştir. Deney suyunun kimyasal özellikleri;

toplam sertlik 318±4 ppm CaCO₃, çözülmüş oksijen 7.22±0.03 mg/L, pH 7.81±0.03 olarak ölçülmüştür.

Deneylerde kullanılan metaller cıva klorür [(HgCl)₂] (Sigma) ve sodyum selenit [(Na₂SeO₃)] (Sigma) olup bu kimyasalların 1 M stok çözeltileri deiyonize su ile taze hazırlanmıştır. Bu hazırlanan çözeltilerden uygun derişimler uygun seyreltmelerle deney akvaryumlarına uygulanmıştır (Ranzani-Paiva vd., 2011). Deneyler cıva ve cıva + selenyum karışımları dikkate alınarak iki seri olacak şekilde yürütülmüştür. Balıklar birinci seride cıvanın 0.01 ve 0.05 ppm; ikinci seride ise cıva + selenyumun 0.01 ppm Hg + 0.01 ppm Se ve 0.05 ppm Hg + 0.05 ppm Se derişimlerinin etkisine 4 ve 21 gün sürelerle bırakılmıştır. Çalışmamızda kullanılan selenyum selenitin 96 saat-LC₅₀ değeri *O. niloticus* için 4.42 mg/L olarak belirlenmiştir (Ranzani-Paiva vd., 2011). Yine *O. niloticus* için Hg’nin 96 saat-LC₅₀ değeri ise 0.2 ppm olarak saptanmıştır (Ishikawa vd., 2007). Çalışmamızda test edilen cıvanın 0.01 ve 0.05 mg/L derişimleri, bu LC₅₀ değerinin sırasıyla 1/20 ve 1/4’ü baz alınarak subletal konsantrasyonlar olarak seçilmiştir. Deneylerde her birinin içerisinde 12 adet balık bulunan toplamda 5 akvaryum kullanılmıştır. Deneylerde akvaryumların ilk ikisine cıva çözeltileri; üçüncü ve dördüncü akvaryumlara cıva + selenyum çözeltilerinden 120’şer litre ve beşinci akvaryum ise kontrol grubu olarak kullanılarak içerisine aynı hacimde (120 L) dinlendirilmiş çeşme suyu konmuştur. Deney akvaryumlarında kullanılan metal çözeltilerinin derişimlerinde zamana bağlı olarak değişim olabileceği dikkate alınarak çözeltiler her gün yeni hazırlanan stok çözeltilerden uygun seyreltmeler yapılarak değiştirilmiştir. Her sürenin sonunda (4. ve 21. günler) deney ve kontrol akvaryumların her birinden 6 balık çıkartılarak deneyler altı tekrarlı olarak yapılmıştır (n=6).

Belirlenen her sürenin sonunda deney akvaryumlarından rastgele seçilen balıklar, çeşme suyuyla yıkanarak temizlenmiş, yüzeylerinde bulunan su damlacıkları kurutma kağıdıyla alınmış ve boy ve ağırlıkları saptanarak diseksiyona hazır hale getirilmiştir. Balıklar diseksiyondan önce spinal yapılarak öldürülmüştür. Steril aletlerle solungaç ve karaciğer doku örnekleri buz üzerinde disekte edilmiş, bu örnekler % 0.59 NaCl ile yıkanmış ve ağırlıkları alındıktan sonra biyokimyasal analize kadar -80 °C’de muhafaza edilmişlerdir. Disekte edilen dokular 1/10 ağırlık/hacim (w/v) olacak şekilde 0.25 M sükröz içeren 0.05 M soğutulmuş Na-P tamponu (pH: 7.4) ile buz içerisinde ultra-turrax homojenizatörde 3 dakika süreyle 10.000 rpm’de homojenize edilmiştir. Homojenatlar +4 °C’de 10.000 rpm’de 30 dakika süreyle santrifüj edilmiş ve elde edilen süpernatantlarda SOD ve CAT aktiviteleriyle MDA ve protein düzeyleri kinetik-spektrofotometrik yöntemlerle belirlenmiştir. SOD aktivite tayini, ksantin ve ksantin oksidazın reaksiyonu ile oluşan süperoksit anyon radikallerinin,

nitrobluetetrazolium ile oluşturduğu mavi renkli formazan boyasının 560 nm'deki absorbanasının okunması esasına dayanmaktadır (Sun vd., 1988). Katalaz aktivite tayini, H₂O₂'nin 240 nm dalga boyundaki absorbanasının enzim ile etkileşiminden sonra zamana bağlı olarak azalması dikkate alınarak yapılmıştır (Lartillot vd., 1988). MDA 90 °C sıcaklıkta thiobarbitirik asit ile pembe renkli bir kompleks oluşturmakta ve bu kompleksin spektrofotometrede 535 nm'de ölçülmesi sonucunda MDA düzeyi hesaplanmaktadır (Dubovskiy vd., 2008). Total protein miktarı ise Lowry vd. (1951) önerdiği yöntemlere göre belirlenmiştir. Bu yöntemle göre proteinler alkali ortamda bakır sülfat eklenmesiyle fosfotungustik-fosfomolibdik asidi redükleyerek mavi renk oluştururlar. Bu renkli bileşiğin absorbanans değeri 750 nm'de ölçülerek protein miktarları tespit edilir (Lowry vd. 1951). Yapılan hesaplamalar sonucunda SOD ve CAT aktiviteleri U/mg protein; MDA düzeyleri ise nmol/mg protein olarak verilmiştir.

Analizlerden elde edilen verilerin istatistik analizi, IBM SPSS Statistics 21.0 paket programında yapılmıştır. Analizler, her parametre için altı tekrarlı olarak yapılmış ve veriler aritmetik ortalama±standart hata şeklinde düzenlenmiştir. Deney grupları arasındaki istatistiksel ayrımlar One Way-ANOVA'yı takiben çoklu karşılaştırma testlerinden Student – Newman Keul's Test kullanılarak yapılmıştır. Süreye bağlı olarak deney grupları arasındaki istatistiksel ayırım için ise Student-t Testi kullanılmıştır. Tablolarda istatistiksel ayrımlar işaretleme sistemiyle gösterilmiştir. Sonuçlar P<0.05 düzeyinde ise önemli kabul edilmiştir.

BULGULAR

Belirli bir ortam derişiminde ve denenen etki sürelerinde *O. niloticus*'un solungaç ve karaciğer dokusu SOD aktivitesi üzerine cıva ve cıva + selenyum karışımlarının etkileri Tablo 1'de verilmiştir. Solungaç

SOD aktivitesinin 4 günlük süre sonunda cıvanın her iki ortam derişiminde ve cıva+selenyum karışımının ise yüksek ortam derişiminin etkisinde anlamlı bir şekilde arttığı (P<0.05); 21 günlük süre sonunda ise yüksek ortam derişimlerinin etkisinde kontrol grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı bir şekilde azaldığı saptanmıştır (P<0.05). 0.05 ppm Hg ve 0.05+0.05 ppm Hg+Se etkisinde ilk etkileşim süresi sonunda solungaç SOD aktivitesi sırasıyla %76 ve %40 düzeyinde artarken; 21 günlük süre sonunda ise tam tersine %47 ve %24 düzeyinde bir azalma göstermiştir. Karaciğer SOD aktivitesi ise son etkileşim süresi sonunda cıvanın tek başına ve selenyumla birlikte etkisinde yüksek ortam derişimlerinde önemli bir şekilde azalış göstermiştir (P<0.05). Karaciğer SOD aktivitesi 21 günlük süre sonunda yüksek cıva ve cıva+selenyum karışımının etkisinde sırasıyla; %37 ve %19 düzeyinde bir azalma göstermiştir.

O. niloticus'un solungaç ve karaciğer CAT aktivitesi üzerine cıva ve cıva + selenyum karışımlarının derişime ve süreye bağlı etkileri Tablo 2'te verilmiştir. Solungaç CAT aktivitesi cıva ve cıva+selenyum karışımının yüksek ortam derişiminin etkisinde kontrol grubuyla karşılaştırıldığında 4 günlük süre sonunda anlamlı bir artış (P<0.05), 21 günlük süre sonunda ise anlamlı bir azalma göstermiştir (P<0.05). 0.05 ppm Hg ve 0.05+0.05 ppm Hg+Se etkisinde 4 günlük süre sonunda solungaç CAT aktivitesinde sırasıyla %80 ve %42 düzeyinde bir artış; 21 günlük süre sonunda ise %59 ve %28 düzeyinde bir azalış belirlenmiştir. Karaciğer CAT aktivitesi, 4 günlük süre sonunda 0.01 ve 0.05 ppm Hg etkisinde anlamlı bir artış gösterirken (P<0.05); Son etkileşim süresi sonunda ise hem cıvanın hem de cıva+selenyum karışımının her iki ortam derişiminin etkisinde anlamlı bir azalma göstermiştir (P<0.05). 21 günlük süre sonunda karaciğer CAT aktivitesinde yüksek cıva ve cıva+selenyum etkisinde sırasıyla %43 ve %26 düzeyinde bir azalma saptanmıştır.

Table 1. *O. niloticus*'ta dokuların SOD aktivitesi (U/mg protein) üzerine cıva ve cıva+selenyumun etkileri
Table 1. Effects of mercury and mercury+selenium on CAT activity (U/mg protein) of tissues of *O. niloticus*

Derişim (ppm)	Solungaç		Karaciğer	
	4 Gün	21 Gün	4 Gün	21 Gün
Kontrol	17.19±0.67 ax	18.59±0.47 ax	25.13±0.44 ax	27.04±0.71 ax
0.01 Hg	22.72±0.39 bx	16.21±0.58 ay	27.28±0.35 ax	25.31±0.69 ax
0.01 Hg+0.01 Se	18.02±0.17 ax	17.70±0.82 ax	26.09±0.51 ax	25.49±0.73 ax
Kontrol	17.19±0.67 ax	18.59±0.47 ax	25.13±0.44 ax	27.04±0.71 ax
0.05 Hg	30.26±0.89 bx	9.81±0.33 by	33.27±0.80 bx	17.11±0.23 by
0.05 Hg+0.05 Se	24.12±0.20 cx	14.22±0.18 cy	27.81±0.32 ax	21.88±0.19 cy

Veriler Aritmetik ortalama ± Standart hata şeklinde verilmiştir. Enzim aktivitesinde aynı etkileşim süresinde derişimler arasındaki ayırımı göstermek için a, b ve c harfleri; belirli bir ortam derişiminde süreler arasındaki ayırımı göstermek için ise x ve y harfleri kullanılmıştır. Farklı harfler veriler arasındaki istatistiksel ayırım olduğunu göstermektedir (P<0.05)

O. niloticus'un incelenen dokularındaki MDA düzeyi üzerine cıva ve cıva + selenyum karışımlarının etkileri Tablo 3'te verilmiştir. 4 günlük etki süresi sonunda cıvanın doğrudan ve selenyumla birlikte etkisinde test edilen her iki ortam derişiminde de önemli bir değişim göstermeyen ($P>0.05$) MDA düzeyi, 21 günlük etki süresi sonunda yüksek cıva ve cıva+selenyum

karışımının etkisinde önemli bir artış göstermiştir ($P<0.05$). Son etkileşim süresi sonunda 0.05 ppm Hg ve 0.05+0.05 ppm Hg+Se derişiminin etkisinde MDA düzeyinde solungaçta sırasıyla %121 ve %37 düzeyinde; karaciğerde ise %51 ve %23 düzeyinde bir artış saptanmıştır.

Tablo 2. *O. niloticus*'ta dokuların CAT aktivitesi (U/mg protein) üzerine cıva ve cıva+selenyumun etkileri
Table 2. Effects of mercury and mercury+selenium on CAT activity (U/mg protein) of tissues of *O. niloticus*

Derişim (ppm)	Solungaç		Karaciğer	
	4 Gün	21 Gün	4 Gün	21 Gün
Kontrol	160±10 ax	173±13 ax	285±22 ax	297±19 ax
0.01 Hg	175±18 ax	130±11 by	349±16 bx	171±12 by
0.01 Hg+0.01 Se	167±12 ax	169±14 ax	293±11 ax	210±17 cy
Kontrol	160±10 ax	173±13 ax	285±22 ax	297±19 ax
0.05 Hg	295±22 bx	71±19 by	387±28 bx	168±23 by
0.05 Hg+0.05 Se	232±15 cx	124±10 cy	301±14 ax	219±13 cy

Veriler Aritmetik ortalama \pm Standart hata şeklinde verilmiştir. Enzim aktivitesinde aynı etkileşim süresinde derişimler arasındaki ayrımı göstermek için a, b ve c harfleri; belirli bir ortam derişiminde süreler arasındaki ayrımı göstermek için ise x ve y harfleri kullanılmıştır. Farklı harfler veriler arasındaki istatistiksel ayrım olduğunu göstermektedir ($P<0.05$)

Tablo 3. *O. niloticus*'ta dokuların MDA düzeyi (nmol/mg protein) üzerine cıva ve cıva+selenyumun etkileri
Table 3. Effects of mercury and mercury+selenium on MDA level (nmol/mg protein) of tissues of *O. niloticus*

Derişim (ppm)	Solungaç		Karaciğer	
	4 Gün	21 Gün	4 Gün	21 Gün
Kontrol	0.79±0.02 ax	0.82±0.04 ax	1.63±0.04 ax	1.65±0.03 ax
0.01 Hg	0.77±0.04 ax	1.10±0.05 by	1.65±0.02 ax	1.68±0.04 ax
0.01 Hg+0.01 Se	0.80±0.03 ax	0.84±0.02 ax	1.62±0.02 ax	1.66±0.03 ax
Kontrol	0.79±0.02 ax	0.82±0.04 ax	1.63±0.04 ax	1.65±0.03 ax
0.05 Hg	0.81±0.01 ax	1.81±0.06 by	1.69±0.03 ax	2.49±0.05 by
0.05 Hg+0.05 Se	0.78±0.02 ax	1.12±0.04 cy	1.61±0.03 ax	2.03±0.04 cy

Veriler Aritmetik ortalama \pm Standart hata şeklinde verilmiştir. MDA düzeyinde aynı etkileşim süresinde derişimler arasındaki ayrımı göstermek için a, b ve c harfleri; belirli bir ortam derişiminde süreler arasındaki ayrımı göstermek için ise x ve y harfleri kullanılmıştır. Farklı harfler veriler arasındaki istatistiksel ayrım olduğunu göstermektedir ($P<0.05$)

TARTIŞMA VE SONUÇ

Sunulan çalışmada cıvanın toksik etkisi sonucu antioksidan enzim aktivitelerinde inhibisyon ve lipid peroksidasyon düzeylerinde ise artışlar gibi subletal etkiler belirlenmişken deneylerin sona erdirildiği 21 günlük süresonunda ve yüksek cıva ortam derişimlerinin etkisinde *O. niloticus*'ta mortalite gözlenmemiştir. Yüksek metal derişimli sularda balıkların yaşamlarını sürdürebilmeleri, bu metallere gösterecekleri uyumla yakından ilişkilidir. Balıklar gelişmiş bir adaptasyon yeteneklerine bağlı olarak metallerin öldürücü etkisi ile baş edebilmektedirler. *O. niloticus*'ta özellikle karaciğer ve solungaç dokularındaki yüksek savunma ve detoksifikasyon mekanizmalarının ve hasar gören hücre bileşenlerinin tamirinde rol oynayan güçlü bir onarım sisteminin varlığına bağlı olarak mortalite gözlenmemiş olabilir. Benzer şekilde [Fıridin vd. \(2015\)](#) yaptıkları çalışmalarında da 14 gün süreyle 0.1 mg/L cıva etkisine bırakılan *O. niloticus*'ta mortalite gözlenmemiştir.

Cıvanın biyomoleküllerin yapısında bulunan sülfidril gruplarına yüksek ilgisi olduğu bilinmektedir. Cıva redoks-inaktif metal olup redoks döngüsüne doğrudan katılmamakla birlikte özellikle tiyol-içeren glutatyon gibi antioksidan ve enzimler gibi hücrelerin önemli antioksidanlarıyla etkileşime girmekte ve bu moleküllerin aktivitelerini engelleyerek ROT'ların dolaylı olarak üretimine neden olabilmektedirler (Stohs ve Bagchi, 1995). ROT'lar ise oksidatif strese neden olarak membran lipidlerini, proteinleri, enzimleri ve nükleik asitler gibi hücresel elemanlarda aktivite kaybı ve oksidasyon gibi hasarlara yol açmaktadır. Bununla birlikte ROT'lar ve zararlı etkilerine karşı en önemli koruyucu mekanizmalar olan SOD, CAT gibi enzimatik ve glutatyon, metallothionein gibi enzimatik olmayan antioksidan savunma sistemleriyle hücreler bu oksidatif stres toksisitesini nötralize edebilme yeteneklerine sahiptirler.

Balıklarda SOD ve CAT oksidatif strese karşı savunmada oldukça önemli antioksidan enzimlerdir. SOD süperoksidi hidrojen peroksidi dismutasyonunu, CAT ise hidrojen peroksiti su ve oksijene dönüşümünü katalizleyerek doğrudan veya dolaylı olarak oksiradikal oluşumunu ve/veya bu radikallerden oksidatif strese gidecek reaksiyonları engelleyerek hücresel savunmada önemli roller oynamaktadırlar ([Bainy vd., 1996](#)). Bu nedenle SOD ve CAT oksidatif hasarın biyobelirteçleri olarak sıklıkla kullanılmaktadırlar ([Regoli ve Principato, 1995](#)).

Araştırmamızda *O. niloticus*'un solungaç ve karaciğer dokularındaki SOD aktivitesinin hem cıvanın tek başına hem de cıva+selenyum karışımının etkisinde özellikle de yüksek ortam derişimlerinde 4

günlük etki süresi sonunda arttığı; 21 günlük etki süresi sonunda ise azaldığı belirlenmiştir. SOD aktivitesindeki artış ve azalışlar, cıva+selenyum karışımına oranla cıvanın doğrudan etkisinde daha fazla olmuştur. Cıvanın etkisinde başlangıçta dokulardaki yüksek SOD aktivitesinin artan süperoksit anyon radikaline karşı bir adaptasyon yanıtı sonucunda oluştuğu öngörülmektedir. Bununla birlikte sürenin uzamasıyla enzim aktivitesi cıvanın artan toksik etkisinin sonucu olarak azalmış olabilir. [Fıridin vd. \(2015\)](#) cıvanın *O. niloticus*'ta antioksidan enzim sistemleri üzerine toksik etkilere neden olduğunu belirtmişlerdir. Azalan SOD aktivitesi süperoksit radikallerine karşı hücrelerin koruma kabiliyetinde bir azalışı gösterebilir ki bu durum hücrelerin oksidatif stresten daha çok etkilenmesine yol açabilir. [Carvalho vd. \(2012\)](#) metallerin etkisinde balıklarda artan SOD aktivitesinin metallerin toksik etkilerinin detoksifikasyonunda önemli olduğunu ve balıkların bu enzim aktivitesindeki artışa bağlı olarak süperoksit radikalinin toksik etkilerine karşı kendilerini koruduklarını belirtmişlerdir. Balık dokularındaki yüksek SOD aktivitesinin metal etkileşimine yanıtta önemli olduğu vurgulanmaktadır ([Fernandes vd., 2008](#)). [Lopez-Lopez vd. \(2011\)](#) ise yaptıkları çalışmalarında kirleticilerin etkisinde balıklardaki azalan SOD aktivitesinin aşırı ROT üretimine bağlı olarak SOD'nin hasar görmesi sonucunda oluştuğunu belirtmişlerdir. Keza [Dimitrova vd. \(1994\)](#) de aşırı süperoksit radikal üretiminin kendisi veya dönüşümü ile oluşan H₂O₂'nin SOD'deki sistemin oksidasyonuna neden olarak enzim aktivitesini düşürdüğünü rapor etmişlerdir.

Genellikle SOD ve CAT aktivitesinde eş zamanlı indüksiyon yanıtı kirleticilerin etkisinde gözlenmektedir ([Dimitrova vd., 1994](#)). Çalışmamızda da böyle bir ilişki gözlenmiştir. Sunulan araştırmada cıvanın doğrudan ve selenyumla birlikte etkisinde özellikle de yüksek ortam derişimlerinde *O. niloticus*'un solungaç ve karaciğer dokularında CAT aktivitesi SOD aktivitesinde olduğu gibi 4 günlük süre sonunda artış; 21 günlük süre sonunda ise azalış göstermiştir. Enzim aktivitesindeki artış ve azalışların, selenyumla birlikte etkisine oranla cıvanın doğrudan etkisinde daha fazla olduğu saptanmıştır. Hücresel yapıları H₂O₂'nin zararlı etkilerine karşı korumak için ilk etkileşim süresi sonunda CAT aktivitesinin arttığı ancak sürenin uzamasıyla artan cıva stresinin sonucunda ve yüksek üretim durumlarında enzim aktivitesini inhibe ettiği belirlenen süperoksit anyon radikaline bağlı olarak CAT aktivitesinin azaldığı düşünülmektedir. Benzer şekilde [Fırat ve Kargin \(2010\)](#) de Zn, Cd ve Zn+Cd etkisine bırakılan *O. niloticus*'ta CAT enzim aktivitesinin metallerin toksik etkilerinin sonucunda arttığını ve artan enzim aktivitesinin yüksek H₂O₂ üretimiyle ilişkili olduğunu ve metallerin indüklediği oksidatif strese karşı bu enzimin biyolojik önemini gösterdiğini belirtmişlerdir. [Talas vd. \(2008\)](#)

de laboratuvar çalışmalarında *O. mykiss*'te kadmiyum ve kromun karaciğer dokusu CAT aktivitesinde önemli azalışlara neden olduğunu belirlemişlerdir.

Cıva balıklarda antioksidan savunma sistemlerde değişikliğe neden olarak oksidatif stresi oluşturabilmekte bu da hücrelerin ölümüne yol açabilecek lipid peroksidasyonuna ve dokularda patolojik durumların oluşmasına yol açmaktadır (Verlecar vd., 2008). MDA, hücre membran fosfolipidlerine ve dolaşımdaki lipidler üzerine oksidatif hasardan kaynaklanan lipid peroksidasyonu ürünlerinden biridir ve düzeyleri doğrudan kirleticiler tarafından indüklenen oksidatif hasarın derecesini gösterir (Banerjee vd., 1999). Sunulan çalışmada *O. niloticus*'un solungaç ve karaciğer dokularındaki MDA düzeyleri 21 günlük etki süresinde hem cıvanın doğrudan hem de cıva+selenyum karışımının yüksek ortam derişimlerinin etkisinde artış göstermiştir. MDA düzeyindeki bu artışların cıvanın doğrudan etkisinde daha yüksek olduğu belirlenmiştir. MDA düzeylerindeki artışlar cıvanın *O. niloticus*'un solungaç ve karaciğer dokularında lipid peroksidasyonuna yol açtığını göstermektedir. Karadag vd. (2014) *C. carpio*'da MDA düzeylerinin kirleticilerin neden olduğu oksidatif stresin bir sonucu olarak arttığını belirtmişlerdir. Yine El-Gazzar vd. (2014) de çalışma sonuçlarımıza benzer olarak kadmiyum etkisinde *O. niloticus*'un karaciğer dokusunda MDA düzeylerinin anlamlı olacak şekilde arttığını saptamışlardır. Araştırmacılar yüksek MDA düzeylerinin oksidatif hasara bağlı olarak oluşan lipid peroksidasyonunun bir göstergesi olduğunu vurgulamışlardır.

Oksidatif stres çalışmalarında MDA düzeyleri genel olarak antioksidan savunmaların etkinliğini değerlendirmek için ölçülmektedir. Çalışmamızda solungaç ve karaciğer dokusundaki yüksek MDA düzeyleri cıvanın, belirgin bir oksidatif stresi indüklediğini göstermektedir. Yüksek MDA düzeylerinin antioksidan enzimlerdeki azalışla ilişkili olduğu öngörülmektedir. SOD ve CAT reaktif oksijen türlerinin oksidatifataklarıyla oluşabilecek lipid peroksidasyonuna karşı hücreleri koruyan en önemli antioksidanlardır; çünkü, bunlar serbest radikal temizleyicileri olarak işlevseldirler. Bu nedenle çalışmamızda balıkların solungaç ve karaciğer dokularında azalan SOD ve CAT aktivitelerine bağlı olarak ROT'ların toksik etkilerinin nötralize edilemediği ve bunun sonucunda da lipid peroksidasyonunun arttığı düşünülmektedir. Talas vd. (2008) yaptıkları çalışmalarında ağır metallerin etkisinde balık dokularında SOD ve CAT aktivitesinin azaldığını ve metallerin antioksidan enzim aktivitelerini baskılanmasının bir sonucu olarak da MDA düzeylerinin arttığını belirtmişlerdir.

Sunulan çalışmada *O. niloticus*'un solungaç ve

karaciğer dokularında saptanan artan veya azalan SOD ve CAT aktivitesiyle artan MDA düzeylerinin cıva+selenyum karışımına oranla cıvanın tek başına etkisinde daha fazla olmuştur. Çalışmamız cıvanın bu oksidatif stres parametreleri üzerine olan toksik etkilerinin selenyumun varlığında azaldığını ya da tamamen iyileştiğini göstermektedir. Önceki çalışmalarda da selenyumun cıvanın toksik etkilerini engellediği ve cıva toksisitesine karşı antogonistik bir etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Fridin vd. (2015) cıva ve cıva+selenyum karışımlarının etkisine bırakılan *O. niloticus*'un beyin ve böbrek dokularında CAT aktivitesi ve MDA düzeylerinin cıvanın tek başına etkisinde daha fazla arttığını ve selenyumun cıvanın toksik etkilerini azalttığını saptamışlardır. Su vd. (2008) de ratlarla yaptıkları çalışmalarında cıva ve cıva+selenyum içeren diyetlerle beslenen hayvanlarda karaciğer ve böbrek dokularında cıvanın doğrudan etkisinde SOD aktivitesinin azaldığı MDA düzeylerinin ise arttığı; bununla birlikte, selenyum varlığında ise enzim aktivitesinin arttığı ve MDA düzeylerinin ise azaldığı rapor edilmiştir. Araştırmacılar cıva toksisitesi üzerine selenyumun antogonistik bir etkiye sahip olduğunu vurgulamışlardır.

Sonuç olarak solungaç ve karaciğer dokularında cıvanın etkisinde azalan SOD ve CAT aktivitesi ve buna bağlı olarak artan MDA düzeyi *O. niloticus*'ta oksidatif stresin oluştuğunu göstermektedir. Bununla birlikte cıvanın selenyumla birlikte etkisinde antioksidan enzimler ve lipid peroksidasyonu üzerindeki cıva toksisitesinin azaldığı ya da tamamen engellendiği belirlenmiştir. Araştırmamız selenyumun cıva toksisitesi üzerine koruyucu bir rolü olduğunu göstermektedir. Selenyumun, balıklardaki cıva alım düzeylerini azaltarak ya da metalin vücuttan atılım oranlarını artırarak dokulardaki cıva birikimini azaltarak, cıvaya bağlanarak Hg-Se kompleksi oluşturup cıvanın hareketsiz bir formda kalmasını sağlayarak ya da antioksidan aktivitesine bağlı olarak cıva toksisitesi üzerine antogonistik etki gösterdiği düşünülmektedir. Araştırmamız sucul organizmalardaki ağır metal toksisitesinin belirlenmesinde ve selenyumun bu toksisite üzerine olan koruyucu rolünün değerlendirilmesinde bir biyobelirteç olarak oksidatif stres parametrelerinin kullanılabileceğini de göstermektedir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma yüksek lisans tez çalışması olup FEFYL2014-0010 nolu Adıyaman Üniversitesi (ADYÜ) Bilimsel Araştırma Projesi ile yürütülmüş olup ADYÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Biriminin değerli yöneticilerine ve çalışanlarına teşekkür ederiz.

KAYNAKÇA

- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). (2018). Priority list of hazardous substances, Available at: <http://www.atsdr.cdc.gov/cercla/05list.html>. Accessed October, 05, 2018.
- Bainy, A.C.D., Saito, E., Carvalho, P.S.M., & Junqueira, V.B.C. (1996). Oxidative stress in gill, erythrocytes, liver and kidney of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from a polluted site. *Aquatic Toxicology*, 34, 151–62. [https://doi.org/10.1016/0166-445X\(95\)00036-4](https://doi.org/10.1016/0166-445X(95)00036-4)
- Banerjee, B.D., Seth, V., Bhattacharya, A., Pasha, S.T., & Chakraborty, A.K. (1999). Biochemical effects of some pesticides on lipid peroxidation and free-radical scavengers. *Toxicology Letters*, 107, 33–47. DOI: [10.1016/S0378-4274\(99\)00029-6](https://doi.org/10.1016/S0378-4274(99)00029-6)
- Beck, M.A., Levandert, O.A., & Handy, J. (2003). Selenium deficiency and viral infection. *The Journal of Nutrition*, 133, 1463-1467. DOI: [10.1093/jn/133.5.1463S](https://doi.org/10.1093/jn/133.5.1463S)
- Berntssen, M.H.G., Aatland, A., & Handy, R.D. (2003). Chronic dietary mercury exposure causes oxidative stress, brain lesions, and altered behaviour in Atlantic salmon (*Salmo salar*) parr. *Aquatic Toxicology*, 65, 55-72. DOI: [10.1016/S0166-445X\(03\)00104-8](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(03)00104-8)
- Carvalho, C.D.S., Bernusso, V.A., Araujo, H.S.S., Espindola, E.L.G., & Fernandes, M.N. (2012). Biomarker responses as indication of contaminant effects in *Oreochromis niloticus*. *Chemosphere*, 89, 60–69. DOI: [10.1016/j.chemosphere.2012.04.013](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.04.013)
- Chien, L.C., Yeh, C.Y., Huang, S.Y., Shieh, M.J., & Han, B.C. (2003). Pharmacokinetic model of daily selenium intake from contaminated seafood in Taiwan. *Science of The Total Environment*, 311, 57-64. DOI: [10.1016/S0048-9697\(03\)00134-7](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(03)00134-7)
- Diez, S. (2008). Human health effects of methylmercury exposure. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 198, 113–132. DOI: [10.1007/978-0-387-09647-6-3](https://doi.org/10.1007/978-0-387-09647-6-3)
- Dimitrova, M.S.T., Tsnova, V., & Velcheva, V. (1994). Combined effect of zinc and lead on the hepatic superoxide dismutase-catalase system in carp (*Cyprinus carpio*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 108C, 43-46. DOI: [10.1016/1367-8280\(94\)90087-6](https://doi.org/10.1016/1367-8280(94)90087-6)
- Dubovskiy, I.M., Martemyanov, V.V., Vorontsova, Y.L., Rantala, M.J., Gryzanova, E.V., & Glupov, V.V. (2008). Effect of bacterial infection on antioxidant activity and lipid peroxidation in the midgut of *Galleria mellonella* L. larvae (Lepidoptera, Pyralidae). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 148C, 1–5. DOI: [10.1016/j.cbpc.2008.02.003](https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2008.02.003)
- Ishikawa, N.M., Ranzani-Paiva, M.J.T., Lombardi, J.V., & Ferreira, C.M. (2007). Hematological parameters in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* exposed to sub-lethal concentrations of mercury. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 50, 619-626.
- El-Gazzar, A.M., Ashry, K.E., & El-Sayed, Y.S. (2014). Physiological and oxidative stress biomarkers in the freshwater Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L., exposed to sublethal doses of cadmium. *Alexandria Journal of Veterinary Sciences*, 40, 29-43. DOI: [10.5455/ajvs.48333](https://doi.org/10.5455/ajvs.48333)
- Fernandes, C., Fontainhas-Fernandes, A., Ferreira, M., & Salgado, M.A. (2008). Oxidative stress response in gill and liver of *Liza saliens*, from the Esmoriz–Paramos Coastal Lagoon Portugal. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 55, 262–269. DOI: [10.1007/s00244-007-9108-z](https://doi.org/10.1007/s00244-007-9108-z)
- Firat, Ö., & Kargin, F. (2010). Effects of zinc and cadmium on erythrocyte antioxidant systems of a freshwater fish *Oreochromis niloticus*. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 24(4), 223-229. DOI: [10.1002/jbt.20327](https://doi.org/10.1002/jbt.20327)
- Firat, Ö., Cogun, H.Y., Yüzereroğlu, T.A., Gök, G., Firat, Ö., Kargin, F., & Kötemen, Y. (2011). A comparative study on the effects of a pesticide (cypermethrin) and two metals (copper, lead) to serum biochemistry of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Fish Physiology and Biochemistry*, 37, 657-666. DOI: [10.1007/s10695-011-9466-3](https://doi.org/10.1007/s10695-011-9466-3)
- Firat, Ö., A. & Şahin İnandı, A. (2016). Investigation of combined effect of zeolite and mercury toxicity on some serum biochemical parameters of *Oreochromis niloticus*. *Ege Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 33(3), 251-257. DOI: [10.12714/egejfas.2016.33.3.09](https://doi.org/10.12714/egejfas.2016.33.3.09)
- Firidin, G., Kargin, F., Firat, Ö., Cogun, H.Y., Firat, Ö., Firidin, B., & Yüzereroğlu, T.A. (2015). Antioxidant defence systems, lipid peroxidation and acetylcholinesterase activity of *Oreochromis niloticus* exposed to mercury and mercury+selenium. *Fresenius Environmental Bulletin*, 24(5), 1958-1965.
- Hu, H. (2000). Exposure to metals. *Primary Care*, 27, 983–996. DOI: [0.1016/S0095-4543\(05\)70185-8](https://doi.org/10.1016/S0095-4543(05)70185-8)
- Karadag, H., Firat, Ö., & Firat, Ö. (2014). Use of oxidative stress biomarkers in *Cyprinus carpio* L. for the evaluation of water pollution in Atatürk Dam Lake (Adiyaman, Turkey). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 92, 289-293. DOI: [10.1007/s00128-013-1187-0](https://doi.org/10.1007/s00128-013-1187-0)
- Lartillot, S., Kadziora, P., & Athios, A. (1988). Purification and characterization of new fungal catalase. *Preparative Biochemistry*, 18, 241-246.
- Lopez-Lopez, E., Sedeno-Diaz, J.E., Soto, C., & Favari, L. (2011). Responses of antioxidant enzymes, lipid peroxidation, and Na⁺/K⁺-ATPase in liver of the fish *Goodea atripinnis* exposed to Lake Yuriria water. *Fish Physiology and Biochemistry*, 37, 511–522. DOI: [10.1007/s10695-010-9453-0](https://doi.org/10.1007/s10695-010-9453-0)
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., & Randall, R.J. (1951). Protein measurements with the folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, 193, 265-275.
- Min, 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. DOI: [10.1016/j.pestbp.2008.07.007](https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2008.07.007)
- Monteiro, D.A., Rantin, F.T., & Kalinin, A.L. (2009). The effects of selenium on oxidative stress biomarkers in the freshwater characid fish matrinxã, *Brycon cephalus* (Gunther, 1869) exposed to organophosphate insecticide Folisuper 600 BR- (methyl parathion). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 149C, 40–49. DOI: [10.1016/j.cbpc.2008.06.012](https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2008.06.012)
- Nogueira, C.W., Quinhones, E.B., Jung, E.A.C., Zeni, G., & Rocha, J.B.T. (2003). Anti-inflammatory and antinociceptive activity of biphenyl diselenide. *Inflammation Research*, 52, 56–63.

- DOI: [10.1007/s000110300001](https://doi.org/10.1007/s000110300001)
- Pathiratne, A., Chandrasekera, L.W.H.U., & Pathiratne, K.A.S. (2009). Use of biomarkers in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) to assess the impacts of pollution in Bolgoda Lake, an urban water body in Sri Lanka. *Environmental Monitoring and Assessment*, 156, 361–375. DOI: [10.1007/s10661-008-0490-4](https://doi.org/10.1007/s10661-008-0490-4)
- Perotoni, J., Lobato, L.P., Silveira, A., Rocha, J.B.T., & Emanuelli, T. (2004). Effects of mercury and selenite on d-aminolevulinatase activity and on selected oxidative stress parameters in rats. *Environmental Research*, 95, 166–173. DOI: [10.1016/j.envres.2003.08.007](https://doi.org/10.1016/j.envres.2003.08.007)
- Plessi, M., Bertelli, D., & Monzani, A. (2001). Mercury and selenium content in selected seafood. *Journal of Food Composition and Analysis*, 14, 461–467. DOI: [10.1006/jfca.2001.1003](https://doi.org/10.1006/jfca.2001.1003)
- Ranzani-Paiva, M.J.T., Lombardi, J.V., & Gonçalves, A. (2011). Acute toxicity of sodium selenite and sodium selenate to tilapia, *Oreochromis niloticus*, fingerlings. *Boletim do Instituto de Pesca*, 37(2), 191 – 197.
- Rayman, M. (2000). The importance of selenium to human health. *Lancet*, 356, 233–241.
- Regoli, F., & Principato, G. (1995). Glutathione, glutathione-dependent and antioxidant enzymes in mussel, *Mytilus galloprovincialis*, exposed to metal under field and laboratory conditions: Implications for the use of biochemical biomarkers. *Aquatic Toxicology*, 31, 143–164. DOI: [10.1016/0166-445X\(94\)00064-W](https://doi.org/10.1016/0166-445X(94)00064-W)
- Stohs, S.J., & Bagchi, D. (1995). Oxidative mechanisms in the toxicity of metals ions. *Free Radical Biology and Medicine*, 2, 321–336.
- Su, L., Wang, M., Yin, S., Wang, H., Chen, L., Sun, L., & Ruan, D. (2008). The interaction of selenium and mercury in the accumulations and oxidative stress of rat tissues. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 70, 483–489. DOI: [10.1016/j.ecoenv.2007.05.018](https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2007.05.018)
- Sun, Y., Oberley, L.W., & Li, Y. (1988). A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clinical Chemistry*, 34, 497–500.
- Talas, Z.S., Orun, I., Ozdemir, I., Erdoğlan, K., Alkan, A., & Yılmaz, I. (2008). Antioxidative role of selenium against the toxic effect of heavy metals (Cd⁺², Cr⁺³) on liver of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum 1792). *Fish Physiology and Biochemistry*, 34, 217–222. DOI: [10.1007/s10695-007-9179-9](https://doi.org/10.1007/s10695-007-9179-9)
- Van Dyk, J.C., Pieterse, G.M., & Van Vuren, J.H.J. (2007). Histological changes in the liver of *Oreochromis mossambicus* (Cichlidae) after exposure to cadmium and zinc. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 66, 432–440. DOI: [10.1016/j.ecoenv.2005.10.012](https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2005.10.012)
- Verlecar, X.N., Jena, K.B., & Chainy, G.B.N. (2008). Modulation of antioxidant defenses in digestive gland of *Perna viridis* (L.), on mercury exposure. *Chemosphere*, 71, 1977–1985. DOI: [10.1016/j.chemosphere.2007.12.014](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.12.014)
- Verma, R.S., Mehta, A., & Srivastava, N. (2007). *In vivo* chlorpyrifos induced oxidative stress: Attenuation by antioxidant vitamins. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 88, 191–196. DOI: [10.1016/j.pestbp.2006.11.002](https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2006.11.002)