

**UVOLNENIE PROGESTERÓNU OVARIÁLNYMI GRANULÓZNYMI BUNKAMI
PO EXPERIMENTÁLNO M PODANÍ KOBALTU
THE RELEASE OF PROGESTERONE BY OVARIAN GRANULOSA CELLS
FOLLOWING COBALT EXPERIMENTAL ADMINISTRATION**

Marína Medveďová, Adriana Kolesárová, Marcela Capcarová, Alexander Sirotkin, Jaroslav Kováčik

ABSTRACT

Cobalt is an essential trace element. It is an integral part of vitamin B₁₂, or cobalamin. The present study was carried out to investigate possible effects of cobalt (Co) administration on porcine ovarian granulosa cells in relation to progesterone (P₄) release. Ovarian granulosa cells were incubated in the medium with 10 % fetal calf serum, 1 % antibiotic–antimycotic solution and with/without cobalt sulphate for 18 hours: groups - Max (1.0 mg Co.ml⁻¹), A - (1:2 dilution), B - (1:10) and the control group - without Co addition. The release of progesterone by cultured granulosa cells was assessed by RIA. Obtained data indicate Co–induced inhibition of progesterone release by ovarian granulosa cells at the lowest concentration. These observations indicate that this metal can be a possible inhibitor in the process of ovarian steroidogenesis

Key words: cobalt, porcine, ovarian granulosa cell, progesterone

ÚVOD

Koncentrácie ťažkých kovov v atmosfére sa zvyšujú s rozsiahlou industrializáciou a environmentálnym znečistením. Niektoré ťažké kovy sú vysoko toxické, iné sú esenciálne pre živočíšny organizmus. Esenciálne kovy sú potrebné pre mnohé enzymatické reakcie a fyziologické procesy živočíchov (Navrátil a Rohovec, 2006). V živočíšnom organizme metalové ióny regulujú rad fyziologických mechanizmov. Regulujú početné homeostatické transportné mechanizmy (Firriolo et al., 1999). Už minimálne zmeny koncentrácií esenciálnych prvkov v organizme vedú k výraznému poškodeniu funkčnosti tkaniva, resp. bunky.

Kobalt (Co) je prvok s číslom 27 v periodickej sústave prvkov, s atómovou hmotnosťou 58,9, hustotou 8,9, bodom topenia 1495°C, bodom varu 2870 ° C, kryštalickej formy, tvrdý, krehký, modro-biely kov, s magnetickými vlastnosťami podobnými železu. Je prítomný v zemskej kôre spolu s inými elementami. Je to kov esenciálny pre živočíšny organizmus. Jeho význam je predovšetkým v tom, že je súčasťou vitamínu B₁₂. V oceliarskom priemysle kobalt slúži ako zložka špeciálnych nástrojových ocelí, ktoré musia vykazovať vynikajúce mechanické vlastnosti – tvrdosť, pevnosť a odolnosť (Lison, 2007). Tento kov je pomerne nereaktívny a pomaly sa rozpúšťa v zriedených kyselinách. Rovnako ako ostatné prechodné kovy, má niekoľko oxidačných stavov, ale iba stavy 2 a 3 majú praktický význam. Co (II) tvorí niekoľko jednoduchých a hydratovaných kobaltnatých solí so všetkými bežnými aniónmi. Prirodzene sa vyskytuje u zvierat, vrátane človeka v minimálnych množstvách (Reilly, 2004). Co sa môže dostať do organizmu inhaláciou a potravou (Malard et al., 2007). Akumulácia Co bola zaznamenaná v pečeni, obličkách, srdci, slezine, krvi, mozgu, pankrease a vo svaloch (Firriolo et al., 2009). Exkrécia Co je zabezpečená močom, stolicou a žľou (De Palma et al., 2009). Co je kožný a respiračný alergén. Predchádzajúce štúdie indikujú, že môže byť príčinou astmy (Stefaniak et al., 2009) a pľúcnych chorôb spôsobené prevažne inhaláciou (Malard et al., 2007). Co je klasifikovaný ako možný ľudský karcinogén. Hoci existujú dôkazy pre *in vivo* a *in vitro* toxicity, mechanizmy kobaltom indukovaných toxicít pľúc nie sú doteraz úplne známe (Malard et al., 2007). Nakoľko Co možno pomerne ľahko

pripraviť a manipulácia s ním nie je zložitá, využíva sa v medicíne ako zdroj gama-lúčov na ožarovanie rakovinových nádorov.

Pokrok v oblasti reprodukčnej biológie a v biotechnológiách (Laurincik et al., 2008) je podmienený poznatkami, ktoré sa týkajú regulátorov reprodukčných funkcií (Kolesárová et al., 2008). Najvýkonnejšie regulátory dlhodobých fyziologických zmien, vrátane reprodukcie, rastu a vývinu sú hormóny a látky s nimi spojené. Progesterón (P₄) je hlavným ovariálnym hormónom (Hagan et al., 2008; Arnhold et al., 2009), ktorý je popisovaný v granulóznych bunkách vaječníkov prasničiek (Kolesarova et al., 2010, 2009, 2008), hydiny (Kolesarova et al., 2009), v ovariálnych folikuloch ošípaných a hovädzieho dobytku (Skarzynski et al., 2008; Florkovičová et al., 2002) a v žltom teliesku (Mahajan, 2008).

Cieľom *in vitro* experimentov bolo skúmať dávkovo-závislé zmeny v sekrečnej aktivite ovariálnych granulóznych buniek po experimentálnej aplikácii kobaltu. Pre splnenie uvedeného cieľa sme sa v našej práci zamerali na skúmanie uvoľnenia P₄ granulóznymi bunkami prasničiek po pridaní rôznych dávok kobaltu.

MATERIÁL A METODIKA

Príprava, spracovanie a kultivácia granulóznych buniek

Vaječníky získané pri zabití zvierat sme individuálne uskladnili v termoske s fyziologickým roztokom pri izbovej teplote a spracovali maximálne do 6 hodín od zabitia zvierat. Ovariálne granulózne bunky sme izolovali metódou aspirácie zo stredne veľkých folikulov (2–5 mm). Suspenziu granulóznych buniek sme odstredžovali (1500 ot·min⁻¹, 10 minút) za účelom oddelenia od folikulovej tekutiny s následným premývaním pomocou sterilného kultivačného média DMEM/F12 1:1 (BioWhittaker™, Verviers, Belgium) doplneného 10 % fetálnym tel'acím sérom (BioWhittaker™) a antibiotikom - antimykotikom (Sigma, St. Louis, MO, USA). Pomocou hemocytometra sme počítali bunky a upravili koncentráciu buniek na potrebnú (10⁶ buniek·ml⁻¹ média). Bunkovú suspenziu riedenú kultivačným médiom sme kultivovali (37 °C, 5 % CO₂) v kultivačných platničkách (1 ml.kultúra⁻¹) a v chamber-slides (200 µl.kultúra⁻¹). Približne po 5-7 dňoch kultivácie, keď bunky vytvorili na 75 % súvislú monovrstvu, sme médium nahradili čerstvým s rovnakými doplnkami ako bolo pôvodné, 1. bez pridanía CoSO₄·7H₂O (kontrola) a 2. s pridaním rôznych koncentrácií CoSO₄·7H₂O (experimentálne skupiny): skupina Max (1 mg CoSO₄·7H₂O), skupina A (1:2 riedenie), skupina B (1:10 riedenie) (Tabuľka 1). Po 18-hodinovej kultivácii s prídavkami Co sme injekčnou striekačkou odobrali médium z kultivačných platničiek a uskladnili pri teplote –20 °C až do doby RIA analýzy.

Tabuľka 1 Koncentrácie kobaltu použité v experimente

Skupina	Granulózne bunky.ml ⁻¹ médium	CoSO ₄ ·7H ₂ O (mg·ml ⁻¹)	Médium (ml)	Zried'ovací pomer
kontrola	10 ⁶	0	1	0:1
Max	10 ⁶	1	0	1:0
A	10 ⁶	0,33	0,67	1:2
B	10 ⁶	0,09	0,91	1:10

Maximálna použitá dávka: 1.0 mg CoSO₄·7H₂O. ml⁻¹ = 0.2096 mg Co.ml⁻¹

RIA analýza

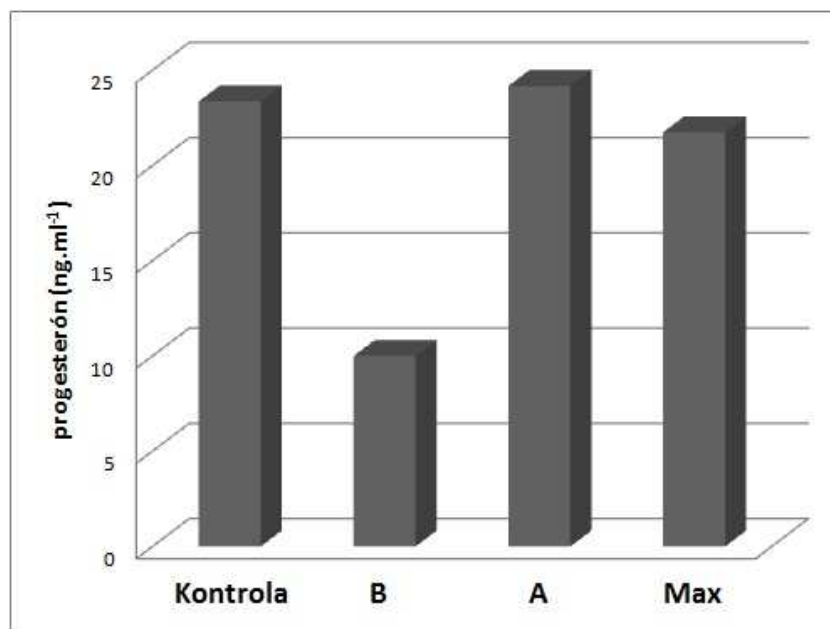
Koncentrácie P₄ boli stanovené metódou RIA v 25-100 µl inkubačného média. Tieto látky boli naviazané použitím RIA kitov (Immunotech SAS, Marseille Cedex, France) podľa inštrukcií výrobcu (**Makarevich a Sirotkin, 1999**). Všetky RIA súbory boli určené pre použitie vzoriek kultivačného média.

Štatistické analýzy

Analýza progesterónu v inkubačnom médiu bola vykonaná duplicitne. Hodnoty týkajúce sa vplyvu rôznych dávok kobaltu na uvoľnenie progesterónu granulóznymi bunkami sú priemerné hodnoty získané z troch rozličných pokusov vykonaných v rozličných dňoch, použitím rozličných súborov vaječníkov získaných z 10-12 zvierat. Štatistické rozdiely medzi skupinami boli hodnotené t-testom použitím štatistického programu Sigma Plot 11.0 (Jandel, Corte Madera, USA). Uvedené hodnoty sú priemerné hodnoty z experimentov ± SEM. Signifikantnosť rozdielov medzi kontrolnou a experimentálnymi skupinami bola určená na úrovni p<0,05.

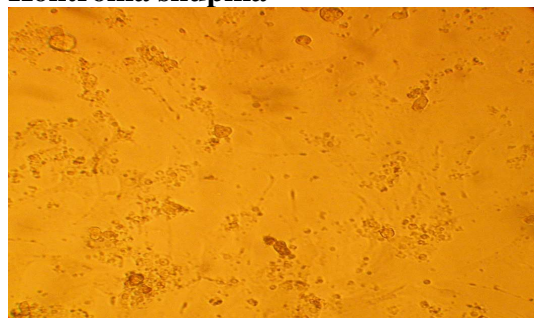
VÝSLEDKY A DISKUSIA

Po aplikácii kobaltu sme zaznamenali rozdiely v uvoľňovaní progesterónu granulóznymi bunkami prasničiek medzi kontrolnou a experimentálnymi skupinami (**Obr. 1, 2, Tabuľka 1**). Uvoľňovanie P₄ granulóznymi bunkami vaječníkov bolo 23,37±1,28 ng.ml⁻¹ v kontrolnej skupine bez aplikácie kobaltu. Uvoľňovanie P₄ granulóznymi bunkami bolo preukázane inhibované (P<0,05) v skupine B s najnižšou dávkou kobaltu. Experimentálne skupiny Max (21,75±1,28 ng.ml⁻¹) a A (24,18±1,51 ng.ml⁻¹) nepreukázali signifikantné rozdiely (P>0,05) v porovnaní s kontrolnou skupinou.

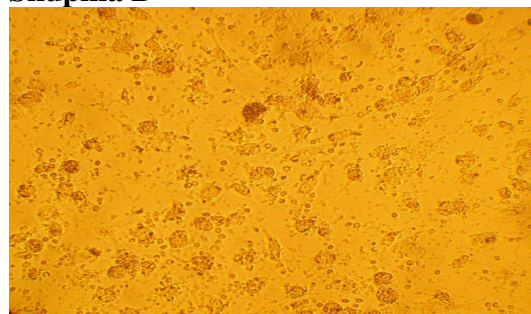


Obrázok 1 Vplyv kobaltu na uvoľňovanie progesterónu granulóznymi bunkami vaječníkov prasničiek (ng.ml⁻¹). Kontrola bez prítomnosti kobaltu v médiu. Skupina Max s prídavkom Co v dávke 1,0 mg.ml⁻¹, skupina A 0,33 mg.ml⁻¹ a skupina B 0,09 mg.ml⁻¹. Signifikantné rozdiely medzi skupinami P<0,05 boli určené t-testom. RIA metóda.

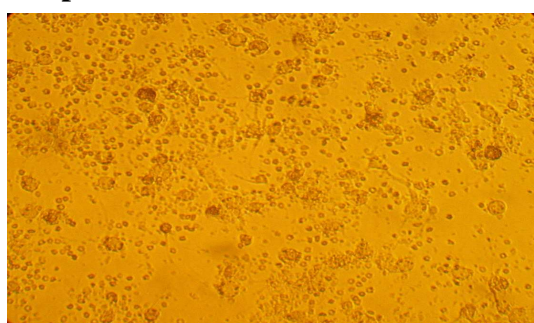
Kontrolná skupina



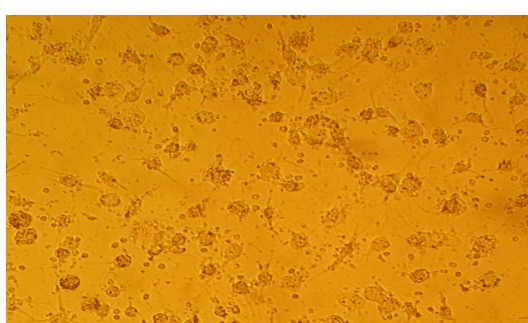
Skupina B



Skupina Max



Skupina A



Obrázok 2 Pôsobenie rôznych dávok kobaltu na granulózne bunky prasničiek.

Vplyv ťažkých kovov na granulózne bunky vaječníkov prasničiek boli pozorované aj v predchádzajúcich štúdiách (**Kolesárová et al., 2009a, 2009b**). Oxidatívny stres môže byť vyvolaný v procese bunkovej smrti indukovanej kobaltom (**Pourahmad et al., 2003; Olivieri et al., 2001; Zou et al., 2001**). Kobalt je cytotoxický pre takmer všetky typy buniek, vrátane nervových buniek (**Yang et al., 2004; Olivieri et al., 2001**) a môže indukovať smrť buniek apoptózou a nekrózou (**Huk et al., 2004**). Uvoľnenie P₄ granulóznymi bunkami bolo inhibované najnižšou dávkou kobaltu (0,09 mg.ml⁻¹). **Lukáč et al. (2007)** uvádza negatívny vplyv kobaltu na štruktúru a funkciu semeníkov. Morfometrické analýzy poukázali, že vo všetkých experimentálnych skupinách buniek ošetrovaných kobaltom poukázali na znížený objem epitelu semenovodu (**Lukac et al., 2007**). V našej práci dávky 1,0 mg.ml⁻¹ a 0,33 mg.ml⁻¹ kobaltu neovplyvnili uvoľnenie P₄ granulóznymi bunkami. Podobne **Grasselli et al. (2005)** nezaznamenali vplyv chloridu kobalnatého na uvoľnenie progesterónu granulóznymi bunkami ošipovaných.

Kumar et al. (2007) skúmali stavy minerálneho séra, vitamínov, hormonálnych a enzymatických profilov u byvolov. Štúdie odhalili marginálne nedostatky kobaltu (22,52%), ktoré boli pripísané moderným poľnohospodárskym postupom. V dôsledku toho, byvoly v tejto oblasti trpia nízkou produktivitou, plodnosťou a rôznymi príznakmi nedostatku minerálnych látok v krmive. Mikro-minerálne deficity cez rôzne enzymatické dráhy tiež ovplyvňujú aj hladinu estrogénu a progesterónu v rôznom štádiu vývoja u týchto zvierat. V ďalšej štúdií bola slúmaná schopnosť aktivácie kovov estrogénneho receptora- α (ER α) v ľudských bunkách rakoviny prsníka línie (MCF-7). Kov znížil koncentrácie ER α proteínov a mRNA a indukovanú expresiu génov regulujúci syntézu estrogén-progesterón receptora. Schopnosť kovov aktivovať chimérický receptor obsahujúci hormón-väzbové domény pre ER α naznačuje, že ich účinky sú sprostredkované hormón-väzbovými doménami. Mutačné analýzy identifikovali aminokyseliny C381, C447, E523, H524, N532, D538 ako potenciálne interakčné miesta, čo naznačuje, že dvojmocné kovy a anióny aktivujú ER α (**Martin, 2003**).

Campbell et al. (1999) skúmali úlohu organických komplexov kobaltu v reprodukčnej výkonnosti a produkcii mlieka u laktujúcich kráv. Na začiatku luteálnej fázy boli identifikované koncentrácie progesterónu $\geq 1 \text{ ng.ml}^{-1}$. Suplementácia komplexu stopových minerálov účinne znižovala počet dní pri prvej ruji (**Campbell et al., 1999**).

ZÁVER

Úloha kobaltu v kontrole ovariálnych funkcií granulóznych buniek prasnícok v súvislosti s uvoľnením P_4 nie je doposiaľ známa. V našich experimentálnych prácach sme sa zamerali na skúmanie účasti a úlohy hormónu v granulóznych bunkách vaječnícok prasnícok po experimentálnom podaní rôznych dávok kobaltu v podmienkach *in vitro*. Kobalt bol schopný spôsobovať zmeny v ovariálnych granulóznych bunkách vaječnícok prasnícok. Výsledky našich experimentov poukázali, že najnižšia koncentrácia Co inhibovala uvoľňovanie P_4 granulóznymi bunkami, čo naznačuje že tento ťažký kov môže byť inhibítorom v procese ovariálnej steroidogenézy.

LITERATÚRA

- ARNHOLD, I.J., LOFRANO-PORTO, A., LATRONICO, A.C. 2009. Inactivating mutations of luteinizing hormone beta-subunit or luteinizing hormone receptor cause oligo-amenorrhea and infertility in women. In *Hormone Research*, vol. 71, 2009, p. 75-82.
- CAMPBELL, M.H., MILLER, J.K., SCHRICK, F.N. 1999. Effect of Additional Cobalt, Copper, Manganese, and Zinc on Reproduction and Milk Yield of Lactating Dairy Cows Receiving Bovine Somatotropin. In *Journal of Dairy Science*, vol. 82, 1999, no. 5, pp. 1019–1025.
- DE PALMA, G., MANINI, P., SARNICO, M., MOLINARI, S., APOSTOLI, P. 2009. Biological monitoring of tungsten (and cobalt) in workers of a hard metal alloy industry. In *International Archives of Occupational and Environmental Health*, 2009, pp. 1–9.
- ELINDER, C., FRIBERG, L. 1986. Cobalt. In: Friberg, L., Nordberg, G., Voulk, V., editors. Handbook on the toxicology of metals. Amsterdam : Elsevier, 1986, pp. 211–232.
- FIRRIOLO, J.M., AYALA-FIERRO, F., SIPES, I.G., CARTER, D.E. 1999. Absorption and disposition of cobalt naphthenate in rats after a single oral dose. In *Journal of Toxicology and Environmental Health – Part A*, vol. 58, 1999, pp. 383–395.
- FLORKOVIČOVÁ, I., SIROTKIN, A., BUDÁČOVÁ, A., SCHAEFFER, H.J. 2002. Úloha IGF-I a oxytocínu v sprostredkovaní vzájomných vzťahoch ovariálnych folikulov. In *XVIII. Medzinárodná konferencia o reprodukciu hospodárskych zvierat*. Nitra : AZ Print, 2002, s. 75-80.
- GRASSELLI, F., BASINI, G., BUSSOLATI, S., BIANCO, F. 2005. Cobalt chloride, a hypoxia-mimicking agent, modulates redox status and functional parameters of cultured swine granulosa cells. In *Reproduction, Fertility and Development*, vol. 17, 2005, no. 7, pp. 715–720.
- HAGAN, C.R., FAIVRE, E.J., LANGE, C.A. 2008. Scaffolding actions of membrane-associated progesterone receptors. In *Steroids* Apr 24 [Epub ahead of print].
- HUK, O.L., CATELAS, I., MWALE, F., ANTONIOU, J., DAVID, J., ZUKOR, D.J., PETIT, A. 2004. Induction of apoptosis and necrosis by metal ions *in vitro*. In *The Journal of Arthroplasty*, vol. 19, 2004, pp. 84–87.
- KOLESÁROVÁ, MARCELA CAPCAROVÁ, HENRIETA ARPÁŠOVÁ, ANNA KALAFOVÁ, PETER MASSÁNYI, NORBERT LUKÁČ, JAROSLAV KOVÁČIK, MONIKA SCHNEIDGENOVÁ. 2008. Nickel-induced blood chemistry alterations in hens after an experimental peroral administration. In: *Journal of environmental science and health. Part B, Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, vol. 43, 2008, pp. 625–632.

- KOLESAROVA, A., CAPCAROVA, M., SIROTKIN, A., MASSANYI, P. 2009. Insulin-Like Growth Factor-I and Progesterone Release by Ovarian Granulosa Cells of Hens after Experimental Lead and Molybdenum Administrations *in vitro*. In *International Journal of Poultry Science*, vol. 8, 2009, pp. 890–895.
- KOLESÁROVÁ, A., ROYCHOUDHURY, S., SLIVKOVA, J., MASSÁNYI, P., SIROTKIN, A., CAPCAROVÁ, M., MEDVEĎOVÁ, M., KOVÁČIK, J. 2009a. Olovom indukované zmeny v sekrécii hormonálnych látok ovariálnymi granulóznymi bunkami prasnícok *in vitro*. In *Potravinárstvo*, vol. 3, 2009a, pp. 30–34.
- KOLESÁROVÁ, A., SLIVKOVA, J., ROYCHOUDHURY, S., MASSÁNYI, P., SIROTKIN, A., CAPCAROVÁ, M., MEDVEĎOVÁ, M., KOVÁČIK, J. 2009b. Olovom indukované zmeny proliferácie a apoptózy granulóznych buniek vaječnícok prasnícok *in vitro*. In *Potravinárstvo*, vol. 3, 2009b, pp. 29–34.
- KOLESAROVA, A., ROYCHOUDHURY, S., SLIVKOVA, J., SIROTKIN, A., CAPCAROVA, M., MASSANYI, P. 2010. *In vitro* study on the effect of lead and mercury on porcine ovarian granulosa cells. In *Journal of Environmental Science and Health, Part A. Toxic hazardous substances and environmental engineering*, vol. 45, 2010, in press
- KOVÁČIK, J., VALENT, M., KOLLÁROVÁ, E. 1999. Fyziológia zvierat. 3. vyd. Nitra : Slovenská poľnohospodárska univerzita, 1999. s. 214-219, 236-237, 252-257. ISBN 80-7137-607-8
- KUMAR, P., SHARMA, M.C., JOSHI, C. 2007. Effect on biochemical profile concurrent with micro-mineral deficiencies in buffaloes (*Bubalus bubalis*) of Eastern Uttar Pradesh. In *Indian Journal of Animal Sciences*, vol. 77, 2007, no. 1, pp. 86–91.
- LANGER, P., VIGAS, M., KVETNANSKY, R., FOLDES, O., CULMAN, J. 1983. Immediate increase of thyroid hormone release acute stress in rats: Effect of biogenic amines rather than of THS? In *Acta Endocrinol-Cop*, vol. 104, 1983, p. 443-449.
- LISON, D. 2007. Cobalt. In *Handbook on the toxicology of metals 3E*. Academic Press, Inc., 2007. pp. 511–525.
- LUKAC, N., MASSANYI, P., ZAKRZEWSKI, M., TOMAN, R., CIGANKOVA, V., STAWARZ, R. 2007. Cobalt-induced alterations in hamster testes *in vivo*. In *Journal of Environment Science and Health A Toxic hazardous substances and environmental engineering*, vol. 42, 2007, pp. 389–392.
- MAHAJAN, D.K. 2008. Pig Model to Study Dynamics of Steroids During Ovarian Follicular Growth and Maturation. In *Sourcebook of Models for Biomedical Research*, 2008, pp. 425-436. ISBN 978-1-58829-933-8.
- MALARD, V., BERENQUER, F., PRAT, O., RUAT, S., STEINMETZ, G., QUEMENEUR, E. 2007. Global gene expression profiling in human lung cells exposed to cobalt. In *BMC Genomics*, vol. 8, 2007, art. no. 147.
- MAKAREVICH, A.V., SIROTKIN, A.V., 1999. Development of sensitive radioimmunoassay for IGF-I determination in samples from blood plasma and cell-conditioned medium. In *Veterinary Medicine*, vol. 44, 1999, p.71-78.
- MARTIN, M.B., REITER, R., PHAM, T., AVELLANET, Y.R., CAMARA, J., LAHM, M., PENTECOST, E. et al. 2003. Estrogen-like activity of metals in MCF-7 breast cancer cells. In *Endocrinology*, vol. 144, 2003, no. 6, pp. 2425–2436.
- MÉSZÁROSOVÁ, M., SIROTKIN, A.V., GROSSMANN, R., DARLAK, K., VALENZUELA, F., 2008. The effect of obestatin on porcine ovarian granulosa cells. In: *Animal Reproduction Science*, vol. 108, 2008, p. 196-207.
- NAVRÁTIL, T. – ROHOVEC, J. 2006. Olovo. In *Vesmír*, roč. 85, 2006, č. 9, s. 518-521, ISSN 1214-4029
- NEVE, J. 1991. The nutritional importance and pharmacologic effects of cobalt and vitamin B 12 in man. In *Journal de pharmacie de Belgique*, vol. 46, 1991, no. 4, pp. 271–280.

- OLIVIERI, G., HESS, C., SAVASKAN, E., LY, C., MEIER, F., BAYSANG, G., et al. 2001. Melatonin protects SHSY5Y neuroblastoma cells from cobalt-induced oxidative stress, neurotoxicity and increased beta-amyloid secretion. In *Journal of Pineal Research*, vol. 31, 2001, pp. 320–325.
- POURAHMAD, J., O'BRIEN, P.J., JOKAR, F., DARAEI, B. 2003. Carcinogenic metal induced sites of reactive oxygen species formation in hepatocytes. In *Toxicology in vitro*, vol. 17, 2003, pp. 803–810.
- REILLY, C. 2004. The Nutritional Trace Metals. UK : Blackwell Publishing Ltd, 2004, 238 p., ISBN 1-405-1040-6
- SÁNCHEZ-CHARDI, A., RIBEIRO, C.A.O., NADAL, J. 2009. Metals in liver and kidneys and the effects of chronic exposure to pyrite mine pollution in the shrew *Crocidura russula* inhabiting the protected wetland of Doñana. In *Chemosphere*, vol. 76, 2009, no. 3, pp. 387–394.
- SANISLO, P., SIROTKIN, A.V., BUDÁČOVÁ, A., FLORKOVIČOVÁ, I., SCHAEFFER, H.J. 2001a. Úloha trombopoietinu a rozličných proteínkináz v regulácii proliferácie, apoptózy a steroidogenézy ovariálnych buniek ošipáných in vitro. In *Acta fytotechnica et zootechnica*, vol. 4, 2001a, no. 2, p. 31-34.
- SKARZYNSKI, D.J., SIEMIENIUCH, M.J., PILAWSKI, W., WOCLAWEK POTOCKA, I., BAH, M.M., MAJEWSKA, M., JAROSZEWSKI, J.J., 2008. In Vitro Assessment of Progesterone and Prostaglandin E(2) Production by the Corpus Luteum in Cattle Following Pharmacological Synchronization of Estrus. In *The Journal of Reproduction and Development*, Jan 29 [Epub ahead of print].
- STEFANIAK, A.B., DAY, G.A., HARVEY, C.J., LEONARD, S.S., SCHWEGLER-BERRY, D.E., CHIPERA, S.J., SAHAKIAN, N.M., CHISHOLM, W.P. 2007. Characteristics of dusts encountered during the production of cemented tungsten carbides. In *Industrial Health*, vol. 45, 2007, no. 6, pp. 793–803.
- SUNDERMAN, W.F., 2001. Review: Nasal toxicity, carcinogenicity, and olfactory uptake of metals. In *Annals of Clinical and Laboratory Science*, vol. 31, 2001. no. 1, pp. 3–24.
- WEHNER, A.P., CRAIG, D.K. 1972. Toxicology of inhaled NiO and CoO in Syrian golden hamsters. In *American Industrial Hygiene Association*, vol. 33, 1972, no. 3, pp. 146–155.
- YANG, S.J., PYEN, J., LEE, I., LEE, H., KIM, Y., KIM, T. 2004. Cobalt chloride-induced apoptosis and extracellular signal-regulated protein kinase 1/2 activation in rat C6 glioma cells. In *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 37, 2004, pp. 480–486.
- ZOU, W., YAN, M., XU, W., HUO, H., SUN, L., ZHENG, Z., et al. 2001. Cobalt chloride induces PC12 cells apoptosis through reactive oxygen species and accompanied by AP-1 activation. In *Journal of Neuroscience Research*, vol. 64, 2001, pp. 646–653.