

EVALUATING THE TOXICITY OF ESTUARINE SEDIMENTS USING PRIMARY EPIDERMAL CULTURES OF *ONCORHYNCHUS MYKISS*.

Sharon Ní Shúilleabháin, Carmel Mothersill, Radiation and Environmental Science Centre, D.I.T., Kevin Street, Dublin 8.

David Sheehan, Dept. of Biochemistry and Environmental Research Institute, University College Cork.

Nora M. O'Brien, Dept. of Food Science, Food Technology, Nutrition and Environmental Research Institute, University College Cork.

Frank Van Pelt, Dept. of Pharmacology, Therapeutics and Environmental Research Institute, University College Hospital Cork.

John O' Halloran, Dept. of Zoology and Environmental Research Institute, University College, Cork.

EXTENDED ABSTRACT

Tests with cells in culture represent an important tool for the rapid and economical evaluation of ecotoxicity (Bols et al., 1984). In comparison to immortal cell lines, primary cell cultures have a greater spectrum of physiological capabilities as they still maintain many of their tissue specific functions. Fish skin is a metabolically active tissue that quickly responds to stressors. The skin contributes substantially to the exchange of lipophilic substances. Dermal absorption can range from 1.6% to 50% of total absorption (Nichols et al., 1996). Previous work in our laboratory has shown that fish epidermal cells can be cultured easily and reproducibly and that the toxic effects of chemicals can be measured using a multitude of endpoints (Mothersill et al., 1995; Lyons-Alcantara et al., 1998., Kilemade et al., 2000). The aim of this study was to investigate whether fish epidermal cultures could be reproducibly employed to evaluate the toxicity of estuarine sediment extracts.

Sediments were collected from three study sites (Ballymacoda Estuary, Co. Cork, the Douglas Estuary, Co. Cork and East Wall, Co. Dublin) that are thought to be representative of the contaminant pollution scope of sediments in Ireland (a reference site, a moderately contaminated site and a highly contaminated site, respectively). Preliminary chemical analyses of these sediments demonstrated that total zinc concentration was elevated. Zinc chloride (CAS No. 7648-85-7) was therefore chosen as a reference chemical.

The sediments were initially extracted with seawaters of 15‰, 25‰ and 32‰ salinity. However, exposure of these extracts to the epidermal cultures proved to be toxic due to salinity and osmolarity problems. Aqueous elutriates were therefore prepared with deionised water. Preliminary experiments have also begun with sediment solvent extracts. Replicate cultures which were set up in triplicate were exposed for 24, 48, 72 and 96h following an initial attachment period of 24h.

The first endpoint quantified was cell proliferation using a method developed in our laboratory (Kilemade, 2001). Briefly, epithelial outgrowths were measured each day by counting the number of 1mm² grids covered by the explant

outgrowth. The average number of cells per 1mm² grid was determined so that the cell number increase or decrease comparative to the control, over the exposure periods could be calculated.

The mode of cell death was originally investigated using two fluorescent dyes; propidium iodide, which identifies cells undergoing necrotic death and Hoechst, which identifies apoptotic cells. These dyes proved to be unsuitable in the course of the experiment due to non-specific staining. Consequently, evidence of apoptosis and necrosis was investigated in 10% formalin-fixed cultures stained with haematoxylin and observed using light microscopy. This method also allowed for the quantification of increases/decreases in goblet cell number (easily identified by their basally located nuclei and accumulation of mucous secretory granules).

Finally, the expression of p-glycoprotein, a transmembrane ATPase efflux pump that has been identified as being responsible for multixenobiotic resistance (MXR) in aquatic organisms was evaluated. P-glycoprotein expression was detected immuno-histochemically, using a 1 in 60 dilution of the JSB-1 clone of p-glycoprotein antibody. Semi-quantitative methods were employed in order to investigate whether sediment elutriate extracts induce or inhibit (due to chemosensitisers) p-glycoprotein expression.

The efficacy of using primary epidermal cultures for evaluating the toxicity of sediment extracts will be discussed. In addition, the value of the assays employed shall be questioned in terms of the understanding afforded about the mechanisms of cellular toxicity induced by a multi-contaminant test material, such as those associated with sediments.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported under the Irish Higher Education Authority funded BIOMASSTOX project.

RÉSUMÉ ALLONGÉ

Les tests de culture cellulaire sont un outil important pour l'évaluation rapide et économique de l'écotoxicité (Bols et al., 1984). Comparé à des lignes de cellules immortelles, les cultures cellulaires primaires ont des champs de capacités psychologiques plus étendues, car elles conservent beaucoup de leurs fonctions spécifiques tissulaires. L'écaïlle de poisson est un tissu métabolique actif qui réagit vivement aux contraintes externes. L'écaïlle contribue substantiellement aux échanges de substances lipophiliques. L'absorption dermique peut varier de 1.6% à 50% de l'absorption totale (Nichols et al., 1996). Le précédent travail de notre laboratoire a démontré que les cellules épidermiques de poissons peuvent être facilement cultivées et reproduites ainsi que les effets toxiques des composants chimiques peuvent être mesurés en utilisant une multitude de méthodes (Mothersill et al., 1995 ; Lyons-Alcantara et al., 1998, Kilemade et al., 2000). Le but de cette étude était de rechercher si les cultures épidermiques de poisson peuvent être utilisées pour évaluer la toxicité des extraits sédimentaires prélevés dans l'estuaire.

Les sédiments ont été récupérés sur trois sites distincts (Ballymacoda Estuary, Co. Cork, the Douglas Estuary, Co. Cork et East Wall, Co. Dublin) qui sont connus pour être représentatifs de la répartition des polluants sédimentaires irlandais (soit respectivement, un site de référence, un site de contamination modérée et un site hautement contaminé). Les analyses chimiques préliminaires ont montré que ces sédiments présentaient une forte concentration en zinc. Le chlorure de zinc (CAS No. 7648-85-7) a de plus été choisi comme substance chimique de référence.

Les sédiments ont initialement été extraits avec de l'eau de mer à des taux de salinité de 15‰, 25‰ et 32‰. L'exposition de ces cultures épidermiques a montré être toxique à cause des problèmes de salinité et d'osmolarité. Des éluviats aqueux ont été préparés avec de l'eau déminéralisée. Des expériences préliminaires avaient aussi débutées avec des extraits de sédiments solvables. Des répliques de cultures préparées en groupe de 3 ont été exposées pendant 24, 48, 72 et 96 heures suivant une période initiale de 24 heures.

La première méthode quantifiée a constitué à une prolifération cellulaire en utilisant la méthode développée dans notre laboratoire (Kilemade, 2001). En bref, les excroissances épithéliales ont été mesurées chaque jour en comptant le maillage couvert par ces excroissances. Le nombre de cellules par carreau (de 1mm²) a été déterminé en fonction de la période d'exposition permettant ainsi le calcul de la variation du nombre de cellules.

Le processus de mortalité des cellules a d'abord été recherché en utilisant deux teintures fluorescentes (propidium iodide, qui identifie les cellules en train de mourir et l'Hoechst qui identifie les cellules apoptotiques). Ces teintures se sont montrées inappropriées pour ce type de recherche à cause de la non-spécificité de ces teintures. En conséquence, les évidences d'apoptosis et de nécroses

ont été recherchées dans des cultures marquées à 10% de formol avec du haematoxylin et ensuite observées à l'aide d'un microscope optique. Cette méthode permet également de quantifier l'augmentation ou la diminution du nombre de cellules en coupe (facilement identifiable par la location fondamentale de leur noyau et par l'accumulation de sécrétions muqueuses).

Pour terminer, l'expression de p-glycoprotéine, qui permet une circulation de ATPase au travers de la trans-membrane à été identifiée pour être responsable de la résistance multixénobiotique (MXR) dans le milieu cellulaire aqueux évalué. L'expression de p-glycoprotéine a été détectée de manière « immunohistochemically », en utilisant une solution diluée à 1/60^{ème} de JSB-1, clone de l'anticorps de p-glycoprotéine. Des méthodes semi-quantitatives ont été employées pour rechercher si les extraits de sédiments éluviats induisent ou inhibent (causés par des sensibilisateurs chimiques) l'expression de p-glycoprotéine.

Le fait d'utiliser des cultures primaires épidermiques pour l'évaluation de la toxicité d'extraits sédimentaires sera discutée. En plus, la valeur des dosages employés peut porter questions au sujet de la connaissance des mécanismes de toxicité cellulaire induite par un produit de contamination multiple, comme ceux des sédiments étudiés.

REMERCIEMENTS

Ce travail a reçu le soutien de l'Irish Higher Education Authority et du projet BIOMASSTOX.

REFERENCES

- Bols, N.C., Boliska, S.A., Dixon, D.G., Hodson, P.V. and Kaiser, K.L.E. 1984. The use of fish cell cultures as an indication of contaminant toxicity to fish. *Aquatic Toxicology*, Vol. 6, pp. 147-155.
- Kilemade, M. 2001. The development of ecotoxicological effects assessment methods using fish and fish cells: A study with the aromatic amine, 2,4 dichloroaniline. PhD Thesis. Dublin Institute of Technology, Ireland.
- Kilemade, M. and Mothersill, C. 2000. An *in vitro* assessment of the toxicity of 2,4-dichloroaniline using rainbow trout primary epidermal cultures. *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 19 (8), pp. 2093-2099.
- Lyons-Alcantara, M., Mooney, R., Lyng, F., Cottell, D., Mothersill, C. 1998. The effects of cadmium exposure on the cytology and function of primary cultures from rainbow trout. *Cell Biochemistry and Function*, Vol. 16, pp. 1-13.
- Mothersill, S., Lyng, F., Lyons, M., Cottell, D. 1995. Growth and differentiation of epidermal cells from the rainbow trout established as explants and maintained in various media. *Journal of Fish Biology*, Vol. 46, pp. 1011-1025.
- Nichols, J.W., McKim, J.M., Lien, G.J., Hoffmann, A.D., Bertelsen, S.L. and Elonen, C.M. 1996. A physiologically based toxicokinetic model of dermal absorption of organic chemicals by fish. *Fundamentals of Applied Toxicology*, Vol. 31, pp. 229-242.