

## CADMIUM AS AN ENDOCRINE DISRUPTOR IN THE MODEL SYSTEM

Zuzana Kňazická, Zsolt Forgács, Eva Tyrdá, Peter Massányi, Jirina Kročková, Norbert Lukáč

### ABSTRACT

Heavy metals are in fact one of the oldest environmental problems, which are widely distributed in the environment. Cadmium is an environmental risk factor having various toxic effects both in animals and in human. Currently, it is a highly discussed topic, because effects of cadmium significantly influence the reproductive system, which can be strongly reflected in the process of steroidogenesis and spermatogenesis. Target of this study was to determine the effects of  $Cd^{2+}$  on steroidogenesis in adrenocarcinoma cells isolated from the cell line H295R. This study examined the changes of cadmium as a potential endocrine disruptor on steroid hormone production – testosterone (T) and progesterone (P). Hormone production was determined after Cd exposure (1.9; 3.9; 7.8; 15.6; 31.2; 62.5  $\mu M Cd.ml^{-1}$ ) using an ELISA. We compared the control group (medium without cadmium) with the experimental groups (exposed to different concentrations of  $CdCl_2$ ). Decreased T production was found in all experimental groups with the addition of cadmium. In the groups A 2.21 $\pm$ 0.87%, B 2.65 $\pm$ 1.37%, C 4.10 $\pm$ 1.78% were released similar amounts of T. In these groups a significant reduction ( $P<0.01$ ) compared with the control group was found. Experimental  $Cd^{2+}$  administration at dose 7.8  $\mu M Cd.ml^{-1}$  decreased significantly ( $P<0.05$ ) T production. Progesterone decreased in all experimental groups compared with the control group. The lowest P concentration was detected in the experimental group A 2.49 $\pm$ 0.90% ( $P<0.01$ ). Our results show the direct effect of  $Cd^{2+}$  on the production of sex hormones by adrenocarcinoma cells. All chosen concentrations of cadmium inhibited hormone production. Probably, low concentrations of T and P affect their metabolites, whose production is conditioned by steroid enzymes. Results of this study confirm the effect of  $Cd^{2+}$  as possible endocrine disruptor.

**Keywords:** endocrine disruption, steroid hormones, steroidogenesis, cell line H295R, cadmium

### ÚVOD

Ťažké kovy sa dostávajú do všetkých zložiek životného prostredia prevažne antropogénnou činnosťou. Rozsiahlou industrializáciou a environmentálnym znečistením sa zvyšujú ich koncentrácie v atmosfére. Dôležité je si uvedomiť, že niektoré ťažké kovy sú vysoko toxické, iné sú nenahraditeľné pre organizmus (Kolesárová et al., 2009a). Esenciálne kovy sú potrebné v biotických systémoch pri regulácii fyziologických a biochemických procesov (Navrátil a Rohovec, 2006). Na druhej strane ich nebezpečenstvo spočíva okrem akútnych intoxikácií, predovšetkým v ukladaní a akumulácii v organizme cez potravinový reťazec (Kolesárová et al., 2009a). Už minimálne zmeny ich koncentrácií vedú k výraznému narušeniu funkčnosti tkaniva, resp. bunky alebo postupne poškodzujú jednotlivé orgánové systémy až nakoniec celý organizmus. Veľmi senzitívnym barometrom účinkov rôznych toxikantov je práve reprodukčný systém.

Environmentálne kontaminanty majú potenciál spôsobovať reprodukčné poruchy, ktoré sa výrazne odzrkadľujú v steroidogéneze (Sanderson, 2006) i spermatogéneze. Pokrok v oblasti reprodukčnej biológie a v biotechnológiách je podmienený poznatkami, ktoré sa týkajú regulátorov reprodukčných funkcií (Kolesárová et al., 2008b). Najvýkonnejšími regulátormi dlhodobých fyziologických zmien, vrátane reprodukcie, rastu a vývinu sú hormóny a látky s nimi spojené, ktoré sú ľahko náchylné k poškodeniu. Po expozícií ťažkými kovmi môžu priamo ovplyvňovať produkciu hormónov prostredníctvom interakcií s príslušnými enzýmami, zasahovať do ich transportu k cieľovým orgánom, meniť prirodzený metabolizmus hormónov alebo inhibovať funkciu regulačných proteínov steroidogézy (StAR - Steroidogenic Acute Regulatory) (Sanderson a Berg, 2003). K takýmto

endokrinným disruptorom, ktoré tlmia, resp. znižujú syntézu steroidov *in vitro* patrí okrem ortute aj kadmium ako výrazný reprodukčný toxikant. V súčasnosti sa mu venuje mimoriadna pozornosť, nakoľko živé organizmy nedisponujú homeostatickým mechanizmom, ktorý by reguloval jeho koncentráciu v tkanivách. Z tohto dôvodu sa zaraďuje medzi abiogénny prvok, ktorý sa kumuluje v orgánoch organizmov, čo je nebezpečné z hľadiska jeho toxicity.

Pre štúdium vplyvu rôznych xenobiotík na produkciu steroidných hormónov sa v *in vitro* experimentoch používajú rôzne primárne kultúry, bunkové suspenzie a línie ako modelové systémy. Na špecifikáciu a detekciu toxického účinku nami sledovaného ťažkého kovu sme použili veľmi stabilnú bunkovú líniu H295R, resp. bunky embryonálneho adrenálneho karcinómu. Zároveň slúžia ako nástroj pre sledovanie účinkov možných endokrinných disruptorov. Bunková línia disponuje kompletnou sadou steroidných enzýmov, čím nadobúda veľmi podobné fyziologické vlastnosti ako nediferencovaná kôra nadobličiek ľudskeho plodu (Gazdar et al., 1990; Staels et al., 1993). Produkuje hormóny zo všetkých troch zón kôry nadobličiek, t.j. mineralokortikoidy (aldosteron), glukokortikoidy (kortizol) a pohlavné hormóny (obrázok 1) (Harvey a Everett, 2003). Vďaka svojim vlastnostiam umožňuje línia H295R merať zmeny v génovej expresii, ale zároveň stanovíť alterácie v produkcii steroidných hormónov prostredníctvom rovnakej bunkovej kultúry (Hilscherová et al., 2004, Gracia et al., 2006).

V súvislosti s týmito spomínanými skutočnosťami bolo cieľom našich *in vitro* experimentov zistiť vplyv ťažkého kovu na steroidogézu bunkovej línie H295R. V detailnejšej analýze sme skúmali dávko-závislé zmeny kadmia ako potenciálneho endokrinného disruptora na produkciu steroidných hormónov - testosterónu (T) a progesterónu (P) adenokarcinómových buniek.

## MATERIÁL A METÓDY

### Biologický materiál

V experimente bola použitá ľudská bunková línia adenokarcinómových buniek H295R získaná z ATCC (American Type Culture Collections, Manassas, VA, USA), ktorá bola zmrazená a uskladnená v tekutom dusíku (-196 °C) do vykonania analýz. Pred samotným experimentom boli bunky z tejto línie rozmrazené, vyzolované, kultivované podľa protokolu **Hilscherová et al. (2004)** a pasážované podľa **Heckera et al. (2006)**. Po dosiahnutí požadovaného počtu bunkových suspenzií sme nariadili výslednú koncentráciu, t.j. 200 000-300 000 buniek.ml<sup>-1</sup>. Adenokarcinómové bunky sa následne nechali kultivovať v CO<sub>2</sub> inkubátore (37 °C, vlhkej atmosfére 95 %, 5 % CO<sub>2</sub>) po dobu 24h, aby došlo k ich opätovnému prisadnutiu na dno kultivačných platničiek. Po inkubácii sa pôvodné kultivačné médium odstránilo a vymenilo za nové. Na stanovenie účinku kadmia (CdCl<sub>2</sub>, Sigma-Aldrich, St.Louis, USA) sa pred inkubáciou navážil; rozpustil v kultivačnom médiu a zriedil na nami požadované koncentrácie (1,9; 3,9; 7,8; 15,6; 31,2; 62,5 μM Cd.ml<sup>-1</sup>). Nariadení roztok sa pridal k bunkám v 96-jamkových mikrotitračných platničkách (MTP, Grainer, Germany), ktoré prešli 48-hodinovou kultiváciou v CO<sub>2</sub> inkubátore (37 °C, vlhkej atmosfére 95 % a 5 % CO<sub>2</sub>). Po inkubácii sme objem z každej kultivačnej platničky jemne aspirovali pipetou. Alikvotnú časť kultivačného média sme centrifugovali (2000 otáčok.min.<sup>-1</sup>, 10 minút, pri teplote 4 °C) a získaný supernatant zmrazili (-20 °C) až do doby determinácie hormónov.

### Stanovenie steroidných hormónov

Kvantifikáciu testosterónu a progesterónu sme prevádzkali priamo z alikvotného množstva kultivačného média pomocou enzýmoimunoanalýzy (ELISA) použitím komerčnej súpravy (Enzyme Linked Immunosorbent Assay, Dialab GmbH – progesteron/testosteron, Austria) podľa inštrukcií výrobcu. Princíp tejto kolorimetrickej metódy spočíva v reakcii antigénu (testosterónu, progesterónu) obsiahnutého vo vzorke, ktorý súperí s konjugátom (HRP-testosteron/HRP-progesteron) o limitované miesto naviazaním na príslušnú špecifickú protilátku (anti-testosteron IgG/anti-progesteron IgG), ktorou sú pokryté 96-jamkové mikrotitračné platne (MTP, Grainer, Germany). Po hodinovej inkubácii (37 °C, vlhkej atmosfére 95 % a 5 % CO<sub>2</sub>) sa prebytočný konjugát separoval premytím. Následne sa pridal základný substrát (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, TMB 0,25g.l<sup>-1</sup>). Po uplynutí požadovaného času pre maximálne zafarbenie sa enzymatická reakcia ukončila zastavovacím roztokom (kyselina sírová 0,15 mol.l<sup>-1</sup>) a odčítala sa absorbancia. Koncentráciu hormónov vo vzorke sme vypočítali na základe optickej denzity kalibrátorov. Intenzita zafarbenia bola nepriamo úmerná koncentrácii antigénu vo vzorke. Absorbancia sa determinovala spektrofotometricky pri vlnovej dĺžke 450 nm podľa referencií na mikroplatničkovom snímači ELISA Reader (Anthos MultiRead 400, Austria).

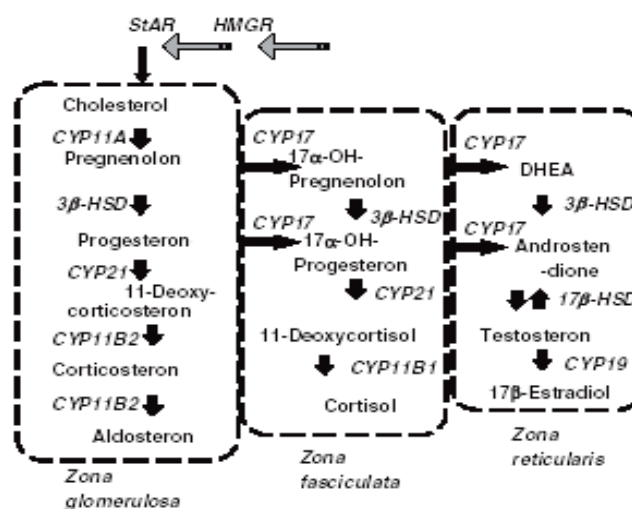
### Štatistická analýza

Dosiahnuté výsledky boli spracované počítačovým štatistickým programom GraphPad Prism 3.02 (GraphPad Software Incorporated, San Diego California, USA). Vypočítali sme základné štatistické ukazovatele (aritmetický priemer, minimálnu a maximálnu hodnotu, smerodajnú odchýlku a variačný koeficient). Signifikantnosť rozdielov medzi kontrolou a experimentálnymi skupinami bola zistená párovým t-testom na úrovniach štatistickej významnosti P<0,05; P<0,01 a P<0,001.

### VÝSLEDKY A DISKUSIA

Progesteragény (progesterón), androgény (androstendion, testosterón) a estrogény (estradiol, estron, estriol) sú najdôležitejšie steroidné hormóny z hľadiska reprodukčného systému (**Edqvist a Forsberg, 1997**), ktoré vplývajú na proces spermatogenézy samcov folikulogenézy, oogenézy a luteogenézy samic.

V práci sme sledovali najvýznamnejších zástupcov steroidných hormónov, t.j testosterón (T) a progesterón (P). Mechanizmus ich účinkov je odlišný v porovnaní s peptidovými hormónmi, pričom je závislý na rôznych vnútrobunkových receptoroch. Syntetizované sú za pomoci sérií chemických reakcií využívajúcich cholesterol ako primárny prekursor (**Miller a Tyrell, 1995**), pričom jeho zásoby sú kľúčové pre správnu steroidogézu. Malé množstvo cholesterolu je tvorené priamo pomocou syntézy *de novo* z acetátu (**Fail et al., 1994**). Viacstupňovým enzymatickým odštiepením jeho bočného reťazca sa konvertuje na pregnenolón pomocou mitochondriálneho enzýmu (dezmoláza), ktorý je kódovaný génom CYP11A a 3β-hydroxysteroiddehydrogenázy (3β-HSD) na progesterón. Pri syntéze druhého hormónu (T) sa využíva gén CYP17, ktorý je lokalizovaný v hladkom endoplazmatickom retikule. Je potrebný pre vznik DHEA (dehydroepiandrosteronu), ktorý sa mení na androstendión uvoľňovaný kôrou nadobličiek. Transformácia androstendiónu na hlavný androgén - testosterón prebehne za účasti 17β-HSD (**Heikkilä et al., 2002, Hilscherová et al., 2004**) (obrázok 1).



Obrázok 1 Schéma procesu syntézy steroidných hormónov v troch zónach nadobličiek (Hilscherová et al., 2004).

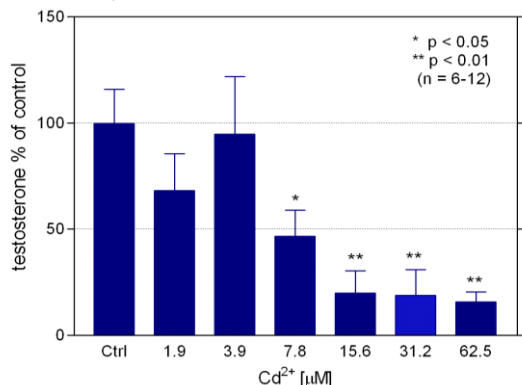
V súčasnosti sa zvyšuje záujem o problematiku ťažkých kovov ako endokrinných disruptorov v reprodukčnom systéme. Výsledky našich experimentov prinášajú poznatky o účinku kadmia ( $\text{CdCl}_2$ ) za použitia jeho rôznych dávok na tvorbu steroidných hormónov adrenokarcinómových buniek. Použité bunky pochádzajú z veľmi stabilnej línie H295R, ktorá je derivovaná z invazívneho ľudského karcinómu kôry nadobličiek (Gazdar et al., 1990; Staels et al., 1993; Harvey a Everett, 2003). Obsahuje kompletnú sadu kľúčových enzýmov (CYP11A, CYP11B1, CYP11B2, CYP17, CYP19, CYP21 a  $3\beta$ -HSD1,  $3\beta$ -HSD2,  $17\beta$ -HSD1 a  $17\beta$ -HSD2) potrebných k steroidogéze (Sanderson, 2006, Hecker et al., 2007), vďaka čomu je veľmi dobre sledovaná interferencia xenobiotík v podmienkach *in vitro* (Gazdar et al., 1990; Sanderson et al., 2002). Výsledky sme vyjadrili v percentách kontroly, nakoľko sme hladiny hormónov sledovali v podmienkach *in vitro*. Vzhľadom k získaniu presnejších výsledkov sme považovali kontrolnú skupinu (K) za 100 %-nú produkciu testosterónu i progesterónu.

#### Vplyv kadmia ( $\text{CdCl}_2$ ) na produkciu steroidných hormónov

Veľmi rozšíreným a stabilným kontaminantom prostredia je aj kadmium, ktorý má tendenciu sa vo zvýšenej miere akumulovať v obličkách, pečeni, ale predovšetkým v reprodukčných orgánoch. Indikuje ich poškodenie s následnými zmenami v hladinách enzýmov, čím ovplyvňuje steroidogézu.

Nadmerný príjem kadmia môže znížiť hmotnosť semenníkov, hladinu testosterónu, tvorbu spermií a spôsobiť histologické zmeny u cicavcov (Massányi et al., 2009).

Sledovaním produktov steroidogézy bunkovej línie H295R sme zistili priamy vplyv  $\text{Cd}^{2+}$  na množstvo testosterónu, ktorý sa tvorí predovšetkým u samcov v Leydigových bunkách (Massányi et al., 1999; Sanderson, 2006), samic v *theca interna* (Massányi et al., 1999), ale v menšej miere aj v zóne *reticularis* kôry nadobličiek (Sanderson, 2006). Po aplikácii tohto ťažkého kovu sme zaznamenali rozdiely v syntéze steroidného hormónu T adrenokarcinómových buniek medzi kontrolou a experimentálnymi skupinami (obrázok 2).



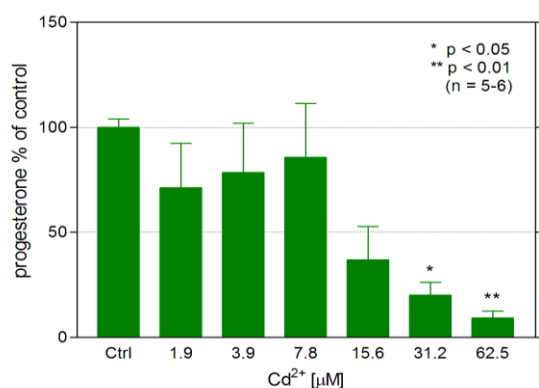
Obrázok 2 Produkcia testosterónu z bunkovej línie H295R po 48h expozícií kadmia ( $\text{CdCl}_2$ ).

Determináciou koncentrácie testosterónu (T) v kultivačnom médiu sme zistili pokles produkcie tohto hormónu vo všetkých pokusných skupinách s prídavkom kadmia. Priemerné koncentrácie testosterónu uvoľneného adrenokarcinómovými bunkami po expozícií  $\text{CdCl}_2$  znázorňujeme v obrázku 2. V experimentálnych skupinách A  $2,21 \pm 0,87\%$ , B  $2,65 \pm 1,37\%$  a C  $4,10 \pm 1,78\%$  sa uvoľnili navzájom podobné množstvá T (tabuľka 1), pričom bolo u nich zistené preukazné zníženie ( $P < 0,01$ ) v porovnaní s hodnotou nameranou v kontrolnej skupine  $14,02 \pm 3,15\%$ . Pri koncentracii  $7,8 \mu\text{M Cd.ml}^{-1}$  kadmium signifikantne znižovalo ( $P < 0,05$ ) produkciu T. V prípade skupiny E bola zaznamenaná z pokusných skupín najvyššia hladina tohto pohlavného hormónu  $13,31 \pm 4,65\%$ . Zníženú produkciu T v kultivovaných Leydigových bunkách po expozícií  $\text{Cd}^{2+}$  pozorovali vo svojich štúdiách aj Ng a Liu 1990 a Laskey a Phelps 1991.

Progesterón (P) je hlavným ovariálnym hormónom (Arnhold et al., 2009), ktorý je detegovaný v granulóznych bunkách vaječníkov prasičiek (Kolesárová et al., 2009a), hydiny (Kolesárová et al., 2009b), v ovariálnych folikulov ošípaných i hovädzieho dobytku (Skarzynski et al., 2008) a v žltom teliesku (Mahajan, 2008). Meraním koncentrácie progesterónu sme zistili pokles vo všetkých experimentálnych skupinách s prídavkom  $\text{CdCl}_2$  pri stanovených koncentráciách (1,9; 3,9; 7,8; 15,6; 31,2; 62,5  $\mu\text{M Cd.ml}^{-1}$ ) v porovnaní s kontrolnou skupinou. Účinok  $\text{CdCl}_2$  na produkciu P prezentujeme na obrázku 3. Od koncentrácie  $>15,6 \mu\text{M Cd.ml}^{-1}$  dochádza k výraznému poklesu tvorby P.  $\text{Cd}^{2+}$  v najvyšších koncentráciách, resp. v pokusných skupinách A  $2,49 \pm 0,90\%$  ( $P < 0,01$ ) a B  $5,34 \pm 1,58\%$  ( $P < 0,05$ ) signifikantne inhiboval produkciu P adrenokarcinómovými bunkami (tabuľka 1).

Paksy et al. (1992) zistili pokles produkcie progesterónu ľudskými folikulovými bunkami po kultivácii s  $\text{Cd}^{2+}$  *in vitro*, pričom až po 24 hodinách dochádzalo k poklesu produkcie P. Ďalšia experimentálna práca Paksy et al. (1999) hodnotí a popisuje zmeny celulárnej morfológie a produkcie progesterónu folikulovými bunkami žien po vystavení kadmium. Autori uvádzajú, že koncentrácia P mohla byť stimulovaná so zvyšovaním koncentrácií FSH. Kadmium znižovalo tvorbu tohto pohlavného hormónu v ovariálnych bunkách bez FSH-stimulácie v závislosti od jeho koncentrácie a doby pôsobenia. FSH ( $100 \text{ ng.cm}^{-3}$ ) chránil bunky pred potlačením produkcie progesterónu  $\text{Cd}^{2+}$ , ktorý ovplyvňoval spojenie a príľnavosť buniek. FSH nedokázal zabrániť morfológickým zmenám vyvolaným týmto toxikantom. Smida et al. (2004) tiež uvádza pokles produkcie P v granulóznych bunkách vyzolovaných z bunkovej línie ošípaných JC-410 po ich kultivácii s vysokými koncentraciami kadmia. Výsledky našej práce tiež poukazujú na fakt, že  $\text{Cd}^{2+}$  ako toxikant inhibuje steroidogézu adrenokarcinómových buniek, v dôsledku čoho dochádza k poklesu sledovaných hormónov. Podobným pokusom sa zaoberal Massányi et al. (2000), ktorý sledoval kultiváciu granulóznych buniek ošípaných s  $\text{Cd}^{2+}$ . Najvyššie uvoľnenie P nastalo v skupine s prídavkom  $10 \text{ ng Cd.ml}^{-1}$  a v prípade skupiny s prídavkom  $20 \text{ ng.ml}^{-1}$   $\text{CdCl}_2$  jeho produkcia poklesla. Okrem ošípaných (Smida et al., 2004) bola dokázaná inhibícia tvorby P kadmium u potkanov (Piasek a Laskey, 1999) i na ľudských

ovariálnych granulóznych bunkách, čo potvrdzujú štúdie Nampoothirihho a Gupty (2006).



Obrázok 3 Produkcia progesterónu z bunkovej línie H295R po 48h expozícií kadmia (CdCl<sub>2</sub>).

Tabuľka 1 Koncentrácie testosterónu a progesterónu po podaní kadmia (CdCl<sub>2</sub>)

Skupina	kontrola	1,9	3,9	7,8	15,6	31,2	62,5
	K	F	E	D	C	B	A
	µM Cd.ml <sup>-1</sup>						
<b>T/Cd</b>							
x	14,02	9,56	13,31	8,82 <sup>C</sup>	4,10 <sup>B</sup>	2,65 <sup>B</sup>	2,21 <sup>B</sup>
minimum	9,22	4,03	8,28	4,97	2,13	1,08	1,02
maximum	18,50	14,66	22,24	12,28	7,12	4,88	3,88
S.D.	3,15	4,26	4,65	2,26	1,78	1,37	0,87
CV (%)	22,49	44,51	34,96	25,66	43,37	51,77	39,36
<b>P/Cd</b>							
x	26,72	23,99	20,97	22,93	9,85	5,34 <sup>C</sup>	2,49 <sup>B</sup>
minimum	15,24	11,77	10,89	8,15	4,88	2,44	1,25
maximum	42,88	37,51	35,07	32,53	12,25	6,88	3,88
S.D.	9,68	10,33	9,17	10,60	2,70	1,58	0,90
CV(%)	36,24	43,05	43,71	46,25	27,37	29,55	36,15

T – testosterón, P - progesterón

x – aritmetický priemer, S.D. – smerodajná odchýlka, CV (%) – variačný koeficient

<sup>A</sup> P<0,001; <sup>B</sup> P<0,01; <sup>C</sup> P<0,05

## 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.

EDQVIST, L.E., FORSBERG, M. 1997. *Clinical Reproductive Endocrinology*. b. m. : Academic Press, 1997. s. 589-599.

FAIL, P.A., PEARCE, S.W., ANDERSON, S.A., GRAY, L.E. 1994. Methoxychlor alters testosterone and LH response to human chorionic gonadotropin or gonadotropin-releasing hormone in male Long-Evans hooded rats. In *Biol. Reprod.*, vol.50, 1994, no. 1, p. 102 (abstr. no. 206).

GAZDAR, A.F., OIE, H.K., SHACKLETON, C.H. CHEN, T.R., TRICHE, T.J., MYERS, C.E., CHROUSOS, G.P., BRENNAN, M.F., STEIN, C.A. LA ROCCA, R.V. 1990. Establishment and characterization of a human adrenocortical carcinoma cell line that expresses multiple

## ZÁVER

Sledovaním jednotlivých stupňov steroidogenézy bunkovej línie H295R sme zistili priamy vplyv kadmia na produkciu testosterónu a progesterónu adrenokarcinómových buniek. Z vyplývajúcich výsledkov našej analýzy môžeme konštatovať, že všetky nami použité koncentrácie ťažkého kovu pôsobili inhibične na koncentráciu sledovaných pohlavných hormónov v kultivačnom médiu. Pravdepodobne sa v dôsledku nízkeho množstva T a P ovplyvňujú ich metabolity, ktorých tvorba je podmienená aktivitou steroidogénnych enzýmov. Výsledky experimentálnej práce zároveň potvrdzujú efekt kadmia ako možného endokrinného disruptora.

pathways of steroid biosynthesis. In *Cancer Research*, vol. 50, 1990, no.17, pp. 5488-5496.

GRACIA, T., HILSCHEROVÁ, K., JONES, P.D., NEWSTED, J.L., ZHANG, X.W., HECKER, M., HIGLEY, E.B., SANDERSON, J.T., YU, R.M.K., WU, R.S.S., GIESY, J.P. 2006. The H295R system for evaluation of endocrine-disrupting effects. In *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 65, 2006, no. 3, pp. 293-305.

HARVEY, P.W., EVERETT, D.J. 2003. The adrenal cortex and steroidogenesis as cellular and molecular targets for toxicity: critical omissions from regulatory endocrine disrupter screening strategies for human health. In *Journal Appl. Toxicol.*, vol. 23, 2003, no. 2, pp.81-87.

HECKER, M., HOLLERT, H., COOPER, R., VINGGAARD, A., AKAHORIS, Y., MURPHY, M., NELLEMAN, CH., HIGLEY, E., NEWSTED, J., WU, R., LAM, P., LASKEY, J., BUCKALEW, A., GRUND, S., NAKAI, M., TIMM, G., GIESY, J. 2007. The OECD validation program of the H295R steroidogenesis assay for

the identification of *in vitro* inhibitors or inducers of testosterone and estradiol production. Phase 2: inter laboratory pre-validation studies. In *Env. Sci. Pollut. Res.*, vol. 14, 2007, pp. 23-30.

HECKER, M., NEWSTED, J.L., MURPHY, M.B., HIGLEY, E.B., JONES, P.D., WU, R.S.S., GIESY, J.P. 2006. Human adrenocarcinoma (H295R) cells for rapid *in vitro* determination of effects on steroidogenesis: Hormone production. In *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 217, 2006, no.1, pp. 114-124.

HEIKKILÄ, M., PELTOKETO, H., LEPPÄLUOTO, J., ILVES, M., VUOLTEENAHO, O. VAINIO, S. 2002. Wnt-4 Deficiency Alters Mouse Adrenal Cortex Function, Reducing Aldosterone Production. In *Endocrinology*, vol. 143, 2002, no. 11, p. 4358-4365.

HILSCEROVÁ, K., JONES, P.D., GRACIA, T., NEWSTED, J.L., ZHANG, X., SANDERSON, J.T., YU, R.M.K., WU, R.S.S., GIESY, J.P. 2004. Assessment of the effects of chemicals on the expression of ten steroidogenic genes in the H295R cell line using real-time PCR. In *Toxicological Science*, vol. 81, 2004, no.1, pp. 78-89.

KOLESÁROVÁ, A., ROYCHOUDHURY, S., SLIVKOVA, J., MASSÁNYI, P., SIROTKIN, A., CAPCAROVÁ, M., MEDVEĐOVÁ, M., KOVÁČIK, J. 2009a. Olovom indukované zmeny v sekrécii hormonálnych látok ovariálnymi granulóznymi bunkami prasničiek *in vitro*. In *Potravinárstvo*, vol. 3, 2009a, pp. 30-34.

KOLESÁROVÁ, A., CAPCAROVA, M., SIROTKIN, A., MASSANYI, P. 2009b. 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., CAPCAROVÁ, M., ARPÁŠOVÁ, H., KALAFOVÁ, A., MASSÁNYI, P., LUKÁČ, N., KOVÁČIK, J., SCHNEIDGENOVÁ, M. 2008b. 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.

LASKEY, J.W., PHELPS, P.V. 1991. Effect of cadmium and other metal cations on *in vitro* Leydig cell testosterone production. In *Toxicol. Applied Pharmacol.*, vol. 108, 1991, pp. 296-306.

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.

MASSÁNYI, P., LUKÁČ, N., STAWARZ, R., ROYCHOUDHURY, S., SLAMEČKA, J., CHLEBEC, I., TOMAN, R., KOVÁČIK, J., BULLA, J. 2009. Environmental concentration of cadmium in rabbit semen and detection of the effect on spermatozoa motility *in vitro*. In *World Applied Sciences Journal (Special Issue for Environment)*, vol. 5, 2009, pp. 21-31.

MASSÁNYI, P., UHRÍN, V., SIROTKIN, A.V., PAKSY, K., FORGÁCS, Zs., TOMAN, R., KOVÁČIK, J. 2000. Effects of cadmium on ultrastructure and steroidogenesis in cultured porcine ovarian granulosa cell. In *Acta Vet. Brno*, vol. 69, 2000, p. 101-106.

MASSÁNYI, P., CIGÁNKOVÁ, V., FABIŠ, M., KOVÁČIK, J., MASSÁNYIOVÁ, K., TOMAN, R. 1999. *Reprodukčná toxikológia*. Nitra : SPU, 1999. 147 s. ISBN 80-7137-641-8.

MILLER, W., TYRELL, J. 1995. The adrenal cortex. In *Endocrinology and Metabolism*. P. Felig, J. Baxter and L. Frohman. New York, McGraw-Hill, p. 555-711.

NAMPOOTHIRI, L.P., GUPTA, P. 2006. Simultaneous effect of lead and cadmium on granulosa cells: a cellular model for ovarian toxicity. In *Reprod. Toxicol.*, vol. 21, 2006, p. 179-185.

NAVRÁTIL, T. – ROHOVEC, J. 2006. Olovo. In *Vesmír*, roč. 85, 2006, č. 9, s. 518-521, ISSN 1214-4029.

NG, T.B., LIU, W.K. 1990. Toxic effect of heavy metals on cells isolated from the rat adrenal and testis *in vitro*. In *Cell Develop. Biol.*, vol. 126, p. 24-28.

PAKSY, K., RAJCZY, K., FORGÁCS, Zs., LÁZÁR, P., BERNARD, A., GÁTI, I., KAÁLL, G.S. 1999. Effect of cadmium on morphology and steroidogenesis of cultured human ovarian granulosa cells. In *J. Appl. Toxicol.*, vol. 17, 1999, no. 5, p. 321-327.

PAKSY, K., VARGA, B., LÁZÁR, P. 1992. Cadmium interferes with steroid biosynthesis in rat granulosa and luteal cells *in vitro*. In *BioMetals*, vol. 5, 1992, pp. 245-250.

PIASEK, M., LASKEY, J.W. 1999. Effects of *in vitro* exposure on ovarian steroidogenesis in rats. In *J. Appl. Toxicol.*, vol. 19, 1999, p. 211-217.

SANDERSON, J.T. 2006. The steroid hormone biosynthesis pathway as a target for endocrine-disrupting chemicals. In *Toxicological Sciences*, vol. 94, 2006, no. 1, pp. 3-21.

SANDERSON, T., BERG, M. 2003. Interactions of xenobiotics with the steroid hormone biosynthesis pathway. In *Pure and Applied Chemistry*, vol. 75, 2003, no. 11-12, p. 1957-1971.

SANDERSON, J.T., BOERMA, J., LANSBERGEN, G.W., van den BERG, M. 2002. Induction and inhibition of aromatase (CYP19) activity by various classes of pesticides in H295R human adrenocortical carcinoma cells. In *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 182, 2002, no. 1, pp. 44-54.

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]

SMIDA, A.D., VALDERRAMA, X.P., AGOSTINI, M.C., FURLAN, M.A., CHEDRESE, J. 2004. Cadmium stimulates transcription of the cytochrome P450 side chain cleavage gene in genetically modified stable porcine granulosa cells. In *Biol. Reprod.*, vol. 70, 2004, p. 25-31.

STAELS, B., HUM, D.W., MILLER, W.L. 1993. Regulation of Steroidogenesis in Ncl-H295 Cells – a Cellular-Model of the Human Fetal Adrenal. In *Molecular Endocrinology*, vol. 7, 1993, no. 3, pp. 423-433.

**Pod'akovanie:**

Práca vznikla za finančnej podpory grantového projektu MŠ SR KEGA101-001SPU-4/2010 a VEGA 1/0532/11.

**Kontaktná adresa:**

Zuzana Kňazická, Department of Animal Physiology, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Slovak University of Agriculture, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra Slovak Republic, tel.: 037 641 4288, e-mail: zuzanaknazicka25@gmail.com

Zsolt Forgács, National Institute of Chemical Safety, Department of Reproductive Toxicology, Budapest H-1450, Hungary, e-mail: dr.forgacs@usa.net

Eva Tvrdá, Department of Animal Physiology, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Slovak University of Agriculture, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra Slovak Republic, e-mail: evina.tvrda@gmail.com

Peter Massányi, Department of Animal Physiology, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Slovak University of Agriculture, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra Slovak Republic, e-mail: massanyi@yahoo.com

Jiřina Kročková, Department of Animal Physiology, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Slovak University of Agriculture, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra Slovak Republic, e-mail: cipko26@yahoo.com

Norbert Lukáč, Department of Animal Physiology, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Slovak University of Agriculture, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra Slovak Republic, e-mail: norolukac@gmail.com