

Czy nieodżywcze składniki pasz – fitoestrogeny stanowią zagrożenie w rozrodzie krów?*)

IZABELA WOŁAWEK-POTOCKA**), ANNA KORZEKWA**), DARIUSZ J. SKARŻYŃSKI

Zakład Immunologii Rozrodu Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN w Olsztynie, ul. Tuwima 10, 10-747 Olsztyn

Woławek-Potocka I., Korzekwa A., Skarżyński D. J.

Can phytoestrogens pose a danger in the reproduction of cows?

Summary

Since alpha-alpha, lucern and soy bean contain high concentrations of phytoestrogens, plant estrogens may be present in fodder for ruminants, especially dairy cattle. Although the concentration of basic flavonoids in blood plasma of cows fed soy bean rises within one hour of feeding, their active metabolites are present in the blood plasma in high concentrations for a lengthy period after feeding. Phytoestrogens are much less active than endogenous estrogens, therefore their 1000-times higher concentrations in the blood plasma enable them to act on the hormonal status of the female. They might influence the reproductive processes on many regulatory levels: on the central level as well as local and peripheral levels. It has been proved that phytoestrogens might inhibit secretion and action of pituitary LH, thus modulating the action of endogenous estrogens in the follicular phase of the estrus cycle, which may be a reason for a lack of estrus and disruption of the ovulation. Although phytoestrogens and their active metabolites do not directly influence P4 secretion in the bovine luteal cells, they may inhibit the sensitivity of the bovine CL to luteotropic factors, including LH. They may also stimulate testosterone and prostaglandin (PG)F_{2α} secretion leading to disruption of steroidogenesis in the CL. Within the bovine oviduct and uterus, phytoestrogens modulate synthesis and action of the factors responsible for conception, embryo development and implantation. Phytoestrogens stimulate PGF_{2α} synthesis in the bovine endometrium, leading to the disruption of the ratio of luteotropic to luteolytic arachidonic acid (AA) metabolites. Therefore, they might be one of the reasons for the disruption of early pregnancy and in the end lead to embryo mortality. In conclusion, when feeding animals with fodder containing many phytoestrogens, the fact that their high productivity might lead to low reproduction efficiency must be taken into account.

Keywords: phytoestrogens, estrus cycle, early pregnancy, cow

Wykazanie spożywania dużej ilości fitoestrogenów w diecie jako przyczyny zaburzeń rozrodu, m.in. u australijskich owiec, dziko żyjących przepiórek kalifornijskich oraz gepardów, stało się inspiracją do rozpoczęcia licznych badań dotyczących wpływu fitoestrogenów na procesy związane z regulacją procesów fizjologicznych, w tym rozrodczych u zwierząt i ludzi (1, 6, 15). Istnieje coraz więcej dowodów, że spożywanie fitoestrogenów wpływa na obniżenie zdolności reprodukcyjnych wielu zwierząt, takich jak: gryzonie (16) i przeżuwacze (1, 20) oraz ludzi (10). Shore i wsp. (21) wykazali, że wysokie stężenie endogennych estrogenów i fitoestrogenów w okresie inseminacji może być przyczyną zaburzeń zapłodnienia i rozwoju zarodka, co w konsekwencji prowadzi do wczesnej śmierci zarodkowej u krów. W badaniach własnych (27) wy-

kazano, że karmienie krów mlecznych śrutą sojową może być przyczyną obniżenia płodności. Liczba kryć w grupie doświadczalnej (zwierzęta skarmiano 2,5 kg śrutą sojową/dzień/sztukę) była dwukrotnie wyższa w porównaniu do grupy kontrolnej, zaś skuteczność zacieleń w ciągu jednego roku obserwacji wynosiła 66,7% (kontrola = 100%). Wykazano przy tym wysokie stężenia metabolitów fitoestrogenów w surowicy krów karmionych śrutą sojową, skorelowane z wysokimi stężeniami luteolitycznej prostaglandyny (PG)F_{2α} i niższym stężeniem progesteronu (P4) w osoczu badanych zwierząt (ryc. 1, 2) (19, 27).

Klasyfikacja i budowa fitoestrogenów

W przyrodzie występują dwie podstawowe klasy estrogenów środowiskowych: fitoestrogeny – występujące w roślinach i ksenoestrogeny – będące syntetycznym produktem działalności człowieka (7). Fitoestrogeny dzielimy na: stilbeny, lignany oraz flawonoidy (18). Flawonoidy stanowią bardzo zróżnicowa-

*) Referat przedstawiony podczas XI Międzynarodowej Konferencji Naukowej, Rozród Bydła, Polanica Zdrój 29-20.06.2007.

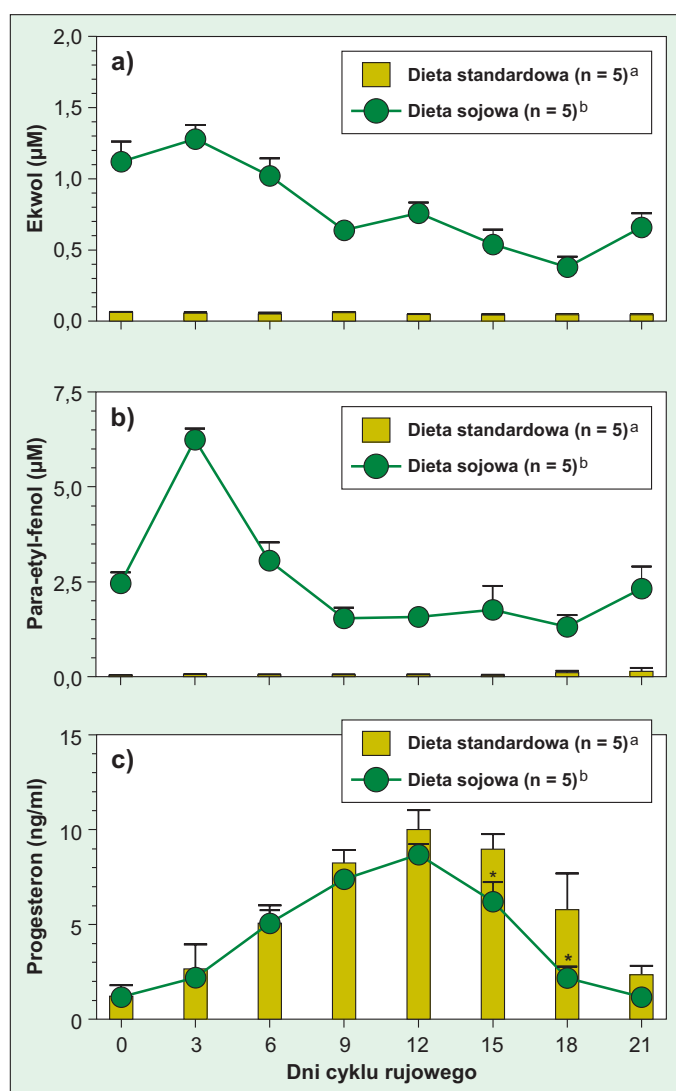
**) Stypendystki Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej, program START 2006 i 2007.

ną pod względem budowy chemicznej grupę substancji obejmującą, obok izoflawonoidów, wiele innych związków fenolowych, takich jak: antocyjaniny, katechiny, flawony, flawonole, flawanony i flawanole. Do izoflawonoidów należą z kolei izoflawony i kumestany. Całą grupę flawonoidów pochodzenia roślinnego zalicza się do polifenoli o niskiej masie cząsteczkowej (2). Polifenole są pochodnymi 2-fenyl-benzo- γ -pironu zbudowanymi z trzech pierścieni fenolowych (8).

Występowanie i metabolizm fitoestrogenów

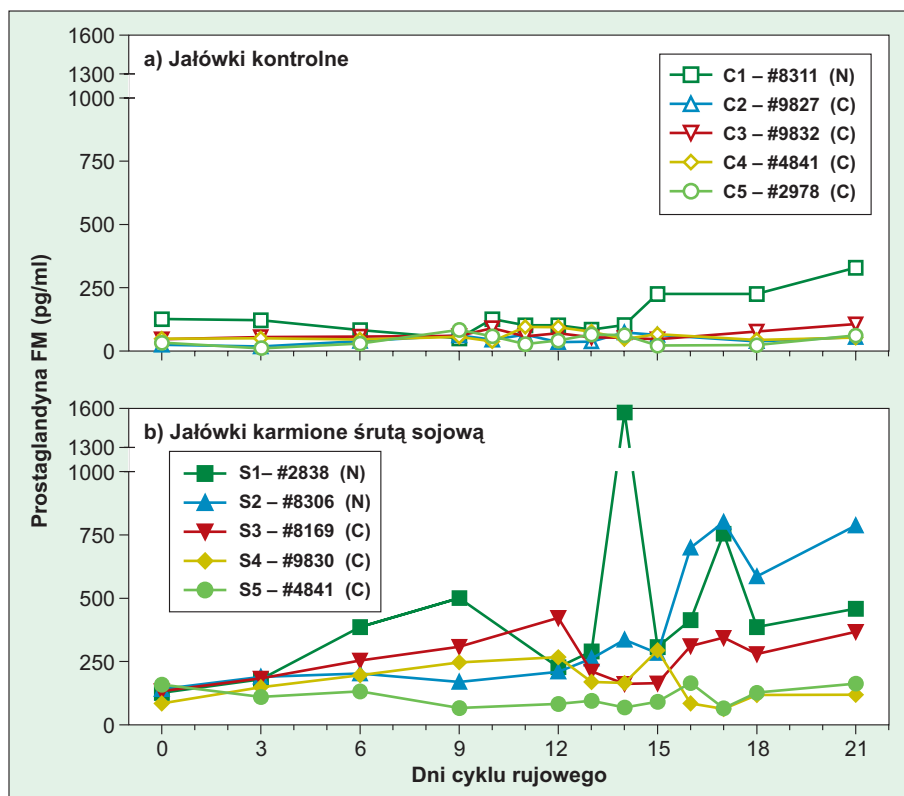
Generalnie flawonoidy roślinne są odporne na ogrzewanie, utlenianie i wysychanie oraz są stosunkowo wrażliwe na działanie światła (2). Fotostabilność flawonoidów zależy od grupy hydroksylowej dołączonej do 3 węgla w pierścieniu C. Intensywność syntezy poszczególnych fitoestrogenów i ich pochodnych w roślinach katalizowana jest poprzez naświetlanie. Stąd też zawartość fitoestrogenów w roślinach stosowanych w żywieniu zwierząt zależy od stopnia ekspozycji poszczególnych części składowych rośliny na światło słoneczne. Największa ich ilość znajduje się w liściach, kwiatach i wszystkich zewnętrznych częściach rośliny, ekspozowanych na światło słoneczne. Wysokie stężenia fitoestrogenów występują często w paszach stosowanych w żywieniu krów. W koniczynie, lucernie i soi wykazano wysokie stężenie izoflawonów: genisteiny i daidzeiny (27), które w organizmie krów, dzięki mikroorganizmom żwacza, metabolizowane są do dwóch aktywnych biologicznie metabolitów: para-etylfenolu i ekwolu (27).

Fitoestrogeny reprezentują grupę substancji, których biologiczne działanie, ze względu na obecność pierścieni fenolowych, jest bardzo zbliżone do endogennych estrogenów. Jakkolwiek wykazują one słabszą aktywność biologiczną od 17β -estradiolu (E_2), to jednak ich występowanie w znacznych ilościach w paszach pochodzenia roślinnego sprawia, że mogą być potencjalnymi czynnikami oddziałującymi na układ hormonalny i rozrodczy samicy (1). W badaniach własnych wykazano ponad 100 000 razy wyższe stężenia ekwolu i para-etylfenolu w osoczu jałówek (odpowiednio ok. 0,2 μ M ekwolu i ok. 1,53 μ M para-etylfenolu) i krów karmionych srtą sojową (ok. 1,1 μ M ekwolu i 6,3 μ M para-etylfenolu) w porównaniu do stężenia endogennego E_2 obserwowanego w osoczu krwi obwodowej krów w czasie cyklu jajnikowego (ok. 0,01-0,05 pM) (27). Tak wysokie stężenia izoflawonów mogą więc kompensować ich znacznie niższe powinowactwo do receptorów estrogenowych (100-1000 razy niższe powinowactwo fitoestrogenów do receptora estrogenowego w porównaniu do E_2) (5). W organizmie zwierzęcia istnieją mechanizmy obronne przed działaniem aktywnych form fitoestrogenów, polegające głównie na sprzęganiu ich z kwasem siarkowym lub glukuronowym i tworzeniu w ten sposób form nieaktywnych (2, 12). Stąd w warunkach fizjo-



Ryc. 1. Stężenie metabolitów fitoestrogenów: ekwolu (a), para-etylfenolu (b) oraz progesteronu (c) w osoczu krwi jałówek karmionych dietą standardową i dietą z dodatkiem 2,5 kg srtuty sojowej/dzień/zwierzę. Przewidywano za zgodą z pracy Piotrowska i wsp. (19)

logicznych zaledwie 5-20% izoflawonów znajdujących w osoczu krów i owiec żywionych paszą bogata w fitoestrogeny jest w formie wolnej – nieskoniugowanej (aktywnej) (12). Jednakże koniugacja fitoestrogenów i ich metabolitów jest procesem odwracalnym, sterowanym enzymatycznie przez odpowiednie enzymy, np. przez β -glukuronidazę (22). Odwrócenie tego procesu może zachodzić w okresie zaburzonej homeostazy organizmu (np. stany zapalne), prowadząc do wzrostu aktywności tych enzymów, a co za tym idzie – do wzrostu stężenia wolnych, aktywnych form izoflawonów w osoczu zwierząt doświadczalnych i ludzi (22). W badaniach własnych wykazano, że u krów we wczesnej ciąży oraz z eksperymentalnie indukowanymi stanami zapalnymi macicy (*metritis*) i wymienia (*mastitis*) dochodzi do znacznego wzrostu stężenia aktywnych metabolitów izoflawonów we krwi (para-etylfenolu i ekwolu) w porównaniu do odpowiednich grup kontrolnych (29). Zaburzenia homeostazy organizmu



Ryc. 2. Stężenie metabolitu prostaglandyny $F_{2\alpha}$ – 13,14, keto $PGF_{2\alpha}$ (PGFM) w osoczu krwi jałówek karmionych dietą standardową (a) i 2,5 kg śrutą sojowej/dzień/zwierzę (b). C – jałówki ciężarne, N – jałówki nieciężarne. Przedrukowano za zgodą z pracy Woławek-Potocka i wsp. (27)

mogą więc doprowadzać do wzrostu stężenia i biodostępności nieskonjugowanych, aktywnych metabolitów izoflawonów, co dodatkowo naraża zwierzęta na działanie egzogennych związków estrogenopodobnych (endocrine disruptors).

Wpływ fitoestrogenów na oś regulacyjną podwzgórze–przysadka–jajnik i lokalne mechanizmy w jajniku

Mechanizm wpływu fitoestrogenów na procesy regulujące funkcje rozrodcze, a szczególnie na funkcje jajnika, jest złożony. McGarvey i wsp. (14) dowiedli, że u szczurów fitoestrogeny mogą hamować wydzielanie LH poprzez uniewrażliwienie komórek przysadki na działanie GnRH. Ponadto Hughes i wsp. (9) wykazali, że fitoestrogeny, hamując wydzielanie LH, obniżają produkcję P₄, co jest przyczyną wysokiej liczby poronień. Fitoestrogeny hamują również działanie endogennych estrogenów w fazie pęcherzykowej cyklu, co może być przyczyną zaburzeń w rozwoju i funkcji pęcherzyków, braku rui oraz nieskutecznych zapłodnień (7). W badaniach własnych określono wpływ fitoestrogenów na funkcje wydzielnicze komórek ciała żółtego (CL) krowy (11, 19, 28). Wykazano, że fitoestrogeny i ich aktywne metabolity nie wpływają na podstawowe i pulsacyjne uwalnianie P₄, związki te zahamowały jednak stymulujący wpływ LH i PGE₂ na uwalnianie P₄ w steroidogennych komórkach CL i w tkance lutealnej oraz stymulowały wydzielanie

$PGF_{2\alpha}$ i testosteronu (19, 29). Ponadto, oprócz wpływu na steroidogenne komórki CL, aktywne metabolity fitoestrogenów (para-etylfenol i ekwol) stymulowały wydzielanie luteolitycznej $PGF_{2\alpha}$, leukotrienu C₄ i tlenku azotu (kolejnych mediatorów luteolizy) w pozostałych typach komórek CL (komórki dodatkowe CL: śródbłonna naczyń oraz układu odpornościowego – leukocyty, monocyty) (11). Luteoliza (regresja CL) jest procesem złożonym i za jej aktywację oraz przebieg odpowiada kaskada czynników/produktów komórek dodatkowych (endotelina-1, cytokiny, tlenek azotu, leukotrien C₄) indukowana przez maciczną $PGF_{2\alpha}$. Można wnioskować, że fitoestrogeny i ich aktywne metabolity (para-etylfenol oraz ekwol) działają jak naturalne estrogeny modulując/inicjując procesy regresji CL zależne od komórek układu immunologicznego i komórek śródbłonna. Wyniki badań uzyskane metodami *in vitro* (kultury i kokultury komórkowe) zostały potwierdzone ostatnio w badaniach *in vivo* (19). Ciałka żółte pozyskane od krów żywionych śrutą sojową wykazują niską wrażliwość na endogenne czynniki luteotropowe (LH, PGE₂), co prowadzi do zaburzeń syntezy i wydzielania P₄ (ryc. 1c) (19). Z kolei niedostateczna osłona rozwijającego się zarodka przez produkty CL w pierwszych, krytycznych okresach ciąży może zaburzać proces macicznego rozpoznania ciąży, hamować rozwój i implantację zarodka, prowadząc do wczesnej śmierci zarodkowej.

Fitoestrogeny modulują syntezę i wydzielanie prostaglandyn w błonie śluzowej macicy krowy

Odpowiedni stosunek luteolitycznych i luteotropowych metabolitów kwasu arachidonowego odpowiada za prawidłowy przebieg cyklu i wczesnej ciąży u krowy. Prostaglandyna $F_{2\alpha}$ jest głównym czynnikiem luteolitycznym u przeżuwaczy (13), podczas gdy PGE₂ posiada funkcje luteotropowe (4). Dlatego utrzymanie odpowiedniego stosunku $PGF_{2\alpha}$ do PGE₂ jest niezbędne dla prawidłowej reaktywności macicy i utrzymania czynności CL oraz wydzielania P₄ (17).

Fitoestrogeny, oprócz modulacji rozwoju oraz funkcji pęcherzyków i oocytu oraz wpływu na proces zapłodnienia, a później tworzenia się i funkcji CL, mogą u krów bezpośrednio zaburzać funkcje wydzielnicze śluzówki macicy podczas przebiegu cyklu rujowego i wczesnej ciąży (27). W badaniach *in vivo* u krów karmionych śrutą sojową wykazano istotny spadek liczby skutecznych zacieleń, wzrost wydzielania $PGF_{2\alpha}$, co udokumentowano wzrostem stężenia jej metaboli-

tu (PGFM) w osoczu krwi (ryc. 2) (27). Wzrost stężenia PGFM był dodatnio skorelowany z wysokim stężeniem aktywnych metabolitów izoflawonów (ekwolu i para-etyl-fenolu) (ryc. 1, 2) (19, 27). W kolejnych doświadczeniach *in vitro* zbadano mechanizmy odpowiedzialne za nakierowanie metabolizmu kwasu arachidonowego w śluzówce macicy krowy na syntezę luteolitycznej $\text{PGF}_{2\alpha}$ (26-28). W badaniach tych wykazano, że fitoestrogeny silnie stymulują wydzielanie luteolitycznej $\text{PGF}_{2\alpha}$ ze skrawków śluzówki macicy w ciągu trwania całego cyklu jajnikowego, tylko nieznacznie wpływając na syntezę luteotropowej PGE_2 (27). Najsilniejszy efekt stymulujący wydzielanie $\text{PGF}_{2\alpha}$ zaobserwowano pomiędzy 5. a 12. dniem cyklu rujowego/ciąży, a więc w okresie wzrostu i pełnego funkcjonowania CL. Za syntezę luteolitycznej $\text{PGF}_{2\alpha}$ w błonie śluzowej macicy krowy są odpowiedzialne komórki nabłonkowe, natomiast komórki łącznotkankowe (stromy) produkują około 10 razy więcej luteotropowej PGE_2 niż komórki nabłonkowe (24). Stąd też w kolejnych badaniach określono, które komórki śluzówki macicy są wrażliwe na działanie fitoestrogenów (26, 30). Wykazano, że fitoestrogeny bardzo silnie stymulują syntezę i wydzielanie $\text{PGF}_{2\alpha}$ w komórkach nabłonkowych (ok. 600% kontroli), znacznie słabiej zaś stymulują uwalnianie PGE_2 w komórkach łącznotkankowych śluzówki macicy (ok. 200% kontroli), ponadto są czynnikami ograniczającymi znacznie żywotność komórek stromy (26). Fitoestrogeny preferencyjnie stymulują więc wydzielanie luteolitycznej $\text{PGF}_{2\alpha}$ w komórkach nabłonkowych macicy krowy, prowadząc w ten sposób do dysfunkcji tego narządu poprzez zachwianie stosunku wydzielania luteotropowej PGE_2 do luteolitycznej $\text{PGF}_{2\alpha}$. Można sądzić, że w okresie wczesnej ciąży fitoestrogeny działając jako agoniści endogennych estrogenów, mogą zaburzać odpowiedni stosunek wydzielania luteotropowych do luteolitycznych metabolitów kwasu arachidonowego, niezbędny do utrzymania czynności CL, matczynego rozpoznania ciąży, prawidłowego rozwoju i implantacji zarodka. Ponadto, według Reinhart i wsp. (20) fitoestrogeny wzmagają w jajowodzie syntezę czynnika hamowania białaczek (LIF), uczestniczącego w implantacji zarodka, co przy jego nadmiernej syntezie może doprowadzić do przedwczesnej implantacji i zaburzeń rozwoju zarodka u krowy. W konsekwencji fitoestrogeny mogą doprowadzać do przedwczesnej luteolizy, niedorozwoju i zatrzymania czynności CL, zaburzeń rozwoju zarodka oraz wczesnego zamierania zarodka.

Jednakże fitoestrogeny stymulują również silne wydzielanie $\text{PGF}_{2\alpha}$ z błony śluzowej macicy krowy w późnej fazie lutealnej, w okresie okołoowulacyjnym oraz w pierwszych pięciu dniach cyklu rujowego/ciąży (27). Pomiedzy 3.-5. dniem po zapłodnieniu dochodzi do przemieszczenia się zapłodnionej komórki jajowej z jajowodu do macicy. Można więc sądzić, że w okresie owulacji i w pierwszych dniach po zapłod-

nieniu stymulujący wpływ fitoestrogenów na uwalnianie $\text{PGF}_{2\alpha}$, która jest czynnikiem silnie wzmagającym kurczliwość jajowodu i macicy (25), może mieć korzystny wpływ na efektywniejszy transport gamet i zarodka. Ponadto, stymulujący wpływ fitoestrogenów na wydzielanie $\text{PGF}_{2\alpha}$ w okresie okołoluteolitycznym może dodatkowo wzmacniać dodatnią pętlę zwrotną między $\text{PGF}_{2\alpha}$ a czynnikami indukującymi luteolizę, takimi jak OT^{α} (3) czy $\text{TNF-}\alpha$ (23). Fitoestrogeny, działając jak endogenne estrogeny, szczególnie w czasie luteolizy i owulacji, mogą więc być czynnikami wzmagającymi mechanizmy umożliwiające powrót do cykliczności krów po porodzie. Dodatkowo, mogą zwiększać kurczliwość mięśniówki jajowodu, umożliwiając lepszy transport gamet do miejsca ich zapłodnienia. Jednakże nie można pominąć opisanego wcześniej bezpośredniego, negatywnego wpływu fitoestrogenów na proces zapłodnienia i wczesny rozwój zarodka.

Wewnątrzkomórkowe i molekularne mechanizmy działania fitoestrogenów w komórkach układu rozrodczego krowy

Interesujące wydaje się pytanie, czy izoflawony działają w komórkach układu rodnego tak, jak endogenne estrogeny? Endogenne estrogeny mogą bowiem oddziaływać w komórce poprzez aktywację wielu wewnątrzkomórkowych szlaków przekazywania informacji – mechanizmów pozagenomowych oraz mechanizmów związanych z aktywacją genomu. Mechanizmy pozagenomowe działania estrogenów mogą odbywać się poprzez: aktywację receptorów błonowych, związanych z systemem białek G, aktywację fosfolipazy C (PLC), kinazy białkowej A (PKA), kinazy tyrozynowych oraz aktywację wewnątrzkomórkowych jonów wapnia $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Klasyczny mechanizm działania estrogenów związany jest z aktywacją genomu poprzez wpływ na estrogenowe receptory jądrowe. Badania wykazały, że izoflawony, w odróżnieniu od endogennych estrogenów, wykazują wyłącznie genomowy, a więc zależny od estrogenowych (i/lub androgenowych) receptorów jądrowych mechanizm działania w komórkach CL i śluzówki macicy krowy (26, 28). Estradiol-17 β działa w komórkach poprzez aktywację genomowych receptorów, ale również może indukować pozagenomowy szlak przekazywania informacji wewnątrz komórek ciała żółtego i śluzówki macicy krowy: PLC-PKC- $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (26, 29, 28). Nie wykazano pozagenomowego, zależnego od pobudzenia PLC, PKC oraz aktywacji jonów $[\text{Ca}^{2+}]_i$, wewnątrzkomórkowego mechanizmu działania tych związków (26, 28). Wykazano ponadto, że stymulacja syntezы luteolitycznej $\text{PGF}_{2\alpha}$ w komórkach nabłonkowych błony śluzowej macicy krowy odbywa się poprzez wpływ fitoestrogenów na ekspresję genów i aktywację białek dla enzymów zaangażowanych w metabolizm kwasu arachidonowego, a szczególnie enzymu bezpośrednio odpowiedzialnego za powstawanie $\text{PGF}_{2\alpha}$ – syntazy $\text{PGF}_{2\alpha}$ (30).

Podsumowanie

Fitoestrogeny i ich metabolity mogą oddziaływać na organizm ludzi i zwierząt na różnych poziomach regulacyjnych: od centralnych – na poziomie regulacji funkcji podwzgórza i przysadki, poprzez obwodowe/lokalne na poziomie jajnika, aż po regulację wydzielania prostaglandyn w błonie śluzowej macicy. Pośród wielu pozytywnych działań i praktycznych zastosowań fitoestrogenów w terapii i profilaktyce wielu schorzeń (nowotwory, immunomodulacja), nie sposób pominąć ich negatywnego, bezpośredniego lub pośredniego, wpływu na rozród zwierząt. W okresie cyklu jajnikowego i ciąży fitoestrogeny działając jako agonści endogennych estrogenów poprzez mechanizmy zależne od pobudzenia jądrowych receptorów estrogenów, obniżają wrażliwość CL na luteotropowe działanie LH, stymulują w komórkach CL syntezę lokalnych mediatorów luteolizy (PGF_{2α}, tlenek azotu i leukotrien C₄) oraz wzmagają wrażliwość komórek na luteolityczne (cytotoksyczne) działanie cytokin, co może być przyczyną niedomogi lutealnej. Ponadto fitoestrogeny stymulują syntezę i wydzielanie PGF_{2α} w CL i w śluzówce macicy krowy. Tym samym zaburzają stosunek wydzielania luteotropowej PGE₂ do luteolitycznej PGF_{2α} niezbędny do utrzymania czynności CL, matczynego rozpoznania ciąży, prawidłowego rozwoju i implantacji zarodka, co w konsekwencji może doprowadzać do przedwczesnej luteolizy i zamierania zarodka.

Wpływ fitoestrogenów (negatywny-pozytywny) zależy od fazy cyklu jajnikowego lub ciąży bądź zachowania homeostaty organizmu. Każde zaburzenie homeostazy organizmu (np. stan zapalny) może narażać krowy karmione paszą bogatą w fitoestrogeny na działanie bardzo wysokich stężeń związków estrogenopodobnych i zakłócać procesy rozrodu zależne od endogennych estrogenów. Żywiąc zwierzęta, szczególnie wysokoprodukcyjne krowy mleczne, należy pamiętać, że ich wysoka produkcyjność może zostać okupiona niedostateczną wydajnością rozrodu.

Piśmiennictwo

1. Adams N. R.: Detection of the effects of phytoestrogens on sheep and cattle. *J. Animal. Sci.* 1995, 7, 1509-1515.
2. Aherne S. A., O'Brien N. M.: Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. *Nutrit.* 2002, 18, 75-81.
3. Asselin E., Fortier M. A.: Detection and regulation of the messenger for a putative bovine endometrial 9-keto-prostaglandin E₂ reductase: effect of oxytocin and interferon- τ . *Biol. Reprod.* 2000, 62, 125-131.
4. Asselin E., Goff A. K., Bergeron H., Fortier M. A.: Influence of sex steroids on the production of prostaglandins F_{2α} and E₂ and response to oxytocin in cultured epithelial and stromal cells of the bovine endometrium. *Biol. Reprod.* 1996, 54, 371-379.
5. Branham W. S., Dial S. L., Moland C. L., Hass B. S., Blair R. M., Fang H., Shi L., Tong W., Perkins R. G., Sheehan D. M.: Phytoestrogens and mycoestrogens bind to the rat uterine estrogen receptor. *J. Nutr.* 2002, 132, 658-664.
6. Burtan J. L., Wells M.: The effects of phytoestrogens on the female genital tract. *J. Clin. Pathol.* 2002, 55, 401-407.
7. Dubey R. K., Rosselli M., Imthurn B., Keller P. J., Jackson E. K.: Vascular effects of environmental oestrogens: implications for reproductive and vascular health. *Hum. Reprod. Upd.* 2000, 4, 351-363.
8. Harborne J. B., Mabry T. J., Mabry H.: The Flavonoids. Academic Press Inc, New York, Inc 1975, rozdz. 8 i 10, 127-213, 377, 1011-1014, 1033-1036.
9. Hughes C. L., Kaldas R. S., Weisinger A. S., McCants C. E., Basham K. B.: Acute and subacute effects of naturally occurring estrogens on luteinizing hormone secretion in the ovariectomized rat. *Reprod. Toxicol.* 1991, 5, 127-132.
10. Humfrey C. D.: Phytoestrogens and human health effects: weighing up the current evidence. *Nat. Toxins* 1998, 6, 51-59.
11. Korzekwa A., Wocławek-Potocka I., Rogozińska A. M., Skarżyński D. J.: Equol and para-ethyl-phenol modulate cytokines action on bovine corpus luteum. Joint Polish-Japanese Seminar & 4th Congress of Society for Biology of Reproduction: Cutting age of reproductive physiology: regulation of ovarian function; Krakow, Poland 21-24 September 2005, s. 112.
12. Lundh T. J.-O.: Metabolism of estrogenic isoflavones in domestic animals. *PSEBM* 1995, 2008, 33-39.
13. McCracken J. A., Custer E. E., Lamsa J. C.: Luteolysis: a neuroendocrine-mediated event. *Physiol. Rev.* 1999, 79, 263-323.
14. McGarvey C., Cates P. S., Brooks N., Swanson I. A., Milligan S. R., Coen C. W., O'Byrne K. T.: Phytoestrogens and gonadotropin-releasing hormone pulse generator activity and pituitary luteinizing hormone release in the rat. *Endocrine* 2001, 124, 1202-1208.
15. McLachlan J. A.: Endocrine disrupters and female reproductive health. *Best Practice Res. Clin. Endocrinol. Metabol.* 2006, 20, 63-75.
16. Medlock K. L., Branham W. S., Sheehan D. M.: Effects of coumestrol and equol on the developing reproductive tract of the rat. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1995, 208, 67-71.
17. Milvae R. A., Hinckley S. T., Carlson J. C.: Luteotropic and luteolytic mechanisms in the bovine corpus luteum. *Theriogenology* 1996, 45, 1327-1349.
18. Morley P., Whitfield J. F., Vanderhygen B. C., Tsang B. K., Schwarz J. L.: A new, nongenomic estrogen action: the rapid release of intracellular calcium. *Endocrinology* 1992, 131, 1305-1312.
19. Piotrowska K. K., Wocławek-Potocka I., Bah M. M., Piskula M., Pilawski W., Bober A., Skarżyński D. J.: Phytoestrogens and their metabolites inhibit the sensitivity of the bovine corpus luteum on luteotropic factors. *J. Reprod. Develop.* 2006, 52, 33-41.
20. Reinhart K. C., Dubey R. K., Keller P. J., Lauper U., Rosselli M.: Xenoestrogens and phyto-oestrogens induce the synthesis of leukaemia inhibitory factor by human and bovine oviduct cells. *Mol. Hum. Reprod.* 1999, 5, 899-907.
21. Shore L. S., Rios C., Marcus S., Bernstein M., Shemesh M.: Relationship between peripheral estrogen concentrations at insemination and subsequent fetal loss in cattle. *Theriogenology* 1998, 50, 101-107.
22. Shimoi K.: Deglucuronidation of flavonoid, luteolin monoglucuronide, during inflammation. *Drug. Metab. Dispos.* 2001, 12, 20-24.
23. Skarżyński D. J., Bah M. M., Deptula K. M., Wocławek-Potocka I., Korzekwa A., Shibaya M., Pilawski W., Okuda K.: Roles of tumor necrosis factor- α in the regulation of the estrous cycle in cattle: an in vivo study. *Biol. Reprod.* 2003, 69, 1907-1913.
24. Skarżyński D. J., Miyamoto Y., Okuda K.: Production of prostaglandin F_{2α} by cultured bovine endometrial cells in response to tumor necrosis factor- α : cell type specificity and intracellular mechanisms. *Biol. Reprod.* 2000, 62, 1116-1120.
25. Wijayagunawardane M. P., Miyamoto A.: Tumor necrosis factor- α system in the bovine oviduct: a possible mechanism for embryo transport. *J. Reprod. Dev.* 2004, 50, 57-62.
26. Wocławek-Potocka I., Acosta T. J., Korzekwa A., Bah M. M., Shibaya M., Okuda K., Skarżyński D. J.: Phytoestrogens modulate prostaglandin production in bovine endometrium: cell type specificity and intracellular mechanisms. *Exp. Biol. Med.* 2005b, 230, 326-333.
27. Wocławek-Potocka I., Bah M. M., Korzekwa A., Piskula M., Wiczkowski W., Depta A., Skarżyński D. J.: Soy-bean derived phytoestrogens regulate prostaglandin secretion in endometrium during cattle estrous cycle and early pregnancy. *Exp. Biol. Med.* 2005a, 230, 189-199.
28. Wocławek-Potocka I., Bober A., Korzekwa A., Okuda K., Skarżyński D. J.: Equol and para-ethyl-phenol stimulate prostaglandin F_{2α} secretion in bovine corpus luteum: intracellular mechanisms of action. *Prostaglandins Other Lipid Med.* 2006, 287-297.
29. Wocławek-Potocka I., Korzekwa A., Piskula M., Skarżyński D. J.: Isoflavone metabolism during experimentally induced mastitis and metritis in cattle. *Reprod. Dom. Animal.* 2006, 41, 355 (P186).
30. Wocławek-Potocka I., Okuda K., Acosta T. J., Korzekwa A., Pilawski W., Skarżyński D. J.: Phytoestrogen metabolites are much more active than phytoestrogens themselves in increasing prostaglandin F_{2α} synthesis via prostaglandin F_{2α} synthase-like 2 stimulation in bovine endometrium. *Prostaglandins Other Lipid Med.* 2005c, 78, 201-217.

Adres autora: prof. dr hab. Dariusz J. Skarżyński, ul. Tuwima 10, 10-747 Olsztyn; e-mail: skadar@pan.olsztyn.pl