

وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور

عنوان:

مقایسه و بررسی امکان سمیت سلولی
و مولکولی عصاره جلبک *Cochlodinium polykrikoides*
در سلولهای کبدی موش و ماهی

مجری مسئول:

عباسعلی مطلبی

شماره ثبت

۴۰۸۳۹

وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور

عنوان پروژه : مقایسه و بررسی امکان سمیت سلولی و مولکولی عصاره جلبک *Cochlodinium polykrikoides* در سلولهای کبدی موش و ماهی

شماره مصوب : ۳-۱۲-۱۲۵۱-۸۸۰۳۳

نام و نام خانوادگی نگارنده/ نگارندگان : عباسعلی مطلبی

نام و نام خانوادگی مجری مسئول (اختصاص به پروژه ها و طرحهای ملی و مشترک دارد) : عباسعلی مطلبی

نام و نام خانوادگی مجری / مجریان : عباسعلی مطلبی (موسسه تحقیقات شیلات ایران) - جلال پورا احمد (دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی)

نام و نام خانوادگی همکاران : جعفر شهرکی - غلامعباس زرشناس

نام و نام خانوادگی مشاوران : -

نام و نام خانوادگی ناظر : -

محل اجرا : استان تهران

تاریخ شروع : ۸۸/۹/۱

مدت اجرا : ۱ سال و ۶ ماه

ناشر : موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور

شمارگان (تیراژ) : ۲۰ نسخه

تاریخ انتشار : سال ۱۳۹۱

حق چاپ برای مؤلف محفوظ است . نقل مطالب ، تصاویر ، جداول ، منحنی ها و نمودارها با ذکر مأخذ بلامانع است .

«سوابق طرح یا پروژه و مجری»

پروژه : مقایسه و بررسی امکان سمیت سلولی و مولکولی عصاره

جلبک *Cochlodinium polykrikoides* در سلولهای کبدی موش و ماهی

کد مصوب: ۸۸۰۳۳-۱۲۵۱-۱۲-۳

شماره ثبت (فروست): ۴۰۸۳۹ تاریخ: ۹۱/۱۲/۳۰

با مسئولیت اجرایی جناب آقای عباسعلی مطلبی دارای مدرک تحصیلی دکتری در رشته

بهداشت مواد غذایی می باشد.

پروژه توسط داوران منتخب بخش اکولوژی منابع آبی در تاریخ ۹۱/۱/۲۹

مورد ارزیابی و با نمره ۱۸/۲ و رتبه عالی تأیید گردید.

در زمان اجرای پروژه، مجری در:

ستاد ■ پژوهشکده □ مرکز □ ایستگاه □

با سمت رئیس موسسه مشغول بوده است.

به نام خدا

عنوان	«فهرست مندرجات»	صفحه
چکیده	۱
۱- مقدمه	۳
۱-۱- اهداف تحقیق	۶
۱-۲- فرضیه طرح	۷
۲- روش ها و پروتکل‌های تحقیق	۹
۲-۱- پروتکل تحقیق هدف کلی اول	۹
۲-۲- پروتکل تحقیق هدف کلی دوم	۹
۲-۳- پروتکل تحقیق هدف کلی سوم	۱۰
۲-۴- پروتکل تحقیق هدف کلی چهارم	۱۰
۲-۵- پروتکل تحقیق هدف کلی پنجم	۱۱
۲-۶- جامعه مورد بررسی	۱۱
۲-۷- ملاحظات اخلاقی	۱۱
۲-۸- آنالیز آماری	۱۱
۲-۹- روش، تکنیک و نحوه اجرای فاز اول مطالعه	۱۲
۳- یافته ها	۱۸
۴- بحث و نتیجه گیری	۳۳
منابع	۳۸
چکیده انگلیسی	۳۹

چکیده

در این تحقیق، ما مکانیسم های سیتوتوکسیک عصاره آبی *Cochlodinium polykricoides* که مسئول شکوفایی جلبکی شدید و گسترده در خلیج فارس و دریای عمان طی سال های ۲۰۰۸-۲۰۰۹ بود، را در سلولهای کبدی کبد جدا شده موش صحرایی و ماهی قزل آلا مورد بررسی و مقایسه قرار دادیم. علاوه بر این، نقش استرس اکسیداتیو و میتوکندری در القای آپوپتوزیس (مرگ برنامه ریزی شده سلولی) نیز مورد بررسی قرار گرفت. سلولهای کبدی ایزوله با پرفیوژن کبد توسط کلاژناز به دست آمد. برای تعیین میزان "ROS" تولیدی کبدی، دی کلروفلورسین دی استات به عنوان معرف استفاده شد. جذب رنگ فلورسنت کاتیونی، رودامین ۱۲۳، برای تعیین پتانسیل غشای میتوکندری سلولهای کبدی استفاده شد. جذب رنگ فلورسنت آکریدین اورانژ برای تعیین آسیب غشای لیزوزومی سلولهای کبدی استفاده شد. GSH و GSSG با روشی اسپکتروفتومتریک تعیین شد. فعالیت کاسپاز ۳ و فنوتیپ آپوپتوز به ترتیب با استفاده از کیت سنجش فعالیت کاسپاز ۳ محصول شرکت سیگما و کیت تشخیص آپوپتوز محصول شرکت سیگما آلدریچ بررسی شد.

انکوباسیون عصاره جلبک با سلولهای ایزوله کبد رت، باعث لیز غشا سلولها، تشکیل گونه های فعال اکسیژن (ROS)، کاهش ذخایر گلوکاتایون، سقوط پتانسیل غشای میتوکندری، تخلیه ATP و افزایش در نسبت ATP / ADP، آزادی سیتوکروم C به سیتوزول، فعال شدن آبشار کاسپازی و ظهور فنوتیپ آپوپتوز گردید. آنتی اکسیدان ها (α -توکوفرول سوکسینات و BHT)، جذب کننده های رادیکال هیدروکسیل (مانیتول و DMSO)، مسدود کننده های روزنه ی نفوذپذیری میتوکندری (MPT) (سیکلوسپورین، کارنیتین و تری فلورپرازین)، مهارکننده های P450 NADPH ردوکتاز (دی فنیل یدونیوم کلرید)، مهار کننده های CYP2E1 (فنیل ایمیدازول و ۴-متیل پیرازول) و تولید کنندگان ATP (L-گلوتامین، فروکتوز و زایلیتول) باعث مهار فعال شدن caspase-3 و مرگ سلولی گردیدند. داده های ما نشان داد که عصاره جلبک سیگنالینگ آپوپتوز را از طریق استرس اکسیداتیو و مسیر میتوکندریایی فعال می کند. تشکیل ROS به طور مستقیم می تواند در باز شدن منافذ MPT میتوکندریایی و فعال شدن آبشار کاسپازی نقش داشته باشد که منجر به اثرات سمی *C. polykricoides* بر سلولهای کبدی ایزوله موش صحرایی و ماهی قزل آلا می گردد. این یافته ها منجر به درک بهتری از اثرات سمی

C.polykricoides بر روی سلولهای کبد پستانداران و آبزیان می گردد. نتایج ما حساسیت بالاتر گونه ی آبی به اثرات سمی C.polykricoides (بیش از دویست برابر) نسبت به گونه ی پستاندار مورد آزمایش نشان داد. از طرف دیگر در سلول های هپاتوسیت ماهی اثرات سمی عصاره جلبک بر غشای لیزوزومی مشاهده گردید که در هپاتوسیت های ماهی مشاهده نگردید.

کلمات کلیدی: کوکلودینیوم، سمیت سلولی، قزل آلا و موش، خلیج فارس ، ایران

۱- مقدمه

harmful algal bloom (HAB) یا شکوفایی جلبکی مضر به عنوان تهدید مهمی برای ماهیگیری، بهداشت عمومی و اقتصاد مطرح هستند و می توانند باعث تغییر رنگ آب، بروز سمیت در انسان و جانداران آبی و تخریب اکوسیستم آبی شوند (Sunda et al., 2006). در سال های اخیر میزان بروز، طول دوره بروز و میزان توزیع جغرافیایی ها HAB افزایش یافته است. به نظر می رسد که این افزایش با درجه آلودگی ساحلی و گرم شدن کره ی زمین در ارتباط باشد. به طور کلی، نه تنها مرگ و میر ماهی ها، بلکه آلودگی ساحلی ناشی از آن نیز نوعی ضرر اقتصادی است (Moore et al. 2008).

عامل بسیاری از HAB های ثبت شده دیوتاژکدان ها بوده اند. Red tide هایی از تجمعات دینوفلاژلاته در ژاپن، کره و دیگر کشورها گزارش شده است که آسیب های شدیدی به جمعیت ماهی ها در این مناطق وارد کرده است (Nagai et al. 2009).

Cochlodinium polykricoides یکی از مضرترین دینوفلاژله هایی است که باعث تشکیل تجمعات جلبکی قرمز رنگ یا red tide می شود و بیشترین سمیت را برای ماهی ها دارد (Kim et al. 2002).

نظریه های اندکی در مورد مکانیسم مرگ ماهی ها توسط این جمعیت های جلبکی مضر بیان شده است و هنوز مکانیسم مرگ ماهی ها توسط این جمعیت های جلبکی ناشناخته است. ثابت شده است که گونه های *Chattonella marina*، *raphidophycean flagellates* و *C. antiqua* قادرند رادیکال های فعال اکسیژن را در سلول در شرایط رشد بسازند. این تولید رادیکال با چگالی سلولی بالا ارتباط مستقیم دارد (Shimada et al. 1991).

به علاوه این احتمال وجود دارد که علاوه بر ROS گونه های *Chattonella* ترکیبات نوروکسیک نیز تولید کنند. در مطالعه اخیر ثابت شده است که *C. marina* سیستم آنزیمی دارد که این سیستم آنزیمی آنالوگ NADPH اکسیداز نوتروفیل انسانی و منبع تولید کننده آنیون سوپراکسید است (Kim et al., 2000). شواهد قوی پیشنهاد می کنند که ROS تولید شده توسط گونه *Chattonella* فاکتور بسیار مهمی در مرگ ماهی ها است (Janssens et al. 2000).

مشخص شده است که برخی دیگر از جلبک های خانواده ی Raphidophyceae مانند *Heterosigma akashiwo*، *Olisthodiscus luteus* و *Fibrocapsa japonica* نیز تولید ROS می کنند و به نظر می رسد کل این خانواده ی جلبکی ROS تولید می کنند (Oda et al. 1997).

گفته می شود که *C.polykricoides* اثرات مضر خود روی ماهی را از طریق ترکیبات بیواکتیو معینی اعمال می کند (Kim et al. 2002). از طرف دیگر Kim و همکارانش گزارش داده اند که *C.polykricoides* باعث تشکیل آنیون سوپراکساید و هیدروژن پراکساید می شود که تشکیل این رادیکال ها با تغییر محل سیتوکروم C همراه بوده است (Kim et al. 2002).

مطالعات گوناگونی که در زمینه سمیت *C.polykricoides* انجام گردیده است، بر سمی بودن گونه ی جلبک *C.polykricoides* تاکید دارند. از جمله: (Onoue et al., 1985; Yuki and Yoshimatsu, 1989; Guzmán et al., 1990; Qi et al., 1993; Kim, 1998; Kim et al., 1999, 2002; Garrate-Lizarraga et al., 2004; Whyte et al., 2001; Curtiss et al., 2008; Anton et al., 2008; Azanza et al., 2008; Tomas and Smayda, 2008).

در فاصله ی زمانی ماه اگوست سال ۲۰۰۸ تا ماه می سال ۲۰۰۹ به مدت ده ماه در نزدیکی تنگه ی هرمز یک HAB غیر معمول و طولانی بروز کرد (Samimi-Namin et al. 2010) که عامل آن *Cochlodinium polykricoides* بود (Matsuoka et al., 2010).

آخرین مطالعات اکولوژیکی ثابت کرده است که گسترش میکروارگانسیم *Cochlodinium polykricoides* در خلیج فارس صنعت ماهیگیری ایران را در مخاطره قرار داده است. سازمان حفاظت از محیط زیست ایران اعلام کرده است که red tide حدود ۳۰ تن ماهی را در خلیج فارس کشته است. با این حال سازمان جانور شناسی ایران می گوید که تلفات حدوداً ۴۵ تن ماهی و پستاندار دریایی است. در بسیاری مناطق تراکم بین ۹ تا ۲۷ میلیون میکروارگانسیم در هر لیتر ثبت شده است که توسط سازمان منطقه ای حمایت از محیط زیست دریایی (ROPME) گزارش شده است. بعد از مرگ چندین تن ماهی به نظر میرسد که این گسترش جلبکی حتی بر جمعیت میگوهای منطقه نیز اثر گذاشته است (press tv, Feb 22, 2009).

Red tide در سایر کشور های مجاور خلیج فارس نیز اثراتی داشته است. تا کنون طبق آمار رسمی اعلام شده توسط شهرداری فجیره امارات بیش از ۶۵۰ تن ماهی تلف شده در سواحل این امیرنشین کشف شده است که متهم اصلی Red tide است. (Aftab news, Dec 3, 2008).

این پدیده به مرجان های دریایی نیز آسیب می زند. بی رنگ شدن مرجان ها اولین نشانه مرگ آنهاست که علت آن افزایش گستره جلبکی می تواند باشد. دانشمندان در یافتند تا راه حلی جهت توقف گسترش آلودگی به اقیانوس ها قبل از شروع بهار و تابستان پیدا کنند. زیرا گسترش جمعیت جلبکی و پدیده red tide در فصول گرم اتفاق می افتد. سوال این است که آیا red tide یکی از مسایلی است که در صورت گرم تر شدن کره ی زمین، ما باید شاهد آن باشیم؟ (Moore et al. 2008).

یکی از اهداف اصلی انجام این مطالعه شناخت مکانیسم های سمیت بالاخص مکانیسم های ایکتیوتوکسیک جلبک *C. polykricoides* است.

گزارش هایی وجود دارند که نه تنها *C. polykricoides* را در مرگ ماهی ها دخیل دانسته اند، بلکه از نقش این جلبک در مرگ پستانداران دریایی نیز صحبت کرده اند (WDR 2008; Mindy et al., 2010; Berkday 2011).

یکی از اهداف دیگر این مطالعه یافتن بینشی اولیه از قدرت سم زایی عصاره و محیط رشد جلبک *Cochlodinium polykricoides* و تاثیر آن روی گونه هایی از پستانداران و آبزیان است. به این منظور کلیه مارکر های سمیت سلولی در سلول های کبدی رت و ماهی قزل آلا پس از تماس با غلظت های EC_{50} مربوطه از عصاره و محیط رشد جلبک *Cochlodinium polykricoides* مورد اندازه گیری و مقایسه قرار خواهد گرفت. رت مورد استفاده در این آزمایش رت اصلاح ژنتیکی شده Sprague dawley است و دلیل انتخاب آن این است که نزدیک ترین کبد را به کبد انسان از لحاظ تنوع و فعالیت آنزیماتیک دارد.

۱-۱- اهداف تحقیق

۱. هدف کلی اول: بررسی نقش گونه های فعال اکسیژن در سمیت سلولی ناشی از عصاره و محیط رشد جلبک *Cochlodinium polykricoides* در سلولهای هپاتوسیت ایزوله شده رت و ماهی.

❖ هدف اختصاصی: آیا گونه های فعال اکسیژن در سلولهای هپاتوسیت ایزوله شده رت و ماهی در تماس با غلظت سمی و غیرسمی عصاره و محیط رشد جلبک *Cochlodinium polykricoides* نسبت به گروه کنترل افزایش معنی داری خواهد داشت؟

❖ هدف اختصاصی: آیا افزایش گونه های فعال اکسیژن در سلولهای هپاتوسیت ایزوله شده رت و ماهی با مرگ سلولی ناشی از عصاره و محیط رشد جلبک *Cochlodinium polykricoides* ارتباط مستقیم دارد؟

❖ هدف اختصاصی: منبع سلولی یا ملکولی تولید گونه های فعال اکسیژن در سلولهای هپاتوسیت ایزوله شده رت و ماهی در تماس با غلظت سمی عصاره و محیط رشد جلبک *Cochlodinium polykricoides* چیست؟

۲. هدف کلی دوم: بررسی نقش آسیب میتوکندریایی در مکانیسم مرگ سلولی ناشی از عصاره و محیط رشد جلبک *Cochlodinium polykricoides* در سلولهای هپاتوسیت ایزوله شده رت و ماهی.

❖ هدف اختصاصی: آیا پتانسیل غشای داخلی میتوکندری در سلولهای هپاتوسیت ایزوله شده رت و ماهی در تماس با غلظت سمی عصاره و محیط رشد جلبک *Cochlodinium polykricoides* دچار افت معنی دار می شود؟

❖ هدف اختصاصی: آیا افت پتانسیل غشای داخلی میتوکندری ارتباط مستقیمی با مرگ سلولی ناشی از عصاره و محیط رشد جلبک *Cochlodinium polykricoides* دارد؟

۳. هدف کلی سوم: بررسی نقش آسیب لیزوزومی در مکانیسم مرگ سلولی ناشی از عصاره و محیط رشد جلبک *Cochlodinium polykricoides* در سلولهای هپاتوسیت ایزوله شده رت و ماهی.

❖ هدف اختصاصی: آیا غشای لیزوزوم سلولهای هپاتوسیت ایزوله شده رت و ماهی در تماس با غلظت سمی عصاره و محیط رشد جلبک *Cochlodinium polykricoides* دچار آسیب دیدگی (نشستی) معنی دار می شود؟

❖ هدف اختصاصی: آیا آسیب دیدن غشای لیزوزوم ها ارتباط مستقیمی با مرگ سلولی ناشی از عصاره و محیط رشد جلبک *Cochlodinium polykricoides* دارد؟

۴. هدف کلی چهارم: بررسی نقش آنزیمی کاسپازها در مکانیسم سمیت سلولی عصاره و محیط رشد جلبک *Cochlodinium polykricoides* و تشخیص فنوتیپ آپوپتوز.

❖ هدف اختصاصی: آیا در روند سمیت سلولی عصاره و محیط رشد جلبک *Cochlodinium polykricoides* افزایش معنی داری در فعالیت آنزیمی کاسپازها بخصوص کاسپاز ۳ (میانجی نهایی آپوپتوز) مشاهده می شود؟

❖ هدف اختصاصی: آیا فنوتیپ آپوپتوز تایید میشود یا نه؟

۵. هدف کلی پنجم: مقایسه سمیت عصاره و محیط رشد جلبک *Cochlodinium polykricoides* در سلول های پستانداران (رت) و آبزیان (ماهی قزل آلا).

❖ هدف اختصاصی: آیا غلظت EC_{50} در دو گونه ی رت و ماهی تفاوت معنی داری دارد؟

❖ هدف اختصاصی: آیا مکانیسم های سمیت سلولی شامل تولید رادیکالهای فعال اکسیژن (ROS)، آسیب لیزوزوم های سلولی، تخلیه گلوتاتیون (GSH)، باز شدن روزنه نفوذپذیری موقت غشای میتوکندری (MPT) در دو گونه ی رت و ماهی تفاوت معنی داری دارد؟

❖ آیا عصاره ی سلولی *Cochlodinium polykricoides* سمیتی متفاوت از محیط رشد *Cochlodinium polykricoides* دارد؟

۲-۱- فرضیه طرح

- عصاره و محیط رشد جلبک *Cochlodinium polykricoides* باعث افزایش تولید رادیکالهای فعال اکسیژن (ROS)، می شود که این افزایش ROS سلولی می تواند از علل اصلی القای سمیت عصاره و محیط رشد جلبک *Cochlodinium polykricoides* در دو گونه ی رت و ماهی باشد.
- سیستم سیتوکروم p450 در فعال سازی متابولیک و روند وقوع سمیت سلولی عصاره و محیط رشد جلبک *Cochlodinium polykricoides* در دو گونه ی رت و ماهی نقش خواهد داشت.

- آسیب دیدن لیزوزوم های سلولی ناشی از تماس سلول با عصاره و محیط رشد جلبک *Cochlodinium polykricoides* می تواند در روند سمیت سلولی عصاره و محیط رشد جلبک *Cochlodinium polykricoides* در دو گونه ی رت و ماهی شرکت کند.
- مکانیسم اصلی مرگ سلولی ناشی از عصاره و محیط رشد جلبک *Cochlodinium polykricoides* در سلولهای هپاتوسیت ایزوله شده رت و ماهی، اثر این ترکیب بر روزنه نفوذپذیری موقت غشای میتوکندری (MPT) می باشد. مرگ سلولی ناشی از عصاره و محیط رشد جلبک *Cochlodinium polykricoides* در دو گونه ی رت و ماهی، از طریق فاکتور هایی که متعاقب گشوده شدن روزنه نفوذپذیری موقت غشای میتوکندری در سیتوپلاسم رها می شود، سیگنال می گردد که در نهایت بوسیله فعال شدن آبشار آنزیمی کاسپازها به انجام می رسد.
- گلوپتایون (GSH)، برای زدودن گونه های فعال اکسیژن در دو گونه ی رت و ماهی مورد نیاز سلول است. بنابراین سلولهایی که فاقد مقادیر مناسبی از آن باشند نسبت به عصاره و محیط رشد جلبک *Cochlodinium polykricoides* آسیب پذیر ترند.
- آپوپتوز مرگی است که توسط جلبک *Cochlodinium polykricoides* القا می شود و فنوتیپ آپوپتوز مشاهده خواهد شد.

۲- روش ها و پروتکل‌های تحقیق

۲-۱- پروتکل تحقیق هدف کلی اول

میزان تولید رادیکال‌های فعال اکسیژن (ROS) در سلول‌های هیپاتوسیت ایزوله شده رت و ماهی، پس از افزودن غلظت های EC_{50} مربوطه عصاره و محیط رشد جلبک *Cochlodinium polykricoides* به سوسپانسیون سلولی در زمانهای متوالی اندازه گیری شد. از آنجایی که منابع مختلفی در سلول می توانند در افزایش میزان تولید رادیکال‌های فعال اکسیژن ایفای نقش کنند، جهت تعیین منبع اصلی تولید رادیکال‌های فعال اکسیژن در سلول‌های در تماس با غلظت EC_{50} عصاره و محیط رشد جلبک *Cochlodinium polykricoides*، از مهارکننده های اختصاصی آن استفاده شد. برای این منظور، مهارکننده های اختصاصی را پیش از افزودن غلظت EC_{50} عصاره و محیط رشد جلبک *Cochlodinium polykricoides* به سوسپانسیون سلولی، با هیپاتوسیت های ایزوله شده رت و ماهی، پره انکوبه کرده و سپس توانایی عصاره و محیط رشد جلبک *Cochlodinium polykricoides* در ایجاد رادیکال‌های فعال اکسیژن و القای سمیت سلولی بررسی گردید.

۲-۲- پروتکل تحقیق هدف کلی دوم

تغییرات پتانسیل غشای میتوکندری در رت و ماهی در زمانهای متوالی متعاقب افزودن غلظت EC_{50} عصاره و محیط رشد جلبک *Cochlodinium polykricoides* به سوسپانسیون سلولی، اندازه گیری شد. با مشاهده تفاوت معنی دار میان تغییرات پتانسیل غشای میتوکندری سلول‌های تحت تماس با عصاره و محیط رشد جلبک *Cochlodinium polykricoides* و سلول‌های کنترل، برای بررسی این که آیا تغییر پتانسیل غشای میتوکندری سلول‌های تحت تماس با عصاره و محیط رشد جلبک *Cochlodinium polykricoides* در سمیت سلولی القا شده عصاره و محیط رشد جلبک *Cochlodinium polykricoides* دخالت دارد یا خیر، از عوامل مسدود کننده روزنه MPT استفاده کرده و پس از پره انکوبه کردن هیپاتوسیت های رت و ماهی با این مهارکننده ها، غلظت EC_{50} عصاره و محیط رشد جلبک *Cochlodinium polykricoides* را افزوده و میزان تغییرات پتانسیل غشای میتوکندری و میزان سمیت القا شده در سلولها را اندازه گیری شد. سپس آن را با میزان تغییرات پتانسیل غشای میتوکندری و

میزان سمیت سلولی القا شده توسط EC₅₀ عصاره و محیط رشد جلبک *Cochlidinium polykricoides* در سلولهای مشابه در غیاب مهارکننده های روزنه ی نفوذپذیری موقت غشای میتوکنندری (MPT) مقایسه کردیم.

۲-۳- پروتکل تحقیق هدف کلی سوم

سلامت غشای لیزوزوم در هیاتوسیت های رت و ماهی در زمانهای متوالی، متعاقب افزودن غلظت EC₅₀ عصاره و محیط رشد جلبک *Cochlidinium polykricoides* مورد بررسی قرار گرفت. با مشاهده تفاوت معنی دار بین آسیب غشای لیزوزوم در سلولهای تحت تماس با عصاره و محیط رشد جلبک *Cochlidinium polykricoides* و سلولهای کنترل، برای بررسی اینکه آیا آسیب غشای لیزوزوم این سلولها در سمیت سلولی آن دخالت دارد یا خیر، از مهارکننده های فعالیت و محافظین لیزوزوم استفاده کرده و پس از پره انکوبه کردن هیاتوسیت های رت و ماهی با این محافظان لیزوزوم، غلظت EC₅₀ عصاره و محیط رشد جلبک *Cochlidinium polykricoides* را افزوده و میزان آسیب غشای لیزوزومی و میزان سمیت القا شده در سلولها اندازه گیری شد. سپس این مقادیر را با میزان آسیب غشای لیزوزومی و میزان سمیت سلولی القا شده توسط غلظت EC₅₀ عصاره و محیط رشد جلبک *Cochlidinium polykricoides* در سلولهای مشابه در غیاب مهارکننده های فعالیت لیزوزوم مقایسه کردیم.

۲-۴- پروتکل تحقیق هدف کلی چهارم

با فرض این که مرگ هیاتوسیت ها متعاقب تماس با غلظت EC₅₀ عصاره و محیط رشد جلبک *Cochlidinium polykricoides* با فعال شدن آبشار کاسپازها به انجام می رسد، به وسیله کیت مخصوص میزان فعالیت کاسپاز ۳ را پس از افزودن غلظت EC₅₀ عصاره و محیط رشد جلبک *Cochlidinium polykricoides* به سوسپانسیون سلولی ماهی و رت به عنوان شاخص برآورد آپوپتوز اندازه گیری کرده و با میزان پایه فعالیت کاسپاز ۳ در سلولهای کنترل مقایسه کردیم.

نتایج فوق الذکر با مشاهده ی فنوتیپهای apoptotic و necrotic در سوسپانسیون سلولی ماهی و رت ناشی از عصاره و محیط رشد جلبک *Cochlidinium polykricoides* تائید شد. در این آزمایش از میکروسکوپ فلورسنت و پروب های فلورژنیک Annexin V و 6-CFDA (۶-کلرو فلورسین دی استات) استفاده گردید.

۲-۵- پروتکل تحقیق هدف کلی پنجم

برای تعیین اینکه آیا غلظت EC_{50} در دو گونه ی رت و ماهی تفاوت دارد، نتایج بدست آمده بوسیله مقایسه ی EC_{50} در دو گونه بررسی شد.

تفاوت های سمیت سلولی شامل تولید رادیکالهای فعال اکسیژن (ROS)، آسیب لیزوزوم های سلولی، تخلیه گلوکاتایون (GSH) و باز شدن روزنه نفوذپذیری موقت غشای میتوکندری (MPT) در دو گونه ی رت و ماهی نیز مورد مطالعه قرار گرفت.

برای بررسی تفاوت های احتمالی سمیت عصاره ی سلولی با محیط رشد *Cochlodinium polykricoides* نیز فاکتورهای موثر در بروز سمیت بررسی شد.

۲-۶- جامعه مورد بررسی

در این مطالعه از رت های نر نژاد Sprague-Dawly و ماهی های قزل آلالی نر در محدوده وزنی ۲۰۰-۳۰۰ گرم استفاده شد.

۲-۷- ملاحظات اخلاقی

این کار بر روی رت و ماهی در چهارچوب مطالعات حیوانی کاملاً مطابق اصول سازمان بهداشت جهانی انجام پذیرفت.

۲-۸- آنالیز آمار

آنالیز نتایج توسط آزمون ANOVA یک طرفه و پست تست Tukey انجام گرفت. جهت بررسی هموزنیسته واریانس در یک گروه، از تست Leven استفاده کرده و نتایج بصورت میانگین سه آزمایش جداگانه $mean \pm SD$ گزارش گردید.

۹-۲- روش ، تکنیک و نحوه اجرای فاز اول مطالعه

۹-۲-۱- اندازه گیری سمیت سلولی

در صد بقاء سلولهای کبدی جداسازی شده بوسیله روش رنگ پذیری با رنگ (0.2%w/v) trypan blue اندازه گیری شد. برای اجتناب از به وجود آمدن شرایط غیر سمی و یا شرایط بسیار سمی در سلولهای کبد جدا شده، از غلظت EC₅₀ عصاره و محیط رشد جلبک *Cochlidinium polykrikoides* استفاده گردید. EC₅₀ یک ترکیب شیمیایی در محدوده زمانی معین در تکنیک سنجش سمیت سلولی، عبارت است از غلظتی از آن ماده که میزان مرگ سلولی ناشی از ترکیب سمی را در سلولهای مورد آزمایش بعد از همان زمان معین انکوباسیون به ۵۰٪ برساند. جهت یافتن EC₅₀ عصاره و محیط رشد جلبک *Cochlidinium polykrikoides* منحنی دوز - پاسخ در زمان معین با سه غلظت متفاوت از این ترکیب ترسیم و از روی خط رگرسیون (probit)، EC₅₀ محاسبه شد. چون در روش اندازه گیری EC₅₀ شمارش تعداد سلولهای مرده و زنده الزامی است از روش رنگ آمیزی تریپان بلو جهت تعیین تعداد سلولهای مرده و زنده استفاده شد. در این روش از رنگ کاتیونی تریپان بلو (با غلظت نهایی ۰/۲ درصد وزنی - حجمی) استفاده شد. بدین ترتیب که سلولهای سالم و بدون آسیب غشای پلاسمایی نسبت به رنگ تریپان بلو نفوذ ناپذیر بوده اما سلولهای مرده با غشای سیتوپلاسمی آسیب دیده تریپان بلو را کاملاً جذب کرده به رنگ آبی تیره درمی آیند (Moldeous et al. 1978; Shen et al. 1996).

برای انکوبه کردن مواد محلول در آب، ۱۰۰ میکرو لیتر از نمونه استوک غلیظ ۱۰۰ برابر غلظت را برداشته و به یکی از فلاسکهای در حال چرخش که حاوی ۱۰ml سوسپانسیون سلول کبدی بوده افزوده تا غلظت دلخواه بدست آید. در مورد مواد محلول در متانول از محلول استوک (۱۰۰۰ برابر غلظت) ۱۰ میکرو لیتر برداشته و به یک فلاسک در حال چرخش که حاوی ۱۰ml سوسپانسیون سلول کبدی بوده افزوده تا غلظت مورد نظر بدست آید (Pourahmad et al. 2009). شایان ذکر است که ۱۰ میکرو لیتر متانول بعد از گذشت شش ساعت انکوباسیون بر روی سمیت سلولی اثر معنی داری (p < ۰/۰۵) ندارد.

برای اندازه گیری سمیت سلولی، در زمانهای متوالی و مختلف دوره شش ساعته انکوباسیون، نمونه های مورد نظر را از فلاسک ها برداشته و مورد ارزیابی قرار داده شد. فلاسک ها به سه گروه کنترل ، نمونه و انواع مهارکنندگان تقسیم می شوند. فلاسک کنترل فقط حاوی سوسپانسیون سلولهای کبدی بوده و هیچ ماده ای با آن

انکوبه نمی شود. فلاسک نمونه حاوی سوسپانسیون سلولهای کبدی و عصاره و محیط رشد جلبک *Cochlidinium polykriokroides* با غلظت EC_{50} بوده و فلاسک های مهارکننده ها نیز حاوی غلظت EC_{50} از عصاره و محیط رشد جلبک *Cochlidinium polykriokroides* و همچنین غلظت های غیرسمی از انواع مهارکننده ها بودند.

اساس انتخاب مهار کننده ها، محرک ها و یا جمع کنندگان رادیکالی و غلظت غیر سمی به کار رفته از آنها در این مطالعه، با استفاده از نتایج مطالعات متعددی بدست آمده که در قسمت منابع به برخی از آنها اشاره شده است. علاوه بر این اثرات سه یا چهار غلظت متفاوت از این مواد را که نزدیک به غلظت اشاره شده در فرانس ها بوده مورد ارزیابی قرار گرفت و سپس غلظتی که بهترین اثر مهارکنندگی، تحریک کنندگی و یا جمع کنندگی رادیکالی را از خود نشان داد، به عنوان غلظت بهینه انتخاب شد. همچنین بعد از یافتن یک غلظت بهینه از هر واکنش گر آن غلظت را جداگانه به مدت ۳ ساعت با سلولهای مورد نظر انکوبه کرده تا اثر سمی احتمالی آن روی سلولها بررسی شود. علاوه بر این در این مطالعه، در مورد اثرات مهارکنندگی، تحریک کنندگی و یا جمع کنندگی رادیکالی تنها از یک واکنش گر استفاده نگردیده، بلکه از گروهی از واکنش گرهای مهار یا تحریکی که دارای اثرات مشابه هستند، استفاده شد. بنابراین وقتی گروه های مختلف این واکنش گرهای مهار یا تحریکی نتایج یکسان از خود نشان دادند می توان با قطعیت گفت که مکانیسم خاصی در پاسخ به سمیت دخالت داشته است (Pourahmad et al. 2009).

۳-۹-۲- اندازه گیری میزان رادیکالهای فعال اکسیژن (ROS)

برای اندازه گیری میزان تولید ROS در سلول های کبدی از معرف ۲ و ۷-دی کلروفلوروسین دی استات (DCFH-DA) استفاده شد. اصول کار به این صورت است که وقتی DCFH-DA با سلولهای کبد انکوبه می شود، بعلاوه لیپوفلیسیته زیاد به راحتی از غشای پلاسمایی سلول عبور کرده و داخل سلول توسط استرازهای موجود در داخل سلول هیدرولیز می گردد و دی کلروفلوروسین غیر فلورسنت را به وجود می آورد. دی کلروفلوروسین غیر فلورسنت (DCFH)، در حضور ROS به سرعت اکسید شده و ترکیب شدیداً فلورسنت دی کلروفلوروسین (DCF) را تشکیل می دهد. در نتیجه می توان شدت فلورسانس این ترکیب را توسط اسپکتروفتومتر فلورسانس در

طول موجهای $Ex: 470 \text{ nm}$ و $Em: 540 \text{ nm}$ اندازه گیری کرد. این شدت فلورسانس در ارتباط مستقیم با غلظت ROS یا همان رادیکالهای فعال اکسیژن می باشد.

روش کار بدین صورت است که DCFH-DA با غلظت 1 M را در بافر Earles + HPES 28 mM با $\text{pH}=7.4$ تهیه کرده، سپس 3 ml از آن را به لوله آزمایش حاوی سلولهای کبد رت و ماهی که از سانتریفیوژ 1 ml از سوسپانسیون سلولی (10^6 cell/ml) بدست آمده، افزوده و به مدت 15 دقیقه در دمای 37 درجه سانتیگراد انکوبه کرده و سپس در طول موجهای ذکر شده شدت فلورسانس DCF توسط دستگاه اسپکتروفلوریمتر اندازه گیری شد (Shen et al. 1996).

۴-۹-۲- اندازه گیری آسیب غشای لیزوزوم

برای بررسی سلامت غشای لیزوزوم از رنگ فلوروژنیک اکریدین اورنج استفاده شد. اکریدین اورنج یک باز ضعیف لیپوفیل با قابلیت تجمع در لیزوزمها بوده که از لحاظ شیمیایی دارای خاصیت فلورسانس می باشد. اکریدین اورنج به علت لیپوفیلیته زیاد به راحتی از غشای سلولی عبور کرده و به دلیل تمایل بالا به واکنش با H^+ (هیدروژن اسیدی) به لیزوزمها وارد شده و با جذب پروتون به صورت مولکول باردار (AH^+) در آنها تجمع پیدا می کند. طبیعی است که مولکول باردار قادر به خروج از غشای لیپیدی لیزوزمها نیست و البته خاصیت فلوروژنیک خود را از دست می دهد. البته به محض این که غشای لیزوزومی توسط رادیکالهای فعال اکسیژن (ROS) حاصل از شرایط استرس اکسیداتیو تخریب گردد، اکریدین اورنج وارد سیتوزول شده و در سیتوزول دوباره پروتون خود را از دست داده و توانایی فلوروسانسی خود را بدست می آورد. در نهایت شدت فلورسانس مولکول بدون بار آن در طول موجهای $Ex: 470 \text{ nm}$ و $Em: 540 \text{ nm}$ قابل اندازه گیری است.

روش کار بدین صورت بود که در یک لوله آزمایش سلولهای کبدی که از سانتریفیوژ 1 ml از سوسپانسیون سلولی با غلظت 10^6 cell/ml بدست آمده است را با 2 ml محلول اکریدین اورنج با غلظت 5 g/ml در بافر Earles + HPES 28 mM با $\text{pH}=7.4$ مخلوط کرده و بمدت 15 دقیقه در دمای 37 درجه سانتیگراد انکوبه کردیم. سپس شدت فلورسانس ناشی از اکریدین اورنج منتشر شده به سیتوزول در طول موجهای $Ex: 470 \text{ nm}$ و $Em: 540 \text{ nm}$ بررسی گردید (Pourahmad et al. 2009).

۵-۹-۲- اندازه گیری افت پتانسیل غشای میتوکندری

طبق روش اندرسون و همکاران، برای بررسی پتانسیل غشای میتوکندری از کاتیون فلوروژنیک رودامین ۱۲۳ که از قابلیت بالای تجمع در میتوکندری برخوردار است استفاده گردید. این رنگ لیپوفیل از طریق انتشار وارد سیتوزول شده و از آنجا با توجه به بار مثبت خود بطور اختصاصی در میتوکندری تجمع می یابد. میزان این تجمع به پتانسیل غشای میتوکندری بستگی دارد. بدین ترتیب در میتوکندری سالم با پتانسیل غشای به شدت منفی کاملاً تجمع یافته و در نتیجه با روش فلوریمتری ردیابی نمی شوند (پدیده خاموشی یا Quenching). اما در صورت سقوط پتانسیل غشای میتوکندری و بازشدن روزنه های MPT، غشای آن متعاقب تماس سلول با سموم میتوکندریایی، رودامین ۱۲۳ از طریق روزنه های MPT به سیتوزول وارد می شود. در نتیجه میزان فلورسانس ناشی از حضور آن در سیتوزول بشدت افزایش می یابد و قابل اندازه گیری می شود. بدین ترتیب درصد کاهش پتانسیل غشای میتوکندری به صورت تفاوت در شدت فلورسانس رودامین ۱۲۳ در سلولهای کنترل و سلولهای تحت تماس با غلظت EC_{50} از عصاره و محیط رشد جلبک *polykricoides Cochlodinium* اندازه گیری می شود.

برای این منظور ۰/۵ml سوسپانسیون سلولی از محیط انکوباسیون برداشته شد و با سرعت ۱۰۰۰rpm به مدت یک دقیقه سانتریفوژ گردید. مایع فوقانی آن را دور ریخته و به سلولهای موجود در ته لوله ۲ml از محلول رودامین M ۱/۵ افزوده شد. بعد از مخلوط کردن کامل، آن را در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه کرده، سپس شدت فلورسانس ناشی از رودامین ۱۲۳ موجود در محیط به روش اسپکتروفلوریمتری در طول موجهای nm ۴۷۰ : Ex و ۵۴۰ nm : Em بررسی گردید. ظرفیت میتوکندری برای جذب رودامین ۱۲۳ به صورت تفاوت در شدت رودامین ۱۲۳ بین سلولهای کنترل و سلولهای تحت تماس با عصاره و محیط رشد جلبک *Cochlodinium polykricoides* معین و درصد تغییرات آن به عنوان شاخص جهت سنجش افت پتانسیل غشای میتوکندری مورد استفاده قرار گرفت (Brunk et al. 1995).

۶-۹-۲- اندازه گیری فعالیت آنزیم کاسپاز ۳

به منظور اندازه گیری فعالیت آنزیم کاسپاز ۳ از کیت مخصوص اندازه گیری فعالیت کاسپاز ۳ استفاده گردید. این سنجش بر اساس هیدرولیز سوبسترای پپتیدی AC-DEVD-pNA توسط آنزیم کاسپاز ۳ است که در نتیجه آن ماده پارانیتروانیلین (pNA) رنگی آزاد می شود. غلظت pNA آزاد شده از سوبسترا را می توان با اندازه گیری میزان جذب آن در طول موج ۴۰۵ nm و با استفاده از منحنی کالیبراسیونی که توسط غلظتهای مشخص pNA رسم شده محاسبه نمود. فعالیت آنزیمی کاسپاز ۳ بر حسب میکرومول pNA آزاد شده در هر دقیقه در هر میلی لیتر از نمونه سلولی با غلظت pNA در نمونه متناسب است و ضریب تناسب آن نیز به حجم نمونه، زمان و فاکتور رقت آن بستگی دارد.

برای این منظور ابتدا در زمان مشخصی از انکوباسیون سلولهای کبدی با غلظت EC_{50} عصاره و محیط رشد جلبک *Cochlodinium polykricoides*، نمونه های سلولی جمع آوری شده و به مدت ۳min با سرعت ۱۰۰۰rpm در دمای ۴۰ C سانتریفیوژ شدند. مایع رویی را دکانته کرده به سلولهای ته نشین شده محلول Lysis را از کیت کاسپاز اضافه کرده، به طوری که در هر ۱۰۰ میکرولیتر تعداد 10^5 سلول موجود باشد. سپس این سوسپانسیون سلولی را به مدت ۱۵-۲۰min روی یخ قرار داده تا سلولها کاملاً لیز شدند. سپس سلولهای لیز شده برای ۱۵-۱۰ min با سرعت ۱۳۰۰۰rpm در دمای ۴۰ C سانتریفیوژ کرده و این بار مایع رویی را که Lysate می باشد جهت آنالیز به پلیتهای ۹۶ خانه ایی منتقل کرده و به آن سوبسترای کاسپاز ۳ (Ac-DEVD-pNA) با غلظت ۲۰mM افزوده شد. به منظور مقایسه نمونه با کنترل مثبت و کنترل منفی از نمونه کاسپاز ۳ (۲ g/L) و نمونه مهارکننده کاسپاز ۳ (Ac-DEVD-CHO) (۲mM) استفاده شد. پس از پر کردن حفره های پلیت، در پوش آن گذاشته و برای ۷۰-۹۰ min در دمای ۳۷ C انکوبه گردید. سپس OD های نمونه ها در طول موج ۴۰۵ nm توسط دستگاه الیزاریدر خوانده شد و نتایج با استفاده از منحنی کالیبراسیون غلظت - جذب پارانیتروانیلین و ضریب تبدیل استخراج شدند (کلیه مراحل این آزمایش براساس دستورالعمل کیت انجام گردید).

۲-۹-۷- اندازه گیری میزان GSH و GSSG

برای اندازه گیری GSH، ۱ ml از سوسپانسیون هیپاتوسیتی سانتریفوژ گردید (۱۰۰۰ rpm، ۱ min). سوپرناتانت دور ریخته شد و به سلول‌های رسوب یافته تری کلرو استیک اسید ۱۰٪ اضافه گردید. پس از سانتریفوژ (۱۰۰۰ rpm، ۱ min)، سوپرناتانت جهت آنالیز مورد استفاده قرار گرفت.

به ۰.۵ ml از سوپرناتانت ۴.۵ ml بافر انکوباسیون با pH = ۸ اضافه شد. پس از آن ۱۰۰ μl از محلول OPT (1mg/ml) و ۱/۸ ml بافر انکوباسیون به ۱۰۰ μl از سوپرناتانت رقیق شده در مرحله قبل افزوده شد. پس از انکوباسیون محلول حاصله به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق، شدت فلورسانس در طول موج‌های Excitation و Emission به ترتیب ۳۵۰ nm و ۴۲۰ nm اندازه گیری شد.

برای اندازه گیری GSH، ۱ ml از سوسپانسیون هیپاتوسیتی رت و ماهی را سانتریفوژ گردید. پس از سانتریفوژ سوپرناتانت جهت آنالیز مورد استفاده قرار گرفت. ۰/۵ ml از سوپرناتانت بدست آمده از مرحله قبل با ۲۰۰ (NEM (0.04 M, ۰.۰۴ μl به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه گردید. سپس به مخلوط حاصله NaOH (0.1N) افزوده شده و دقیقاً مانند روش اندازه گیری GSH عمل گردید. با این تفاوت که به جای بافر انکوباسیون از (0.1N) NaOH بعنوان رقیق کننده استفاده شد. میزان GSSG و GSH بر حسب μM بوسیله منحنی کالیبراسیون GSSG و GSH خالص محاسبه گردید.

۳- یافته ها

EC₅₀ یک ترکیب شیمیایی در محدوده زمانی معین در تکنیک سنجش سمیت سلولی، عبارت است از غلظتی از آن ماده که میزان مرگ سلولی ناشی از ترکیب سمی را در سلولهای مورد آزمایش بعد از همان زمان معین انکوباسیون به ۵۰٪ برساند. جهت یافتن EC₅₀ عصاره و محیط رشد جلبک *Cochlidinium polykrikroides* منحنی دوز - پاسخ با غلظت های متفاوت از این ترکیبات ترسیم و از روی خط رگرسیون (probit)، EC₅₀ محاسبه شد. در مورد هیپاتوسیت های رت، برای به دست آوردن غلظت بهینه یا به عبارتی EC₅₀ سه ساعت، غلظت های متفاوتی از عصاره و محیط رشد جلبک مورد بررسی قرار گرفت که با استفاده از منحنی رگرسیون، رقت معادل ۲۴۰ سلول جلبک در میلی لیتر برای عصاره ی جلبک به عنوان EC₅₀ سه ساعت در هیپاتوسیت های رت در نظر گرفته شد. در مورد هیپاتوسیت های ماهی، برای به دست آوردن غلظت EC₅₀ دو ساعت، غلظت های متفاوتی از عصاره و محیط رشد جلبک مورد بررسی قرار گرفت که با استفاده از منحنی رگرسیون، رقت معادل ۲ سلول جلبک در میلی لیتر برای عصاره ی جلبک به عنوان EC₅₀ دو ساعت در در هیپاتوسیت های ماهی قزل آلا نظر گرفته شد.

شایان ذکر است که وقتی از حداکثر غلظت ممکن محیط رشد جلبک در تست های بررسی سمیت استفاده گردید، در مورد هر دو گونه ی رت و ماهی هیچ گونه اختلاف معنی داری با هیپاتوسیت های کنترل مشاهده نگردید.

کلید ی تست های بیان شده در طرح انجام و یافته های حاصل از تست های انجام شده در جداول ذیل ذکر گردیده است.

Table 1- Effect of antioxidant, ROS scavengers, MPT pore sealing agents, lysosomotropic agents and CYT P450 inhibitors on Algal extract cytotoxicity in hepatocytes.

Addition	Cytotoxicity (%) 2h	Cytotoxicity (%) 3h	Cytotoxicity (%) 4h
Control rat hepatocytes	18±2	21±3	25±3
Algal extract (Eq. 240cells/ml)	36±3 ^a	51±4 ^a	67±5 ^a
+α-Tocopherol succinate (10μM)	19±2 ^b	26±3 ^b	32±3 ^b
+Mannitol (50mM)	16±2 ^b	24±2 ^b	36±4 ^b
+Dimethyl sulfoxide (150μM)	26±3 ^b	31±4 ^b	40±4 ^b
+Carnitine (2mM)	29±2 ^b	42±4 ^b	53±5 ^b
+Glucose (10mM)	30±1 ^b	41±3 ^b	54±4 ^b
+Trifluoprazine (15μM)	28±3 ^b	39±3 ^b	۵۳±6 ^b
+Phenylimidazole (300μM)	26±2 ^b	42±4 ^b	45±5 ^b
+Diphenylene iodonium chloride (0.05 mM)	27±3 ^b	39±4 ^b	48±4 ^b
+ 3-Methyladenine (5mM)	34±3	49±5	63±6
+Chloroquine (100μM)	31±4	53±4	71±4
+Monensin (10μM)	33±4	47±5	64±5
+n-Bromoheptane	38±4	57±6	75±4

Hepatocytes (10⁶cells/ml) were incubated in Krebs–Henseleit buffer pH 7.4 at 37°C for 2,3 &4 hours following the addition of EC50_{3h} of Algal extract. The dinoflagellate concentration equivalent to algal extract considers that the extract at 100% was obtained from a lysate of *C. polykricoides*. Cytotoxicity was determined as the percentage of cells that take up trypan blue (Pourahmad and O’Brien, 2000).

Values are expressed as mean±SD of three separate experiments (n=3).

a Significant difference in comparison with control hepatocytes ($P < 0.05$).

b Significant difference in comparison with Algal extract (treated hepatocytes ($P < 0.05$).

Table 2- Effect of antioxidant, ROS scavengers, MPT pore sealing agents, lysosomotropic agents, and CYT P450 inhibitors on Algal extract ROS formation in hepatocytes..

Addition	DCF				
	Incubation time				
	30 min	60 min	90 min	120 min	180 min
Control rat hepatocytes	3570±135	3923±143	3985±127	4033±79	4167±120
Algal extract (Eq. 240cells/ml)	6232±156 ^a	6892±170 ^a	6809±245 ^a	6754±213 ^a	5678±155 ^a
+ α -Tocopherol succinate (10 μ M)	4534±102 ^b	4707±196 ^b	4768±176 ^b	4474±450 ^b	4358±56 ^b
+Mannitol (50mM)	4345±207 ^b	4455±55 ^b	4734±110 ^b	3464±202 ^b	4324±166 ^b
+Dimethyl sulfoxide (150 μ M)	4621±86 ^b	4744±108 ^b	4932±98 ^b	4436±175 ^b	4394±84 ^b
+Carnitine (2mM)	4693±176 ^b	4541±91 ^b	4786±128 ^b	3957±131 ^b	4148±87 ^b
+Glucose (10mM)	3890±430 ^b	4346±305 ^b	3992±149 ^b	4275±570 ^b	3829±75 ^b
+Trifluoprazine (15 μ M)	3822±179 ^b	3876±152 ^b	4602±140 ^b	4234±185 ^b	4324±402 ^b
+Phenylimidazole (300 μ M)	3876±421 ^b	4243±312 ^b	3876±176 ^b	4324±462 ^b	3834±102 ^b
+Diphenylene iodonium chloride (0.05 mM)	3745±187 ^b	3972±125 ^b	4592±137 ^b	4173±207 ^b	4427±402 ^b
+ 3-Methyladenine (5mM)	6023±178	6789±192	6792±281	6746±235	5701±183
+Chloroquine (100 μ M)	6389±165	6981±184	6782±204	6862±248	5871±215
+Monensin (10 μ M)	5971±189	6822±209	6902±198	6643±258	5692±202
+n-Bromoheptane	6245±570	7365±147	6893±151	5973±212 ^b	4211±41 ^b

Hepatocytes (10⁶cells/ml) were incubated in Krebs–Henseleit buffer pH 7.4 at 37°C for 3.0 h following the addition of EC50_{3h} of Algal extract. The dinoflagellate concentration equivalent to algal extract considers that the extract at 100% was obtained from a lysate of *C. polykricoides*. DCF formation was expressed as fluorescent intensity units (pourahmad et al., 2009).

Values are expressed as mean±SD of three separate experiments (n=3).

a Significant difference in comparison with control hepatocytes ($P < 0.05$).

b Significant difference in comparison with Algal extract (treated hepatocytes ($P < 0.05$).

Table 3- Effect of lipid antioxidant, ROS scavengers, MPT pore sealing agents, lysosomotropic agents, and CYT P450 inhibitors on Algal extract induced Mitochondrial membrane potential decrease in hepatocytes.

Addition	% ΔΨ _m				
	Incubation time				
	30 min	60 min	90 min	120 min	180 min
Control rat hepatocytes	0	2±1	2±2	4±1	5±1
Algal extract (Eq. 240cells/ml)	13±1 ^a	19±2 ^a	16±2 ^a	20±2 ^a	28±3 ^a
+α-Tocopherol succinate (10μM)	6±1 ^b	5±1 ^b	10±2 ^b	12±2 ^b	12±1 ^b
+Mannitol (50mM)	5±1 ^b	8±1 ^b	6±2 ^b	6±1 ^b	7±1 ^b
+Dimethyl sulfoxide (150μM)	5±1 ^b	8±1 ^b	6±2 ^b	6±1 ^b	7±1 ^b
+Carnitine (2mM)	2±1 ^b	8±1 ^b	10±2 ^b	12±2 ^b	15±1 ^b
+Glucose (10mM)	7±1 ^b	8±1 ^b	11±2 ^b	13±1 ^b	16±1 ^b
+Trifluoprazine (15μM)	6±1 ^b	7±1 ^b	9±2 ^b	13±1 ^b	14±1 ^b
+Phenylimidazole (300μM)	3±1 ^b	3±1 ^b	5±1 ^b	4±2 ^b	6±1 ^b
+Diphenylene iodonium chloride (0.05 mM)	2±1 ^b	4±1 ^b	7±1 ^b	11±2 ^b	10±1 ^b
+ 3-Methyladenine (5mM)	11±2	16±2	18±2	19±1	24±2
+Chloroquine (100μM)	14±1	17±1	18±2	21±3	27±2
+Monensin (10μM)	12±1	15±2	17±2	18±1	22±3
+n-Bromoheptane	12±1	18±1	20±2	29±2 ^b	34±2 ^b

Hepatocytes (10⁶cells/ml) were incubated in Krebs–Henseleit buffer pH 7.4 at 37°C for 3.0 h following the addition of EC50_{3h} of Algal extract. The dinoflagellate concentration equivalent to algal extract considers that the extract at 100% was obtained from a lysate of *C. polykricoides*. Mitochondrial membrane potential was determined as the difference in mitochondrial uptake of the rhodamine 123 between control and treated cells and expressed as fluorescence intensity unit (Andersson et al., 1987).

Values are expressed as mean±SD of three separate experiments (n=3).

a Significant difference in comparison with control hepatocytes ($P < 0.05$).

b Significant difference in comparison with Algal extract (treated hepatocytes ($P < 0.05$).

Table 4- Comparison between Control hepatocytes and Algal extract induced Lysosomal membrane integrity changes.

Addition	% Acridine orange redistribution				
	Incubation time				
	30 min	60 min	90 min	120 min	180 min
Control rat hepatocytes	0	2±1	4±1	6±1	10±1
Algal extract (Eq. 240cells/ml)	1±1	2±1	5±1	7±2	9±2

Hepatocytes (10^6 cells/ml) were incubated in Krebs–Henseleit buffer pH 7.4 at 37°C for 3.0 h following the addition of $EC_{50_{3h}}$ of Algal extract. The dinoflagellate concentration equivalent to algal extract considers that the extract at 100% was obtained from a lysate of *C. polykricoides*. Lysosomal membrane damage was determined as intensity unit of diffuse cytosolic green fluorescence induced by acridine orange following the release from lysosomes (adapted from Brunk et al., 1995).

Values are expressed as mean±SD of three separate experiments (n=3).
a Significant difference in comparison with control hepatocytes ($P < 0.05$).

Table 5- Effect of lipid antioxidant, ROS scavengers, MPT pore sealing agents, lysosomotropic agents, and CYT P450 inhibitors on Algal extract induced Caspase-3 activity changes in hepatocytes.

Addition	Caspase-3 activity (μ M pNA/ml/min)
Control rat hepatocytes	43±4
Algal extract (Eq. 240cells/ml)	128±6 ^a
+ α -Tocopherol succinate (10 μ M)	46±3 ^b
+Mannitol (50mM)	55±3 ^b
+Dimethyl sulfoxide (150 μ M)	62±3 ^b
+Carnitine (2mM)	76±3 ^b
+Glucose (10mM)	65±4 ^b
+Trifluoprazine (15 μ M)	77±4 ^b
+Phenylimidazole (300 μ M)	69±3 ^b
+Diphenylene iodonium chloride (0.05 mM)	74±4 ^b
+ 3-Methyladenine (5mM)	118±5
+Chloroquine (100 μ M)	130±4
+Monensin (10 μ M)	126±4
+n-Bromoheptane	143±6 ^b

Hepatocytes (10^6 cells/ml) were incubated in Krebs–Henseleit buffer pH 7.4 at 37°C for 90 min following the addition of $EC_{50_{3h}}$ of Algal extract. The dinoflagellate concentration equivalent to algal extract considers that the extract at 100% was obtained from a lysate of *c.polykricoides*. Caspase-3 activity was determined by Sigma-Aldrich kit (Sakahira et al;1998).The kit determines produced pNA that is released from the interaction of caspase-3 and AC-DEVD-pNA (peptide substrate).

Values are expressed as mean±SD of three separate experiments (n=3).
a Significant difference in comparison with control hepatocytes ($P < 0.05$).
b Significant difference in comparison with Algal extract (treated hepatocytes ($P < 0.05$)).

Table 6- Effect of lipid antioxidant, ROS scavengers, MPT pore sealing agents, lysosomotropic agents, and CYT P450 inhibitors on Algal extract induced glutathione depletion in hepatocytes.

Addition	Intracellular GSH(μ M) 3h	Extra cellular GSSG(μ M) 3h
Control rat hepatocytes	57 \pm 4	5.4 \pm 0.7
Algal extract (Eq. 240cells/ml)	15 \pm 3 ^a	12 \pm 1.6 ^a
+ α -Tocopherol succinate (10 μ M)	35 \pm 4 ^b	4.3 \pm 0.5 ^b
+Mannitol (50mM)	29 \pm 3 ^b	5.2 \pm 0.4 ^b
+Dimethyl sulfoxide (150 μ M)	27 \pm 3 ^b	5.5 \pm 0.6 ^b
+Carnitine (2mM)	25 \pm 3 ^b	4.5 \pm 0.7 ^b
+Glucose (10mM)	32 \pm 5 ^b	3.8 \pm 0.4 ^b
+Trifluoprazine (15 μ M)	30 \pm 3 ^b	5.6 \pm 0.7 ^b
+Phenylimidazole (300 μ M)	28 \pm 4 ^b	4.7 \pm 0.5 ^b
+Diphenylene iodonium chloride (0.05 mM)	36 \pm 5 ^b	6.4 \pm 0.6 ^b
+ 3-Methyladenine (5mM)	17 \pm 3	9 \pm 0.6
+Chloroquine (100 μ M)	14 \pm 4	11.2 \pm 0.8
+Monensin (10 μ M)	18 \pm 3	9.8 \pm 1
+n-Bromoheptane	9 \pm 3 ^b	16 \pm 1.2 ^b

Hepatocytes (10⁶cells/ml) were incubated in Krebs–Henseleit buffer pH 7.4 at 37°C for 90 min following the addition of EC50_{3h} of Algal extract. The dinoflagellate concentration equivalent to algal extract considers that the extract at 100% was obtained from a lysate of *c.polykricoides*. Intracellular GSH and extra cellular GSSG were flurimetrically determined as described by Hissin and Hilf, 1978.

Values are expressed as mean \pm SD of three separate experiments (n=3).

a Significant difference in comparison with control hepatocytes ($P < 0.05$).

b Significant difference in comparison with Algal extract (treated hepatocytes ($P < 0.05$).

Table 7- Comparison between Control hepatocytes and Algal growth media induced cytotoxicity

Addition	Cytotoxicity (%)	Cytotoxicity (%)	Cytotoxicity (%)
	2h	3h	4h
Control rat hepatocytes	18±2	21±3	25±3
+Algal growth media	20±4	25±4	28±4

Hepatocytes (10^6 cells/ml) were incubated in Krebs–Henseleit buffer pH 7.4 at 37°C for 2,3 &4 hours following the addition of Algal growth media. Cytotoxicity was determined as the percentage of cells that take up trypan blue (Pourahmad and O'Brien, 2000).

Values are expressed as mean±SD of three separate experiments (n=3).

a Significant difference in comparison with control hepatocytes ($P < 0.05$).

Table 8- Comparison between Control hepatocytes and Algal growth media induced Cytotoxicity and ROS formation

Addition	DCF				
	Incubation time				
	30 min	60 min	90 min	120 min	180 min
Control rat hepatocytes	3570±135	3923±143	3985±127	4033±79	4167±120
+Algal growth media	3729±145	4021±161	4208±193	4246±314	4092±164

Hepatocytes (10^6 cells/ml) were incubated in Krebs–Henseleit buffer pH 7.4 at 37°C for 4.0 h following the addition of Algal growth media. Cytotoxicity was determined as the percentage of cells that take up trypan blue (Pourahmad and O'Brien, 2000). DCF formation was expressed as fluorescent intensity units (Shen et al., 1996). TBARS formation was expressed as nM concentrations (Smith et al., 1982).

Values are expressed as mean±SD of three separate experiments (n=3).

a Significant difference in comparison with control hepatocytes ($P < 0.05$).

Table 9- Effect of antioxidant, ROS scavengers, MPT pore sealing agents, lysosomotropic agents and CYT P450 inhibitors on Algal extract induced trout hepatocytes cytotoxicity

Addition	Cytotoxicity (%) 2h
Control trout hepatocytes	15±2
Algal extract (Eq. 2 cells/ml)	54±5 ^a
+ α -Tocopherol succinate (10 μ M)	17±3 ^b
+Mannitol (50mM)	19±4 ^b
+Dimethyl sulfoxide (150 μ M)	26±4 ^b
+Carnitine (2mM)	19±3 ^b
+Glucose (10mM)	21±3 ^b
+Trifluoprazine (15 μ M)	24±4 ^b
+Phenylimidazole (300 μ M)	34±5 ^b
+Diphenylene iodonium chloride (0.05 mM)	31±4 ^b
+ 3-Methyladenine (5mM)	30±3 ^b
+Chloroquine (100 μ M)	33±4 ^b
+Monensin (10 μ M)	27±3 ^b
+n-Bromoheptane	58±5

Hepatocytes (10⁶cells/ml) were incubated in Krebs–Henseleit buffer pH 7.4 at 37°C for 2 hours following the addition of EC50_{2h} of Algal extract. The dinoflagellate concentration equivalent to algal extract considers that the extract at 100% was obtained from a lysate of *C. polykricoides*. Cytotoxicity was determined as the percentage of cells that take up trypan blue (Pourahmad and O'Brien, 2000).

Values are expressed as mean±SD of three separate experiments (n=3).

a Significant difference in comparison with control hepatocytes ($P < 0.05$).

b Significant difference in comparison with Algal extract (treated hepatocytes ($P < 0.05$).

Table 10- Effect of antioxidant, ROS scavengers, MPT pore sealing agents, lysosomotropic agents, and CYT P450 inhibitors on Algal extract ROS formation in hepatocyte.

Addition	DCF		
	Incubation time		
	15 min	30 min	60 min
Control trout hepatocytes	58±5	62±4	66±6
Algal extract (Eq. 2 cells/ml)	112±10 ^a	135±7 ^a	129±6 ^a
+α-Tocopherol succinate (10μM)	64±6 ^b	67±7 ^b	68±9 ^b
+Mannitol (50mM)	56±5 ^b	59±4 ^b	67±8 ^b
+Dimethyl sulfoxide (150μM)	62±6 ^b	64±8 ^b	71±7 ^b
+Carnitine (2mM)	69±6 ^b	71±9 ^b	78±8 ^b
+Glucose (10mM)	59±5 ^b	66±5 ^b	69±9 ^b
+Trifluoprazine (15μM)	56±7 ^b	64±6 ^b	68±7 ^b
+Phenylimidazole (300μM)	63±4 ^b	71±7 ^b	75±8 ^b
+Diphenylene iodonium chloride (0.05 mM)	65±7 ^b	72±5 ^b	82±7 ^b
+ 3-Methyladenine (5mM)	57±6 ^b	67±7 ^b	72±8 ^b
+Chloroquine (100μM)	61±5 ^b	69±5 ^b	79±9 ^b
+Monensin (10μM)	59±6 ^b	68±4 ^b	74±5 ^b
+n-Bromoheptane	110±7	154±12 ^b	138±7 ^b

Hepatocytes (10⁶ cells/ml) were incubated in Krebs–Henseleit buffer pH 7.4 at 37°C for 1.0 h following the addition of EC50_{2h} of Algal extract. The dinoflagellate concentration equivalent to algal extract considers that the extract at 100% was obtained from a lysate of *C. polykricoides*. DCF formation was expressed as fluorescent intensity units (pourahmad et al., 2009).

Values are expressed as mean±SD of three separate experiments (n=3).

a Significant difference in comparison with control hepatocytes ($P < 0.05$).

b Significant difference in comparison with Algal extract (treated hepatocytes ($P < 0.05$).

Table 11- Effect of lipid antioxidant, ROS scavengers, MPT pore sealing agents, lysosomotropic agents, and CYT P450 inhibitors on Algal extract induced Mitochondrial membrane potential decrease in hepatocytes.

Addition	% $\Delta\Psi_m$		
	Incubation time		
	15 min	30 min	60 min
Control trout hepatocytes	0	4±2	7±3
Algal extract (Eq. 2 cells/ml)	43±4 ^a	59±4 ^a	66±5 ^a
+ α -Tocopherol succinate (10 μ M)	2±1 ^b	5±2 ^b	9±2 ^b
+Mannitol (50mM)	5±1 ^b	10±2 ^b	16±4 ^b
+Dimethyl sulfoxide (150 μ M)	4±2 ^b	9±3 ^b	15±2 ^b
+Carnitine (2mM)	2±1 ^b	5±1 ^b	8±2 ^b
+Glucose (10mM)	4±2 ^b	9±2 ^b	9±3 ^b
+Trifluoprazine (15 μ M)	3±1 ^b	6±3 ^b	11±2 ^b
+Phenylimidazole (300 μ M)	2±1 ^b	5±2 ^b	8±2 ^b
+Diphenylene iodonium chloride (0.05 mM)	6±1 ^b	10±4 ^b	15±2 ^b
+ 3-Methyladenine (5mM)	3±2 ^b	6±2 ^b	13±2 ^b
+Chloroquine (100 μ M)	4±2 ^b	8±2 ^b	15±3 ^b
+Monensin (10 μ M)	2±1 ^b	11±3 ^b	10±2 ^b
+n-Bromoheptane	46±5	62±4	76±4 ^b

Hepatocytes (10⁶cells/ml) were incubated in Krebs–Henseleit buffer pH 7.4 at 37°C for 1.0 h following the addition of EC50_{2h} of Algal extract. The dinoflagellate concentration equivalent to algal extract considers that the extract at 100% was obtained from a lysate of *C. polykricoides*. Mitochondrial membrane potential was determined as the difference in mitochondrial uptake of the rhodamine 123 between control and treated cells and expressed as fluorescence intensity unit (Andersson et al., 1987).

Values are expressed as mean±SD of three separate experiments (n=3).

a Significant difference in comparison with control hepatocytes ($P < 0.05$).

b Significant difference in comparison with Algal extract (treated hepatocytes ($P < 0.05$).

Table 12- Comparison between Control rat hepatocytes and Algal extract induced Lysosomal membrane integrity changes in hepatocytes.

Addition	% Acridine orange redistribution		
	Incubation time		
	15 min	30 min	60 min
Control trout hepatocytes	0	3±1	3±1
Algal extract (Eq. 2 cells/ml)	42±3 ^a	67±5 ^a	69±4 ^a
+α-Tocopherol succinate (10μM)	2±0.5 ^b	3±1 ^b	2±2 ^b
+Mannitol (50mM)	2±1 ^b	7±1 ^b	14±2 ^b
+Dimethyl sulfoxide (150μM)	3±0.7 ^b	6±1 ^b	15±2 ^b
+Carnitine (2mM)	3±1 ^b	9±2 ^b	17±3 ^b
+Glucose (10mM)	4±2 ^b	7±2 ^b	13±1 ^b
+Trifluoprazine (15μM)	2±1 ^b	8±1 ^b	19±3 ^b
+Phenylimidazole (300μM)	3±1 ^b	11±2 ^b	17±2 ^b
+Diphenylene iodonium chloride (0.05 mM)	7±2 ^b	9±2 ^b	12±1 ^b
+ 3-Methyladenine (5mM)	2±1 ^b	4±1 ^b	13±3 ^b
+Chloroquine (100μM)	3±1 ^b	5±2 ^b	16±2 ^b
+Monensin (10μM)	3±1 ^b	5±2 ^b	11±1 ^b
+n-Bromoheptane	40±3	59±4	79±3 ^b

Hepatocytes (10⁶cells/ml) were incubated in Krebs–Henseleit buffer pH 7.4 at 37°C for 1.0 h following the addition of EC50_{2h} of Algal extract. The dinoflagellate concentration equivalent to algal extract considers that the extract at 100% was obtained from a lysate of *C. polykricoides*. Lysosomal membrane damage was determined as intensity unit of diffuse cytosolic green fluorescence induced by acridine orange following the release from lysosomes (adapted from Brunk et al., 1995).

Values are expressed as mean±SD of three separate experiments (n=3).

a Significant difference in comparison with control hepatocytes ($P < 0.05$).

b Significant difference in comparison with Algal extract (treated hepatocytes ($P < 0.05$).

Table 13- Effect of lipid antioxidant, ROS scavengers, MPT pore sealing agents, lysosomotropic agents, and CYT P450 inhibitors on Algal extract induced Caspase-3 activity changes in hepatocytes.

Addition	Caspase-3 activity ($\mu\text{M pNA/ml/min}$)
Control trout hepatocytes	51 \pm 3
Algal extract (Eq. 2 cells/ml)	142 \pm 5 ^a
+ α -Tocopherol succinate (10 μM)	59 \pm 3 ^b
+Mannitol (50mM)	53 \pm 3 ^b
+Dimethyl sulfoxide (150 μM)	60 \pm 3 ^b
+Carnitine (2mM)	56 \pm 2 ^b
+Glucose (10mM)	63 \pm 3 ^b
+Trifluoprazine (15 μM)	69 \pm 3 ^b
+Phenylimidazole (300 μM)	57 \pm 4 ^b
+Diphenylene iodonium chloride (0.05 mM)	65 \pm 2 ^b
+ 3-Methyladenine (5mM)	68 \pm 5 ^b
+Chloroquine (100 μM)	79 \pm 3 ^b
+Monensin (10 μM)	72 \pm 4 ^b
+n-Bromoheptane	137 \pm 6 ^b

Hepatocytes (10⁶cells/ml) were incubated in Krebs–Henseleit buffer pH 7.4 at 37°C for 60 min following the addition of EC50_{2h} of Algal extract. The dinoflagellate concentration equivalent to algal extract considers that the extract at 100% was obtained from a lysate of *c.polykricoides*. Caspase-3 activity was determined by Sigma-Aldrich kit (Sakahira et al;1998).The kit determines produced pNA that is released from the interaction of caspase-3 and AC-DEVD-pNA (peptide substrate).

Values are expressed as mean \pm SD of three separate experiments (n=3).

a Significant difference in comparison with control hepatocytes ($P < 0.05$).

b Significant difference in comparison with Algal extract (treated hepatocytes ($P < 0.05$).

Table 14- Effect of lipid antioxidant, ROS scavengers, MPT pore sealing agents, lysosomotropic agents, and CYT P450 inhibitors on Algal extract induced glutathione depletion in hepatocytes.

Addition	Intracellular GSH(μ M) 2h	Extra cellular GSSG(μ M) 2h
Control trout hepatocytes	59 \pm 4	7.3 \pm 0.5
Algal extract (Eq. 2 cells/ml)	9 \pm 2 ^a	15 \pm 2.1 ^a
+ α -Tocopherol succinate (10 μ M)	42 \pm 3 ^b	5 \pm 0.9 ^b
+Mannitol (50mM)	35 \pm 4 ^b	5.2 \pm 1 ^b
+Dimethyl sulfoxide (150 μ M)	36 \pm 2 ^b	3.5 \pm 0.7 ^b
+Carnitine (2mM)	38 \pm 3 ^b	4.6 \pm 1.2 ^b
+Glucose (10mM)	37 \pm 4 ^b	3.9 \pm 0.8 ^b
+Trifluoprazine (15 μ M)	32 \pm 2 ^b	5.5 \pm 1 ^b
+Phenylimidazole (300 μ M)	28 \pm 2 ^b	5 \pm 1.2 ^b
+Diphenylene iodonium chloride (0.05 mM)	34 \pm 4 ^b	4.6 \pm 0.7 ^b
+ 3-Methyladenine (5mM)	27 \pm 4 ^b	5.8 \pm 1.5 ^b
+Chloroquine (100 μ M)	31 \pm 3 ^b	8.1 \pm 1.1 ^b
+Monensin (10 μ M)	26 \pm 4 ^b	7.5 \pm 1.4 ^b
+n-Bromoheptane	7 \pm 2	19.3 \pm 1.2 ^b

Hepatocytes (10⁶ cells/ml) were incubated in Krebs–Henseleit buffer pH 7.4 at 37°C for 2 hours following the addition of EC50_{2h} of Algal extract. The dinoflagellate concentration equivalent to algal extract considered that the extract at 100% was obtained from a lysate of *c.polykricoides*. Intracellular GSH and extra cellular GSSG were fluorimetrically determined as described by Hissin and Hilf, 1978.

Values are expressed as mean \pm SD of three separate experiments (n=3).

a Significant difference in comparison with control hepatocytes ($P < 0.05$).

b Significant difference in comparison with Algal extract (treated hepatocytes ($P < 0.05$).

Table 15- Comparison between Control hepatocytes and Algal growth media induced cytotoxicity.

Addition	Cytotoxicity (%) 2h
Control trout hepatocytes	15±2
+Algal growth media	19±4

Hepatocytes (10^6 cells/ml) were incubated in Krebs–Henseleit buffer pH 7.4 at 37°C for 2 hours following the addition of Algal growth media. Cytotoxicity was determined as the percentage of cells that take up trypan blue (Pourahmad and O'Brien, 2000).

Values are expressed as mean±SD of three separate experiments (n=3).

a Significant difference in comparison with control hepatocytes ($P < 0.05$).

Table 16- Comparison between Control hepatocytes and Algal growth media induced Cytotoxicity, ROS formation and lipid peroxidation.

Addition	DCF		
	Incubation time		
	15 min	30 min	60 min
Control trout hepatocytes	58±5	62±4	66±6
+Algal growth media	54±5	64±3	63±4

Hepatocytes (10^6 cells/ml) were incubated in Krebs–Henseleit buffer pH 7.4 at 37°C for 3.0 h following the addition of Algal growth media. Cytotoxicity was determined as the percentage of cells that take up trypan blue (Pourahmad and O'Brien, 2000). DCF formation was expressed as fluorescent intensity units (Shen et al., 1996). TBARS formation was expressed as nM concentrations (Smith et al., 1982).

Values are expressed as mean±SD of three separate experiments (n=3).

a Significant difference in comparison with control hepatocytes ($P < 0.05$).

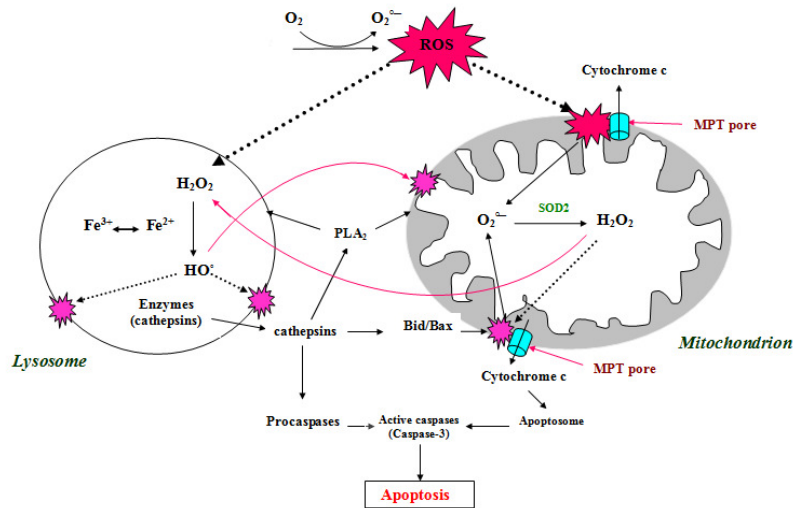


Figure 1- Proposed mechanism for *C. polykricoides* induced hepatocyte toxicity in trout hepatocytes- Bid and Bax- two pro-apoptotic proteins, MPT pore- mitochondrial permeability transition pore, PLA₂- phospholipase A₂, ROS- reactive oxygen species, SOD2- mitochondrial superoxide dismutase-2.

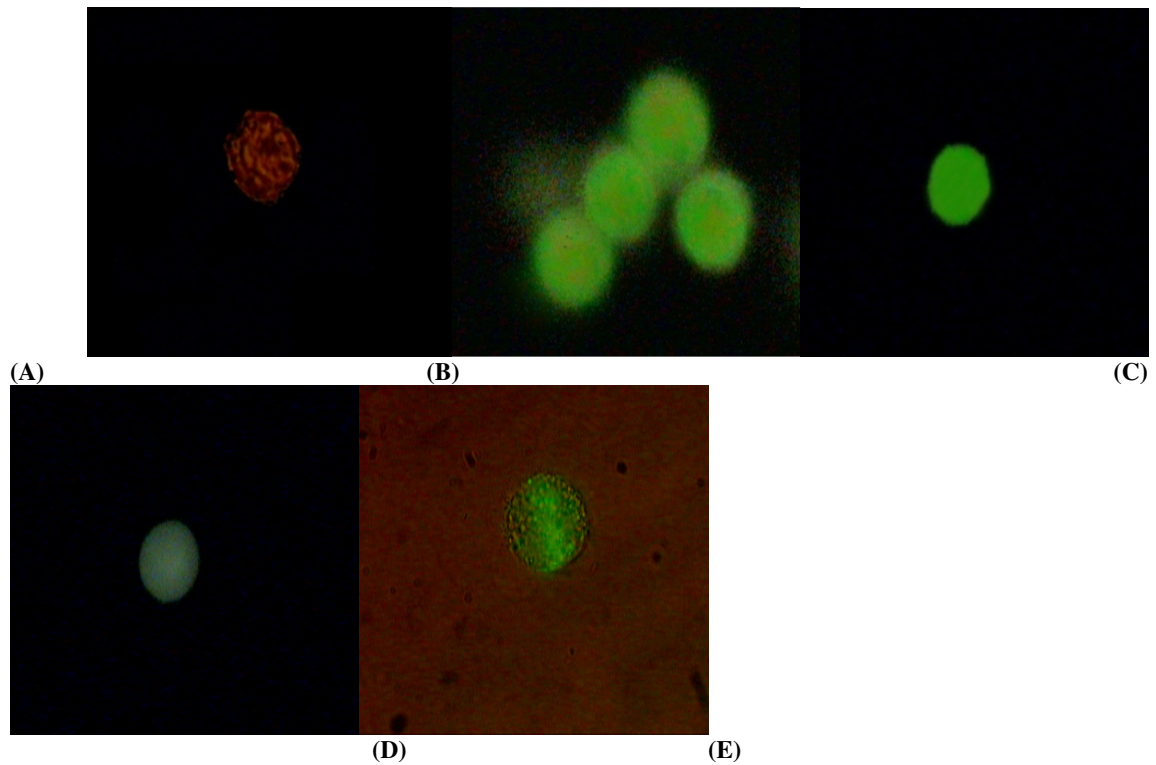


Figure 2- Apoptosis phenotype in rat and trout hepatocytes following the exposure of algal extract detected by AnnCy3. 6-CFDA is a non-fluorescent compound and when enters a live viable cell (control cell), it is hydrolyzed and converted to a highly fluorescent compound 6-CF (green fluorescence) that remains in the cytoplasm (photograph A: rat hepatocytes, D: trout hepatocytes). After the apoptosis initiated, the membrane PS translocated from the inner leaflet of the plasma membrane to the cell surface. There, PS can be easily identified by staining with a red fluorescent conjugate of Annexin V. Hepatocytes in the early stage of apoptosis will be dyed with both AnnCy3 (red) spots within 6-CF (green) background. Photograph B (rat hepatocytes) and E (trout hepatocytes) show apoptosis phenotype in hepatocytes exposed to algal extract. Necrotic cells will only be labeled with AnnCy3 (red). Photograph C shows a necrotic cell.

۴- بحث و نتیجه گیری

۴-۱- نتایج اثر جلبک بر سلول پستانداران (هپاتوسیت های رت)

به نظر می رسد که استرس اکسیداتیو یکی از مکانیزمهای مطرح سمیت کبدی ناشی از عصاره ی جلبک *Cochlodinium polykricoides* در هپاتوسیت های رت و ماهی می باشد. عصاره ی جلبک *Cochlodinium polykricoides* تولید ROS را در سلولهای رت و ماهی زیاد می کند (جدول ۲ و ۱۰). با توجه به اینکه عصاره جلبک *Cochlodinium polykricoides* بر طبق آزمایشات ما در دو گونه ی رت و ماهی یک ترکیب اکسیدایزر (تولید بالای رادیکال های فعال اکسیژن در سلول) است، انتی اکسیدان ها در حفاظت از سلول در برابر اثرات مخرب استرس اکسیداتیو ناشی از آن موثر می باشند (جداول ۱، ۲، ۹، ۱۰). در مطالعه ما سمیت عصاره جلبک *Cochlodinium polykricoides* توسط انتی اکسیدان (آلفا توکوفرول)، جاذب رادیکال آزاد (مانیتول، دی متیل سولفوکساید) و عوامل مسدود کننده MPT (کارنیتین، گلوکز و تری فلورپرازین) در دو گونه ی رت و ماهی پیشگیری شده، که نشان می دهد تشکیل رادیکالهای آزاد در سمیت عصاره ی جلبک *Cochlodinium polykricoides* نقش اساسی دارد (جداول ۱، ۲، ۹، ۱۰). شایان ذکر است که همه عوامل به کار رفته در آزمایش های ذکر شده به تنهایی در غلظتهای استفاده شده هیچ تأثیر سمیتی بر هپاتوسیت های رت و ماهی نداشت (داده ها نشان داده نشده اند).

نتایج ما نشان داد که در هپاتوسیت های ماهی، محافظت کنندگان غشای لیزوزومی (کلروکین، موننزین و ۳-متیل آدنین) اثر پیشگیری کننده ای در برابر اثرات سمی عصاره جلبک *Cochlodinium polykricoides* از جمله لیز شدن غشای هپاتوسیت و تولید رادیکالهای آزاد (ROS) را از خود نشان دادند (جدول ۹ و ۱۰) که حاکی از آن است که نشت غشای لیزوزوم می تواند سیتوتوکسیستی ناشی از استرس اکسیداتیو عصاره ی جلبک *Cochlodinium polykricoides* را در هپاتوسیت های ماهی تسریع و تشدید کند. از طرف دیگر نتایج ما نشان داد که در هپاتوسیت های رت، محافظت کنندگان غشای لیزوزومی (کلروکین، موننزین و ۳-متیل آدنین) هیچ گونه اثر معنی دار پیشگیری کننده ای در برابر اثرات سمی عصاره جلبک *Cochlodinium polykricoides* از خود نشان

ندادند (جدول ۱، ۲، ۳، ۴، ۵ و ۶). این یافته نشان می دهد که نشت غشای لیزوزوم نقشی در سیتوتوکسیستی ناشی از استرس اکسیداتیو عصاره ی جلبک *Cochlodinium polykricoides* در هپاتوسیت های رت ندارد.

ROS می تواند توسط مکانیزم های دیگر داخل سلول تولید شود. یکی از مسیرها، CYT P450 را درگیر می کند. CYT P450 یکی از القا کننده های قدرتمند استرس اکسیداتیو در سلولهای کبدی رت و ماهی است که از طریق تشکیل متابولیت های فعال بیولوژیک و الکتروفیل عمل می کند. نتایج ما نشان داد که در هپاتوسیت های ماهی، مهار کنندگان CYT P450 (فنیل ایمیدازول و دی فنیل یدونیوم کلراید) جلوی سمیت سلولی القا شده توسط عصاره ی جلبک *Cochlodinium polykricoides*، تولید رادیکالهای آزاد و آسیب غشای لیزوزوم را گرفتند (جدول ۹، ۱۰ و ۱۲). همچنین نتایج ما نشان داد که در هپاتوسیت های رت، مهار کنندگان CYT P450 (فنیل ایمیدازول و دی فنیل یدونیوم کلراید) جلوی سمیت سلولی القا شده توسط عصاره ی جلبک *Cochlodinium polykricoides* و تولید رادیکالهای آزاد را گرفتند (جدول ۱ و ۲). می توان پیشنهاد کرد که افزایش استرس اکسیداتیو، مرتبط با تشکیل متابولیت های فعال ناشی از عصاره ی جلبک *Cochlodinium polykricoides*، در دو گونه ی رت و ماهی توسط ایزو آنزیم های CYT P450 می باشد. براساس نتایج به دست آمده، عصاره ی جلبک در دو گونه ی رت و ماهی سمی اکسیدایزر است و باعث آسیب به غشای لیزوزوم در هپاتوسیت های ماهی می گردد (جدول ۱۲)، در حالی که این سم باعث آسیب به غشای لیزوزوم در هپاتوسیت های رت نمی گردد (جدول ۴).

در مطالعه ما در مورد هپاتوسیت های هر دو گونه ی رت و ماهی پتانسیل غشایی میتوکندری هپاتوسیت توسط عصاره ی جلبک کاهش پیدا کرده و توسط آنتی اکسیدان (آلفا توکوفرول)، جاذب رادیکال آزاد (مانیتول، دی متیل سولفو کساید) و عوامل مسدود کننده MPT (کارنیتین، گلوکز و تری فلورپرازین) پیشگیری شده است که نشان می دهد آسیب غشای میتوکندری در نتیجه تشکیل رادیکالهای آزاد بوده است (جدول ۳ و ۱۱). $\Delta\Psi_m$ توسط پمپ کردن مداوم پروتون از ماتریکس سرتاسر غشای داخلی میتوکندری به سمت فضای ما بین غشایی برقرار می باشد. چون این پروتونها در نوبت خود جهت تحریک ATP synthase استفاده می شوند، همواره سقوط $\Delta\Psi_m$ منجر به کاهش میزان ATP می شود. فقدان ATP میتوکندریایی منجر به اسیدوز داخل سلولی و آسیب اسموتیک که باعث لیز شدن غشای پلاسمایی می شود.

آسیب میتوکندریایی القا شده توسط رادیکالهای آزاد می تواند گسترش یابد، سپس هیدروژن پروکساید ناشی از میتوکندری به داخل لیزوزومها منتشر می شود و یک واکنش از تیپ فنتون (Haber—Weiss) که توسط-intra lysosomal-active iron کاتالیز می شود صورت گیرد. این واکنش، رادیکالهای هیدروکسیل خیلی فعال را تولید می کند که می تواند پیوستگی غشای لیزوزوم را ناپایدار کند. در نتیجه پروتئازهای هضم کننده رادیکالهای آزاد می توانستند داخل سیتوزول آزاد شوند.

نتایج ما نشان داد که آسیب هپاتوسیت های ماهی القا شده توسط عصاره ی جلبک شامل آسیب غشای لیزوزومی (جدول ۱۲) و آزاد شدن آنزیمهای پروتئولیتیک می شود. یکی از این آنزیمهای پروتئولیتیک کاتپسین (B,L,D) است که باعث باز شدن روزنه MPT و باعث آزاد شدن سیتوکروم C و آغاز جریان پایین رویی شود که در نهایت منجر به فعال شدن کاسپاز-۳ و آپوپتوز می شود.

ROS همچنین می تواند توسط مکانیزم های دیگر داخل سلول تولید شود. یکی از مسیرها، CYP450 را درگیر می کند. CYP2E1 یکی از القا کننده های قدرتمند استرس اکسیداتیو از طریق تشکیل متابولیت های فعال بیولوژیک و الکتروفیل در سلولهای کبدی می باشد.

نتایج ما نشان داد که مهار کننده CYP2E1 (فنیل ایمیدازول) جلوی سمیت سلولی القا شده توسط عصاره ی جلبک، تولید رادیکالهای آزاد، آسیب غشای میتوکندری، آسیب غشای لیزوزوم و فعالیت کاسپاز-۳ را در هپاتوسیت های ماهی گرفت (جداول ۹، ۱۰، ۱۱، ۱۲ و ۱۳). برای این منظور، می توان پیشنهاد شود که افزایش استرس اکسیداتیو مرتبط با تشکیل متابولیت های فعال عصاره ی جلبک توسط ایزو آنزیم CYP2E1 می باشد.

همچنین نتایج ما نشان داد که تخلیه گلوکوتایون هپاتوسیت ها (n - بروموهپتان) در هپاتوسیت های ماهی باعث افزایش سمیت سلولی القا شده توسط عصاره ی جلبک، تولید رادیکالهای آزاد ، آسیب غشای میتوکندری، آسیب غشای لیزوزوم و فعالیت کاسپاز-۳ شد (جداول ۹، ۱۰، ۱۱، ۱۲ و ۱۳). همچنین نتایج ما نشان داد که تخلیه گلوکوتایون هپاتوسیت ها (n - بروموهپتان) در هپاتوسیت های رت سمیت سلولی القا شده توسط عصاره ی جلبک، تولید رادیکالهای آزاد ، آسیب غشای میتوکندری و فعالیت کاسپاز-۳ را افزایش داد (جداول ۱، ۲، ۳، ۴، ۵). بنابراین می توان استنباط نمود که در هر دو گونه ی رت و ماهی، در استرس اکسیداتیو و سمیت سلولی

مرتبط با فعال سازی متابولیک عصاره ی جلبک علاوه بر نقش القائی ایزو آنزیم CYP2E1، گلوکاتیون نیز با عملکرد مهاری دخیل می باشد.

در هپاتوسیت های ماهی مهار کننده های آندوسیتوز لیزوزومی یا همان غیر فعال کنندگان لیزوزومی (کلروکین، مونزین و ۳-متیل آدنین) از آسیب غشای میتوکندری پیشگیری کرد (جداول ۱۱). به علاوه، عوامل مسدود کننده MPT جلوی آسیب غشای لیزوزوم را گرفت (جدول ۱۲). بنابراین، پیشنهاد می شود که یک ارتباط متقاطع بین آسیبهای میتوکندریایی و لیزوزومی در تشدید سمیت کبدی عصاره ی جلبک در ماهی وجود دارد (شکل ۱).

عصاره ی جلبک *Cochlodinium polykricoides* آپوپتوز سلولی در هپاتوسیت های دو گونه ی رت و ماهی را زیاد کرده که این مساله با اندازه گیری فعالیت مدیاتور نهایی آپوپتوز یعنی کاسپاز-۳ مشخص گردید (جدول ۵ و ۱۳). در هپاتوسیت های ماهی، افزایش فعالیت کاسپاز-۳، توسط انتی اکسیدان (آلفا توکوفرول)، جاذب رادیکال آزاد (مانیتول، دی متیل سولفوکساید)، عوامل مسدود کننده MPT (کارنیتین، گلوکز و تری فلورازین)، غیر فعال کنندگان لیزوزومی (کلروکین، مونزین و ۳-متیل آدنین) و مهار کنندگان CYT P450 (فنیل ایمیدازول و دی فنیل یدونیوم کلراید) مهار گردید (جدول ۱۳). بررسی های انجام گرفته توسط میکروسکوپ فلورسانس نیز بروز آپوپتوز را اثبات کرد (شکل ۲).

در هر دو گونه ی رت و ماهی تمامی تست هایی که بر روی عصاره ی جلبک انجام شد، بر روی محیط رشد جلبک در غلظت های مختلف از جمله حداکثر غلظت ممکن محیط رشد هم صورت گرفت که در رابطه با کلیه ی مارکرهای سمیتی اعم از سیتوتوکسیسیته، تولید رادیکالهای آزاد، آسیب غشای میتوکندری، آسیب غشای لیزوزوم و فعالیت کاسپاز-۳ هیچ اختلاف معنی داری در مقایسه با سلول های کنترل مشاهده نشد (جداول ۷، ۸، ۱۵ و ۱۶. مابقی داده ها نشان داده نشده اند). با توجه به این داده ها با اطمینان می توان بیان کرد که جلبک *Cochlodinium polykricoides* جزه سمی را وارد محیط نمی کند و جزء سمی در داخل خود جلبک باقی می ماند.

نتایج ما نشان داده که در هپاتوسیت های ماهی و رت، عصاره ی جلبک با تولید رادیکالهای آزاد، لیز غشای هپاتوسیت، کاهش پتانسیل غشایی میتوکندری، تخلیه گلوکاتیون و فعال کردن کاسپاز-۳ سمیت را القا می کند که این همه با هم می تواند به مرگ سلولی و در نهایت آسیب کبدی منجر شود. تفاوت اصلی در سمیت در دو

گونه نقش آسیب لیزوزومی در سمیت ایجاد شده در گونه ی ماهی است، در حالی که آسیب لیزوزومی نقشی در سمیت جلبک *Cochlodinium polykricoides* در گونه ی رت ندارد.

از طرف دیگر با مقایسه EC_{50} در دو گونه به راحتی میتوان به این نتیجه رسید که اثر سمی عصاره ی جلبک *Cochlodinium polykricoides* بر روی هپاتوسیت های ماهی حداقل ۱۲۰ برابر بیشتر از اثر سمی آن بر روی هپاتوسیت رت است.

منابع

1. Berkday A. (2011) Environmental Approach and Influence of Red Tide to Desalination Process in the Middle East Region. *IJCEE* 2(3) 183-188
2. Brunk U T, Zhang H, Dalen H and Ollinger K. (1995) Exposure of cells to nonlethal concentrations of hydrogen peroxide induces degeneration-repair mechanisms involving lysosomal destabilization. *Free Radic Biol Med* 19(6):813-822
3. Galati G, Teng S, Moridani M Y, Chan T S and O'Brien P J. (2000) Cancer chemoprevention and apoptosis mechanisms induced by dietary polyphenolics. *Drug Metabol Drug Interact* 17(1-4):311-349
4. Janssens B J, Childress J J, Baguet F and Rees J F. (2000) Reduced enzymatic antioxidative defense in deep-sea fish. *J Exp Biol* 203(Pt 24):3717-3725
5. Kim D, Oda T, Muramatsu T, Matsuyama Y and Honjo T. (2002) Possible factors responsible for the toxicity of *Cochlodinium polykricoides*, a red tide phytoplankton. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 132(4):415-423
6. Klaunig J E, Ruch R J and Goldblatt P J. (1985) Trout hepatocyte culture: isolation and primary culture. *In Vitro Cell Dev Biol* 21(4):221-228
7. Matsuoka K, Takano Y, Kamrani E, Rezai H, Puthiyedathu ST and Al Gheilani H M. (2010) Study on *Cochlodinium Polykricoides* margalef (*Gymnodiniales, Dinophyceae*) in the Oman sea and the Persian gulf from august 2008 to august 2009. *curr dev oceanogr* 1(3): 153-171.
8. Mindy L R, Steve L M, Ebrahim A J, Anbiah R and Donald M A (2010) The catastrophic 2008-2009 red tide in the Arabian Gulf region, with observations on the identification and phylogeny of the fish killing dinoflagellate *Cochlodinium polykricoides*. *Harmful Algae* 9: 163-172.
9. Moldeous P, Anderson B and norting A. (1978) interaction of ethanol oxidation with glucuronidation in isolated hepatocyte. *Biochem Pharmacol* 22(27):2583-2588
10. Moore S K, Trainer V L, Mantua N J, Parker M S, Laws E A, Backer L C and Fleming L E. (2008) Impacts of climate variability and future climate change on harmful algal blooms and human health. *Environ Health* 7 Suppl 2:S4
11. Nagai S, Nishitani G, Sakamoto S, Sugaya T, Lee C K, Kim C H, Itakura S and Yamaguchi M. (2009) Genetic structuring and transfer of marine dinoflagellate *Cochlodinium polykricoides* in Japanese and Korean coastal waters revealed by microsatellites. *Mol Ecol* 18(11):2337-2352
12. Oda T, Nakamura A, Shikayama M, Kawano I, Ishimatsu A and Muramatsu T. (1997) Generation of reactive oxygen species by raphidophycean phytoplankton. *Biosci Biotechnol Biochem* 61(10):1658-1662
13. Pankratz T. (2008) WDR. Red tides close desal plants. In: T. Pankrantz (Ed.), *Water Desalination Report*, Houston, TX, vol 44
14. Pourahmad J, Amirmostofian M, Kobarfard F and Shahraki J. (2009) Biological reactive intermediates that mediate dacarbazine cytotoxicity. *Cancer Chemother Pharmacol* 65:89-96
15. Samimi-Namin K, Risk MJ, Hoeksema BW, Zohari Z and Rezai H (2010) Coral mortality and serpulid infestations associated with red tide, in the Persian Gulf. *Coral Reefs* 29: 509
16. Shen H M., Shi C Y, Shen Y and Ong C N. (1996) Detection of elevated reactive oxygen species level in cultured rat hepatocytes treated with aflatoxin B1. *Free Radic Biol Med* 21(2):139-146
17. Shimada M, Akagi N, Nakai Y, Goto H, Watanabe M, Watanabe H, Nakanishi M, Yoshimatsu S and Ono C. (1991) Free radical production by the red tide alga, *Chattonella antiqua*. *Histochem J* 23(8):361-365
18. Smith M T, Thor H, Hartzell P and Orrenius S. (1982) The measurement of lipid peroxidation in isolated hepatocytes. *Biochem Pharmacol* 31(1):19-26
19. Sunda WG, Graneli E and Gobler CJ. (2006) Positive feedback and the development and persistence of ecosystem disruptive algal blooms. *J Phycol* 42: 963-974
20. www.aftab.ir/news/2008/dec/03/c3c1228310389_science_education_environment_water.php
21. www.presstv.ir/classic/Detail.aspx?id=86453§ionid=351020205

Abstract

In this research, we investigated and compared the cytotoxic mechanisms of aqueous extract of *C. polykricoides* responsible for a severe and widespread HAB in the Persian Gulf and Gulf of Oman (2008-2009) in both isolated rat and trout liver hepatocytes. In addition, the role of oxidative stress and mitochondria in the induction of apoptosis were also investigated. Isolated hepatocytes were obtained by collagenase perfusion of the rat liver. To determine the hepatocyte "ROS" generation, dichlorofluorescein diacetate was used as the reagent. The uptake of the cationic fluorescent dye, rhodamine 123, has been used for the determination of hepatocytes mitochondrial membrane potential. Redistribution of lysosomotropic probe, acridine orange from lysosomes into cytosol was used for determination of lysosomal membrane damage. GSH and GSSG were determined using spectrofluorometric method. Caspase-3 activity and apoptosis phenotype were also determined using "Sigma's caspase-3 assay kit and Sigma-Aldrich apoptosis detection kit, respectively. Incubation of algal extract with isolated rat hepatocytes caused hepatocyte membrane lysis, reactive oxygen species formation (ROS), glutathione depletion, collapse of mitochondrial membrane potential, ATP depletion and increase in ADP/ATP ratio, cytochrome c release in to the hepatocyte cytosol, activation of caspases cascade and appearance of apoptosis phenotype. antioxidants (α -tocopherol succinate and BHT), hydroxyl radical scavenger (mannitol and DMSO), Mitochondrial permeability transition (MPT) pore sealing agents (cyclosporine A, carnitine and trifluoperazine), NADPH P450 reductase inhibitor (Diphenyliodonium chloride), CYP2E1 inhibitors (Phenylimidazole and 4-Methylpyrazole) and ATP generators (L-glutamine, Fructose and Xylitol) inhibited the activation of caspase-3 and cell death. Our data showed, that algal extract activate apoptosis signaling via oxidative stress and mitochondrial pathway. ROS formation could directly be involved in mitochondrial MPT pore opening and activation of caspases cascade leading to toxic effect of *C. polykricoides* extract on both rat and trout hepatocytes. These findings contribute to a better understanding of *C. polykricoides*-toxic effects on mammalian and aquatic liver cells. Our findings revealed that trout hepatocytes are much more sensitive (more than two hundred folds) to toxic effects of *C. polykricoides* extract than rat hepatocytes. On the other hand the algal extract induced lysosomal membrane damage only in trout but not rat hepatocytes.

Keywords: *C. polykricoides*, cytotoxic, rat and trout ,Persian Gulf,Iran

Ministry of Jihad – e – Agriculture
AGRICULTURAL RESEARCH, EDUCATION & EXTENTION ORGANIZATION
IRANIAN FISHERIES RESEARCH ORGANIZATION

Title : A Search for Cellular and Molecular Cytotoxic Mechanisms of Cochlodinium polykricoides in Isolated Rat and Fish Hepatocytes

Apprpved Number: 3-12-1251-88033

Author: Abbasali Mottalebi- Jalal Pourahmad

Executor : Abbasali Mottalebi- Jalal Pourahmad

Collaborator : J.Shahraki, Gh.Zarshenas

Advisor(s): -

Supervisor: -

Location of execution : Tehran province

Date of Beginning : 2010

Period of execution : 1 Year& 6 Months

Publisher : *Iranian Fisheries Research Organization*

Circulation : 20

Date of publishing : 2013

All Right Reserved . No Part of this Publication May be Reproduced or Transmitted without indicating the Original Reference

MINISTRY OF JIHAD - E - AGRICULTURE
AGRICULTURAL RESEARCH, EDUCATION & EXTENTION ORGANIZATION
IRANIAN FISHERIES RESEARCH ORGANIZATION

Title:

**A Search for Cellular and Molecular Cytotoxic
Mechanisms of Cochlodinium polykricoides in Isolated
Rat and Fish Hepatocytes**

Executor :

Abbassali Mottalebi

Registration Number

40839