



## Fluoksetin hidroklorid'in kılıçkuyruk balıklarında (*Xiphophorus hellerii*) oluşturduğu oksidatif hasarın belirlenmesi

Güllü KAYMAK

### Cite this article as:

Kaymak, G. (2021). Fluoksetin hidroklorid' in kılıçkuyruk balıklarında (*Xiphophorus hellerii*) oluşturduğu oksidatif hasarın belirlenmesi. *Aquatic Research*, 4(3), 286-292. <https://doi.org/10.3153/AR21022>

Kütahya Sağlık Bilimleri Üniversitesi,  
Simav Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek-  
kokulu, Kütahya, Türkiye

### ORCID IDs of the author(s):

G.K. 0000-0001-6309-0208

Submitted: 18.01.2021

Revision requested: 02.03.2021

Last revision received: 14.03.2021

Accepted: 16.03.2021

Published online: 10.05.2021

### Correspondence:

Güllü KAYMAK

E-mail: [gullu.kaymak@ksbu.edu.tr](mailto:gullu.kaymak@ksbu.edu.tr)



© 2021 The Author(s)

Available online at  
<http://aquatres.scientificwebjournals.com>

### ÖZ

Bu çalışma ile dünyada gittikçe artış gösteren sağlık sorunlarından biri olan depresyonun tedavisinde yaygın olarak kullanılan ve kardiyovasküler olarak güvenilir kabul edilen SSRI (Özgül Serotonin Geri Alım Engelleyicileri) grubu antidepresanlardan Prozac®'in etken maddesi olan Fluoksetin Hidroklorür'ün, sucul bir organizma olan kılıçkuyruk balığı (*Xiphophorus hellerii* Heckel, 1848) dokularında oluşturduğu oksidatif stresin belirlenmesi amaçlanmıştır. Fluoksetin-HCl, doğada yüzey sularında 0.012 µg/L, atık sularda 0.54- 0.929 µg/L doz aralığında bulunmuştur. Bu bilgiler doğrultusunda kılıçkuyruk balıklarına 0.1 µg/L ve 1 µg/L Fluoksetin-HCl uygulaması yapılmıştır. 96 saat sonunda balıklardan kalp ve karaciğer dokuları antiseptik şartlarda disekte edilip homojenize edilmiştir. Daha sonra malondialdehit (MDA), total glutatyon (GSH) miktarları, katalaz (CAT) enzim aktivitesi, süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktivitesi ve total protein miktarı spektrofotometrik yöntemlerle belirlenmiştir. Sonuç olarak, kalp dokuda CAT enzim aktivitesi ve MDA seviyesi azalırken, SOD enzim aktivitesi ve GSH seviyesi artmıştır. Karaciğer dokuda ise, CAT enzim aktivitesi ve GSH miktarı artarken, SOD enzim aktivitesi ve MDA seviyesi azalmıştır. Sonuç olarak bu çalışmada kontrol grubu ile yapılan karşılaştırmalar sonucu Fluoksetin-HCl'nin kılıçkuyruk balıklarında stres yolaklarını etkileyerek, stres cevabının düzenlenmesinde etkili olduğu belirlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Fluoksetin-HCl, Oksidatif stres, Kılıçkuyruk balığı, *Xiphophorus hellerii*, Kalp, Karaciğer

### ABSTRACT

#### The determination of oxidative damage caused by fluoxetine hydrochloride in swordtail fish (*Xiphophorus hellerii*)

In this study, it was aimed to determine the oxidative stress in the tissues of the swordtail fish (*Xiphophorus hellerii* Heckel, 1848) after exposed to the active ingredient of Prozac® and one of the SSRI (Selective Serotonine Reuptake Inhibitor) group antidepressants, Fluoxetine Hydrochloride, which is considered to be safe cardiovascular. It is widely used in the treatment of depression, which is one of the increasing health problems in the World. Fluoxetine-HCl has been found 0.012 µg/L in surface waters and in the dose range of 0.54- 0.929 µg/L in wastewater (Sehonova et al., 2018). In line with this information, 0.1 µg / L and 1 µg / L Fluoxetine-HCl was administered to swordtails. At the end of 96 hours, heart and liver tissues of the fish were dissected under antiseptic conditions and homogenized. Later, malondialdehyde (MDA), total glutathione (GSH), catalase (CAT) enzyme activity, superoxide dismutase (SOD) enzyme activity and total protein amount were determined by spectrophotometric methods. As a result, while CAT enzyme activity and MDA level decreased in heart tissue, SOD enzyme activity and GSH level increased. In liver tissue, while CAT enzyme activity and GSH amount increased, SOD enzyme activity and MDA level decreased. As a result of the comparisons with the control group, it was determined that Fluoxetine-HCl is effective in regulating the stress response by affecting the stress pathways in swordtails.

**Keywords:** Fluoxetine-HCl, Oxidative stress, Swordtail fish, *Xiphophorus hellerii*, Heart, Liver

## Giriş

Stres, günümüzde sık karşılaşılan sorunlardan birisidir. Toplumun %12-17'sinde stresle ilişkili olarak depresyon görülmektedir. Depresyonun en etkili şekilde tedavisi için çeşitli antidepresan ilaçlar kullanılmaktadır. Son zamanlarda bu amaçla Özgül Serotonin Geri Alım Engelleyicileri (ÖSGE, SSRI=Selective Serotonine Reuptake Inhibitor) kullanılmaya başlanmıştır. İlk SSRI grubu antidepresanlardan biri olan Fluoksetin-HCl, 1987 yılında piyasaya sürülmüştür ve 2001 yılında etken madde olarak genel kullanıma açılmıştır (Panlilio ve diğ., 2016; McCallum ve diğ., 2017; Zindler ve diğ., 2020).

Akılcı bir tasarım ile hedeflenerek sentezlenen Fluoksetin-HCl, *in vitro* koşullarda %94.5 oranında albümin ve insan serum proteinlerine bağlanır. Aktif metaboliti olan Norfluoksetin ve tanımlanmamış diğer metabolitlerine karaciğerde yoğun olarak metabolize edilerek dönüşür. İnaktif metabolitleri idrarla atılır. Yarılanma süresi uzundur. Antidepresan etkisinin yanı sıra obsesif-kompulsif bozukluk, bulimiya nervoza ve premenstrual disforik bozukluğun tedavisinde de kullanılır (Yang ve diğ., 2014; Yan ve diğ., 2020).

Farmasötiklerin sucül ortamlardaki davranışları, akibetleri ve onların metabolitleri henüz tam olarak tanımlanmamıştır. Farmasötikler çevreye verildiğinde hayvanlarda benzer veya aynı hedef organlar, dokular, hücreler veya biyomolekülleri etkileyebilir (Balcı ve diğ., 2010). Farmasötik bileşiklerin çevresel değerlendirmeleri yapılırken, beklenen çevresel giriş konsantrasyonu (EIC) 1 µg/L' yi aşarsa türlerin bu bileşiğe verdiği tepkiler göz önüne alınır (FDA-CDER, 1998). Son yıllarda akarsu, göl ve deniz gibi sucül ortamlarda yüzey sularında 0.012 µg/L, atık sularda 0.54-0.929 µg/L doz aralığında Fluoksetin-HCl bulunmuştur (Sehonova ve diğ., 2018). Fluoksetin ve onun metaboliti Norfluoksetinin, balık dokularında 10 µg/kg konsantrasyonda bulunması, bu bileşiklerin biyolojik olarak birikme kapasitesine sahip olduğunu düşündürmektedir (Orem ve Dolph, 2002; Yan ve diğ., 2020).

Balıklar da dahil olmak üzere suda yaşayan organizmalar, doğal olarak kirleticilerin bir karışımına maruz kalır. Balıklarındaki antioksidatif enzim aktivitelerinin ölçümleri, sucül ekosistemlerdeki kimyasalların neden olduğu oksidatif hasarı gösterebilir (Jin ve diğ., 2010). İlaçlara maruz kalma, DNA, lipidler ve proteinlere zarar verebilen süperoksit anyon (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ve hidroksil radikali (HO) gibi reaktif oksijen türlerinin (ROT) gelişimini uyarabilir (Halliwel ve Gutteridge, 2015).

Farmasötiklerin çoğu uzun yarılanma ömürlerinden dolayı ekosistemde besin zinciri yolu ile sucül ortamlarda taşınırlar.

Fluoksetin; hormon seviyelerini düşürmek, beslenme davranışlarını ve yüzmeyi azaltmak, fizyolojik ve üreme gelişimini geciktirme gibi 5-HT yolu üzerindeki etkisinden dolayı maruz kalan sucül faunanın fizyolojik süreçleri üzerindeki önemli yıkıcı etkileri nedeniyle hedef olmayan sucül organizmalar için toksik ilaçlardan biri olarak kabul edilmiştir (Menigen ve diğ., 2017; Weinberger ve Klaper, 2014; Vera-Chang ve diğ., 2019). Kılıçkuyruk balığı küçük olması ve yetiştirme kolaylığı, kısa nesil süresi ve farklı cinsel özellikler gibi büyük avantajları nedeniyle genellikle davranış ekolojisi, genetik, biyoloji (Kayım ve diğ., 1999) ve biyocoğrafya (Gutierrez-Rodriguez ve diğ., 2007) çalışmalarında sıklıkla kullanılır ve toksikolojik çalışmalar için ideal bir tür olarak kabul edilir (Kwak ve diğ., 2001). Bu özelliklerinden dolayı seçilen kılıçkuyruk balıklarının farklı dokularında Fluoksetin-HCl'nin oksidatif stres oluşturma potansiyelinin belirlenmesi bu çalışmanın amacını oluşturmaktadır. Bu çalışma, Fluoksetin-HCl'nin sucül canlılar üzerinde meydana getirebileceği olası zararlı etkilerinin değerlendirilmesi açısından önemlidir.

## Materyal ve Metot

### Yöntem

Bu çalışmada kullanılan kılıçkuyruk balıkları ticari akvaryumculardan satın alınmıştır. Laboratuvar ortamına getirilen balıklar için akvaryumlardaki su sıcaklığı 26-28°C, pH 7 ve aydınlık: karanlık (14:10) olacak şekilde ayarlanmıştır. Akvaryumlara bir hava motoru yardımı ile yeterli düzeyde (9-12 mg/L) sürekli hava verilmiştir. Denemede balıkların beslenmesi için granül balık yemi kullanılmıştır. Balıkların yeni şartlara adaptasyonu için iki hafta beklenmiştir. Uygulama için balıklar biri kontrol olmak üzere üç gruba ayrılmıştır (n=10). Fluoksetinin uygulama dozları 0.1 µg/L ve 1 µg/L akvaryum sularına eklenmiş ve 96 saat boyunca maruziyet sağlanmıştır.

Uygulama sonrası balıklar, soğuk şoku ile hissizleştirilerek disekte edilmiştir. Cryo tüplere alınan dokular dismembrantör ile cam boncuklar vasıtasıyla hemen homojenize edilmiştir. Ardından 10000 rpm'de 4°C'de 20 dk. santrifüjlenerek deneylerde kullanılmak üzere süpernatant alınmıştır.

### Malondialdehit (MDA) Tayini

Ledwozyw ve diğ. (1986) yöntemine göre belirlenmiştir. 250 µl doku homojenatı, 1250 µL TCA çözeltisi (1.22 M, 0.6 M HCl'deki) ile karıştırılır. 15 dk. sonra 750 µL TBA çözeltisi (0.047 M) ile 30 dk. kaynar su banyosunda inkübe edilir.

Daha sonra 2000 µL ticari n-Bütanol ilave edilen karışım 10 dk. 3000 rpm'de santrifüj edilir. Butanol fazı alınarak 532 nm'de absorbanslar kaydedilip ve nmol/g doku olarak hesaplanır.

#### **Katalaz (CAT) Enzim Aktivitesi Tayini**

Aebi (1974) yöntemi ile yapılmıştır. CAT enzimi; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin, H<sub>2</sub>O'ya dönüşüm reaksiyonunu katalizler. Bu dönüşüm 240 nm'de absorbansın azalması ile takip edilebilir. 1 dk.'da absorbanstaki azalma katalaz aktivitesi ile ilgilidir. 0.4 mL doku homojenatı üzerine kör için 0.2 mL Fosfat tamponu (50 mM, pH=7.0), numune için 0.2 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> çözeltisi (30 mM) + Fosfat tamponu eklenir ve U/mg protein dk. cinsinden hesaplanır.

#### **Süperoksit Dismutaz (SOD) Enzim Aktivitesi Tayini**

Mylorie ve diğ. (1986) yöntemi ile yapılmıştır. SOD aktivitesi, riboflavin ile duyarlandırılmış o-dianisidinin foto-oksidasyon hızını arttırma yeteneği olarak ölçülür. Riboflavinin floresans ışığı etkisiyle oluşturduğu süperoksit radikali, ortamdaki SOD'un etkisiyle hidrojen peroksite dönüşür. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ise o-dianisidin ile reaksiyona girerek renkli ürün oluşturur. SOD aktivitesi ne kadar çok ise renkli ürün oluşumu da o kadar fazla olur. Oluşan renkli ürünün absorbansı 460 nm'de spektrofotometrik olarak U/ mg protein cinsinden değerlendirilir.

#### **Total Glutasyon (GSH) Tayini**

Beutler (1975) yöntemi kullanılacaktır. 0.2 mL homojenat üzerine 0.3 mL metafosforik asit, NaCl ve EDTA-Na içeren proteinsizleştirme çözeltisinden ilave edilir. 4000 rpm'de 10 dk. santrifüj edilen homojenattan 0.2 mL süpernatant alınır ve 0.8 mL Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> çözeltisi (0.3 M) ve 0.1 mL % 40 mg DTNB (5-5' ditiyobis 1-2 nitrobenzoik asit) ile karıştırılır. 412 nm'de DTNB ile sülfidril gruplarının reaksiyonu sonucu oluşan renkli ürün spektrofotometrik olarak nmol/g protein cinsinden değerlendirilir.

#### **Total Protein Hesaplama**

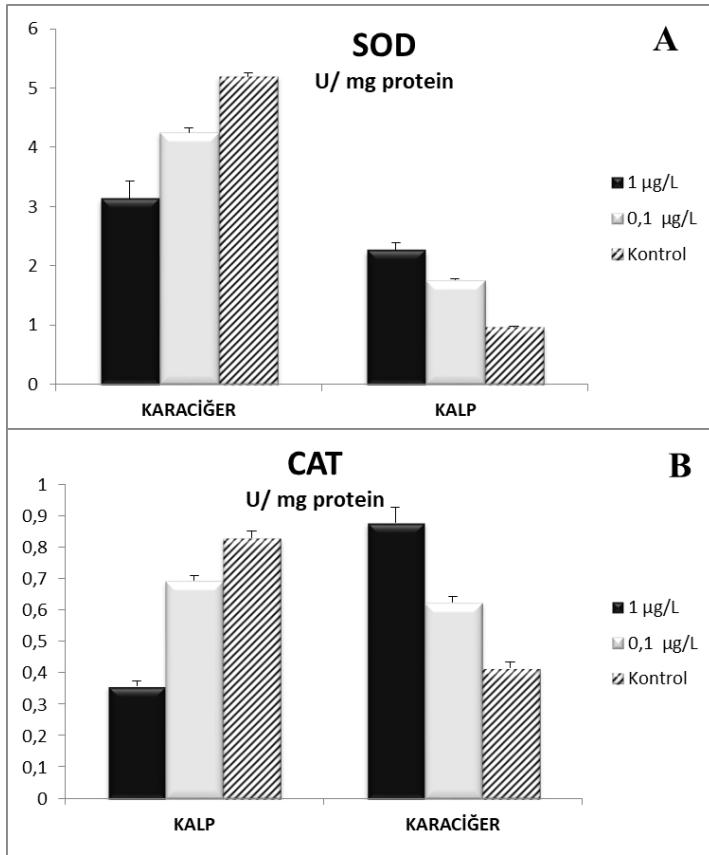
Protein tayini Bradford (1976) yöntemi ile ölçülmüştür. Stok albümin çözeltisi ile standart eğri grafiği oluşturulur. 25 µL doku homojenatı 775 µL distile su ve 200 µL ticari Bradford reaktifi ile karıştırıldıktan 15 dk. sonra 595 nm'de köre karşı absorbansları kaydedilir. Protein miktarları µg/µL cinsinden ifade edilir.

#### **İstatistiksel Analiz**

Biyokimyasal parametrelerin istatistiksel analizi IBM SPSS Statistic version 23 yazılım programı (IBM Corp., Armonk, NY, ABD) kullanılarak yapıldı. Veriler, ortalama ± standart hata olarak ifade edildi. İki grup arasındaki karşılaştırmalar parametrik Student's t-testi ve parametrik olmayan Mann-Whitney U testi ile eşit olmayan varyanslar varsayılarak yapıldı. İki'den fazla grup arasındaki karşılaştırmalar tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile yapıldı. ANOVA'yı takiben gruplar arasındaki önemli farkı karşılaştırmak için Tukey post-hoc testi yapıldı. p < 0.05 anlamlı kabul edildi.

#### **Bulgular ve Tartışma**

Kılıçkuyruk balıklarının kalp ve karaciğer dokularında Fluoksetin-HCl'nin etkilerinin biyokimyasal parametrelerle incelendiği bu çalışmada, doza bağlı olarak SOD enzim aktivitesi kalp dokuda artarken (p<0.01), karaciğerde azalmıştır (p<0.05) (Şekil 1A). SOD, süperoksit radikalini oksijen ve hidrojen peroksite dönüşümünü katalizler. CAT aktivitesi ortamda bulunan hidrojen peroksite konsantrasyonuyla doğru orantılı olarak artar. Eğer ortamda düşük konsantrasyonda bile hidrojen peroksit bulunuyorsa bu bileşiği substrat olarak kullanan katalaz devreye girerek zararlı bileşiği ortamdan uzaklaştırır (Airhart ve diğ. 2007). Ancak bu çalışmada, CAT enzim aktivitesi kalp dokuda azalırken, karaciğerde artmıştır (p<0.01) (Şekil 1B). Teorik bilgiler ile çelişen bu durum artan toksisiteyle enzimlerin inhibe olmasıyla açıklanabilir. Gökkuşluğu alabalıklarına (*Oncorhynchus mykiss*) Propiconazole (PCZ) uygulanması ile yapılan bir çalışmada enzimatik olmayan antioksidan parametrelerinde yüksek seviyeler ile antioksidan enzimlerde inhibisyon görülmüş, uzun süreli muamelelerin ise ciddi oksidatif hasara yol açtığı bildirilmiştir (Li ve diğ., 2010). Ek olarak, fluoksetin detoksifikasyon ve antioksidan fonksiyonları bozarak organizmaların oksidatif hasarla baş edememesine neden olabilir (Cunha ve diğ., 2016). Fluoksetin hidroklorüre ve diazepam akut maruziyetin *Danio rerio*'da oluşturduğu stres cevabına etkilerinin araştırıldığı çalışmada, Fluoksetin ve diazepamın stres yollarını engellediğini gösterilmiştir. Bu sonuca bağlı olarak da psikotik ilaçların sucül sistemlerdeki varlığının nöroendokrin işlev yitimine sebep olabileceğini belirtmişlerdir (Abreu ve diğ., 2014).

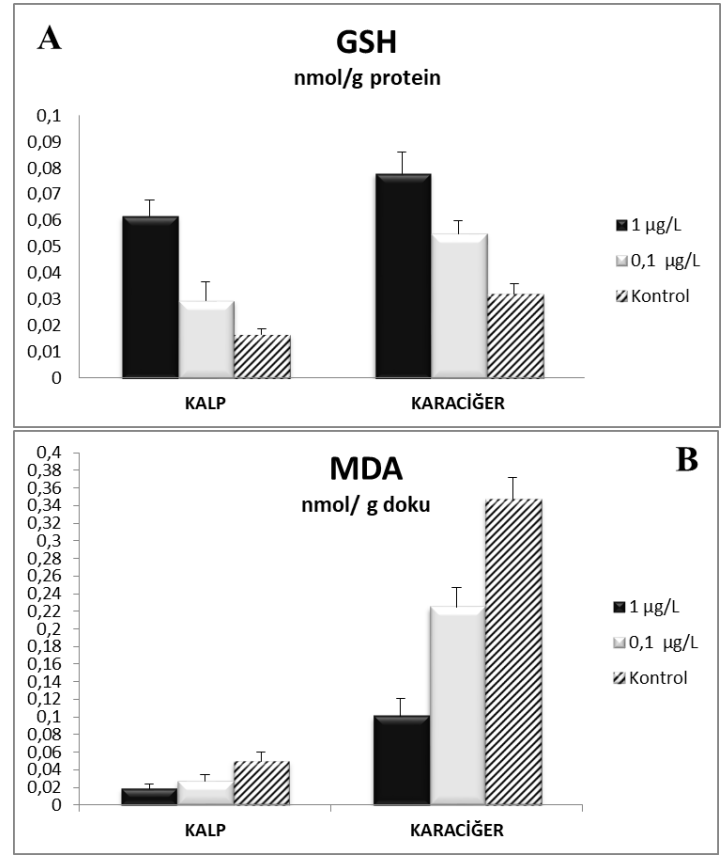


**Şekil 1.** Kılıçkuyruk balıklarında kalp ve karaciğer dokularında Fluoksetin-HCL'nin; A) Süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktivitesine, B) Katalaz (CAT) enzim aktivitesine etkileri

**Figure 1.** Effects of Fluoxetine-HCL in heart and liver tissues in swordtail fish; A) Superoxide dismutase (SOD) enzyme activity, B) Catalase (CAT) enzyme activity

GSH, oksijen radikali yakalayıcısı olarak oksidatif strese karşı savunmada önemli bir antioksidandır. GSH miktarı, hücresel işlevlerin korunmasında önemlidir ve detoksifikasyon ve oksidatif stres durumlarında oksidatif strese karşı ko-yabilmek amacıyla seviyeleri artar (Oliveira, 2016; Sehring ve diğ., 2016). Bu çalışmada da kalp ve karaciğer dokuda kontrole göre artış gözlenmiştir ( $p < 0.05$ ) (Şekil 2A). Chen ve diğ. (2018) yaptıkları çalışmada fluoksetinin *Pseudorasbora parva* balıklarının karaciğer dokularında CAT enzim aktivitesinin ve GSH miktarının akut uygulamalarda artırdığını, kronik uygulamalarda azalttığını belirtmişlerdir. Zebra balığı larvalarına fluoksetin,  $\beta$ -naphthoflavon, östrojen ve  $17\alpha$ -etinilestradiol uygulanarak çeşitli çevresel atıkların akut toksisite mekanizması incelenmiştir. Fluoksetin ve  $\beta$ -naphthoflavonun tüm vücutta  $Na^+$  ve  $K^+$  değerlerini düşürdüğü

gözlemlenmiştir. Sucul ortamdaki birçok atık maddenin varlığı, balıklarda iyon dengesini bozarak toksisiteye neden olabileceğini belirtmişlerdir (Alsop ve Wood., 2013).



**Şekil 2.** Kılıçkuyruk balıklarının kalp ve karaciğer dokularında Fluoksetin-HCL'nin; A) Total Glutasyon (GSH) miktarı, B) Malondialdehit (MDA) miktarına etkileri

**Figure 2.** Effects of Fluoxetine-HCL in the heart and liver tissues of swordtail fish; A) Total Glutathione (GSH) amount, B) Malondialdehyde (MDA) amount

Lipid peroksidasyonu (LPO), oksidatif stresin bir belirtici olarak yaygın olarak kullanılmaktadır ve hücre zarı lipidlerinin ayrışması olarak belirlenebilir (Sayeed ve diğ., 2003). Malondialdehit (MDA), LPO sonucu oluşan ürünlerden biridir ve oksidatif hasarı göstermede sıklıkla kullanılan bir parametredir. MDA miktarının yüksek bulunması, yüksek lipid peroksidasyonuna işaretler. LPO meydana gelmemesi veya düşük olması oksidatif enzimlerin koruyucu etkilerini gösterir. Bu çalışmanın sonucunda, kılıçkuyruk balıklarının kalp ve karaciğer dokularında Fluoksetin-HCL uygulamasının MDA miktarını azalttığı bulunmuştur ( $p < 0.01$ ) (Şekil 2B).

Ding ve diğ erleri (2016) Fluoksetinin *Carassius auratus* dokularında MDA seviyesini artırdığını bildirmişlerdir. Trisiklik antidepresan olan amitriptilin'e maruz bırakılan zebra balığı embriyolarında oksidatif stres parametrelerine bakılmış ve amitriptilin'in toksik etkileri belirlenerek diğ er antidepresanların sucul ortama için potansiyel risk oluşturduğunu ortaya koymuşlardır (Yang ve diğ ., 2014).

## Sonuç

Sonuç olarak, sucul ortamlarda bulunabilen dozlardaki Fluoksetin-HCl'nin kılıçkuyruk balıklarında oksidatif strese neden olduğu ve buna antioksidan savunma ile karşılık verilse dahi, enzimlerde inhibisyona neden olduğu bulunmuştur. Fluoksetin-HCl'nin depresyon tedavisinde en çok kullanılan antidepresan olduğu bilindiğ inden, sucul canlılarda da bu etkileri ile antioksidan cevapları etkilediğ i düşünölmektedir. Ayrıca, bu çalışma ile sucul biyotadaki antidepresan konsantrasyonlarını tespit etmek ve ölçme için daha iyi tekniklerin geliştirmesine acil bir ihtiyaç olduğu ortaya koyulmuştur. Hatta bu ilaçların çevredeki biyolojik ve biyolojik olmayan yollardan dolayı yaşadığı kimyasal değışikliklerin daha iyi anlaşılması, antidepresan bileşikleri verimli bir şekilde bozabilmek için atık su arıtma tesislerinin yeniden tasarlanması ve güncellenmesi gerekmektedir.

## Etik Standart ile Uyumluluk

**Çıkar çatışması:** Yazarlar herhangi bir çıkar çatışmasının olmadığını beyan eder.

**Etik kurul izni:** Bu çalışma, Marmara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu (Etik onay no: 37a.2018.mar Tarih: 09.04.2018) prosedürlerine uygun olarak yapılmıştır.

**Finansal destek:** -

**Teşekkür:** -

**Açıklama:** Bu çalışmanın bir bölümü "2nd International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences (EurasianBioChem 2019)" kongresinde özet bildiri olarak sunulmuştur.

## Kaynaklar

**Abreu, M.S., Koakoski, G., Ferreira, D., Oliveira, T.A., da Rosa, J.G.S., Gusso, D., Barcellos, L.J.G. (2014).** Diazepam and fluoxetine decrease the stress response in zebrafish. *PLoS One*, 9(7), e103232.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103232>

**Aebi, H. (1984).** Catalase in vitro. *Methods of Enzymology*, 105, 121-126.

[https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3)

**Airhart, M.J., Lee, D.H., Wilson, T.D., Miller, B.E., Miller, M.N., Skalko, R.G. (2007).** Movement disorders and neurochemical changes in zebrafish larvae after bath exposure to fluoxetine (PROZAC). *Neurotoxicology and Teratology*, 29, 652-664.

<https://doi.org/10.1016/j.ntt.2007.07.005>

**Alsop, D., Wood, C.M. (2013).** Metal and pharmaceutical mixtures: is ion loss the mechanism underlying acute toxicity and widespread additive toxicity in zebrafish?. *Aquatic Toxicology*, 140, 257-267.

<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.05.021>

**Balci, B., Erkuş, A., Erkuş, F.Ş. (2010).** Farmasötik bileşiklerin sucul ortamda bulunuşu ve etkileri. *Research Journal of Biology Sciences*, 3(2), 13-19.

**Beutler, E. (1975).** Reduced glutathione-GSH, u: Beutler E.(ur.) Red cell metabolism: A manual of biochemical methods. Grane and Straton, New York.

**Bradford, M.M. (1976).** A Rapid Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding, *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.

[https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)

**Chen, H., Zeng, X., Mu, L., Hou, L., Yang, B., Zhao, J., Zhang, Q. (2018).** Effects of acute and chronic exposures of fluoxetine on the Chinese fish, topmouth gudgeon *Pseudorasbora parva*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 160, 104-113.

<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.04.061>

- Cunha, V., Rodrigues, P., Santos, M.M., Moradas-Ferreira, P., Ferreira, M. (2016). *Danio rerio* embryos on Prozac Effects on the detoxification mechanism and embryo development. *Aquatic Toxicology*, 178, 182-189. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.08.003>
- Ding, J., Lu, G., Li, Y. (2016). Interactive effects of selected pharmaceutical mixtures on bioaccumulation and biochemical status in crucian carp (*Carassius auratus*). *Chemosphere*, 148, 21-31. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.01.017>
- FDA-CDER (1998). Guidance for industry-Environmental assessment of human drugs and biologics applications, Revision 1.
- Gutiérrez-Rodríguez, C., Morris, M.R., Dubois, N.S., de Queiroz, K. (2007). Genetic variation and phylogeography of the swordtail fish *Xiphophorus cortezi* (Cyprinodontiformes, Poeciliidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 43(1), 111-123. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2006.10.022>
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M. (2015). Free radicals in biology and medicine. Oxford University Press, USA. ISBN: 978-0-19-871747-8 <https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780198717478.001.0001>
- Jin, Y., Zhang, X., Shu, L., Chen, L., Sun, L., Qian, H., Fu, Z. (2010). Oxidative stress response and gene expression with atrazine exposure in adult female zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere*, 78(7), 846-852. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.11.044>
- Kayım, M. H., Çağırğan, H., Güner, Y. (1999). The research of the effects of 17 $\alpha$ -methyltestosterone on the growth of swordtail fish (*Xiphophorus helleri* Heckel, 1848). *Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 16(1-2), 31-46.
- Kwak, H.I., Bae, M.O., Lee, M.H., Lee, Y.S., Lee, B.J., Kang, K.S., Cho, M.H. (2001). Effects of nonylphenol, bisphenol A, and their mixture on the viviparous swordtail fish (*Xiphophorus helleri*). *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 20(4), 787-795. <https://doi.org/10.1002/etc.5620200414>
- Ledwozyw, A., Michalak, J., Stepień, A., Kadziolka, A. (1986). The relationship between plasma triglycerides, cholesterol, total lipids and lipid peroxidation products during human atherosclerosis. *Clinica Chimica Acta*, 155, 275-283. [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(86\)90247-0](https://doi.org/10.1016/0009-8981(86)90247-0)
- Li, Z., Zlabeka, V., Grabica, R., Lia, P., Machovaa, J., Veliseka, J., Randak, T. (2010). Effects of exposure to sublethal propiconazole on the antioxidant defense system and Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase activity in brain of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquatic Toxicology*, 98, 297-303. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.02.017>
- McCallum, E.S., Bose, A.P., Warriner, T.R., Balshine, S. (2017). An evaluation of behavioural endpoints: the pharmaceutical pollutant fluoxetine decreases aggression across multiple contexts in round goby (*Neogobius melanostomus*). *Chemosphere*, 175, 401-410. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.02.059>
- Mennigen, J.A., Zamora, J.M., Chang, J.P., Trudeau, V.L. (2017). Endocrine disrupting effects of waterborne fluoxetine exposure on the reproductive axis of female goldfish, *Carassius auratus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 202, 70-78. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2017.08.003>
- Mydroie, A.A., Collins, H., Umbles, C., Kyle, J. (1986). Erythrocyte superoxide dismutase activity and other parameters of copper status in rats ingesting lead acetate. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 82(3), 512-520. [https://doi.org/10.1016/0041-008X\(86\)90286-3](https://doi.org/10.1016/0041-008X(86)90286-3)
- Oliveira, M.R. (2016). Fluoxetine and the mitochondria: A review of the toxicological aspects. *Toxicology Letters*, 256, 185-191. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2016.07.001>
- Orem, N.R., Dolph, P.J., (2002). Loss of the phospholipase C gene product induces massive endocytosis of rhodopsin and arrestin in *Drosophila* photoreceptors. *Vision Research*, 42, 497-505. [https://doi.org/10.1016/S0042-6989\(01\)00229-2](https://doi.org/10.1016/S0042-6989(01)00229-2)

- Panlilio, J.M., Marin, S., Lobl, M.B., McDonald, M.D. (2016).** Treatment with the selective serotonin reuptake inhibitor, fluoxetine, attenuates the fish hypoxia response. *Scientific Reports*, 6(1), 1-12.  
<https://doi.org/10.1038/srep31148>
- Sayed, I., Parvez, S., Pandey, S., Bin-Hafeez, B., Haque, R., Raisuddin, S. (2003).** Oxidative stress biomarkers of exposure to deltamethrin in freshwater fish, *Channa punctatus* Bloch. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 56(2), 295-301.  
[https://doi.org/10.1016/S0147-6513\(03\)00009-5](https://doi.org/10.1016/S0147-6513(03)00009-5)
- Sehonova, P., Svobodova, Z., Dolezelova, P., Vosmerova, P., Faggio, C. (2018).** Effects of waterborne antidepressants on non-target animals living in the aquatic environment: a review. *Science of the Total Environment*, 631, 789-794.  
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.03.076>
- Sehring, I.M., Jahn, C., Weidinger, G. (2016).** Zebrafish fin and heart: what's special about regeneration?. *Current Opinion in Genetics & Development*, 40, 48-56.  
<https://doi.org/10.1016/j.gde.2016.05.011>
- Vera-Chang, M.N., Moon, T.W., Trudeau, V.L. (2019).** Cortisol disruption and transgenerational alteration in the expression of stress-related genes in zebrafish larvae following fluoxetine exposure. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 382, 114742.  
<https://doi.org/10.1016/j.taap.2019.114742>
- Weinberger II, J., Klaper, R. (2014).** Environmental concentrations of the selective serotonin reuptake inhibitor fluoxetine impact specific behaviors involved in reproduction, feeding and predator avoidance in the fish *Pimephales promelas* (fathead minnow). *Aquatic Toxicology*, 151, 77-83.  
<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.10.012>
- Yan, Z., Zhang, X., Bao, X., Ling, X., Yang, H., Liu, J., Ji, Y. (2020).** Influence of dissolved organic matter on the accumulation, metabolite production and multi-biological effects of environmentally relevant fluoxetine in crucian carp (*Carrassius auratus*). *Aquatic Toxicology*, 226, 105581.  
<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2020.105581>
- Yang, M., Qiu, W., Chen, J., Zhan, J., Pan, C., Lei, X., Wu, M. (2014).** Growth inhibition and coordinated physiological regulation of zebrafish (*Danio rerio*) embryos upon sublethal exposure to antidepressant amitriptyline. *Aquatic Toxicology*, 151, 68-76.  
<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.12.029>
- Zindler, F., Tisler, S., Loerracher, A.K., Zwiener, C., Braunbeck, T. (2020).** Norfluoxetine is the only metabolite of fluoxetine in Zebrafish (*Danio rerio*) embryos that accumulates at environmentally relevant exposure scenarios. *Environmental Science & Technology*, 54(7), 4200-4209.  
<https://doi.org/10.1021/acs.est.9b07618>