

Aktywne metabolity fitoestrogenów stymulują wydzielanie mediatorów luteolizy w różnych typach komórek ciała żółtego krowy*)

ANNA KORZEKWA**), ANNA ROGOZIŃSKA, IZABELA WOCLAWEK-POTOCKA**),
DARIUSZ JAN SKARŻYŃSKI

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

Korzekwa A., Rogozinska A., Woclawek-Potocka I., Skarzynski D. J.

Active phytoestrogen metabolites stimulate luteolysis mediators secretion in different types of bovine corpus luteum cells

Summary

It has been demonstrated recently that phytoestrogens (ekwol, para-ethyl-phenol and 17 β -estradiol) modulate steroidogenesis and enhance luteolytic PGF_{2 α} and cytokine action in bovine corpus luteum (CL). The regression of bovine CL is dependent on the appropriate contact between all the types of CL cells and induction of consecutive luteolysis mediators. The aim of this study was to determine the influence of phytoestrogens on the secretion of luteolytic mediators depending on cell type and cell-to-cell contact. The studies were conducted according to the earlier established cell coculture model, which allowed the studies of interactions between steroidogenic cells, endothelial cells and immune CL in vitro. As indicators of phytoestrogene actions during luteolysis the authors measured the levels of PGF_{2 α} , leukotrien C₄ and stable nitric oxide metabolites (NO₂/NO₃) using immuno-enzymatical assays (EIA). Phytoestrogens stimulated secretion of PGF_{2 α} , LTC₄ and NO₂/NO₃ in steroidogenic cells (p < 0.05) at the highest level. Cell cultures in cocultures (in composition steroidogenic, endothelial, immune cells) did not influence the effect of phytoestrogens, which indicated that steroidogenic cells are the main target for phytoestrogen action within the bovine CL.

Keywords: phytoestrogens, prostaglandin F_{2 α} , corpus luteum, cow

Oprócz komórek steroidogennych, stanowiących od 25% do 40% ilości wszystkich komórek ciała żółtego (CL) krowy, w jego skład wchodzi także: komórki śródbłonna naczyń, komórki układu immunologicznego oraz komórki tkanki łącznej (3, 11, 12). Bezpośrednio po owulacji dochodzi do proliferacji komórek śródbłonna naczyń, które penetrują rozwijającą się tkankę lutealną i pod koniec fazy lutealnej stanowią główny element strukturalny CL krowy – ponad 60% objętości (12). W pierwszych dniach cyklu jajnikowego oraz w okresie poprzedzającym luteolizę dochodzi również do wzrostu w CL liczby komórek immunologicznych: makrofagów, monocytów oraz limfocytów (17, 24). Od 12. do 18. dnia cyklu jajnikowego w CL krowy produkowane i wydzielane jest chemotaktyczne białko monocytów (MCP-1), które wzmacnia infiltrację CL komórkami układu immunologicznego, stymuluje ich proliferację i zwiększa produkcję cytokin (24).

Komórki steroidogenne współdziałają z komórkami niesteroidogennymi na drodze parakrynej i w ten spo-

sób dochodzi do modulacji/regulacji funkcji wydzielniczych CL (3, 6-8, 14, 16, 17, 19). Procesy wzrostu, różnicowania się oraz regresji CL zależne są od także od interakcji międzykomórkowych (3, 6, 11). Dyskusyjny jest ponadto mechanizm bezpośredniego wpływu prostaglandyny (PG) F_{2 α} na procesy luteolityczne zachodzące w steroidogennych komórkach podczas regresji CL (2, 11, 13, 17, 23). Rolę pośredników działania PGF_{2 α} w komórkach steroidogennych CL pełnią produkty innych, dodatkowych komórek CL (3, 11, 16, 19, 23). Komórki śródbłonna produkują endotelinę-1 (ET-1) uznaną za jeden z ważniejszych mediatorów luteolitycznego działania PGF_{2 α} w CL krowy (1, 5).

Ponadto w komórkach śródbłonna uwalniany jest tlenek azotu (NO) i leukotrieny (LT) zaangażowane także w proces regresji CL krowy (8, 9, 11, 21, 22). Cytokiny, w tym przede wszystkim czynnik martwicy nowotworu- α (TNF) i interferon- γ są za to głównymi mediatorami luteolitycznego działania PGF_{2 α} , pochodzącymi z komórek układu odpornościowego (13, 16, 17, 20, 21).

Wykazano ostatnio, że aktywne metabolity izoflawonów (fitoestrogenów): para-etyl-fenol oraz ekwol działają jako agoniści naturalnych estrogenów, modulując

*) Praca wykonana w ramach projektu badawczego KBN nr PBZ-KBN-084/P06/2002/5.2.

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

proces regresji CL zależny od komórek układu immunologicznego (4, 10, 18, 26). Fitoestrogeny hamują stymulowane LH wydzielanie P4 w CL krowy (18) oraz pobudzają proces funkcjonalnej luteolizy poprzez wzmożenie stymulowanej przez cytokiny syntezy $\text{PGF}_{2\alpha}$ i NO w CL krowy (4, 10). Jak opisano wcześniej, proces regresji CL krowy jest zależny od zapewnienia właściwego kontaktu między wszystkimi typami komórek CL i możliwości pobudzenia kolejnych mediatorów luteolizy. Stąd też określenie wpływu fitoestrogenów na procesy zachodzące w CL podczas jego regresji wymaga zastosowania modelu badawczego zapewniającego z jednej strony kontakt między komórkami, a z drugiej strony różnicującego wpływ fitoestrogenów na poszczególne typy komórek. Ostatnio opracowaliśmy model kokultur komórek CL w zawieszynie, jako odpowiedni do badania interakcji pomiędzy głównymi typami komórek CL krowy (11).

Celem badań było określenie wpływu aktywnych metabolitów fitoestrogenów (para-etyl-fenolu, ekwolu) oraz 17β -estradiolu (E_2) w parakrynnych regulacjach pomiędzy poszczególnymi typami komórek CL krowy. Jako parametry działania fitoestrogenów na komórki CL mierzono stężenia $\text{PGF}_{2\alpha}$, LTC_4 oraz stabilnych metabolitów NO w medium hodowlanym.

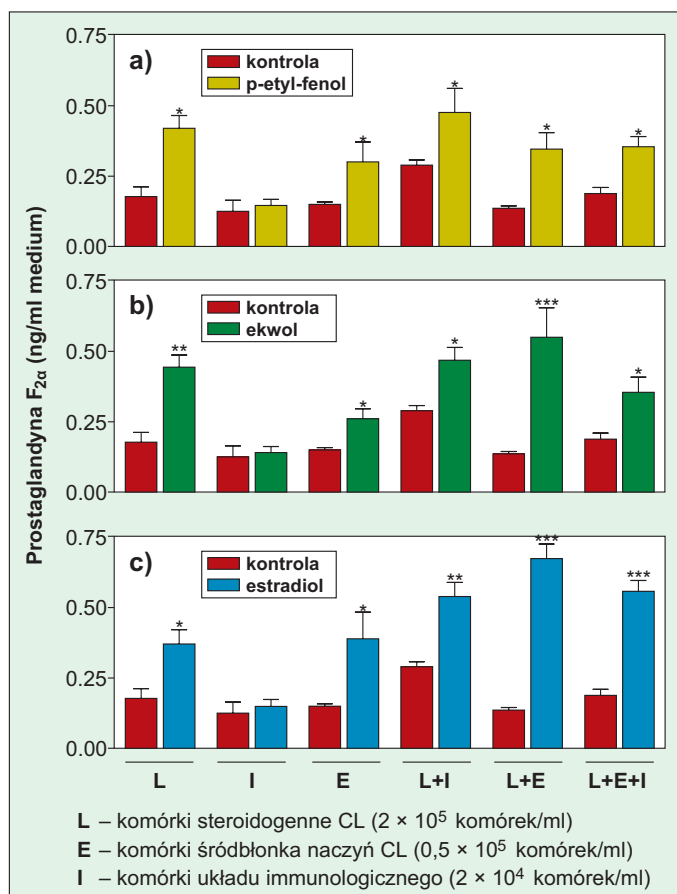
Materiał i metody

Materiał stanowiły jajniki i krew jałówek (rasy nizinnej czarno-białej z 50-80% dolewem krwi krów holsztyńsko-fryzyjskich), pobierane po uboju zwierząt w 15. dniu cyklu jajnikowego (2). Komórki steroidogenne CL izolowano enzymatycznie i hodowano zgodnie z procedurą opisaną wcześniej (11). Komórki immunologiczne (limfocyty) izolowano z krwi obwodowej przy użyciu zestawu Histopaque[®]-1077 (Sigma; # H-8889) ściśle stosując się do procedur metodycznych, opisanych w instrukcji przez producenta. Izolację komórek śródbłonna naczyń CL przeprowadzano z perfuzatów CL i nadsączu, uzyskanych podczas izolacji komórek steroidogennych CL, zgodnie z procedurą opisaną ostatnio (1, 11). Do wyselekcjonowania czystych populacji komórek śródbłonna naczyń CL zastosowano zestaw Dynabeads, zgodnie z metodyką opisaną przez producenta (Dynabeads[®] M-450 Dynal Inc. # 140.03).

Różne typy komórek CL hodowano w kombinacjach, jak opisano ostatnio (11):

- komórki steroidogenne samodzielnie (L; 2×10^5 komórek/ml)
- komórki śródbłonna naczyń samodzielnie (E; $0,5 \times 10^5$ komórek/ml)
- limfocyty samodzielnie (I; 2×10^4 komórek/ml)
- komórki steroidogenne z komórkami śródbłonna (L + E),
- komórki steroidogenne z limfocytami (L + I),
- komórki steroidogenne z komórkami śródbłonna i limfocytami (L + E + I).

Po 2 godzinach preinkubacji kokultury komórek CL stymulowano przez 22 godziny (z wyjątkiem grupy kontrolnej) wybranymi metabolitami fitoestrogenów: para-etyl-fenolem (Merck&Co., Inc. NJ, USA, # 821290; 10^{-8} M), ekwolem ((S)-4', 7 dihydroksyizoflawon, Fluka, # 45405; 10^{-8} M) oraz 17β -estradiolem (E_2 ; 10^{-8} M).



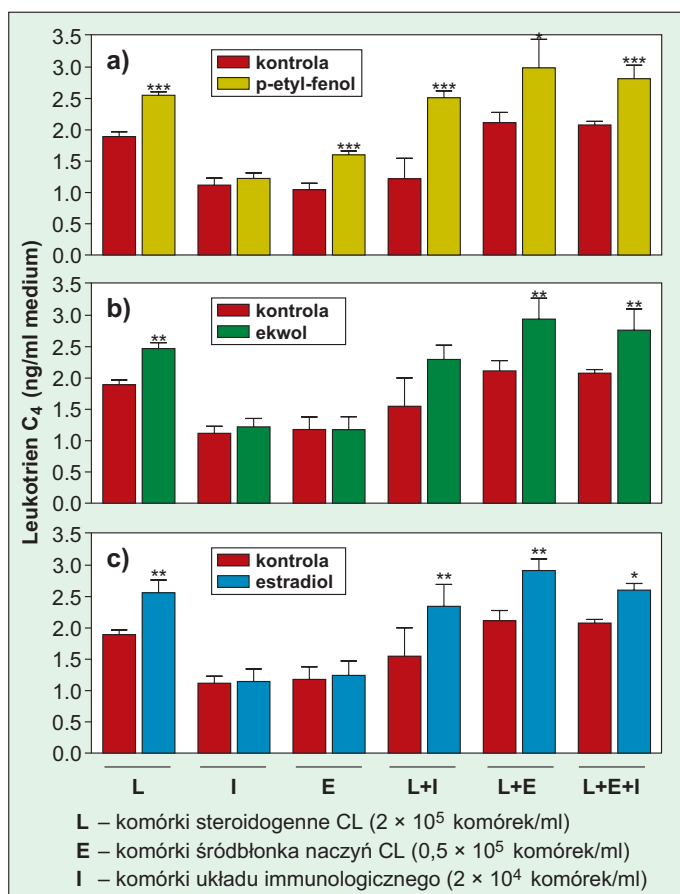
Ryc. 1. Wpływ para-etyl-fenolu (a), ekwolu (b) oraz 17β -estradiolu (c) na wydzielanie prostaglandyny $F_{2\alpha}$ w kokulturach komórek CL krowy. L – komórki steroidogenne CL, I – limfocyty T, E – komórki śródbłonna, L + I – komórki steroidogenne z limfocytami, L + E – komórki steroidogenne z komórkami śródbłonna, L + E + I – komórki steroidogenne z komórkami śródbłonna oraz z limfocytami. Gwiazdki określają różnice statystyczne w porównaniu do odpowiednich kontroli (* – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$)

W medium oznaczano poziom $\text{PGF}_{2\alpha}$, LTC_4 metodą immunoenzymatyczną (EIA) oraz stabilnych metabolitów NO (NO_2/NO_3) metodą kolorymetryczną (2, 11, 22).

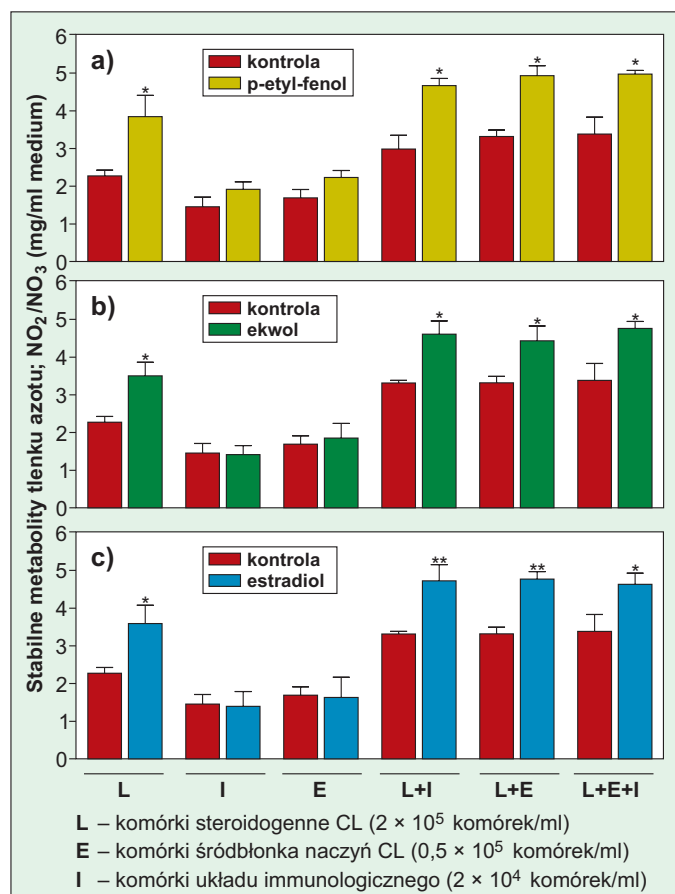
Wyniki i omówienie

Wykazano, że w CL krowy komórki steroidogenne są najbardziej wrażliwe na działanie naturalnych estrogenów (E_2) i fitoestrogenów.

Poziom wydzielanej $\text{PGF}_{2\alpha}$ po stymulacji para-etyl-fenolem (ryc. 1a) wzrastał: w komórkach steroidogennych (236% do kontroli; $p < 0,05$), w komórkach śródbłonna naczyń (201% do kontroli; $p < 0,05$) oraz we wszystkich typach kokultur komórkowych (powyżej 135%; $p < 0,05$). Ekwol stymulował wydzielanie $\text{PGF}_{2\alpha}$ (ryc. 1b): w komórkach steroidogennych (249% do kontroli; $p < 0,01$), w komórkach śródbłonna naczyń (174% do kontroli; $p < 0,05$) oraz w kokulturach wszystkich typów komórek CL (powyżej 187% do kontroli; $p < 0,05$). Poziom wydzielanej $\text{PGF}_{2\alpha}$ po stymulacji E_2 (ryc. 1c) wzrastał: w komórkach steroidogennych (208% do kontroli; $p < 0,01$), w komórkach śródbłonna naczyń (259% do kontroli; $p < 0,05$) oraz we wszystkich typach kokultur (powyżej 188% do kontroli; $p < 0,05$). W komór-



Ryc. 2. Wpływ para-etyl-fenolu (a), ekwolu (b) oraz 17β -estradiolu (c) na wydzielanie leukotrienu C₄ w kokulturach komórek CL krwi. L – komórki steroidogenne CL, I – limfocyty T, E – komórki śródbłonna, L + I – komórki steroidogenne z limfocytami, L + E – komórki steroidogenne z komórkami śródbłonna, L + E + I – komórki steroidogenne z komórkami śródbłonna oraz z limfocytami. Gwiazdki określają różnice statystyczne w porównaniu do odpowiednich kontroli (* – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$)



Ryc. 3. Wpływ para-etyl-fenolu (a), ekwolu (b) oraz 17β -estradiolu (c) na uwalnianie tlenu azotu (pomiar stabilnych metabolitów NO₂/NO₃) w kokulturach komórek CL krwi. L – komórki steroidogenne CL, I – limfocyty T, E – komórki śródbłonna, L + I – komórki steroidogenne z limfocytami, L + E – komórki steroidogenne z komórkami śródbłonna, L + E + I – komórki steroidogenne z komórkami śródbłonna oraz z limfocytami. Gwiazdki określają różnice statystyczne w porównaniu do odpowiednich kontroli (* – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$).

kach immunologicznych żaden z zastosowanych czynników nie stymulował wydzielania PGF_{2α} ($p > 0,05$).

Poziom LTC₄ wzrastał po stymulacji para-etyl-fenolem: w komórkach steroidogennych (135% do kontroli; $p < 0,001$), w komórkach śródbłonna naczyń (153% do kontroli; $p < 0,001$) oraz we wszystkich typach kokultur (powyżej 207% do kontroli; $p < 0,05$) (ryc. 2a). Ekwolu stymulował wydzielanie LTC₄ (ryc. 2b): w komórkach steroidogennych (131% do kontroli; $p < 0,001$) oraz w kokulturach komórek steroidogennych z komórkami śródbłonna naczyń i kokulturach wszystkich trzech typów komórek CL (powyżej 133% do kontroli; $p < 0,01$). Poziom LTC₄ po stymulacji E₂ wzrastał w komórkach steroidogennych (135% do kontroli; $p < 0,001$) oraz we wszystkich typach kokultur (powyżej 125% do kontroli; $p < 0,05$; ryc. 2c).

Stężenie NO₂/NO₃ w medium inkubacyjnym po stymulacji komórek (ryc. 3a) para-etyl-fenolem wzrastało: w komórkach steroidogennych (169% do kontroli; $p < 0,05$) i w każdym rodzaju kokultur komórkowych (powyżej 150% do kontroli; $p < 0,05$). Ekwolu stymulował produkcję NO (ryc. 3b): w komórkach steroidogennych

(154% do kontroli; $p < 0,05$) i we wszystkich typach kokultur (powyżej 135% do kontroli; $p < 0,05$). Stężenie NO₂/NO₃ w medium inkubacyjnym po stymulacji komórek E₂ (ryc. 3c) wzrastało: w komórkach steroidogennych (158% do kontroli; $p < 0,05$) i w każdym rodzaju kokultur (powyżej 133% do kontroli; $p < 0,05$). Fitoestrogeny i E₂ nie stymulowały produkcji NO w komórkach układu immunologicznego oraz śródbłonna naczyń CL (brak istotnie statystycznego wzrostu stężenia NO₂/NO₃ w mediach inkubacyjnych; $p > 0,05$; ryc. 3).

Z przeprowadzonych badań wynika, że aktywne metabolity fitoestrogenów: ekwolu i para-etyl-fenol, zachowują się jak agoniści naturalnych estrogenów w regulacji interakcji między komórkami CL i stymulują uwalnianie mediatorów luteolizy w CL – PGF_{2α}, LTC₄ oraz NO₂/NO₃, w sposób porównywalny do E₂. Uzyskane wyniki potwierdzają nasze wcześniejsze badania z zastosowaniem ekwolu i para-etyl-fenolu wskazujące, że w regulacji funkcji wydzielniczych CL krwi fitoestrogeny wykazują analogiczne działanie do naturalnych estrogenów (18, 25-27). Należy jednak zauważyć, że w odróżnieniu od działania fitoestrogenów, zaobserwo-

wano protegowanie wpływu E_2 w kokulturach komórek CL (wzrost do około 500% wydzielania $PGF_{2\alpha}$ w stosunku do kontroli i w porównaniu do efektów w poszczególnych typach komórek: L – 208%, E – 259%, I – brak wpływu; ryc. 1). Rozbieżność w działaniu fitoestrogenów i endogennych estrogenów w kokulturach komórek może wynikać z różnic w wewnątrzkomórkowym działaniu (przekaznictwie) (15, 26). We wcześniejszych badaniach własnych wykazano, że E_2 działa w komórkach CL i macicy zarówno za pośrednictwem receptorów jądrowych, czyli tradycyjną – genomową drogą, jak i drogą pozagenomową (z udziałem jonów wapnia i kinazy białkowej C jako wewnątrzkomórkowych przekazników). W odróżnieniu, fitoestrogeny działają w komórkach CL krwi wyłącznie w sposób genomowy, zależny od receptorów jądrowych (25-27). Ponadto powinowactwo endogennego E_2 do receptorów jest niemalże 1000 razy większe niż fitoestrogenów (4, 15).

W okresie luteolizy komórki CL krwi ściśle ze sobą współpracują, a działanie $PGF_{2\alpha}$ i TNF podczas luteolizy w CL krwi odbywa się poprzez wzbudzenie kaskady mediatorów w poszczególnych typach komórek, które oddziałują w CL w sposób auto- i/lub parakryny (1, 8, 11, 16, 17, 23). Jednakże w odróżnieniu od działania $PGF_{2\alpha}$ i TNF, w przypadku fitoestrogenów kontakt między poszczególnymi rodzajami komórek CL krwi nie wydaje się konieczny do wzmacniania efektu ich działania. Świadczą o tym wyniki, w których wykazano stymulację wydzielania $PGF_{2\alpha}$, LTC_4 oraz NO_2/NO_3 pod wpływem fitoestrogenów na tym samym poziomie zarówno w komórkach steroidogennych, jak i w kokulturach poszczególnych typów komórek CL (komórki steroidogenne, śródbłonna naczyń, układu immunologicznego). Wykazaliśmy już wcześniej, że komórki steroidogenne CL krwi są wrażliwe na działanie fitoestrogenów. Fitoestrogeny stymulują w komórkach steroidogennych CL wydzielanie $PGF_{2\alpha}$, NO i LTC_4 , a w przekazywaniu sygnału zaangażowane są jądrowe receptory estrogenowe (15). Zatem otrzymane wyniki wskazują, że głównie komórki steroidogenne CL są wrażliwe na działanie fitoestrogenów, jak również samego E_2 .

Podsumowanie

Aktywne metabolity izoflawonów: para-etylfenol oraz ekwol działają jako agoniści naturalnych estrogenów (4, 15), modulując proces regresji CL. Jednak spośród głównych typów komórek CL komórki steroidogenne są najbardziej wrażliwe na działanie fitoestrogenów. Para-etylfenol i ekwol, podobnie jak endogenne estrogeny, stymulują uwalnianie prostaglandyny $F_{2\alpha}$ leukotrienu C_4 oraz NO , a tym samym mogą modulować/inicjować lokalne procesy regresji CL.

Piśmiennictwo

1. Acosta T. J., Yoshioka S., Komiyama J., Lee S. H., Grazul-Bilska A. T., Skarzynski D. J., Okuda K.: Effects of storage and passage of luteal endothelial cells on ET-1 and $PGF_{2\alpha}$ production. *J. Reprod. Dev.* 2007, 53, 473-480.
2. Bah M. M., Acosta T. J., Pilawski W., Deptula K., Okuda K., Skarzynski D. J.: Role of intraluteal prostaglandin $F_{2\alpha}$, progesterone and oxytocin in basal and pulsatile progesterone release from developing bovine corpus luteum. *Prostaglandins Other Lipid. Med.* 2006, 79, 218-229.
3. Del Vecchio R. P., Thibodeaux J. K., Hansel W.: Contact-associated interactions between large and small bovine luteal cells during the estrous cycle. *Dom. Anim. Endocrinol.* 1995, 12, 25-33.

4. Dusza L., Ciereszko R., Skarzynski D. J., Nogowski L., Opalka M., Kaminska B., Nynca A., Kraszewska O., Slomczynska M., Woclawek-Potocka I., Korzekwa A., Pruszyńska-Oszmalek E., Sz kudelska K.: Mechanism of phytoestrogens action in reproductive processes of mammals and birds. *Reprod. Biol.* 2006, 6, 151-174.
5. Girsh E., Milvae R. A., Wang W., Meidan R.: Effect of endothelin-1 on bovine luteal cell function: role in prostaglandin $F_{2\alpha}$ -induced antisteroidogenic action. *Endocrinology* 1996, 137, 1306-1312.
6. Grazul-Bilska A. T., Reynolds L. P., Redmer D. A.: Gap junctions in the ovaries. *Biol. Reprod.* 1997, 57, 947-957.
7. Gregoraszczyk E. L.: The advantage of the aggregate culture of isolated ovarian cell types over the monolayer culture. *Cytotechnology* 1990, 4, 195-200.
8. Jaroszewski J. J., Skarzynski D. J., Blair R. M., Hansel W.: Influence of nitric oxide on the secretory function of the bovine corpus luteum: dependence on cell composition and cell-to-cell communication. *Exp. Biol. Med.* 2003, 228, 741-748.
9. Jaroszewski J. J., Skarzynski D. J., Hansel W.: Is nitric oxide a local mediator of prostaglandin $F_{2\alpha}$ -induced regression of the bovine corpus luteum? *Exp. Biol. Med.* 2003, 228, 1057-1062.
10. Korzekwa A., Woclawek-Potocka I., Rogozińska A. M., Skarzynski D. J.: Equol and para-ethyl-phenol modulate cytokines action on bovine corpus luteum. *Joint Polish-Japanese Seminar: Cutting age of reproductive physiology: regulation of ovarian function.* Krakow, Poland 21-24 September 2005.
11. Korzekwa A. J., Jaroszewski J. J., Woclawek-Potocka I., Bah M. M., Skarzynski D. J.: Luteolytic effect of prostaglandin $F_{2\alpha}$ on bovine corpus luteum depends on cell composition and contact. *Reprod. Dom. Animal.* 2007, oddane do druku.
12. Lei Z. M., Chegini N., Rao Ch. V.: Quantitative cell composition of human and bovine corpora lutea from various reproductive states. *Biol. Reprod.* 1991, 44, 1148-1156.
13. Meidan R., Milvae R. A., Weiss S., Levy N., Friedman A.: Intraovarian regulation of luteolysis. *J. Reprod. Fertil.* 1999, 54 (Suppl), 217-228.
14. Niswender G. D., Juengel J. L., Silwa P. J., Rollyson M. K., McIntush E. W.: Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. *Physiol. Rev.* 2000, 80, 1-29.
15. Nowicka E., Sz kudelski R., Nogowski L.: Działanie fitoestrogenów na organizm człowieka i zwierząt. *Medycyna Wet.* 2006, 62, 736-738.
16. Pate J. L.: Intercellular communication in the bovine corpus luteum. *Theriogenology* 1996, 45, 1381-1397.
17. Pate J. L.: Involvement of immune cells in regulation of ovarian function. *J. Reprod. Fertil.* 1995, 49, 365-377.
18. Piotrowska K. K., Woclawek-Potocka I., Bah M. M., Piskula M. K., Pilawski W., Bober A., Skarzynski D. J.: Phytoestrogens and their metabolites inhibit the sensitivity of the bovine corpus luteum to luteotropic factors. *J. Reprod. Dev.* 2006, 52, 33-41.
19. Redmer D. A., Grazul-Bilska A. T., Reynolds L. P.: Contact-dependent intercellular communication of bovine luteal cells in culture. *Endocrinology* 1991, 129, 2757-2766.
20. Sakamoto R., Berisha B., Kawate N., Schams D., Okuda K.: Tumor necrosis factor- α and its receptors in bovine corpus luteum throughout the estrous cycle. *Biol. Reprod.* 2000, 62, 192-199.
21. Skarzynski D. J., Bah M. M., Woclawek-Potocka I., Deptula K., 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.
22. Skarzynski D. J., Jaroszewski J. J., Bah M. M., Deptula K. M., Barszczewska B., Gawronska B., Hansel W.: Administration of a nitric oxide synthase inhibitor counteracts prostaglandin $F_{2\alpha}$ -induced luteolysis in cattle. *Biol. Reprod.* 2003, 68, 1674-1681.
23. Skarzynski D. J., Jaroszewski J. J., Okuda K.: Role of tumor necrosis factor- α and nitric oxide in luteolysis in cattle. *Dom. Animal Endocrinol.* 2005, 29, 340-346.
24. Townson T. H., O'Connor C. L., Pru J. K.: Expression of Monocyte Chemoattractant Protein-1 and distribution of immune cell populations in the bovine Corpus Luteum throughout the estrous cycle. *Biol. Reprod.* 2002, 66, 361-366.
25. Woclawek-Potocka I., Acosta T. J., Korzekwa A., Bah M. M., Shibaya M., Okuda K., Skarzynski D. J.: Phytoestrogens modulate prostaglandin production in bovine endometrium: cell type specificity and intracellular mechanisms. *Exp. Biol. Med.* 2005, 230, 326-333.
26. Woclawek-Potocka I., Bober A., Korzekwa A., Okuda K., Skarzynski D. J.: Equol and para-ethyl-phenol stimulate prostaglandin $F_{2\alpha}$ secretion in bovine corpus luteum: intracellular mechanisms of action. *Prostaglandins Other Lipid. Mediat.* 2006, 79, 287-297.
27. Woclawek-Potocka I., Borkowski K., Korzekwa A., Okuda K., Skarzynski D. J.: Phyto- and endogenous estrogens differently activate intracellular calcium ions in the bovine endometrial cells. *J. Reprod. Dev.* 2006, 52, 731-740.

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