



# Ocena wpływu nanocząstek platyny na steroidogenezę na podstawie oznaczania poziomu testosteronu i 17 $\beta$ -estradiolu w komórkach Leydiga (R2C)<sup>1</sup>

## Evaluation of platinum nanoparticles effect on steroidogenesis based on the determination of testosterone and 17 $\beta$ -estradiol levels in Leydig cells (R2C)<sup>1</sup>

LIDIA ZAPÓR

<https://orcid.org/0000-0002-7398-4608>

e-mail: [lizap@ciop.pl](mailto:lizap@ciop.pl)

JOLANTA SKOWROŃ

<https://orcid.org/0000-0003-4550-5339>

KATARZYNA MIRANOWICZ-DZIERŻAWSKA

<https://orcid.org/0000-0003-0013-5047>

LUIZA CHOJNACKA-PUCHTA

<https://orcid.org/0000-0002-3598-3719>

DOROTA SAWICKA

<https://orcid.org/0000-0001-7096-5965>

Centralny Instytut Ochrony Pracy – Państwowy Instytut Badawczy

Central Institute for Labour Protection – National Research Institute, Warsaw, Poland

### Streszczenie

Coraz popularniejsze zastosowanie nanocząstek platyny (Pt-NPs) powoduje, że mogą one systematycznie uwalniać się do środowiska, przede wszystkim do powietrza (w tym powietrza środowiska pracy), ale także do wody, ścieków i gleby, zarówno z procesów produkcyjnych, jak i podczas ich przetwarzania i stosowania oraz w wyniku utylizacji odpadów. Dane dotyczące toksyczności Pt-NPs są ograniczone. Biorąc pod uwagę zdolność Pt-NPs do bioakumulacji w organizmach żywych, ważne jest poznanie długotrwałych skutków narażenia, jakim jest wpływ na funkcje rozrodcze, w tym produkcję hormonów (testosteronu i 17 $\beta$ -estradiolu). Celem pracy była ocena wpływu Pt-NPs na sekrecję hormonów steroidowych w komórkach Leydiga. W komórkach Leydiga linii R2C pochodzących z jąder szczura oceniano działanie cytotoksyczne Pt-NPs <50 nm, badając ich wpływ na aktywność metaboliczną komórek (test MTT) oraz uszkodzenie błon komórkowych (test NRU). Zaburzenia steroidogenezy w komórkach oceniano poprzez oznaczanie sekrecji testosteronu (T) i 17 $\beta$ -estradiolu (E2), stosując kompetencyjny test ELISA. Pt-NPs działały cytotoksycznie na komórki R2C zależnie od stężenia, ale efekt ten był widoczny tylko w teście MTT (zmniejszenie przeżywalności komórek o 50% notowano przy stężeniach powyżej 250  $\mu\text{g/ml}$ ). Pt-NPs w stężeniach nie działających cytotoksycznie (8 ÷ 125  $\mu\text{g/ml}$ ) powodowały zwiększenie sekrecji T i E2 w porównaniu z kontrolą. Stężenie E2 utrzymywało się na poziomie porównywalnym z działaniem induktora (forskolin). Uzyskane wyniki, chociaż mają charakter przesiewowy, mogą wskazywać na potencjalne działanie modulujące proces steroidogenezy w gonadach pod wpływem Pt-NPs.

**Słowa kluczowe:** nanocząstki platyny, testosteron, 17 $\beta$ -estradiol, komórki Leydiga (R2C).

<sup>1</sup> Opracowano i wydano na podstawie wyników V etapu programu wieloletniego „Poprawa bezpieczeństwa i warunków pracy”, finansowanego w zakresie badań naukowych i prac rozwojowych ze środków Narodowego Centrum Badań i Rozwoju. Projekt nr II.PB.10 pt. „Ocena in vitro aktywności biologicznej wybranych nanostrukturalnych cząstek stałych jako potencjalnych czynników zaburzających funkcjonowanie układu hormonalnego”. Koordynator programu: Centralny Instytut Ochrony Pracy – Państwowy Instytut Badawczy.

This paper is published and based on the results of a research task carried out within the scope of the fifth stage of the National Programme “Improvement of Safety and Working Conditions” supported from the resources of the National Centre for Research and Development. Task no. II.PB.10 entitled “In vitro evaluation of biological activity of selected nanostructured solid particles as potential endocrine disruptors”. The Central Institute for Labour Protection – National Research Institute is the Programme’s main co-ordinator.

## Abstract

Due to the increasingly popular application of platinum nanoparticles (Pt-NPs), they can be continuously released to the environment, mainly to the air (including the air in the working environment), but also to water, wastewater and soil, both from production processes, during their processing and use, and as a result of waste disposal. Pt-NPs toxicity data are limited. Given the ability of Pt-NPs to bioaccumulate in living organisms, it is important to know the long-term effects of exposure, such as the impact on reproductive functions, including hormone (testosterone and 17 $\beta$ -estradiol) production. The aim of this study was to assess the effect of Pt-NPs on steroid hormone secretion in Leydig cells. Cytotoxicity of Pt-NPs < 50 nm was assessed in the R2C Leydig cell line derived from rat testicles by examining their effects on cellular metabolic activity (MTT assay) and cell membrane damage (NRU assay). Abnormalities of steroidogenesis in cells were evaluated by determination of testosterone (T) and 17 $\beta$ -estradiol (E2) secretion with the competitive ELISA test. Pt-NPs exerted a cytotoxic effect on R2C cells depending on the concentration, but this effect was seen only in the MTT assay (50% reduction in cell survival was noted at concentrations above 250  $\mu$ g/ml). Pt-NPs at non-cytotoxic concentrations (8–125  $\mu$ g/ml) increased the secretion of T and E2 as compared with control. The E2 concentration was maintained at a level comparable to the effect of an inducer (forskolin). The results, yet having a screening nature, may indicate a potential steroidogenesis-modulating effect of Pt-NPs in gonads.

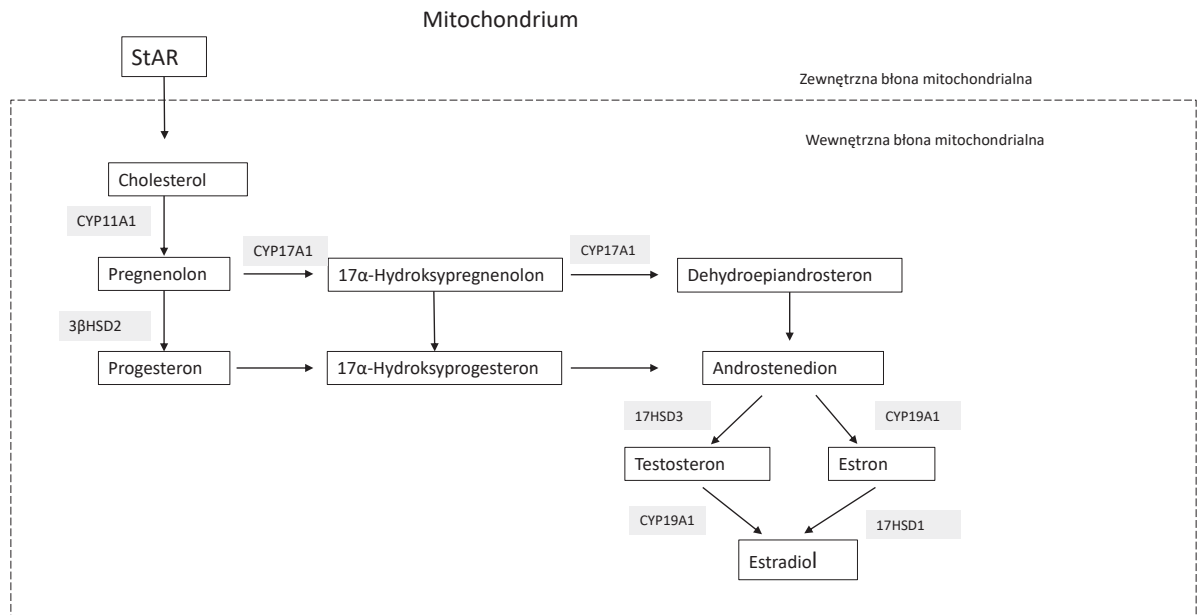
**Keywords:** platinum nanoparticles, testosterone, 17 $\beta$ -estradiol, Leydig cells (R2C).

## WPROWADZENIE

Hormony steroidowe należą do głównych czynników związanych z regulacją reprodukcji kręgowców, wpływają także na układ immunologiczny, odpowiedź na stres, glukoneogenezę oraz szereg procesów powiązanych z rozwojem i wzrostem (Hecker, Giesy 2008; Larson i in. 2014; Lauretta i in. 2019; Maglich i in. 2014). U ludzi występują pięć klas steroidów: glikokortykoidy (kortyzol), mineralokortykoidy (aldosteron) oraz hormony płciowe (gestageny, estrogeny i androgeny). Proces syntezy hormonów steroidowych (steroidogeneza) zachodzi w korze nadnerczy, gonadach i łożysku. Związkiem wyjściowym do powstawania hormonów steroidowych jest cholesterol, przenoszony w krwiobiegu przez lipoproteiny o niskiej gęstości. Kompleksy powstałe po związaniu cholesterolu z receptorami lipoprotein o niskiej gęstości są przenoszone do komórek i hydrolizowane w lizosomach, a następnie cholesterol jest uwalniany do cytoplazmy komórek. W pierwszym etapie steroidogenezy zachodzącej w komórkach, cholesterol jest transportowany z zewnętrznej do wewnętrznej błony mitochondrialnej za pomocą białka regulatorowego StAR (*steroidogenic acute regulatory protein*), (ryc. 1). Następnie cholesterol staje się substratem jednego z enzymów cytochromu P450 (CYP11A1), który katalizuje konwersję cholesterolu do pregnenolonu. Pregnenolon dyfunduje do retikulum endoplazmatycznego gładkiego,

gdzie przy udziale 3-dehydrogenazy beta-hydroksysteroidowej (3 $\beta$ HSD2) zostaje przekształcony w progesteron. CYP17A1 katalizuje 17-hydroksylację pregnenolonu i progesteronu do 17 $\alpha$ -hydroksy związków pośrednich prowadzących do powstawania hormonu dehydroepiandrosteronu (DHEA), a przy udziale dehydrogenazy 17-beta-hydroksysteroidowej (17 $\beta$ HSD) do testosteronu. Testosteron jest zarówno hormonem pośrednim, jak i produktem końcowym szlaku przekształceń. 17 $\beta$ -Estradiol jest przekształcany z testosteronu przez enzym aromatazę (CYP19A1), a alternatywnie może być przekształcany przez 17 $\beta$ HSD z estronu, hormonu wytwarzanego w wyniku działania aromatazy na androstendion. Testosteron (T) i 17 $\beta$ -estradiol (E2) są uważane za końcowe hormony szlaku steroidogenezy (Haggard i in. 2018; Larson i in. 2014; Maglich i in. 2014; Simon i in. 2017; Zirkin, Papadopoulos 2018).

Badania in vitro wpływu ksenobiotyków na steroidogenezę skupiają się na takich aspektach, jak: potencjalne interakcje ksenobiotyków z receptorami dla hormonów, ocena aktywności enzymów z rodziny cytochromu P450 (np. aromatazy, CYP19A1) i ocena sekrecji końcowych produktów szlaku enzymatycznego, czyli poszczególnych hormonów (Larson i in. 2014; Lauretta i in. 2019; Nakano i in. 2016).



Rycina 1. Schemat steroidogenezы w gonadach męskich (komórki Leydiga), (na podstawie: Zirkin, Papadopoulos 2018)

Unikalnym modelem *in vitro* badania wpływu ksenobiotyków na steroidogenezę nadnerczową jest ludzka linia NCI-H295R, wyprowadzona z raka kory nadnerczy (Ahmed i in. 2018; Karmaus i in. 2016; Maglich i in. 2014; Nakano i in. 2016; Nielsen i in. 2012; OECD 2011; Strajhar i in. 2017; Wang, Rainey 2012). Badania steroidogenezы na tej linii zostały pozytywnie zwalidowane i opublikowane w postaci metody OECD nr 456 (Hecker i in. 2011; OECD 2011; Wang, Rainey 2012). Z kolei do badań steroidogenezы gonadalnej wykorzystuje się syntetyzującą aromatazę linię komórkową pochodzącą z: jajników (KGN), łożyska (JEG-3 i JAR) lub jąder (R2C, TM3, MA-10, K9, BLTK-1), często też stosuje się test wykorzystujący ludzką łożyskową frakcję mikrosomalną (Abdou i in. 2014; Bara, Kaul 2018; Engeli i in. 2018; Odermatt i in. 2016; Simon i in. 2017; Young i in. 2017; Zirkin, Papadopoulos 2018).

Jednym z modeli *in vitro* do przesiewowego badania związków zakłócających proces steroidogenezы w gonadach są odpowiedzialne za produkcję testosteronu komórki Leydiga, występujące w przestrzeni śródmiąższowej jąder samców kręgowców. Najczęściej do badań wykorzystuje się ustalone linie komórek Leydiga pochodzące od gryzoni, głównie myszy i szczurów (Botteri Principato i in. 2018; Chen i in. 2016; Engeli i in. 2018; Heneweer i in. 2004; Leisegang, Henkel 2018; Odermatt i in. 2016; Zirkin, Papadopoulos 2018).

Isolowane z jąder szczurów komórki Leydiga linii R2C do produkcji hormonów steroidowych (głównie progesteronu) w odróżnieniu od analogicznych komórek pochodzących z jąder myszy nie wymagają stymulacji czynnikiem luteinizującym (Zirkin, Papadopoulos 2018). Wykazują też wysoką ekspresję genów odpowiedzialnych za produkcję białka StAR, a ich mitochondria zawierają dużo większy poziom cholesterolu niż komórki mysie (Rao i in. 2003). Badania przeprowadzone przez Heneweer i in. (2004) wykazały, że komórki Leydiga linii R2C są bardziej wrażliwe na działanie inhibitorów aromatazy w porównaniu z linią NCI-H295R zalecaną do badań steroidogenezы nadnerczowej (OECD 2011).

Postępy, jakie dokonały się w ostatnich latach w dziedzinie nanotechnologii, doprowadziły do opracowania wielu rodzajów nanostruktur/nanomateriałów mających zastosowanie w różnych sektorach przemysłowych, biomedycynie oraz w produktach dostępnych dla konsumentów. Postępujący rozwój nanotechnologii niesie za sobą potencjalne korzyści, jednak wzbudza obawy dotyczące możliwych skutków toksykologicznych w układach biologicznych i środowisku. Badania eksperymentalne *in vitro* i *in vivo* potwierdzają, że nanomateriały mogą inicjować toksyczność na poziomie subkomórkowym, komórkowym oraz na poziomie całego organizmu (Zapór 2016; 2018;

Zapór, Oberbek 2020). Coraz więcej badań wskazuje, że nanomateriały nie są obojętne dla zdrowia człowieka. Mogą powodować m.in. stany zapalne i zmiany zwłóknieniowe tkanki mięśniowej płuc, zmiany w układzie sercowo-naczyniowym, nerwowym, immunologicznym, zmiany morfologiczne w narządach, w których ulegają kumulacji, i uszkodzenia genotoksyczne. Mogą też działać szkodliwie na rozwój płodu i rozrodczość oraz niekorzystnie wpływać na mikrobiotę w układzie pokarmowym i oddechowym człowieka (Borisova 2018; Fröhlich, Salar-Behzadi 2014; Kuijpers i in. 2018; Larese Filon i in. 2016; Pietroiusti i in. 2018; Poh i in. 2018; Schulte i in. 2019; Stapleton i in. 2018; Stone i in. 2017; Umezawa i in. 2018; Zapór, Oberbek 2020). Mało rozpoznany w badaniach naukowych obszarem dotyczącym zagrożeń dla zdrowia i środowiska, jakie mogą stanowić nanomateriały, jest ich działanie na układ hormonalny człowieka (Pietroiusti i in. 2018; Priyam i in. 2018).

Do nanomateriałów o coraz większym zastosowaniu zarówno przemysłowym, jak i konsumenckim należą nanocząstki platyny (Pt-NPs). Pt-NPs są stosowane w elektrochemii i elektronice, w metalurgii i motoryzacji (jako katalizatory w silnikach samochodowych), jako katalizatory w przemyśle petrochemicznym. W medycynie i diagnostyce medycznej wykorzystuje się je jako leki kliniczne (w chorobach nowotworowych, w chorobie Parkinsona), nośniki leków, biosensory, środki antyseptyczne, środki kontrastowe i fototerapeutyczne. Wchodzą w skład implan-

tów stomatologicznych, mają też zastosowanie w kosmetologii (Czubacka, Czerczak 2019; Demir i in. 2020; Jeyaraj i in. 2019; Labrador-Rached i in. 2018).

Coraz większe zastosowanie Pt-NPs powoduje, że mogą one systematycznie uwalniać się do środowiska, przede wszystkim do powietrza (w tym powietrza środowiska pracy), ale także do wody, ścieków i gleby, zarówno z procesów produkcyjnych, jak i podczas ich przetwarzania i stosowania oraz w wyniku utylizacji odpadów. Pt-NPs, szczególnie te stosowane jako katalizatory spalin, mogą ulegać depozycji w poszczególnych kompartmentach środowiska, zwłaszcza że nie ulegają biodegradacji, przez co stanowią zagrożenie dla organizmów żywych (Demir i in. 2020; Thangam, Veeramani 2015). Dane dotyczące toksyczności Pt-NPs potwierdzają działanie prozapalne i nefrotoksyczne oraz możliwość bioakumulacji w płucach, wątrobie i śledzionie (Czubacka, Czerczak 2019; Mukherjee i in. 2021). Nieliczne wyniki badań wskazują, że Pt-NPs mogą działać endokrynnie (Labrador-Rached i in. 2018).

Biorąc pod uwagę zdolność Pt-NPs do bioakumulacji w organizmach żywych, ważne jest poznanie długotrwałych skutków narażenia, jakim jest wpływ na funkcje rozrodcze, w tym produkcję hormonów (testosteronu i 17 $\beta$ -estradiolu).

Celem pracy była ocena wpływu nanocząstek platyny na sekrecję hormonów steroidowych w komórkach Leydiga linii R2C.

## CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

### Materiały i metody

#### Odczynniki i media hodowlane

Do badań stosowano nanocząstki platyny (Pt-NPs) <50 nm w zawiesinie o stężeniu 1 mg/ml (Pt-NPs), (Nanocomposix), stabilizowane cytrynianem sodu o stężeniu 0,05%. Forskolina, prochloraz oraz DMSO pochodziły z firmy Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Komórki R2C (ATCC® CCL-97™) hodowano w medium Ham's F-12 Nutrient mixture (Gibco) z dodatkiem 10-procentowej płodowej surowicy cielęcej FBS (Fetal Bovine Serum), (Sigma-Aldrich).

Do przeprowadzenia testów kolorymetrycznych stosowano: 0,4-procentowy roztwór błękitu trypanu (numer kat. T-8154); NRU (Neutral Red Solution), (numer kat. N-2889); MTT [bromek 3-(4,5-dimetylotiazolo-2-ylo)-2,5-difenylo-tetrazolu], (numer kat. M-5655); DMSO (dimetylo-sulfotlenek), (numer kat. D-5879); bufor Hanka (Hank's Balanced Salt Solution), (numer kat. H-8264); Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (numer kat. D-8537) firmy Sigma-Aldrich; zbuforowany roztwór soli fizjologicznej (PBS, Biomed-Lublin), etanol techniczny firmy Avantor Performance Materials Poland SA.



Sekrecję hormonów steroidowych – testosteronu (T) i 17 $\beta$ -estradiolu (E2) oznaczano testem kompetencyjnym ELISA (Enzyme-Linked Immune-Sorbent Assay) za pomocą komercyjnego zestawu firmy Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA (testosteron, numer kat. 582701; 17 $\beta$ -estradiol, numer kat. 582251).

#### **Prowadzenie hodowli komórkowych**

Komórki linii R2C (ATCC<sup>®</sup> CCL-97<sup>™</sup>) pochodzące z raka komórek Leydiga wyizolowanych z jądra szczura (*Rattus norvegicus*) zakupiono w banku komórek ATCC (American Type Culture Collection), (LGC Standards Sp. z o.o.).

Komórki hodowano w warunkach sterylnych, w inkubatorze z dostępem 5% CO<sub>2</sub>, w stałej temperaturze 37°C i wilgotności 95%, w naczyniach hodowlanych o powierzchni wzrostu hodowli wynoszącej 25 oraz 75 cm<sup>2</sup> (NUNC). Komórki hodowano w postaci pojedynczej warstwy na dnie naczynia (*monolayer*). Wzrost hodowli oceniano pod mikroskopem. Po uzyskaniu 60 ÷ 80% konfluencji hodowli (procent powierzchni naczynia hodowlanego zajętego przez komórki) komórki pasażowano. W celu przeprowadzenia pasażu komórki przepłukiwano 0,5 mM EDTA, a następnie poddawano trawieniu z udziałem 0,25-procentowej trypsyny w temperaturze 37°C. Działanie enzymu hamowano przez płukanie komórek medium hodowlanym. Komórki następnie wirowano dwukrotnie (125 × g, 5 min) i z wykorzystaniem 0,4-procentowego roztworu błękitu trypanu oceniano ich żywotność za pomocą mikroskopu świetlnego z odwróconą optyką (Nikon TMS-F, Japonia).

#### **Ocena cytotoksycznego działania Pt-NPs oraz wyznaczenie stężeń niskotoksycznych**

Roztwory Pt-NPs przygotowywano w kompletnym medium hodowlanym bezpośrednio przed wykonaniem doświadczenia. Roztwory (zawiesiny) przed nakropieniem na komórki mieszano (Vortex) przez ok. 1 min w celu zapewnienia ich jednorodności.

Przed przystąpieniem do badań cytotoksyczności sporządzano zawiesinę komórek. W tym celu komórki rozdzielano za pomocą trypsyny (0,25-procentowy roztwór trypsyny z EDTA), a następnie zawieszano w świeżym medium hodowlanym i poddawano wirowaniu (200 × g przez 5 min), aby usunąć komórki uszkodzone w procesie trypsynizacji. Przed rozpoczęciem właściwego doświadczenia w otrzymanej zawieszynie oceniano

przeżywalność komórek, stosując test wychwytu błękitu trypanu. W tym celu komórki umieszczano w komorze Bürkera i komórki żywe (niezabarwione) oraz uszkodzone (zabarwione na niebiesko) liczono przy użyciu mikroskopu świetlnego z odwróconą optyką (Nikon TMS-F, Japonia), stosując 100-krotne powiększenie.

Na podstawie otrzymanych wyników obliczano tzw. współczynnik przeżywalności (stosunek komórek żywych do uszkodzonych). Do dalszych badań stosowano zawiesinę komórek, w której liczba uszkodzonych komórek nie przekraczała 20%. Następnie zawiesinę komórek doprowadzano do stężenia wymaganego w doświadczeniu.

Po 48-godzinnym narażeniu komórek cytotoksyczne działanie badanych substancji analizowano za pomocą testu redukcji soli tetrazolowej MTT (test MTT), określającego aktywność metaboliczną komórek wyrażoną zdolnością pochłaniania barwnika, czyli żółtej soli tetrazolowej (MTT) [bromek 3-(4,5-dimetylotiazolo-2-yl)-2,5-difenylo-tetrazolu], i redukcji go, głównie w mitochondriach, przy udziale dehydrogenazy bursztynianowej do krystalicznego związku formazanowego o fioletowo-granatowym zabarwieniu (INVITTOX nr 17), oraz testu pochłaniania czerwieni obojętnej oceniającego integralność błon komórkowych (test NRU, Neutral Red Uptake Assay), którego zasada opiera się na zdolności żywych, nieuszkodzonych komórek do pochłaniania barwnika, czyli czerwieni obojętnej (chlorowodorek 3-amino-7-dimetylo-amino-2-metylofenazy), który gromadzi się w lizosomach (INVITTOX nr 64).

Komórki R2C zawieszano w medium hodowlanym w stężeniu 1 · 10<sup>5</sup> żywych komórek/ml, a następnie w mikropłytkę 96-zagłębieniowej umieszczano po 100  $\mu$ l zawiesiny w każdym zagłębieniu. Po 24 h inkubacji (temp. 37°C; 5% CO<sub>2</sub>; 95% wilgotności), podczas której komórki przyklejały się do dna mikropłytki, aspirowano medium z dna komórek i do każdego zagłębienia mikropłytki dodawano po 100  $\mu$ l roztworu (zawiesiny) badanej substancji o określonym stężeniu. Każdą próbkę nanoszono w dziewięciu powtórzeniach. Kontrolę stanowiły komórki inkubowane w medium odżywczym pozbawionym ksenobiotyków. Mikropłytki umieszczano w inkubatorze CO<sub>2</sub> na 24 h, po czym wykonywano testy MTT lub NRU zgodnie z zaleceniami protokołów INVITTOX nr 17 (MTT) lub nr 64 (NRU).

Stężenie barwników w próbach badanych i kontrolnych oznaczano wobec próby ślepej (którą stanowił barwnik w zagłębieniach mikroplątki bez komórek) na czytniku do mikroplątek SYNERGY 2 (BioTek Instruments, Inc.), przy długości fali 570/630 nm (MTT) lub 540/450 nm (NRU).

Na podstawie pomiarów absorbancji wyliczono procent przeżywalności komórek (żywność) narażanych na Pt-NPs w porównaniu z kontrolą według wzoru:

$$\text{żywność [\%]} = \left( \frac{\text{śr. absorbancja próby badanej}}{\text{śr. absorbancja próby kontrolnej}} \right) \times 100\%$$

Przed przystąpieniem do badań cytotoksyczności sprawdzano możliwość interferencji nanocząstek z odczynnikami testu. W tym celu przeprowadzono inkubację badanych nanomateriałów bez obecności komórek, a następnie wykonywano test MTT lub NRU (Kroll i in. 2012). Badanie cytotoksyczności wykonywano w trzech powtórzeniach.

Zmiany cytotoksyczne zachodzące w komórkach po narażeniu na niskie stężenia Pt-NPs (4 µg/ml) oceniano również techniką mikroskopii holotomograficznej (HTM). W celu uwidocznienia struktur mitochondrialnych komórki inkubowano z barwnikiem MitoView (Biotium) w stężeniu 100 nM. Do wizualizacji lizosomów zastosowano barwnik LysoView (1: 1000, Biotium), jądra komórkowe barwiono za pomocą odczynnika DAPI (1: 1000, Sigma-Aldrich).

#### **Badanie wpływu Pt-NPs na steroidogenezę w komórkach R2C na podstawie testu oznaczania T i E2**

Czynności związane z wykonaniem badania obejmowały:

- kontrolę jakości układu badawczego, czyli ocenę zdolności komórek do wydzielania

hormonów T i E2 pod wpływem działania silnego induktora (forskolina) lub inhibitora (prochloraz) steroidogenezy,

- narażenie komórek R2C na szereg stężeń Pt-NPs,
- badanie żywotności komórek po narażeniu na Pt-NPs.

#### **Kontrola jakości układu badawczego**

Na płytce 24-dołkowej nanoszono zawiesinę komórek o stężeniu 150 000 komórek/ml w medium hodowlanym w objętości 1 ml na dołek. Kontrola jakości układu badawczego zawierała:

- próby ślepe (komórki nienarażane),
- próby kontrolne, które stanowiły komórki w medium z dodatkiem rozpuszczalnika – 0,1-procentowy DMSO (*solvent control*, SC),
- dwa stężenia forskoliny (FOR), (1 i 10 µM) – substancja silnie indukująca syntezę hormonów 17β-estradiolu (E2) i testosteronu (T),
- dwa stężenia prochlorazu (PRO), (0,1 i 1 µM) – silny inhibitor syntezy hormonów 17β-estradiolu (E2) i testosteronu (T),
- metanol (MeOH), (70%) – jako kontrola dodatnia cytotoksyczności (powoduje śmierć 100% komórek) w teście żywotności/cytotoksyczności.

Układ płytki kontroli jakości przedstawiono w tabeli 1.

Po 48-godzinnym narażeniu komórek na badane substancje pożywkę przenoszono do probówek Eppendorfa i przechowywano w temperaturze –80°C do czasu analizy ELISA, natomiast w każdym dołku mikroplątki natychmiast po usunięciu pożywki oceniano żywotność komórek testem

**Tabela 1.** Układ płytki kontroli jakości do celów badania efektywności nienarażonych komórek R2C i komórek narażonych na działanie znanych inhibitorów (PRO – prochloraz) i stymulatorów (FOR – forskolina) produkcji 17β-estradiolu i testosteronu

	1	2	3	4	5	6
A	Próba ślepa (a)	Próba ślepa (a)	Próba ślepa (a)	Próba ślepa (a) (+ MeOH) (b)	Próba ślepa (a) (+ MeOH) (b)	Próba ślepa (a) (+ MeOH) (b)
B	DMSO (c) 1µl	DMSO (c) 1µl	DMSO (c) 1µl	DMSO (c) 1µl (+ MeOH) (b)	DMSO (c) 1µl (+ MeOH) (b)	DMSO (c) 1µl (+ MeOH) (b)
C	FOR 1µM	FOR 1µM	FOR 1µM	PRO 0,1 µM	PRO 0,1 µM	PRO 0,1 µM
D	FOR 10 µM	FOR 10 µM	FOR 10 µM	PRO 1 µM	PRO 1 µM	PRO 1 µM

Objaśnienia: (a) Komórki w dołkach próby ślepej otrzymują jedynie podłoże (bez rozpuszczalnika, DMSO); (b) Metanol (MeOH) dodawany po zakończeniu narażenia i usunięciu podłoża z tych dołków; (c) DMSO – kontrola rozpuszczalnika (komórki nienarażane w medium hodowlanym zawierającym 0,1-procentowy DMSO); PRO – prochloraz, FOR – forskolina.

MTT. Kontrolę jakości układu badawczego wykonywano każdorazowo w przypadku stosowania do badań komórek z nowego rozmrożonego pasażu.

#### **Narażenie komórek na Pt-NPs**

Na płytce 24-dołkowej wysiewano komórki w stężeniu 150 000 komórek/ml w medium hodowlanym w objętości 1 ml na dołek. Po 24 h inkubacji pożywkę usuwano, a na płytkę наносono zawiesinę Pt-NPs w medium hodowlanym z dodatkiem rozpuszczalnika, tj. 0,1-procentowego DMSO w pięciu stężeniach, w trzech powtórzeniach. Zakres stężeń wynosił: 8 ÷ 125 µg/ml.

Komórki narażano przez 48 h, po czym pożywkę przenoszono do probówek Eppendorfa i przechowywano w temp. -80°C do czasu analizy ELISA, a w każdym dołku mikro płytki oceniano żywotność komórek testem MTT.

Na podstawie pomiarów absorbancji wyliczono procent przeżywalności komórek (żywotność) narażonych na Pt-NPs w porównaniu z kontrolą według wzoru:

$$\% \text{ żywych komórek} = \frac{\text{śr. OD bad.} - \text{śr. OD MeOH}}{\text{śr. OD (SC)} - \text{śr. OD MeOH}} \times 100\%$$

gdzie:

śr. OD bad. – średnia absorbancja próby badanej;  
śr. OD MeOH – średnia absorbancja w dołkach, w których podawano MeOH (100% martwych komórek);

śr. OD (SC) – średnia absorbancja w dołkach zawierających kontrolę rozpuszczalnika.

#### **Oznaczanie stężeń hormonów T i E2 testem kompetencyjnym ELISA**

Do oznaczeń poziomu T i E2 zastosowano kompetencyjne testy ELISA (Cayman). Zasada testu kompetencyjnego (rywalizującego) polega na dodawaniu do płytki opłaszczonej antygenem zarówno surowicy, jak i specyficznego wobec antygeny przeciwciała wyznakowanego enzymem. Między przeciwciałami pochodzącymi z surowicy a przeciwciałami wyznakowanymi następuje współzawodnictwo (kompetencja), co pozwala określić ilość przeciwciał w surowicy; im mniej przeciwciał wyznakowanych połączy się z antygenem, tym słabsza reakcja barwna jest obserwowana.

Zakres oznaczalności w teście oznaczania E2 wynosił 0,61 ÷ 10 000 pg/ml, czułość: 20 pg/ml. Zakres oznaczalności w teście oznaczania T wynosił 3,9 ÷ 500 pg/ml, czułość (80% B/B<sub>0</sub>): 6 pg/ml. Do pomiaru absorpcji użyto automatycznego czytnika SYNERGY-2 firmy BioTek Instruments (USA) przy długości fali zalecanej przez producenta (410 nm). Ekstrakty pożywki hodowlanej przed użyciem w testach ELISA rozcieńczono: 1: 5, 1: 10 i 1: 50 w przypadku oznaczeń E2 oraz 1: 50, 1: 100 i 1: 500 dla T.

#### **Analiza danych**

Do analizy stężeń hormonów brano pod uwagę tylko wyniki pomiarów pochodzące z dołków płytki (studzienek), w których cytotoksyczność była mniejsza niż 20% (w przypadku ponad 20-procentowej cytotoksyczności następuje zahamowanie procesu steroidogenezy). Aby ocenić względne zwiększenie/zmniejszenie produkcji hormonów, wyniki normalizowano do średniej wartości stężeń hormonów w kontroli, którą stanowiły komórki nienarażane z medium zawierającym 0,1-procentowy DMSO (kontrola rozpuszczalnika), i wyrażano jako krotność zmiany w stosunku do kontroli rozpuszczalnika na każdej płytce testowej według wzoru:

$$\text{względna zmiana} = \frac{\text{stężenie hormonu w dołku}}{\text{średnie stężenie hormonu we wszystkich dołkach z kontrolą rozpuszczalnika}}$$

Wszystkie eksperymenty przeprowadzono w dwóch niezależnych próbach. Dane wyrażono jako średnia ± błąd standardowy średniej. Testy cytotoksyczności oraz kontrolę jakości układu badawczego przeprowadzono w trzech niezależnych powtórzeniach. Istotność różnic między wartościami średnimi a próbami kontrolnymi oceniano za pomocą niesparowanego testu t-Studenta przy  $p < 0,05$ . Do analizy statystycznej wykorzystano oprogramowanie Statistica w wersji 7.1.

## OMÓWIENIE WYNIKÓW

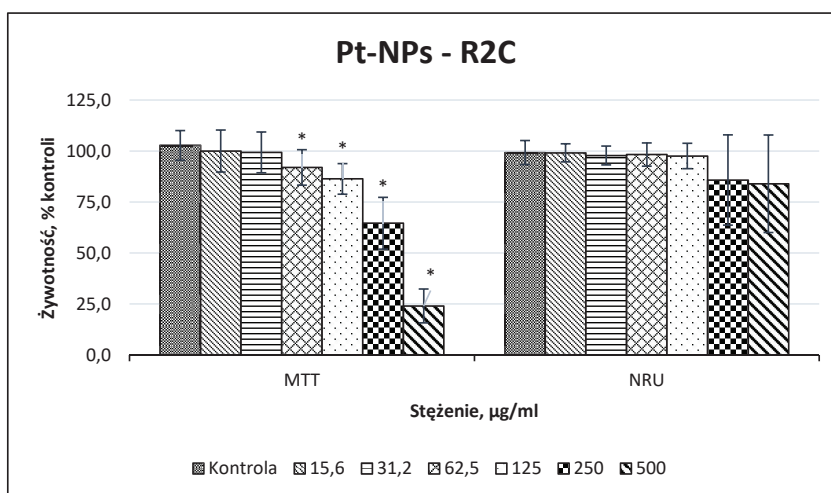
### Ocena działania cytotoksycznego

Wpływ nanocząstek platyny (Pt-NPs) na przeżywalność komórek Leydiga (R2C) ocenianą za pomocą testów MTT i NRU po 48-godzinnym narażeniu przedstawiono na rycinie 2, natomiast zmiany morfologiczne zachodzące pod wpływem narażenia komórek R2C oceniane techniką mikroskopii holotomograficznej zobrazowano na rycinach 3 i 4.

Otrzymano duże różnice w działaniu cytotoxycznym w zależności od stosowanego testu. Pt-NPs w teście oceniającym aktywność mitochondriów (MTT) wykazały pełny profil działania toksycznego, tj. zmniejszenie żywotności komórek w zakresie 20 ÷ 80%. Stopniowe zmniejszenie przeżywalności komórek w stosunku do kontroli notowano przy stężeniach powyżej 31 µg/ml. Zmniejszenie przeżywalności komórek o 50% notowano przy stężeniach powyżej 250 µg/ml. Stężenia uznane za niskotoksyczne (powodujące zmniejszenie żywotności komórek o 20%) mieściły się w zakresie do 125 µg/ml. Test oceniający integralność błon lizosomów (NRU) nie uwidocznił zmian cytotoxycznych pod wpływem narażenia na żadne ze stosowanych stężeń Pt-NPs.

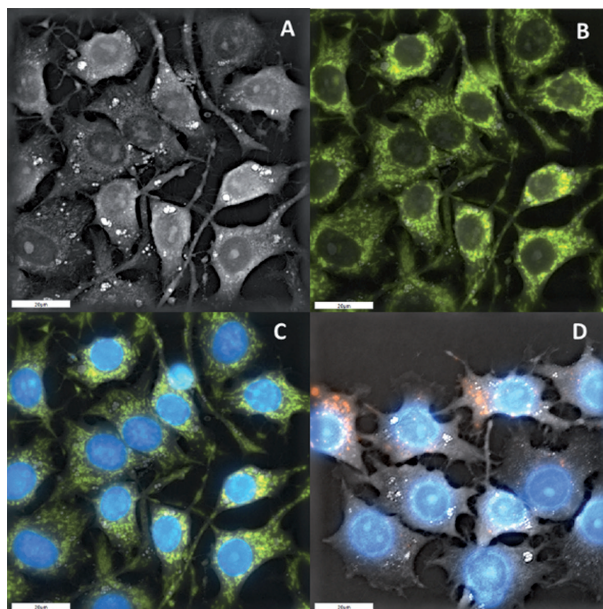
Na rycinie 3 przedstawiono obraz prawidłowych, nienarażanych komórek Leydiga R2C (komórki kontrolne) w świetle przechodzącym oraz po wybarwieniu organelli komórkowych barwnikami fluorescencyjnymi. Komórki charakteryzują się regularnym kształtem i gęstą cytoplazmą, w której widoczne są mitochondria oraz jądra komórkowe z regularnymi, nienaruszonymi błonami. Komórki R2C narażone na działanie Pt-NPs (ryc. 4) mają zmieniony i wydłużony kształt, charakteryzują się zmniejszoną w stosunku do kontroli ilością cytoplazmy, wydłużonymi wypustkami oraz rozluźnieniem połączeń między komórkami. W obrazie mikroskopowym widoczna jest obkurczona cytoplazma oraz zgromadzone w obrębie cytoplazmy i jądra komórkowego mitochondria, obserwowano również zwiększenie liczby lizosomów.

Ocena cytotoxyczności substancji chemicznych jest podstawowym narzędziem w określaniu ich potencjalnych skutków na poziomie komórkowym. Najczęściej stosowaną miarą cytotoxyczności (tzw. cytotoxyczności podstawowej) jest wartość  $IC_{50}$  (stężenie substancji, które powoduje śmierć 50% komórek w hodowli). Jednak do pogłębianych badań toksyczności (np. badania stresu oksydacyjnego, reakcji zapalnych, genotokyczności, steroidogenezy itp.) istotne jest określenie

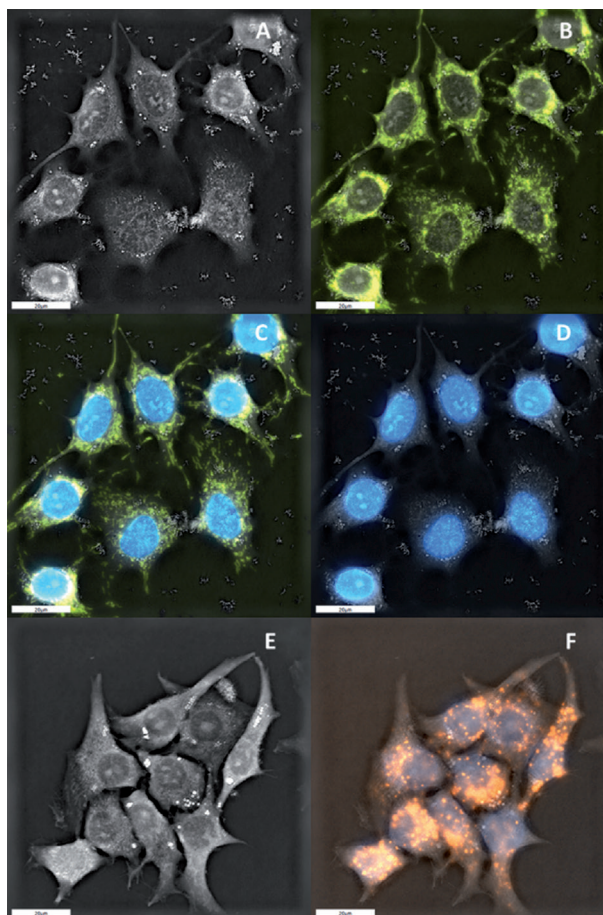


**Rycina 2.** Wpływ nanocząstek platyny (Pt-NPs), (<50 nm) na żywotność komórek R2C ocenianą testem MTT i NRU po 48 h narażenia. Dane wyrażono jako procentową żywotność komórek narażanych na Pt-NPs w stosunku do komórek kontrolnych. Każdy punkt reprezentuje średnią i odchylenie standardowe z 3 niezależnych eksperymentów. (\*) Różnice istotne statystycznie ( $p < 0,05$ )





**Rycina 3.** Komórki R2C nie poddane działaniu żadnego związku (kontrola). A – obraz w świetle przechodzącym; B, C – komórki z uwidocznionymi mitochondriami (kolor zielony) oraz jądrami komórkowymi (kolor niebieski). D – komórki z wyznakowanymi lizosomami (kolor pomarańczowy) i jądrami komórkowymi (kolor niebieski). Powiększenie 60 $\times$



**Rycina 4.** Komórki R2C narażane na nanocząstki platyny (Pt-NPs) (<50 nm) w stężeniu ok. 4  $\mu$ g/ml. A, E – obraz komórek w świetle przechodzącym; B, C – komórki z uwidocznionymi mitochondriami (kolor zielony); C, D – komórki z wyznakowanymi jądrami komórkowymi (kolor niebieski); F – komórki z uwidocznionymi lizosomami (kolor pomarańczowy). Powiększenie 60 $\times$

stężeń subletalnych, w których substancja działa słabo cytotoksycznie. Na takie działanie wskazują stężenia substancji powodujące zmniejszenie żywotności komórek o 20% w testach cytotoksyczności (OECD 2011). W przeprowadzonym badaniu obserwowano bardzo duże różnice w zakresie stężeń cytotoksycznych w zależności od stosowanej metody badawczej. Test MTT wykazał większą czułość (pełny profil działania toksycznego). Dużą dysproporcję w działaniu cytotoksycznym nanocząstek platyny obserwowano też w zależności od typu komórek. Komórki pęcherzyków płucnych A549 narażone na Pt-NPs (25 nm) traciły żywotność już przy stężeniu 1 µg/ml, podczas gdy komórki oskrzelików BEAS-2B były całkowicie niewrażliwe na działanie cząstek (Diabaté i in. 2009). Podobnie w komórkach (monocytach) THP-1 nie obserwowano zmian cytotoksycznych po narażeniu na Pt-NPs o wielkości cząstek 5 i 20 nm w stężeniach do 100 µg/ml (Gatto i in. 2018). W badaniach na komórkach wątroby HepG2 prowadzonych przez Labrador-Rached i in. (2018) obserwowano 25-procentowe zmniejszenie żywotności komórek po narażeniu na Pt-NPs (50 nm) w stężeniu 100 µg/ml. Demir i in. (2020) w badaniach na komórkach jajowych ryb (linia EPC i BF) narażonych na Pt-NPs (4 ÷ 9 nm) obserwowali istotne statystycznie zmiany wskazujące na cytotoksyczne działanie platyny w zależności od stosowanej metody badawczej i rodzaju nanocząstek. Pierwsze zmiany cytotoksyczne (ok. 20% śmiertelności komórek) oceniane testem aktywności metabolicznej (Almar Blue) obserwowano przy

stężeniach Pt-NPs wynoszących 100 ÷ 150 µg/ml, natomiast destrukcja błon lizosomalnych (test NRU) następowała przy stężeniu ok. 200 µg/ml. Nanocząstki Pt powlekane PVP nie powodowały zmian cytotoksycznych w zakresie stężeń wynoszącym 0,325 ÷ 200 mg/l.

### Ocena wpływu nanocząstek platyny na steroidogenezę w komórkach R2C na podstawie testu oznaczania T i E2

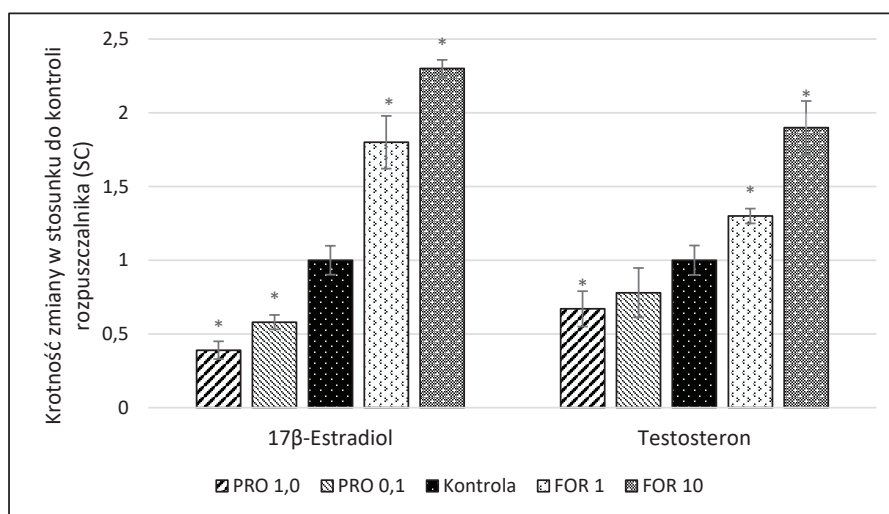
#### Kontrola jakości układu badawczego

Na rycinie 5 przedstawiono zmiany w sekrecji testosteronu (T) i 17β-estradiolu (E2) w komórkach R2C poddanych działaniu substancji indukującej (forskolina, FOR) lub hamującej (prochloraz, PRO) sekrecję hormonów, wyrażone jako wartość względna w stosunku do kontroli rozpuszczalnika (krotność zmian w stosunku do kontroli rozpuszczalnika).

Badane komórki R2C wykazywały zdolność zarówno do indukcji, jak i inhibicji produkcji hormonów.

W komórkach narażonych na induktor (FOR) obserwowano istotne statystycznie w stosunku do kontroli i zależne od stężenia zwiększenie poziomu obu hormonów. Przy najwyższym stężeniu FOR (10 µM) krotność zwiększenia stężenia E2 wynosiła 2,3±0,06, a stężenia T – 1,9±0,18.

Narażenie komórek na inhibitor (PRO) powodowało istotne statystycznie, zależne od stężenia zmniejszenie stężenia E2 w stosunku do kontroli



Rycina 5. Wpływ induktora (FOR: 1 i 10 µM) oraz inhibitora (PRO: 0,1 i 1 µM) na sekrecję testosteronu i 17β-estradiolu w komórkach R2C wyrażony jako wartość względna (krotność zmian) w stosunku do kontroli rozpuszczalnika SC (SC = 1), (n = 3)

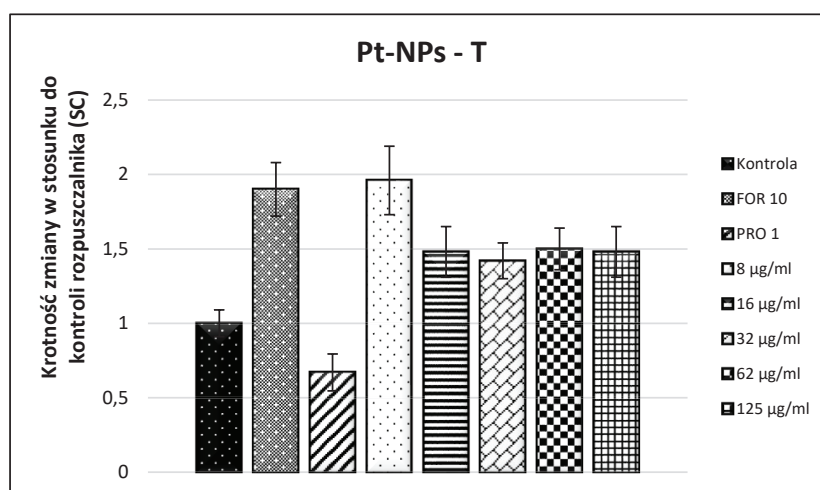
(przy stężeniu 1 μM krotność wynosiła 0,39±0,06). W przypadku T istotne w stosunku do kontroli zmniejszenie stężenia hormonu obserwowano tylko przy stężeniu PRO wynoszącym 1 μM (krotność: 0,67±0,12).

#### Ocena wpływu Pt-NPs na sekrecję T oraz E2 w komórkach R2C

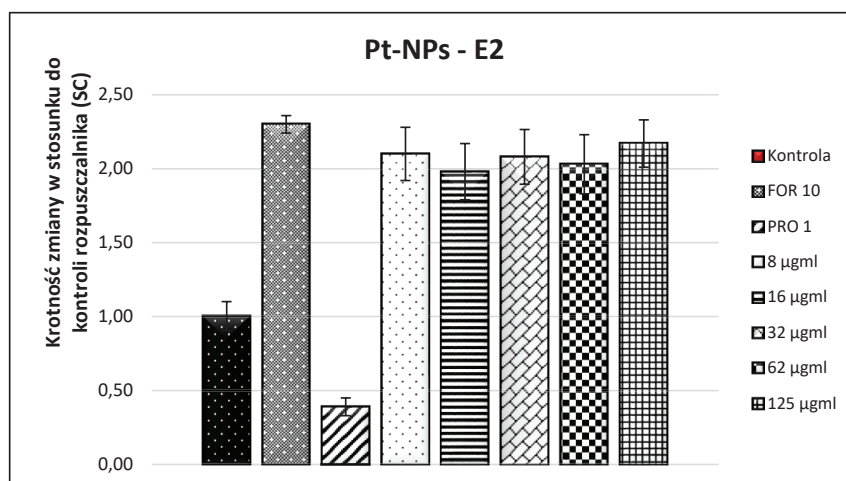
Narażenie komórek R2C na nanocząstki platyny (Pt-NPs) powodowało zwiększenie produkcji testosteronu (T) przy najniższym z zastosowanych stężeń (8 μg/ml) na poziomie porównywalnym z działaniem induktera (FOR). Przy większych stężeniach Pt-NPs

produkcja hormonu T utrzymywała się niezależnie od stężenia na poziomie większym niż w kontroli (krotność zmian – 1,5), ale poniżej wartości notowanej dla FOR. Nie obserwowano zależnych od stężenia różnic w produkcji T przy stężeniach Pt-NPs powyżej 8 μg/ml.

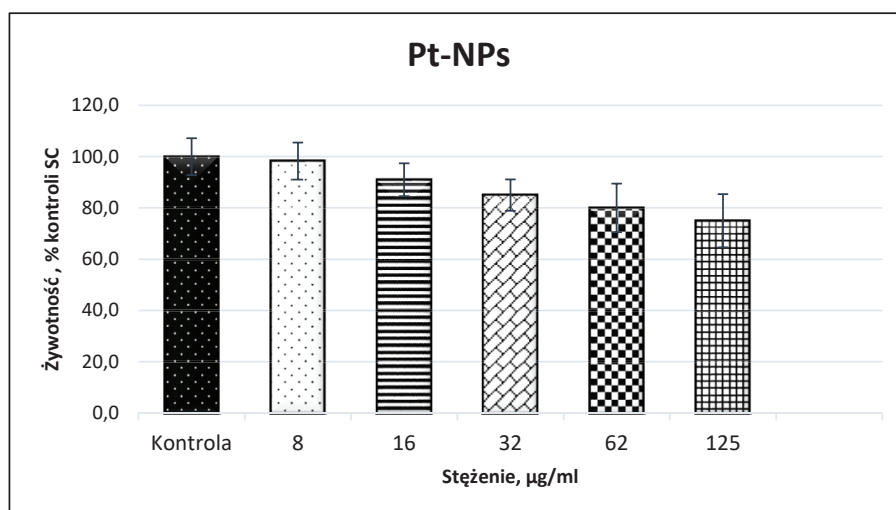
Z kolei stężenie 17β-estradolu (E2) utrzymywało się na poziomie zbliżonym do FOR niezależnie od stężenia Pt-NPs (ryc. 6 i 7). Przeżywalność komórek po narażeniu na Pt-NPs w największym stężeniu (125 μg/ml), oceniana testem MTT, wynosiła ok. 80% (ryc. 8).



Rycina 6. Wpływ nanocząstek platyny (Pt-NPs) na sekrecję testosteronu (T) w komórkach R2C wyrażony jako krotność zmiany w stosunku do kontroli rozpuszczalnika SC (SC = 1), (n = 2). FOR – forskolina 10 μM; PRO – prochloraz 1 μM.



Rycina 7. Wpływ nanocząstek platyny (Pt-NPs) na sekrecję 17β-estradolu (E2) w komórkach R2C wyrażony jako krotność zmiany w stosunku do kontroli rozpuszczalnika SC (SC = 1), (n = 2). FOR – forskolina 10 μM; PRO – prochloraz 1 μM



Rycina 8. Wpływ nanocząstek platyny (Pt-NPs) na żywotność komórek R2C ocenianą testem MTT ( $n = 2$ )

Badania *in vitro* procesu steroidogenezy należą do panelu badań przesiewowych według kryteriów opracowanych przez OECD (2011). Pozwalają one zidentyfikować substancje, które mogą wpływać na produkcję hormonów w międzykomórkowym szlaku biochemicznym rozpoczynającym się sekwencją reakcji od cholesterolu po produkcję E2 lub T, natomiast nie identyfikują substancji, które wpływają na steroidogenezę na drodze oddziaływania na oś podwzgórze–przysadka–gonady, ponieważ taki skutek można zbadać wyłącznie na zwierzętach doświadczalnych. Niemniej badania na liniach komórkowych dają odpowiedź TAK/NIE na pytanie o zdolność danej substancji chemicznej do wywoływania lub hamowania produkcji T i E2. Wyniki testu wyraża się jako względną zmianę w produkcji hormonów w porównaniu z kontrolą, którą stanowią komórki hodowane w medium zawierającym rozpuszczalnik (tzw. kontrola rozpuszczalnika).

Zastosowany układ badawczy komórek Leydiga linii R2C umożliwił ocenę zarówno indukcji, jak i inhibicji sekrecji hormonów steroidowych,

17 $\beta$ -estradiolu i testosteronu, co potwierdzono pomiarami stężeń hormonów w komórkach narażanych na związek indukujący (forskolinę) lub hamujący (prochloraz).

Narażenie komórek R2C na Pt-NPs <50 nm powodowało nasilenie sekrecji obu hormonów (T i E2) w stosunku do kontroli, przy czym stężenie E2 notowano na poziomie porównywalnym z działaniem induktora. Uzyskane wyniki, chociaż mają charakter przesiewowy, mogą wskazywać na potencjalne działanie modulujące proces steroidogenezy w gonadach pod wpływem nanocząstek platyny.

Nie znaleziono w literaturze opisanego wpływu nanocząstek platyny na steroidogenezę w gonadach. Niektóre badania dotyczące działania związków platyny wskazują, że takie działanie jest prawdopodobne. Doniesienia dotyczące cis-platyny potwierdzają, że ma ona istotny wpływ na układ hormonalny, zwłaszcza na oś steroidogenezy podwzgórze–przysadka–jądra, i poważnie zaburza produkcję testosteronu (Khanal i in. 2020; Maines 1990).

## WNIOSEK

Wyniki wskazują na możliwość wpływu nanocząstek platyny na sekrecję enzymów szlaku syntezy steroidów płciowych (17 $\beta$ -estradiolu i/lub testo-

steronu) w gonadach, co może przełożyć się na ich potencjalne działanie endokrynne.

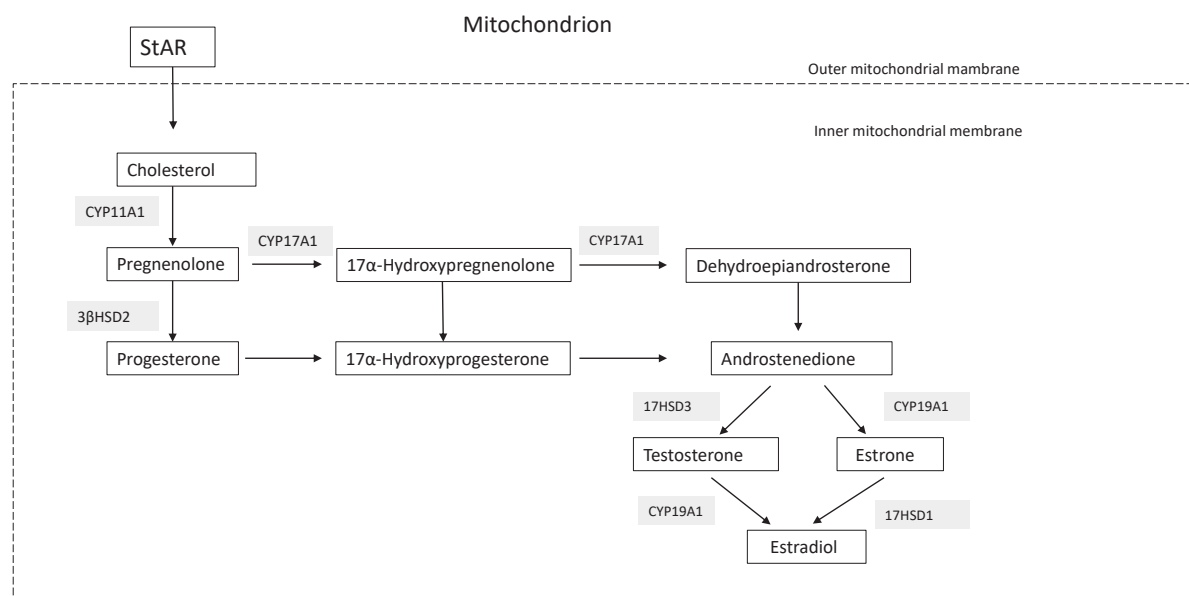


## INTRODUCTION

Steroid hormones are among the main factors involved in regulating vertebrate reproduction, they also affect the immune system, response to stress, gluconeogenesis, and a number of development and growth processes (Hecker, Giesy 2008; Larson et al. 2014; Lauretta et al. 2019; Maglich et al. 2014). Five classes of steroids are present in human bodies: glucocorticoids (cortisol), mineralocorticoids (aldosterone) and sex hormones (gestagens, oestrogens and androgens). The process of steroid hormone synthesis (steroidogenesis) occurs in the adrenal cortex, gonads and placenta. Steroid hormones are synthesised from cholesterol, carried in the bloodstream by low-density lipoproteins. Complexes formed by cholesterol binding to low-density lipoprotein receptors are transferred to cells and hydrolysed in lysosomes, and subsequently cholesterol is released into the cell cytoplasm. In the first stage of steroidogenesis taking place in cells, cholesterol is transported from the external to the internal mitochondrial membrane by the steroidogenic acute regulatory protein (StAR), (Figure 1). Subsequently, cholesterol becomes a substrate of one of the cytochrome P450 enzymes (CYP11A1), which catalyses

cholesterol conversion to pregnenolone. Pregnenolone diffuses to the smooth endoplasmic reticulum, where it is converted into progesterone in a process catalysed by beta-hydroxysteroid 3-dehydrogenase (3 $\beta$ HSD2). CYP17A1 catalyses 17-hydroxylation of pregnenolone and progesterone to 17 $\alpha$ -hydroxy intermediates leading to the formation of the dehydroepiandrosterone (DHEA) hormone and – in the process catalysed by 17-beta-hydroxysteroid dehydrogenase (17 $\beta$ HSD) – to testosterone. Testosterone is both an intermediate hormone and a final product of the transformation pathway. 17 $\beta$ -Estradiol is converted from testosterone by the enzyme aromatase (CYP19A1) and – alternatively – it can be converted by 17 $\beta$ HSD from oestrone, a hormone produced from androstenedione through aromatase. Testosterone (T) and 17 $\beta$ -estradiol (E2) are regarded as the final hormones of the steroidogenesis pathway (Haggard et al. 2018; Larson et al. 2014; Maglich et al. 2014; Simon et al. 2017; Zirkin, Papadopoulos 2018).

In vitro studies of xenobiotic effects on steroidogenesis focus on aspects such as potential interactions of xenobiotics with hormone receptors, evaluation of the cytochrome P450



**Figure 1.** The steroidogenic pathway in male gonads (Leydig cells), (adapted from: Zirkin, Papadopoulos 2018)

enzymes activity (e.g. aromatase, CYP19A1) and evaluation of secretion of final enzyme pathway products, i.e. individual hormones (Larson et al. 2014; Lauretta et al. 2019; Nakano et al. 2016).

The human NCI-H295R line, derived from adrenal cortical carcinoma, is a unique in vitro model in examining xenobiotic effects on adrenal steroidogenesis (Ahmed et al. 2018; Karmaus et al. 2016; Maglich et al. 2014; Nakano et al. 2016; Nielsen et al. 2012; OECD 2011; Strajhar et al. 2017; Wang, Rainey 2012). Studies of steroidogenesis on this cell line were positively validated and published as OECD Method 456 (Hecker et al. 2011; OECD 2011; Wang, Rainey 2012). On the other hand, gonadal steroidogenesis studies use aromatase-synthesizing cell lines derived from: ovaries (KGN), placenta (JEG-3 and JAR) or testicles (R2C, TM3, MA-10, K9, BLTK-1), and a test using human placental microsomal fraction is also used frequently (Anadou et al. 2014; Bara, Kaul 2018; Engeli et al. 2018; Odermatt et al. 2016; Simon et al. 2017; Young et al. 2017; Zirkin, Papadopoulos 2018).

Leydig cells, present in the interstitial space of male vertebrate testicles and responsible for the production of testosterone, are one of the in vitro models for screening of compounds interfering with steroidogenesis in gonads. Established Leydig cell lines from rodents, mainly mice and rats, are usually used in research (Botteri Principato et al. 2018; Chen et al. 2016; Engeli et al. 2018; Heneweer et al. 2004; Leisegang, Henkel 2018; Odermatt et al. 2016; Zirkin, Papadopoulos 2018).

Unlike cells derived from mouse testicles, Leydig cells of R2C line, isolated from rat testicles for production of steroid hormones (mainly progesterone) do not require stimulation by the luteinising factor (Zirkin, Papadopoulos 2018). They also exhibit high expression of genes responsible for StAR production, and their mitochondria contain much higher cholesterol levels than murine cells (Rao et al. 2003). Studies by Heneweer et al. (2004) showed that of the R2C Leydig cell line is more sensitive to aromatase inhibitors compared with the NCI-H295R line, which is recommended for studies of adrenal steroidogenesis (OECD 2011).

The progress in nanotechnology made in recent years have led to the development of many types of nanostructures/nanomaterials applicable in various industrial sectors, biomedicine

and consumer products. The development of nanotechnology has potential benefits, but it raises concerns about possible toxicological effects in biological systems and the environment. In vitro and in vivo experimental studies have confirmed that nanomaterials can initiate toxicity at the subcellular, cellular and whole body levels (Zapór 2016; 2018; Zapór, Oberbek 2020). More and more studies indicate that nanomaterials are not neutral to human health. They can cause, among others, inflammations and fibrotic lesions of parenchymal tissue of the lungs, changes in the cardiovascular, nervous, immune systems, morphological changes in organs where they accumulate, and genotoxic damage. They can also cause foetal and reproductive toxicity and adverse effects on human gastrointestinal and respiratory microbiota (Borisova 2018; Fröhlich, Salar-Behzadi 2014; Kuijpers, et al. 2018; Larese Filon et al. 2016; Pietroiusti et al. 2018; Poh et al. 2018; Schulte et al. 2019; Stapleton et al. 2018; Stone et al. 2017; Umezawa et al. 2018; Zapór, Oberbek 2020). Nanomaterial effects on the human endocrine system is a poorly explored area of health and environmental risks (Pietroiusti et al. 2018; Priyam et al. 2018).

Nanomaterials that are increasingly often used in industry and in consumer goods include platinum nanoparticles (Pt-NPs). Pt-NPs are used in electrochemistry and electronics, metallurgy and automotive products (as catalysts in car engines), as catalysts in the petrochemical industry. In medicine and medical diagnostics, they are used as clinical drugs (in cancer, in Parkinson's disease), carriers of drugs, biosensors, antiseptics, contrast agents and phototherapeutics. They are parts of dental implants and are also used in cosmetology (Czubacka, Czerczak 2019; Demir et al. 2020; Jeyaraj et al. 2019; Labrador-Rached et al. 2018).

Due to the increasing use of Pt-NPs, they can be released systematically into the environment, especially to the air (including the air in the work environment), but also to water, wastewater and soil, both from production processes and during their processing and use, and as a result of waste disposal. Pt-NPs, especially those used as exhaust catalysts, can be deposited in individual compartments of the environment, especially since they are not biodegradable and therefore pose a threat to living organisms (Demir et al. 2020; Thangam, Veeramani 2015). Pt-NPs toxicity data

confirms their pro-inflammatory and nephrotoxic effects and their potential for bioaccumulation in the lungs, liver and spleen (Czubacka, Czerczak 2019; Mukherjee et al. 2021). Few research results indicate that Pt-NPs can have an endocrine effect (Labrador-Rached et al. 2018).

Given the ability of Pt-NPs to bioaccumulate in living organisms, it is important to know the

long-term effects of exposure, such as the effects on reproductive functions, including hormone (testosterone and 17 $\beta$ -estradiol) production.

The objective of this study was to assess the effect of platinum nanoparticles on the secretion of steroid hormones in the R2C Leydig cell line.

## EXPERIMENTAL PART

### Materials and methods

#### Reagents and culture media

Platinum nanoparticles (Pt-NPs) <50 nm in a 1 mg/ml suspension (Pt-NPs) stabilised with sodium citrate at a concentration of 0.05% (Nanocomposix), were used in this study. Forskolin, prochloraz and DMSO were supplied by Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

R2C (ATCC<sup>®</sup> CCL-97<sup>™</sup>) cells were cultured in Ham's F-12 Nutrient mixture (Gibco) with the addition of 10% foetal bovine serum (FBS) (Sigma-Aldrich).

The following were used for colorimetric tests: 0.4% solution of trypan blue (cat. number T-8154); NRU (Neutral Red Solution), (cat. number N-2889); MTT [3(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazole bromide], (cat. number M-5655); DMSO (dimethyl sulfoxide), (cat. number D-5879); Hank's buffer (Hank's Balanced Salt Solution), cat. number H-8264); Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (cat. number D-8537) from Sigma-Aldrich; buffered saline (PBS, Biomed-Lublin), technical-grade ethanol, Avantor Performance Materials Poland SA.

Secretion of steroid hormones – testosterone (T) and 17 $\beta$ -estradiol (E2) was determined by a competitive ELISA (Ezyme-Linked Immune-Sorbent Assay) test using a commercial kit made by Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA (testosterone, cat. number 582701; 17 $\beta$ -estradiol, cat. number 582251).

#### Cell cultures

R2C line (ATCC<sup>®</sup> CCL-97<sup>™</sup>) cells derived from Leydig cell carcinoma isolated from the rat (*Rattus norvegicus*) testicles were purchased from the American Type Culture Collection (ATCC) cell bank (LGC Standards Sp. z o.o.).

The cells were cultured under sterile conditions, in an incubator with an access to 5% CO<sub>2</sub>, at a constant temperature of 37°C and 95% humidity, in culture vessels with a culture area of 25 and 75 cm<sup>2</sup> (NUNC). Cells were grown in a monolayer on the bottom of the vessel. The culture growth was assessed under a microscope. When 60 ÷ 80% confluence of culture was achieved (cell surface percentage in the culture vessel), the cells were passaged. For passaging, cells were washed with 0.5 mM EDTA and subsequently digested with 0.25% trypsin at 37°C. The enzyme was inhibited by washing the cells with the culture medium. The cells were then centrifuged twice (125 × g, 5 min) and their viability was assessed using a 0.4% solution of trypan blue, under an inverted microscope (Nikon TMS-F, Japan).

#### Assessment of Pt-NPs cytotoxicity and determination of low-toxic concentrations

Pt-NPs solutions were prepared in a complete culture medium immediately prior to the experiment. Before being instilled on the cells, the solutions (suspensions) were stirred (Vortex) for about 1 min to ensure their homogeneity.

Prior to cytotoxicity testing, a cell suspension was prepared. To this end, the cells were separated by trypsin (0.25% solution of trypsin with EDTA), suspended in the fresh culture medium and centrifuged (200 × g for 5 min) to remove the cells damaged during the trypsinisation process. Cell survival in the suspension was evaluated with the trypan blue uptake test prior to the start of the proper experiment. For this purpose, the cells were placed in the Bürker chamber and live (non-stained) and damaged (blue) cells were counted under an inverted microscope (Nikon TMS-F, Japan) at 100× magnification.

Based on the results, the so-called survival rate (live to damaged cells ratio) was calculated. Cell suspension with not more than 20% of damaged cells was used for further studies. Subsequently, the cell suspension was brought to the concentration required in the experiment.

After 48-hour cell exposure, the cytotoxic effect of the tested substances was analysed by means of a tetrazole salt reduction test MTT (MTT assay), which determined the metabolic activity of cells expressed by the absorption capacity for the dye, i.e. yellow tetrazole salt (MTT) [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazole bromide], and its reduction, mainly in mitochondria, by succinate dehydrogenase to a crystalline purple-navy-blue formazan compound (INVITTOX No 17) and the neutral red absorption test to assess the cell membrane integrity (NRU test), whose principle is based on the ability of live, undamaged cells to absorb the dye, i.e. neutral red (3-amino-7-dimethylamino-2-methylphenazine hydrochloride), which accumulates in lysosomes (INVITTOX No 64).

R2C cells were suspended in a culture medium at concentrations of  $1 \times 10^5$  live cells/ml, followed by placing 100  $\mu$ l of suspension in each well of a 96-well microplate. After 24-hour incubation (temperature 37°C; 5% CO<sub>2</sub>; 95% humidity), during which cells adhered to the microplate bottom, the medium above the cells was aspirated and 100  $\mu$ l of the solution (suspension) of the tested substance at a certain concentration was added to each well. Each sample was applied in nine replicates. The control consisted of cells incubated in a xenobiotic-free medium. The microplates were placed in the CO<sub>2</sub> incubator for 24 h, after which MTT or NRU tests were performed in accordance with INVITTOX Protocols No 17 (MTT) or No 64 (NRU).

The dye concentration in the test and control samples was determined against the blank sample (which was a dye in cell-free microplate wells) on the SYNERGY 2 microplate reader (BioTek Instruments, Inc.), at the wavelength of 570/630 nm (MTT) or 540/450 nm (NRU).

On the basis of the absorbance measurements, the survival percentage (viability) of cells exposed to Pt-NPs was calculated compared to control according to the following formula:

$$\text{viability [\%]} = (\text{mean absorbance of the test sample} / \text{mean absorbance of the control sample}) \times 100\%$$

Prior to the cytotoxicity testing, the possibility of nanoparticles interference with the test reagents was examined. To this end, the tested nanomaterials were incubated with no cells present, and the MTT or NRU test was subsequently performed (Kroll et al. 2012). The cytotoxicity test was performed in triplicate.

Cytotoxic changes occurring in cells after exposure to low levels of Pt-NPs (4  $\mu$ g/ml) were also assessed by means of holotomography microscopy (HTM). To visualize the mitochondrial structures, cells were incubated with the MitoView dye (Biotium) at a concentration of 100 nM. The LysoView dye (1:1000, Biotium) was used to visualise lysosomes and cell nuclei were stained with the DAPI reagent (1:1000, Sigma-Aldrich).

#### **Examining the effect of Pt-NPs on steroidogenesis in R2C cells by T and E2 assays**

The assay-related actions included:

- quality control of the test system, i.e. the ability of cells to secrete T and E2 hormones as affected by a strong inducer (forskolin) or inhibitor (prochloraz) of steroidogenesis,
- exposure of R2C cells to a range of Pt-NPs concentrations,
- cell viability test after exposure to Pt-NPs.

#### **Test system quality control**

Cell suspension at a concentration of 150,000 cells/mL in culture medium was placed on 24-well plates at 1 mL per well. The testing system quality control included:

- blank (non-exposed cells),
- control samples, which comprised cells in a medium with the solvent – 0.1 % DMSO (solvent control, SC),
- two concentrations of forskolin (FOR), (1 and 10  $\mu$ M) – a potent inducer of 17 $\beta$ -estradiol (E2) and testosterone (T) synthesis,
- two concentrations of prochloraz (PRO), (0.1 and 1  $\mu$ M) – a potent inhibitor of 17 $\beta$ -estradiol (E2) and testosterone (T) synthesis,
- methanol (MeOH), (70%) – as a positive cytotoxicity control (causes 100% cell death) in the viability/cytotoxicity test.

The quality control plate layout is shown in Table 1.



**Table 1.** Quality control layout for testing the effectiveness of non-exposed R2C cells and cells exposed to known inhibitors (PRO – prochloraz) and stimulators (FOR – forskolin) of 17 $\beta$ -estradiol and testosterone production

	1	2	3	4	5	6
<b>A</b>	Blank (a)	Blank (a)	Blank (a)	Blank (a) (+ MeOH) (b)	Blank (a) (+ MeOH) (b)	Blank (a) (+ MeOH) (b)
<b>B</b>	DMSO (c) 1 $\mu$ l	DMSO (c) 1 $\mu$ l	DMSO (c) 1 $\mu$ l	DMSO (c) 1 $\mu$ l (+ MeOH) (b)	DMSO (c) 1 $\mu$ l (+ MeOH) (b)	DMSO (c) 1 $\mu$ l (+ MeOH) (b)
<b>C</b>	FOR 1 $\mu$ M	FOR 1 $\mu$ M	FOR 1 $\mu$ M	PRO 0,1 $\mu$ M	PRO 0,1 $\mu$ M	PRO 0,1 $\mu$ M
<b>D</b>	FOR 10 $\mu$ M	FOR 10 $\mu$ M	FOR 10 $\mu$ M	PRO 1 $\mu$ M	PRO 1 $\mu$ M	PRO 1 $\mu$ M

Explanations: (a) cells in the blank wells receive only the culture medium (without solvent, DMSO); (b) methanol (MeOH) added after the exposure and removal of the medium from these wells; (c) DMSO – solvent control (non-exposed cells in a culture medium containing 0.1 % DMSO); PRO – prochloraz, FOR – forskolin.

After 48-hours cell exposure to the test substances, the medium was transferred to Eppendorf tubes and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until the ELISA assay, whereas cell viability was assessed in each microplate well with the MTT assay immediately after the medium removal. The test system quality control was performed each time when cells from a new thawed passage were used in the test.

#### Cell exposure to Pt-NPs

24-well plates were inoculated with cells at a concentration of 150,000 cells/ml in a culture medium at 1 ml per well. After 24-hour incubation, the medium was removed and the Pt-NPs suspension in culture medium with an addition of the solvent, i.e. 0.1 % DMSO in five concentrations, was applied to the plate in triplicate. The range of concentrations was: 8–125  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

The cells were exposed for 48 hours, after which the medium was transferred to Eppendorf tubes and stored at a temperature of  $-80^{\circ}\text{C}$  until the ELISA assay, and the cell viability was assessed in each microplate well with the MTT assay.

On the basis of the absorbance measurements, the survival percentage (viability) of cells exposed to Pt-NPs was calculated compared to control according to the following formula:

$$\% \text{ live cells} = \frac{\text{mean absorbance of test sample} - \text{mean absorbance in wells treated with MeOH (100\% dead cells)}}{\text{mean absorbance in the wells containing solvent controls} - \text{mean absorbance in wells treated with MeOH (100\% dead cells)}} \times 100\%$$

#### Determination of T and E2 levels by ELISA competitive assay

Competitive ELISA assays (Cayman) were used to determine the T and E2 levels. The principle of competitive assay lies in placing both serum and the antigen-specific enzyme-labelled antibody in an antigen-coated plate. Serum antibodies and labelled antibodies compete, which allows

for determination of the antibody amount in the serum; the fewer labelled antibodies are bound to the antigen, the weaker the colour reaction.

The quantitation range in the E2 assay was 0.61–10,000  $\text{pg}/\text{mL}$ , sensitivity: 20  $\text{pg}/\text{ml}$ . The quantitation range in the T assay was 3.9–500  $\text{pg}/\text{mL}$ , sensitivity (80% B/B<sub>0</sub>): 6  $\text{pg}/\text{ml}$ . An automatic SYNERGY-2 reader from BioTek Instruments (USA) was used to measure the absorption at the wavelength recommended by the manufacturer (410 nm). Extracts of culture medium were diluted before use in ELISA tests: 1:5, 1:10 and 1:50 for E2 assays and 1:50, 1:100 and 1:500 for T.

#### Data analysis

Only measurement results from plate wells in which cytotoxicity was lower than 20% (cytotoxicity above 20% inhibits steroidogenesis) were taken into account in the analysis of hormone concentrations. To assess the relative increase/decrease in hormone production, the results were normalized to the mean value of control hormone concentrations, i.e. non-exposed cells from a medium containing 0.1% DMSO (solvent control), and expressed as a factor of change relative to the solvent control on each test plate according to the following formula:

$$\text{relative change} = \frac{\text{hormone concentration in a well}}{\text{mean hormone concentration in all solvent control wells}}$$

All experiments were carried out in two independent samples. Data were expressed as a mean  $\pm$  standard error of the mean. The cytotoxicity tests and the test system quality control were performed in three independent replicates. The significance of differences between the mean values and the control samples was assessed by the unpaired Student t-test at  $p < 0.05$ . Statistica version 7.1 was used for statistical analysis.

## DISCUSSION OF RESULTS

## Cytotoxicity assessment

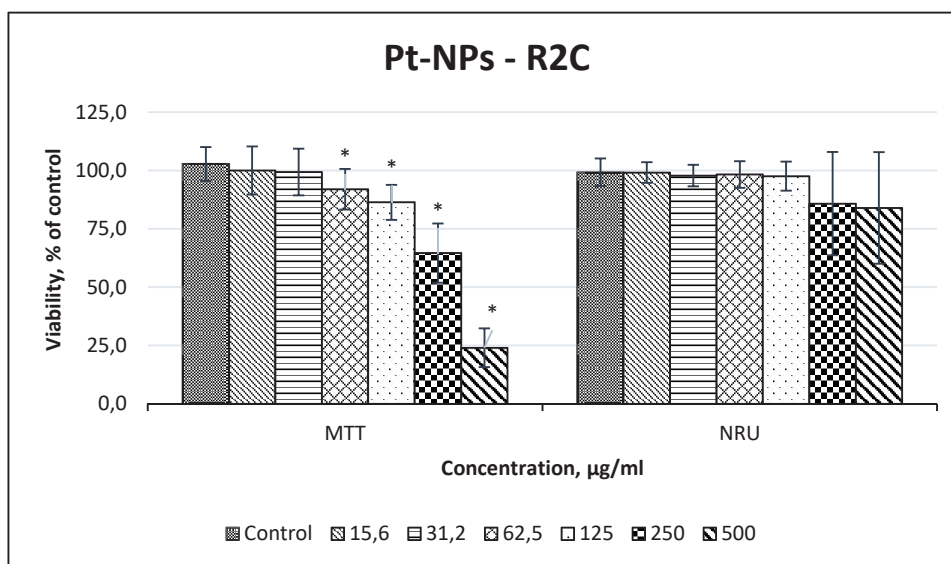
The effect of platinum nanoparticles (Pt-NPs) on Leydig cell (R2C) survival after 48-hour exposure as assessed by the MTT and NRU assays is shown in Figure 2, while the morphological changes caused by exposure of R2C cells as assessed by holotomography microscopy are shown in Figures 3 and 4.

Great differences were observed in the cytotoxic effects depending on the test used. Pt-NPs in the mitochondria activity assay (MTT) exhibited a full toxicity profile, i.e. a decrease in cell viability within the range of 20–80%. A gradual decrease in the cell survival relative to control was observed at concentrations above 31 µg/ml. A 50% decrease in cell survival was noted at concentrations above 250 µg/ml. Concentrations considered low-toxic (causing a 20% decrease in cell viability) were those lower than 125 µg/ml. The lysosome membrane integrity test (NRU) did not reveal any cytotoxic changes caused by exposure to any of the Pt-NPs concentrations used.

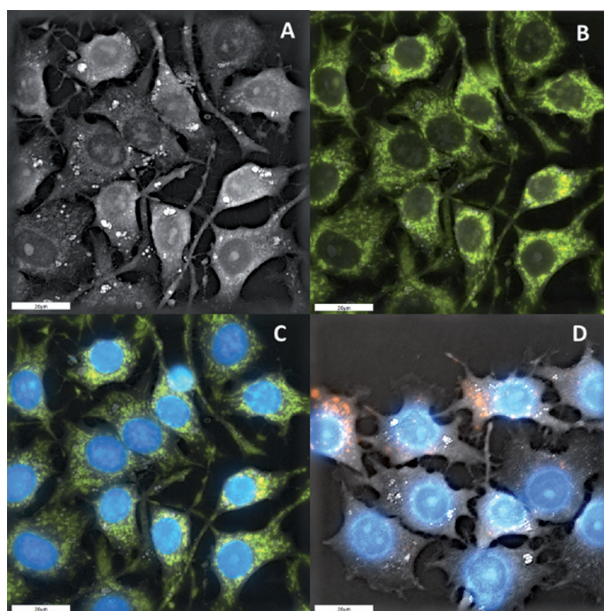
Figure 3 shows a picture of normal, non-exposed R2C Leydig cells (control cells) in the passing light and after organelle staining with fluorescent dyes. The cells have a regular shape and thick cytoplasm, with visible mitochondria

and nuclei with regular, intact membranes. R2C cells exposed to Pt-NPs (Figure 4) have a changed and elongated shape, they have less cytoplasm compared with control, elongated projections and weaker bonds between cells. A microscopic image shows shrunk cytoplasm and mitochondria accumulated within cytoplasm and cell nucleus; an increase in the number of lysosomes was also observed.

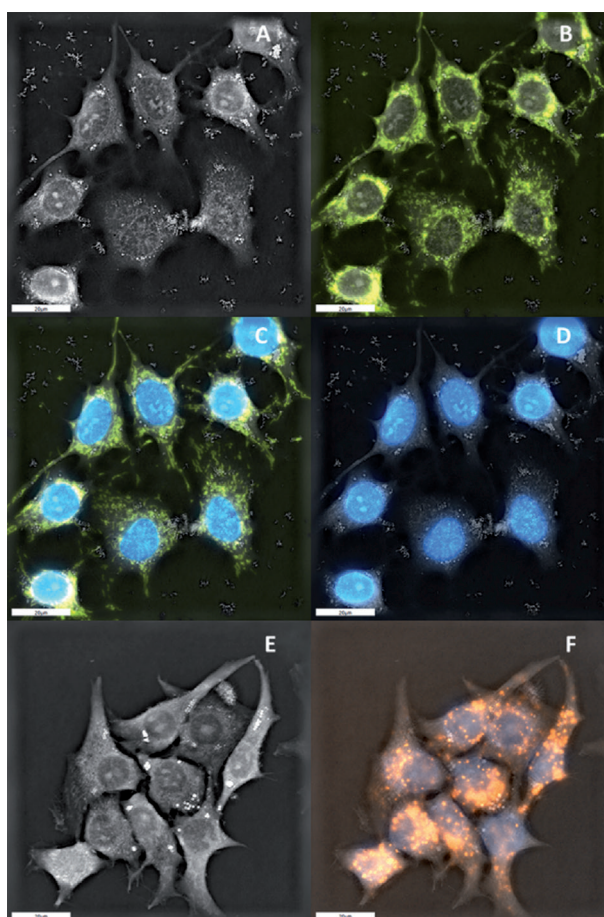
Evaluation of chemical cytotoxicity is an essential tool in determining their potential effects at the cell level. The most commonly used measure of cytotoxicity (so-called primary cytotoxicity) is the  $IC_{50}$  value (concentration of a substance that causes death of 50% of cells in a culture). However, for in-depth toxicity studies (e.g. oxidative stress, inflammatory reactions, genotoxicity, steroidogenesis, etc.), it is important to determine sublethal concentrations at which a substance is weakly cytotoxic. These effects are exerted at substance concentrations which reduce the cell viability by 20% in cytotoxicity tests (OECD 2011). Great differences in cytotoxic concentrations were observed in this study, depending on the test method used. The MTT assay showed higher sensitivity (full toxicity profile). Considerable differences between the cytotoxic effects of platinum nanoparticles were



**Figure 2.** The effect of platinum nanoparticles (Pt-NPs), (<50 nm) on R2C cell viability after 48 h exposure as assessed by the MTT and NRU assays. Data were expressed as percentage viability of cells exposed to Pt-NPs compared with control cells. Each point represents an average and a standard deviation from 3 independent experiments. (\*) Statistically significant differences ( $p < 0.05$ )



**Figure 3.** R2C cells not exposed to any compound (control). A – image in passing light; B, C – cells with visualised mitochondria (green) and cell nuclei (blue). D – cells with stained lysosomes (orange) and nuclei (blue). Magnification 60 $\times$



**Figure 4.** R2C cells exposed to platinum nanoparticles (Pt-NPs) (<50 nm) at a concentration of about 4  $\mu$ g/ml. A, E – cell image in passing light; B, C – cells with visible mitochondria (green); C, D – cells with stained nuclei (blue); F – cells with visible lysosomes (orange). Magnification 60 $\times$

also observed depending on the cell type. Alveolar cells A549 exposed to Pt-NPs (25 nm) lost viability at concentrations as low as 1 µg/ml, whereas bronchiole cells BEAS-2B were completely non-susceptible to the particles (Diabaté et al. 2009). Similarly, in THP-1 cells (monocytes), no cytotoxic effects were observed following exposure to Pt-NPs with particle size of 5 and 20 nm at concentrations up to 100 µg/ml (Gatto et al. 2018). A 25% decrease in cell viability was observed after exposure to Pt-NPs (50 nm) at a concentration of 100 µg/ml, in a study on HepG2 hepatocytes, conducted by Labrador-Rached et al. (2018). In a study of fish ova (EPC and BF lines) (Demers et al. (2020)) exposed to Pt-NPs (4–9 nm), statistically significant changes indicative of platinum cytotoxicity were observed depending on the test method used and the nanoparticle type. The first cytotoxic changes (about 20% cell mortality) as assessed by the metabolic activity test (Almar Blue) were observed at Pt-NPs concentrations of 100–150 µg/ml, while lysosomal membrane destruction (NRU assay) occurred at approximately 200 µg/ml. PVP-coated Pt particles did not induce cytotoxic effects within the concentration range of 0.325–200 mg/l.

### Assessment of platinum nanoparticle effect on steroidogenesis in R2C cells by T and E2 assays

#### Test system quality control

Figure 5 shows changes in testosterone (T) and 17β-estradiol (E2) secretion in R2C cells treated

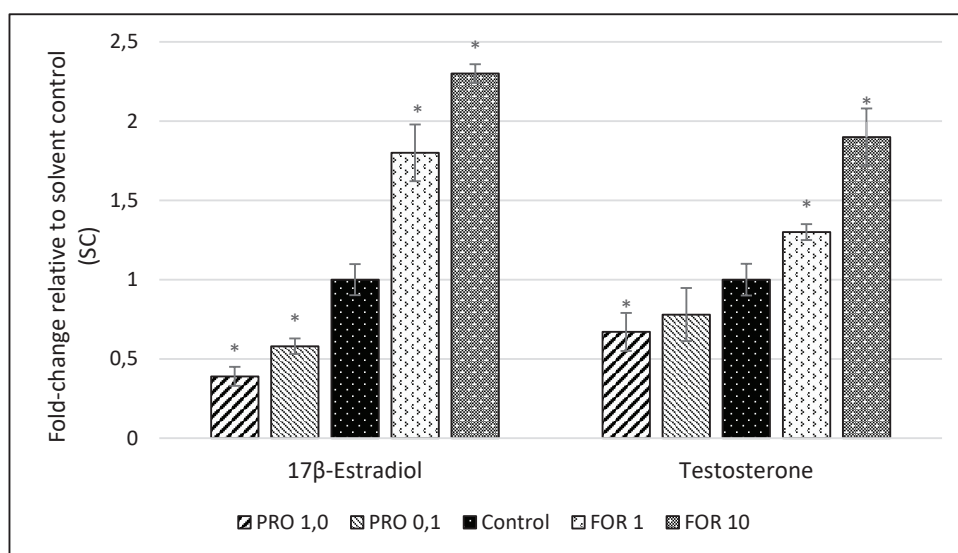
with an inducer (forskolin, FOR) or an inhibitor (prochloraz, PRO) of hormone secretion, expressed as a value relative to solvent control (fold-change to solvent control, SC=1).

The tested R2C cells exhibited both the ability to induce and inhibit hormone production. Increases in both hormone levels were observed in cells exposed to an inducer (FOR) – statistically significant relative to the control and concentration-dependent. At the highest FOR concentration level (10 µM), the fold of the E2 concentration increase was  $2.3 \pm 0.06$ , and  $1.9 \pm 0.18$  for the T concentration.

Cell exposure to inhibitor (PRO) resulted in a statistically significant concentration-dependent decrease in E2 concentration relative to control (the fold-change was  $0.39 \pm 0.06$  at a concentration of 1 µM). For T, the reductions in hormone levels that were significant relative to control were only observed at the PRO concentration of 1 µM (fold:  $0.67 \pm 0.12$ ).

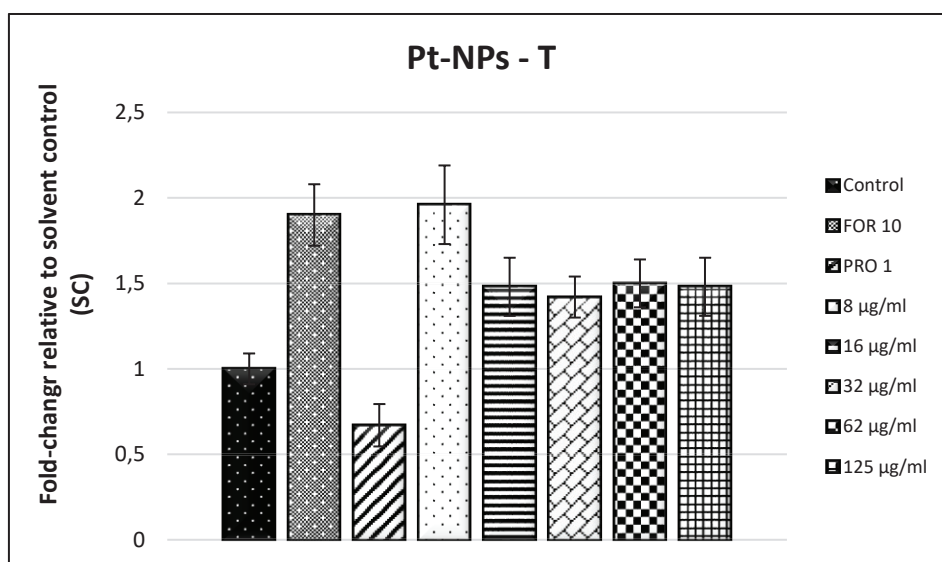
#### Assessment of Pt-NPs effect on T and E2 secretion in R2C cells

Exposure of R2C cells to platinum nanoparticles (Pt-NPs) increased testosterone (T) production at the lowest concentrations (8 µg/ml) at a level comparable to the inducer (FOR) effect. At higher Pt-NPs concentrations, T hormone production remained unchanged regardless of the concentration above the control level (fold-change 1.5) but below the value for FOR. No

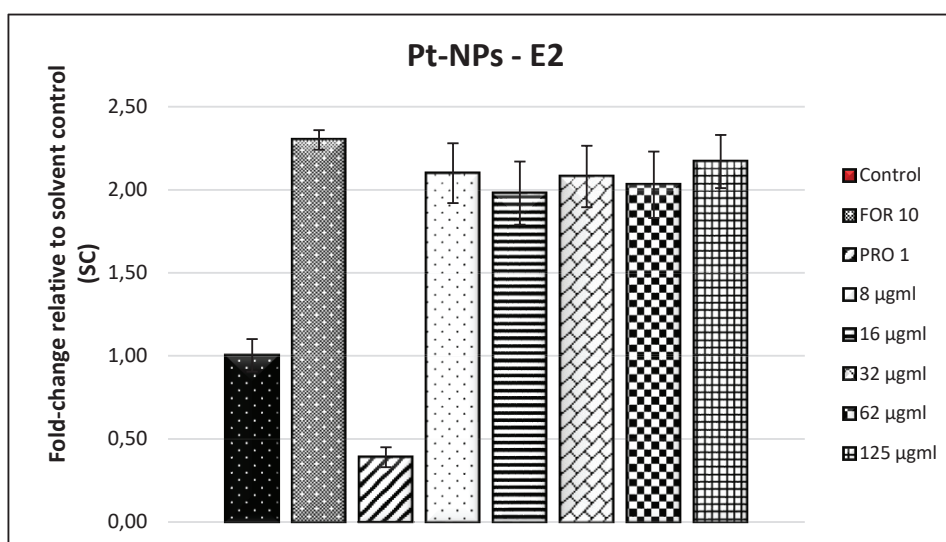


**Figure 5.** Effect of inducer (FOR: 1 and 10 µM) and inhibitor (PRO: 0.1 and 1 µM) on testosterone and 17β-estradiol secretion in R2C cells expressed as fold changes relative to the solvent control (SC=1), (n=3)





**Figure 6.** The effect of platinum nanoparticles (Pt-NPs) on testosterone (T) secretion in R2C cells expressed as fold change relative to the solvent control (SC=1), (n=2). FOR – forskolin 10  $\mu$ M; PRO – prochloraz 1  $\mu$ M

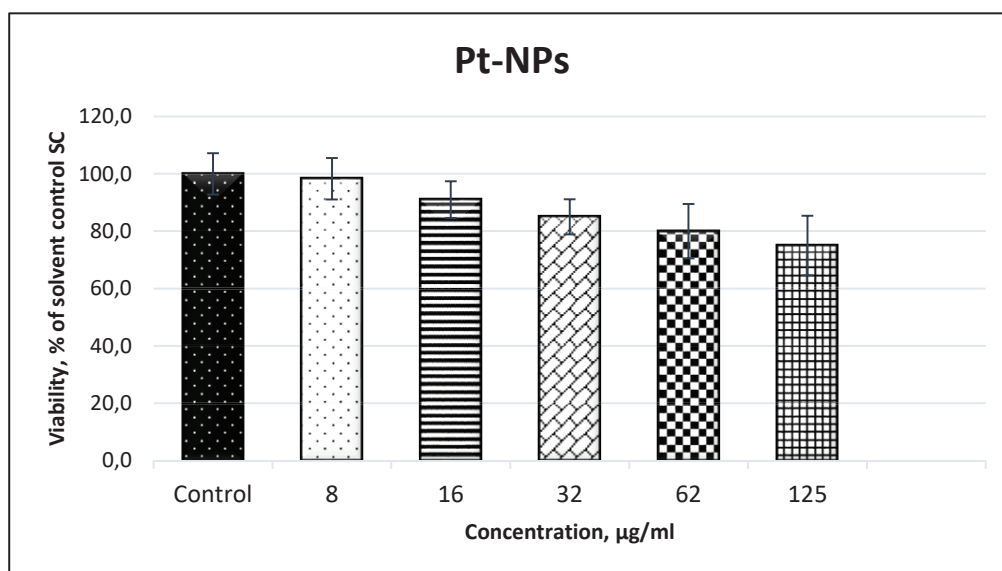


**Figure 7.** The effect of platinum nanoparticles (Pt-NPs) on secretion of 17 $\beta$ -estradiol (E2) in R2C cells expressed as fold change relative to the solvent control (SC=1), (n=2). FOR – forskolin 10  $\mu$ M; PRO – prochloraz 1  $\mu$ M

concentration-dependent differences in T production were observed at Pt-NPs concentrations above 8  $\mu$ g/ml.

In contrast, the concentration of 17 $\beta$ -estradiol (E2) was similar to FOR regardless of Pt-NPs concentration (Figures 6 and 7). Cell survival following exposure to Pt-NPs at the highest concentration (125  $\mu$ g/ml), as assessed by the MTT assay, was approximately 80% (Figure 8).

In vitro studies of steroidogenesis are included in the screening panel according to the OECD criteria (2011). They help to identify substances that can affect hormone production in the intercellular biochemical pathway that begins with a reaction sequence from cholesterol to E2 or T production, but they do not identify substances which have an effect steroidogenesis by affecting the hypothalamic-pituitary-gonadal axis, as this



**Figure 8.** The effect of platinum nanoparticles (Pt-NPs) on R2C cell viability, as assessed by the MTT assay (n=2)

effect can only be investigated in experimental animals. However, studies on cell lines give a YES/NO answer to a question about the ability of a particular chemical to induce or inhibit T and E2 production. The test results are expressed as a relative change in hormone production compared to the control – cells grown in a solvent-containing medium (so-called solvent control).

The R2C Leydig cell experimental system used allowed assessment of both induction and inhibition of steroid hormone – 17β-estradiol and testosterone – secretion, as confirmed by measurements of hormone concentrations in cells exposed to the inducer (forskolin) or inhibitor (prochloraz).

Exposure of R2C cells to Pt-NPs <50 nm resulted in intensified secretion of both hormones

(T and E2) relative to control, with an E2 concentration comparable to the inducer effect. The results, although of a screening nature, may indicate potential effect of platinum nanoparticles-modulating steroidogenesis in gonads.

No effect of platinum nanoparticles on steroidogenesis in gonads has been reported in the literature. Some studies on platinum compound effect indicate that this is likely to occur. Reports on cisplatin confirm that it has a significant effect on the endocrine system, especially on hypothalamic-pituitary-gonadal steroidogenesis axis, and it severely disrupts testosterone production (Khanal et al. 2020; Maines 1990).

## CONCLUSION

The results indicate a possible effect of platinum nanoparticles on the secretion of enzymes of the sex steroid synthesis pathway (17β-estradiol and/

or testosterone) in gonads, which may translate into their potential endocrine effects.

## PIŚMIENNICTWO / REFERENCES

- Abdou H.S., Bergeron F., Tremblay J.J. (2014). A cell-autonomous molecular cascade initiated by AMP-activated protein kinase represses steroidogenesis. *Mol. Cell. Biol.* 34(23), 4257–4271.
- Ahmed K.E.M., Frøysa H.G., Karlsen O.A. i in. (2018). LC-MS/MS based profiling and dynamic modelling of the steroidogenesis pathway in adrenocarcinoma H295R cells. *Toxicol. In Vitro* 52, 332–341.
- Bara N., Kaul G. (2018). Enhanced steroidogenic and altered antioxidant response by ZnO nanoparticles in mouse testis Leydig cells. *Toxicol. Ind. Health* 34(8), 571–588.
- Borisova T. (2018). Nervous system injury in response to contact with environmental, engineered and planetary micro- and nano-sized particles. *Front. Physiol.* 9, 728. DOI: 10.3389/fphys.2018.00728.
- Botteri Principato N.L., Suarez J.D., Laws S.C. i in. (2018). The use of purified rat Leydig cells complements the H295R screen to detect chemical-induced alterations in testosterone production. *Biol. Reprod.* 98(2), 239–249.
- Chen T-M., Czerwiec F.S., Puett D. (2016). Steroidogenesis and early response gene expression in MA-10 Leydig tumor cells following heterologous receptor down-regulation and cellular desensitization. *Biochem. Biophys. Rep.* 5, 305–312.
- Czubacka E., Czerczak S. (2019). Are platinum nanoparticles safe to human health? *Med. Pr.* 70(4), 487–495.
- Demir V., Bucher J., Kropf C. i in. (2020). Comparative study of cytotoxicity by platinum nanoparticles and ions in vitro systems based on fish cell lines. *Toxicol. In Vitro* 66, 104859. DOI: 10.1016/j.tiv.2020.104859.
- Diabaté S., Weiss C., Mühlhopt S. i in. (2009). Biological effects in human lung cells exposed to platinum nanoparticles aerosol. *European Aerosol Conference, 2009 Sept 11, Karlsruhe, Germany.*
- Engeli R.T., Fürstenberger C., Kratschmar D.V. i in. (2018). Currently available murine Leydig cell lines can be applied to study early steps of steroidogenesis but not testosterone synthesis. *Heliyon* 4, e00527. DOI: 10.1016/j.heliyon.2018.e00527.
- Fröhlich E., Salar-Behzadi S. (2014). Toxicological assessment of inhaled nanoparticles: role of in vivo, ex vivo, in vitro, and in silico studies. *Int. J. Mol. Sci.* 15(3), 4795–4822.
- Gatto F., Moglianetti M., Pompa P.P. i in. (2018). Platinum nanoparticles decrease reactive oxygen species and modulate gene expression without alteration of immune responses in THP-1 monocytes. *Nanomaterials (Basel)* 8(6), 392.
- Haggard D.E., Karmaus A.L., Martin M.T. i in. (2018). High-throughput H295R steroidogenesis assay: utility as an alternative and a statistical approach to characterize effects on steroidogenesis. *Toxicol. Sci.* 162(2), 509–534.
- Hecker M., Giesy J.P. (2008). Novel trends in endocrine disruptor testing: the H295R Steroidogenesis Assay for identification of inducers and inhibitors of hormone production. *Anal. Bioanal. Chem.* 390(1), 287–291.
- Hecker M., Hollert H., Cooper R. i in. (2011). The OECD validation program of the H295R steroidogenesis assay: Phase 3. Final inter-laboratory validation study. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 18, 503–515.
- Heneweer M., van den Berg M., Sanderson J.T. (2004). A comparison of human H295R and rat R2C cell lines as in vitro screening tools for effects on aromatase. *Toxicol. Lett.* 146, 183–194.
- INVITTOX Protocol No 17: MTT Assay (1990). The ERGATT/FRAME Data Bank of In Vitro Techniques in Toxicology, Nottingham.
- INVITTOX Protocol No 64: The Neutral Red Cytotoxicity Assay (1992). The ERGATT/FRAME Data Bank of In Vitro Techniques in Toxicology, Nottingham.
- Jeyaraj M., Gurunathan S., Qasim M. i in. (2019). A comprehensive review on the synthesis, characterization, and biomedical application of platinum nanoparticles. *Nanomaterials (Basel)* 9(12), 1719. DOI: 10.3390/nano9121719
- Karmaus A.L., Toole C.M., Filer D.L. i in. (2016). High-throughput screening of chemical effects on steroidogenesis using H295R human adrenocortical carcinoma cells. *Toxicol. Sci.* 150(2), 323–332.
- Khanal N., Ahmed S.S., Kalra M. i in. (2020). The effects of hypogonadism on quality of life in survivors of germ cell tumors treated with surgery alone versus surgery plus platinum-based chemotherapy. *Support Care Cancer* 28(7), 3165–3170.
- Kroll A., Pillukat M.H., Hahn D. i in. (2012). Interference of engineered nanoparticles with in vitro toxicity assays. *Arch. Toxicol.* 86(7), 1123–1136.
- Kuijpers, E., A. Pronk, R. Kleemann i in. (2018). Cardiovascular effects among workers exposed to multiwalled carbon nanotubes. *Occup. Environ. Med.* 75(5), 351–358.
- Labrador-Rached C.J., Browning R.T., Braydich-Stolle L.K. i in. (2018). Toxicological implications of platinum nanoparticle exposure: stimulation of intracellular stress, inflammatory response, and Akt signaling in vitro. *J. Toxicol.* 2018, 1367801. DOI: 10.1155/2018/1367801.
- Larese Filon F., Bello D., Cherrie J.W. i in. (2016). Occupational dermal exposure to nanoparticles and nano-enabled products: Part 1. Factors affecting skin absorption. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 219(6), 536–544.
- Larson J.K., Carvan M.J. 3rd, Hutz R.J. (2014). Engineered nanomaterials: an emerging class of novel endocrine disruptors. *Biol. Reprod.* 91(1), 20, 1–8.

- Lauretta R., Sansone A., Sansone M. i in. (2019). Endocrine disrupting chemicals: effects on endocrine glands. *Front. Endocrinol.* 10, 178.
- Leisegang K., Henkel R. (2018). The in vitro modulation of steroidogenesis by inflammatory cytokines and insulin in TM3 Leydig cells. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 16, 26.
- Maglich J.M., Kuhn M., Chapin R.C. i in. (2014). More than just hormones: H295R cells as predictors of reproductive toxicity. *Reprod. Toxicol.* 45, 77–86.
- Maines M.D. (1990). Effect of cis-platinum on heme, drug, and steroid metabolism pathways: possible involvement in nephrotoxicity and infertility. *Crit. Rev. Toxicol.* 21(1), 1–20.
- Mukherjee S., Sravan V., Roy A. i in. (2021). Acute toxicity, biodistribution, and pharmacokinetics studies of pegylated platinum nanoparticles in mouse model. *Adv. NanoBioMed Res.* 1(7), 2000082.
- Nakano Y., Yamashita T., Okuno M. i in. (2016). In vitro steroid profiling system for the evaluation of endocrine disruptors. *J. Biosci. Bioeng.* 122(3), 370–377.
- Nielsen F.K., Hansen C.H., Fey J.A. i in. (2012). H295R cells as a model for steroidogenic disruption: a broader perspective using simultaneous chemical analysis of 7 key steroid hormones. *Toxicol. In Vitro* 26, 343–350.
- Odermatt A., Strajhar P., Engeli R.T. (2016). Disruption of steroidogenesis: cell models for mechanistic investigations and as screening tools. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 158, 9–21.
- OECD (2011). OECD Guideline for the testing of chemicals. H295R Steroidogenesis Assay, <https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/suppdocs/feddocs/oced/oced-tg456-2011-508.pdf> [dostęp: 23.05.2023].
- Pietroiusti, A., H. Stockmann-Juvala, F. Lucaroni i in. (2018). Nanomaterial exposure, toxicity, and impact on human health. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* 10, e1513.
- Poh T.J., Ali N.A.B.M., Aogáin M.M. i in. (2018). Inhaled nanomaterials and the respiratory microbiome: clinical, immunological and toxicological perspectives. *Part. Fibre Toxicol.* 15(1), 46.
- Priyam, A., Singh P.P., Gehlout S. (2018). Role of endocrine-disrupting engineered nanomaterials in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Front. Endocrinol.* 9, 704. DOI: 10.3389/fendo.2018.00704.
- Rao R.M., Jo Y., Leers-Sucheta S. i in. (2003). Differential regulation of steroid hormone biosynthesis in R2C and MA-10 Leydig tumor cells: role of SR-B1-mediated selective cholesteryl ester transport. *Biol. Reprod.* 68, 114–121.
- Schulte P.A., Leso V., Niang M. i in. (2019). Current state of knowledge on the health effects of engineered nanomaterials in workers: a systematic review of human studies and epidemiological investigations. *Scand. J. Work Environ. Health* 45(3), 217–238.
- Simon V., Avet Ch., Grange-Messent V. i in. (2017). Carbon black nanoparticles inhibit aromatase expression and estradiol secretion in human granulosa cells through the ERK1/2 pathway. *Endocrinology* 158(10), 3200–3211.
- Stapleton P.A., Hathaway Q.A., Nichols C.E. i in. (2018). Maternal engineered nanomaterial inhalation during gestation alters the fetal transcriptome. *Part. Fibre Toxicol.* 15, 3.
- Stone V., Miller M.R., Clift M.J.D. i in. (2017). Nanomaterials versus ambient ultrafine particles: an opportunity to exchange toxicology knowledge. *Environ. Health Perspect.* 125(10), 106002.
- Strajhar P., Tonoli D., Jeanneret F. i in. (2017). Steroid profiling in H295R cells to identify chemicals potentially disrupting the production of adrenal steroids. *Toxicology* 381, 51–63.
- Thangam Y., Veeramani C. (2015). Toxicity assay on platinum nano particles to fresh water fish “*Cirrhinus mrigala*”. *Int. J. Sci. Res.* 4(6), 3102–3108.
- Umezawa M., Onoda A., Korshunova I. i in. (2018). Maternal inhalation of carbon black nanoparticles induces neurodevelopmental changes in mouse offspring. *Part. Fibre Toxicol.* 15(1), 36.
- Wang T., Rainey W.E. (2012). Human adrenocortical carcinoma cell lines. *Mol. Cell. Endocrinol.* 351(1), 58–65.
- Young F., Asaduzzaman M., Austin S. i in. (2017). Effect of glyphosate and roundup on H295R, T47D and murine follicular cell viability and estrogen synthesis in vitro. *Adv. J. Toxicol. Curr. Res.* 1(2), 084–093.
- Zapór L. (2016). Effects of silver nanoparticles of different sizes on cytotoxicity and oxygen metabolism disorders in both reproductive and respiratory system cells. *Arch. Environ. Protect.* 42, 32–47.
- Zapór L. (2018). Zagrożenia wynikające ze stosowania nanotechnologii w środkach smarnych i sposoby ich monitorowania [Hazards resulting from the use of nanomaterials in lubricants and ways of monitoring them]. *Bezp. Pr.* 1, 18–21.
- Zapór L., Oberbek P. (2020). Nanomaterials in the work environment. [W:] *Emerging chemical risks in the work environment.* [Red.] M. Pośniak. Taylor & Francis.
- Zirkin B.R., Papadopoulos V. (2018). Leydig cells: formation, function, and regulation. *Biol. Reprod.* 99(1), 101–111.

**Adres do korespondencji/Contact details:**

LIDIA ZAPÓR  
e-mail: lizap@ciop.pl  
Centralny Instytut Ochrony Pracy –  
Państwowy Instytut Badawczy  
00-701 Warszawa, ul. Czerniakowska 16  
POLAND