

Cytotoxicity and interactions of organotins and heavy metals with cytochrome P4501A in fish hepatoma cells

Doctoral Thesis

Author(s):

Brüschweiler, Beat J.

Publication date:

1996

Permanent link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-001555539>

Rights / license:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#)

Diss. ETH No. 11'413

**Cytotoxicity and Interactions
of Organotins and Heavy Metals
with Cytochrome P4501A
in Fish Hepatoma Cells**

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY
ZÜRICH

for the degree of
DOCTOR OF NATURAL SCIENCES

presented by

BEAT J. BRÜSCHWEILER

Dipl. Natw. ETH
born July 19, 1965
citizen of Zürich and Hefenhofen (TG)

accepted on the recommendation of
Prof. Dr. F.E. Würigler, examiner
PD Dr. K. Fent, co-examiner

1996

SUMMARY

In vitro bioassays are developed and applied for the determination of cytotoxicity of environmental pollutants in fish hepatoma cells. It is shown as an example for the organotin compounds, that these assays are very useful and sensitive methods for effect analysis in environmental research. The used assays for the determination of cytotoxicity are the neutral red (NR) assay, MTT assay, bromodeoxyuridine assay, and crystal violet assay giving very similar results. Especially trisubstituted organotins such as tributyltin and triphenyltin have been found to be cytotoxic at micromolar concentrations. In case of tributyltin these effects have been observed already few minutes after exposure. Similar as in *in vivo* toxicity studies with fish, a correlation between structure and activity could be derived at the cellular level with the following sequence of cytotoxicity: trisubstituted > disubstituted > tetrasubstituted > mono-substituted > inorganic tins. Among the substances with the same degree of substitution, compounds with butyl- or phenyl-groups were more cytotoxic than those with propyl-, ethyl-, and methyl-groups. These findings indicate that the lipophilicity of organotin compounds is a decisive parameter for their toxic potency. The results suggest that such *in vitro* bioassays have great potential for prescreening the effects of chemical substances in aquatic toxicology.

In contrast to organotin compounds, many critical environmental pollutants cause no extremely acute, cytotoxic effects. For that reason, there is growing interest for specific reactions which take place at subcytotoxic concentrations giving hints for potential chronic effects. In this context, special attention has been paid to cellular proteins, so-called biomarkers, which are specifically synthesized in presence of specific environmental chemicals. A very sensitive biomarker for dangerous polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH), polychlorinated dibenzodioxins, polychlorinated dibenzofurans, and polychlorinated biphenyls (PCBs) has been shown to be the cytochrome P4501A (CYP1A), which belongs to the biotransformation enzymes in the liver and other organs of vertebrates. In the present work, CYP1A is induced at very low concentrations of certain PCBs and PAHs in fish hepatoma cells. The induction response is measured in the ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) assay and the relative CYP1A protein content is

detected in a cell ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). While the EROD activity is competitively inhibited by certain CYP1A-inducers (e.g. PCB 77), the relative CYP1A protein content increases monotonically. For that reason, the immunochemical detection of CYP1A could gain in significance in environmental monitoring as complementary method to the measurement of CYP1A enzymatic activity.

For several years, there have been hints that environmental chemicals such as tributyltin, triphenyltin, and cadmium may have inhibitory effects on CYP1A induction response in fish. This could call in question the use of CYP1A as biomarker, when these substances are present in the field. For that reason, the inhibitory activities of triphenyltin, tributyltin, dibutyltin, monobutyltin, cadmium, cobalt, copper, lead, nickel, zinc are analyzed *in vitro* in the ELISA and EROD assay. The experiments show, that special attention has to be paid to the presence of tributyltin and dibutyltin as well as cadmium and copper. These substances primarily show effects on CYP1A enzymatic activity. In case of tributyltin, a non-competitive inhibition of CYP1 enzymatic activity has been found. These results underline the need for immunochemical detection in CYP1A biomonitoring.

Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Anwendung von *in vitro* Bioassays zur Untersuchung von zellschädigenden Wirkungen verschiedener Umweltchemikalien in Fischleber-Zellkulturen. Am Beispiel der Organozinn-Verbindungen kann gezeigt werden, dass sich solche Zellkulturen als nützliche und sensitive Systeme für die Effektanalyse in der Umweltforschung eignen. Bei den verwendeten Methoden handelt es sich um den Neutralrot-Assay, MTT-Assay, Bromodeoxyuridin-Assay und die Kristallviolett-Färbung, welche im Vergleich sehr ähnliche Resultate ergeben. Die trisubstituierten Verbindungen wie Tributylzinn und Triphenylzinn zeigen im speziellen bei niedrigen Konzentrationen im mikromolaren Bereich cytotoxische Wirkungen, welche am Beispiel des Tributylzinns bereits nach wenigen Minuten beobachtet werden können. Genau wie bei *in vivo* Versuchen an Fischen kann eine Gesetzmässigkeit zwischen der Struktur und der toxischen Aktivität auch auf der zellulären Ebene aufgezeigt werden, wobei die folgende Sequenz in der Cytotoxizität eruiert wird: trisubstituierte > disubstituierte > tetrasubstituierte > monosubstituierte > anorganische Zinnverbindungen. Innerhalb dieser Substitutionsgruppen erweisen sich Verbindungen mit Butyl- und Phenyl-Gruppen als stärker cytotoxisch gegenüber solchen mit Propyl-, Ethyl- und Methyl-Gruppen. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Lipophilität der Organozinn-Verbindungen ein ganz entscheidender Parameter für ihre toxische Wirkung ist. Die erhaltenen Resultate sind vielversprechend in Hinblick auf die Verwendung von solchen *in vitro* Bioassays beim Effektscreening von chemischen Substanzen in der aquatischen Toxikologie.

Im Gegensatz zu den Organozinn-Verbindungen zeigen viele andere Umweltchemikalien keine extrem akuten, cytotoxischen Reaktionen. Vermehrt wird deshalb nach spezifischen Reaktionen gesucht, welche bereits bei sublethalen Konzentrationen stattfinden und somit Hinweise über mögliche chronische Effekte von Schadstoffen geben könnten. Von besonderem Interesse sind in diesem Zusammenhang Zellproteine, sogenannte Biomarker, welche bei der Exposition von Umweltschadstoffen spezifisch synthetisiert werden. Als äusserst sensitiver Biomarker für gefährliche polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK), polychlorierte Dibenzodioxine, polychlorierte

Dibenzofurane und polychlorierte Biphenyle (PCBs) hat sich Cytochrom P4501A (CYP1A) erwiesen, welches zu den Biotransformationsenzymen in der Leber und anderen Organen von Vertebraten gehört. In der vorliegenden Arbeit kann die Induzierbarkeit von CYP1A in Fischleberzellen bei Zugabe von bestimmten PCBs und PAKs nachgewiesen werden. Die Induktionsantwort wird mittels Enzymaktivitätsmessung der Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) ermittelt, während der relative CYP1A-Proteingehalt mittels eines ELISAs (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) detektiert wird. In beiden Assayarten ergeben niedrige PCB-Konzentrationen im nanomolaren Bereich eine statistisch signifikante Induktion von CYP1A. Weil bei hohen Konzentrationen von bestimmten Induktoren jedoch die EROD-Aktivität kompetitiv gehemmt wird, während der relative CYP1A-Proteingehalt kontinuierlich ansteigt, dürfte ein immunochemischer Nachweis des CYP1A-Proteins als komplementäre Methode zur CYP1A-Enzymaktivität im Umweltmonitoring an Bedeutung gewinnen.

Seit wenigen Jahren gibt es Hinweise dafür, dass bestimmte Umweltchemikalien wie Tributylzinn, Triphenylzinn und Cadmium eine inhibierende Wirkung auf CYP1A ausüben. Dies wiederum könnte die Nützlichkeit von CYP1A als Biomarker im Umweltmonitoring bei Anwesenheit dieser Stoffe in Frage stellen. Mit den etablierten EROD- und ELISA-Assays wird die inhibitorische Aktivität von Triphenylzinn, Tributylzinn, Dibutylzinn und Monobutylzinn sowie den Schwermetallen Blei, Cadmium, Cobalt, Kupfer, Nickel und Zink untersucht. Die Versuche zeigen, dass speziell Tributylzinn und Dibutylzinn sowie Cadmium und Kupfer mit ihren Effekten auf das CYP1A-System mitberücksichtigt werden müssen. Diese Substanzen inhibieren primär die Enzymaktivität von CYP1A. Im Falle von Tributylzinn kann eine nicht-kompetitive Hemmung der EROD-Aktivität festgestellt werden. Diese Resultate unterstreichen die Nützlichkeit des immunochemischen Nachweises von CYP1A im Umweltmonitoring.