

Ekspresja genów dla NP-I/OT i PGA w komórkach lutealnych i warstwy ziarnistej pęcherzyka jajnikowego oraz czynnika LIF w komórkach endometrium krowy pod wpływem DDT i jego metabolitów

JAROSŁAW MŁYNARCZUK, MICHAŁ WRÓBEL, JAN KOTWICA

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

Młynarczuk J., Wróbel M., Kotwica J.

Effect of DDT and its metabolites on the expression of the NP-I/OT and PGA genes in luteal and granulosa cells and the LIF factor in endometrium in cattle

Summary

Ovarian oxytocin (OT) and endometrial leukemia inhibitory factor (LIF) are involved in estrous cycle regulation and implantation of the blastocyst in cows. For this reason the authors investigated the effect of DDT and its metabolites (DDE), known as environmental pollutants, on the expression of genes involved in OT and LIF synthesis. Granulosa from follicles (1 cm in diameter), luteal and endometrial cells from cows on days 8-12 of the estrous cycle were treated for 6 h with DDT, p,p'-DDE, o,p'-DDE and technical mixture (MIX) of DDE isomers (10 ng/ml each). Obtained RNA was reverse transcribed and cDNA was amplified by PCR using primers for genes of NP-I/OT, PGA, LIF and G3PDH as a reference gene. DDT and DDE in granulosa cells and DDE in luteal cells increased ($P < 0.05$) the expression of the NP-I/OT gene, while DDE in granulosa cells and MIX in luteal cells increased the expression of the PGA gene ($P < 0.05$). In contrast, p,p'-DDE and MIX reduced ($P < 0.05$) the LIF expression in endometrial cells. Obtained data allow the authors to assume that DDE and its metabolite impairs regulation of the estrous cycle, affecting OT and LIF synthesis on the genomic level.

Keywords: DDT, LIF, oxytocin

Wiele chloroorganicznych związków, które przedostały się do środowiska, może zakłócać procesy rozrodu ludzi i zwierząt (20). Jednym z nich jest insektycyd, dwuchlorodwufenylotrójchloroetan (DDT), a także jego metabolit, dwuchlorodwufenylodwuchloroetan (DDE), powstający w czasie biodegradacji, niekorzystnie wpływają na te procesy (8). Mimo że produkcja i stosowanie DDT zostało zakazane w Europie i USA, jest on nadal wykorzystywany w krajach Afryki i Azji, w programach zwalczania chorób zakaźnych, np. malarii i tyfusu. Związki te ulegają kumulacji w żywności oraz w tkankach organizmów żywych, w tym także w płynie pęcherzykowym pęcherzyka jajnikowego (7). Wcześniejsze badania wykazały, że polichlorowane bifenylole (PCBs) mające podobną budowę chemiczną, zwiększają sekrecję i syntezę oksytocyny (OT) z komórek lutealnych i warstwy ziarnistej pęcherzyka jajnikowego (14, 15). Proces ten odbywał się przez zwiększenie ekspresji genów prekursora OT (NP-I/OT), jak i monoksygenazy peptydylo-glicylo- α -aminowej – PGA (29), enzymu biorącego udział w przemianach potranslacyjnych prekursora OT (22). W jajniku krowy OT wpływa na wzrost i dojrzewanie pęcherzyków jajnikowych (16), bierze udział w owulacji i wzmacnia pro-

cesy luteinizacji komórek warstwy ziarnistej i osłonki wewnętrznej (25) oraz przestawia steroidogenezę w tych komórkach na produkcję progesteronu (P4) w procesie ich luteinizacji (6). Oksytocyna stymuluje także syntezę P4 w początkowej i środkowej fazie cyklu (12) oraz pogłębia już zapoczątkowaną luteolizę w końcowej fazie cyklu (11). Stąd zaburzenia w sekrecji i syntezie tego hormonu mogą wpływać niekorzystnie na przebieg cyklu rujowego.

Endometrium jest tkanką docelową także dla czynnika hamującego białaczkę (Leukemia inhibitory factor; LIF) (9, 23), który przygotowuje środowisko macicy do przyjęcia blastocysty. LIF jest cytokiną, której zarówno ekspresja genu, jak i wydzielanie jest szczególnie istotne w macicy (9) i jajowodzie (18), zaś w przypadku jego niedoboru nie dochodzi do implantacji i rozwoju blastocysty, mimo udanego zapłodnienia (4, 19). Synteza LIF jest zależna od estradiolu (E2) (18), dlatego związki wykazujące powinowactwo do receptorów estrogenowych, takie jak DDT (3), mogą istotnie zakłócać proces implantacji.

Celem badań było określenie wpływu DDT i jego metabolitów na ekspresję genów uczestniczących w syntezie oksytocyny; neurofizyny-I/oksytocyny i monooksy-

genazy peptydylo-glicylo- α -aminowej w komórkach granulocyty i lutealnych oraz na ekspresję mRNA dla LIF, w komórkach *endometrium*.

Materiał i metody

Pozyskanie komórek do badań. Jajniki i przyległe rogi macicy krowy z 8-12 dnia cyklu (5) pobierano poubojowo, a następnie transportowano do laboratorium w 0,9% NaCl (4°C). Komórki warstwy ziarnistej pęcherzyków jajnikowych o średnicy 1 cm, uzyskiwano przez kilkakrotną aspirację własnego płynu folikularnego. Komórki lutealne uzyskiwano w procesie enzymatycznej dyspersji tkanki jajnikowej drogą perfuzji przez tętnicę jajnikową (13). Komórki *endometrium* otrzymywano także przez enzymatyczne trawienie nabłonka (30). Liczbę żywych komórek określano przez barwienie ich 0,04% błękitem trypanu i zliczanie, używając komory Bürkera (Brandt, Niemcy). Do dalszych badań kwalifikowano komórki, wśród których co najmniej 75-80% było żywych.

Hodowle komórkowe. Komórki (5×10^5 /ml) w medium DMEM/F-12 HAM z 5% FCS przenoszono na płytki (Nunc-clon, Dania), w objętości 4 ml zawieszony na dołek. Komórki lutealne i granulocyty preinkubowano (38°C, atmosfera 95% powietrza i 5% CO₂, wilgotność 100%; Heraeus BB-6060, Niemcy) 24 h, zaś *endometrium* 72 h. Następnie komórki przemywano (M-199 i 0,1% BSA) i dodawano 0,5 ml (DMEM/F-12 HAM + 0,1% BSA). Media używane w czasie pozyskiwania i hodowli komórek wzbogacono gentamycyną (20 µg/ml). Wszystkie odczynniki, jeśli nie podano inaczej, pochodziły z Sigma (Polska).

Doświadczenie 1. Komórki granulocyty inkubowano (6 h) z DDT, izomerami DDE (p,p'-DDE i o,p'-DDE) lub ich mieszaniną (95% p,p'-DDE i 5% o,p'-DDE) w dawce 10 ng/ml. Jako kontroli pozytywnej użyto FSH (100 ng/ml; AFP-5679C, dar dr APF Parłowa, NHPP, Harbour-UCLA, Medical Center, USA). Po usunięciu medium, komórki zalewano fenozolem (200 µl; A&A Biotechnology, Polska) i przechowywano (-70°C) do czasu pomiaru ekspresji genów NP-1/OT i PGA.

Doświadczenie 2. Komórki lutealne inkubowano (6 h) z DDT, izomerami DDE oraz ich mieszaniną, tak jak komórki granulocyty. Jako kontroli pozytywnej użyto LH (100 ng/ml, AFP-11743B, dar dr APF Parłowa, NHPP, Harbour-UCLA, Medical Center, USA). Po usunięciu medium komórki lutealne traktowano tak jak komórki granulocyty.

Doświadczenie 3. Komórki *endometrium* inkubowano (6 h) z DDT, jego metabolitami oraz ich mieszaniną w dawce 10 ng/ml. Jako kontroli pozytywnej użyto kwasu arachidonowego (AA, 20 µg/ml). Po usunięciu medium komórki zalewano Trizolem (150 µl) i przechowywano (-70°C) do czasu pomiaru ekspresji genu LIF.

Medium uzyskane z każdego z doświadczeń przeznaczono do oznaczenia PGE₂, metabolitu PGF₂ α (PGFM), estradiolu, progesteronu i oksytocyny w zależności od rodzaju użytych komórek. Na tej podstawie wnioskowano o fizjologicznej reakcji komórek na czynniki użyte jako kontrola pozytywna. Dane te przedstawiono w innej pracy (29).

Określanie ekspresji badanych genów metodą RT-PCR. Izolowano mRNA korzystając z zestawu TotalRNA (A&A Biotechnology, Polska). Uzyskane RNA przechowywano w ultrazamrażarce (-70°C) do czasu przeprowadzenia odwrotnej transkrypcji. Koncentrację RNA i czystość uzyskanej próbki mierzono przy użyciu fotometru BioPhotometer (Eppendorf) przy długościach fali 260/280 nm. Synteze cDNA przeprowadzano z użyciem odwrotnej transkryptazy M-MLV Reverse Transcriptase (Promega) w termocyklerze MJ Mini (BioRad). Warunki odwrotnej transkrypcji: 42°C/1 h – przyłączenie starterów, 72°C/10 min. – elongacja. Otrzymane cDNA powielano w re-

Tab. 1. Optymalizacja cykli PCR dla poszczególnych genów

Gen	Komórki granulocyty	Komórki lutealne	Komórki <i>endometrium</i>
NP-1/OT	23 cykle	23 cykle	-
PGA	21 cykli	23 cykle	-
LIF	-	-	29 cykli
G3PDH	21 cykli	21 cykli	21 cykli

Tab. 2. Charakterystyka starterów użytych w reakcji PCR

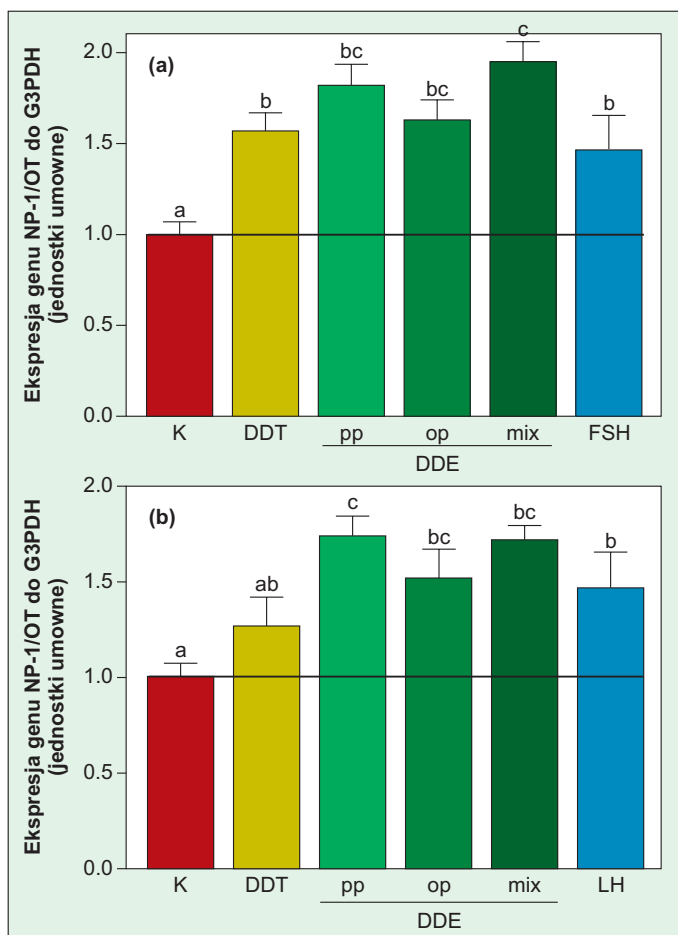
Gen	Sekwencja starterów	Długość produktu	Nr w GenBank
NP-1/OT	Lewy: ccgcctgtacattcagaac Prawy: gtctcagtgctggagaagg	329 bp	V00114
PGA	Lewy: accaggcagtgaccagaatc Prawy: acgatgggtgcttaatctcg	314 bp	NM_173948
LIF	Lewy: ctgtctgtgtgtcttccact Prawy: tgacagcccagctcttctt	528 bp	NM_173931
G3PDH	Lewy: tccaccaccctgtgtctgta Prawy: tgttccagtagtccacc	318 bp	NM_001034034

akcji PCR w środowisku RedTaq Polimerase Mix, wcześniej optymalizując liczbę cykli dla poszczególnych genów. Do reakcji PCR użyto 0,5 µg/ml cDNA przy objętości całkowitej 25 µl. Jeden cykl przebiegał w następujących warunkach: 94°C/1 min., 55°C/1 min., 72°C/1 min. Jako genu referencyjnego użyto genu G3PDH byłą. Produkty PCR rozdzielano elektroforetycznie na 2% żelu agarozowym (EuroGenTec) i uwidaczano bromkiem etydy w ultrafioletcie (transiluminator Hofer UV-20). Elektroforegramy fotografowano i analizowano przy użyciu programu Kodak EDAS290. Startery zostały zsyntetyzowane przez Tib Molbiol, Polska. Optymalizacja cykli PCR oraz dane dotyczące starterów podano w tab. 1 i 2.

Analiza statystyczna. Średnie (\pm SEM) wartości poszczególnych pomiarów były poddane analizie wariancji oraz post-testu Newman-Keulsa (Prism 2.0, GraphPad Software Inc. USA). Za istotne statystycznie uznawano wartości, dla których prawdopodobieństwo błędu wynosiło $p < 0,05$.

Wyniki i omówienie

DDT i DDE zwiększały ($p < 0,05$) ekspresję genu NP-1/OT w komórkach granulocyty (ryc. 1a). Natomiast w komórkach lutealnych ekspresja tego genu była zwiększana ($p < 0,05$) przez izomer p,p'-DDE (ryc. 1b). Ekspresja genu PGA była zwiększana ($p < 0,05$) również przez DDE (ryc. 2a), natomiast w komórkach lutealnych jedynie mieszanina kongenerów zwiększyła istotnie ($p < 0,05$) ilość transkryptu dla PGA (ryc. 2b). Uzyskane dane wskazują, że wzrost podstawowej sekrecji OT z komórek lutealnych i warstwy ziarnistej przez PCBs może odbywać się w dwójaki sposób. DDT i DDE zwiększają zarówno ekspresję genu prekursora OT, jak i genu PGA – enzymu odpowiedzialnego za potranslacyjne przemiany prekursora OT. W prawidłowym przebiegu cyklu proces syntezy prekursora OT kończy się około 6.-7. dnia cyklu, a ilość i aktywność PGA skokowo wzrasta ok. 12.-14. dnia cyklu (22). Stąd badane związki mogą przedłużać czas syntezy prekursora OT i przyspieszać pojawienie się znacznych ilości PGA. Trudne jest określenie drogi, którą DDT i DDE wpływają na wzrost ekspresji badanych genów. W genie NP-1/OT krowy nie znaleziono funkcjo-

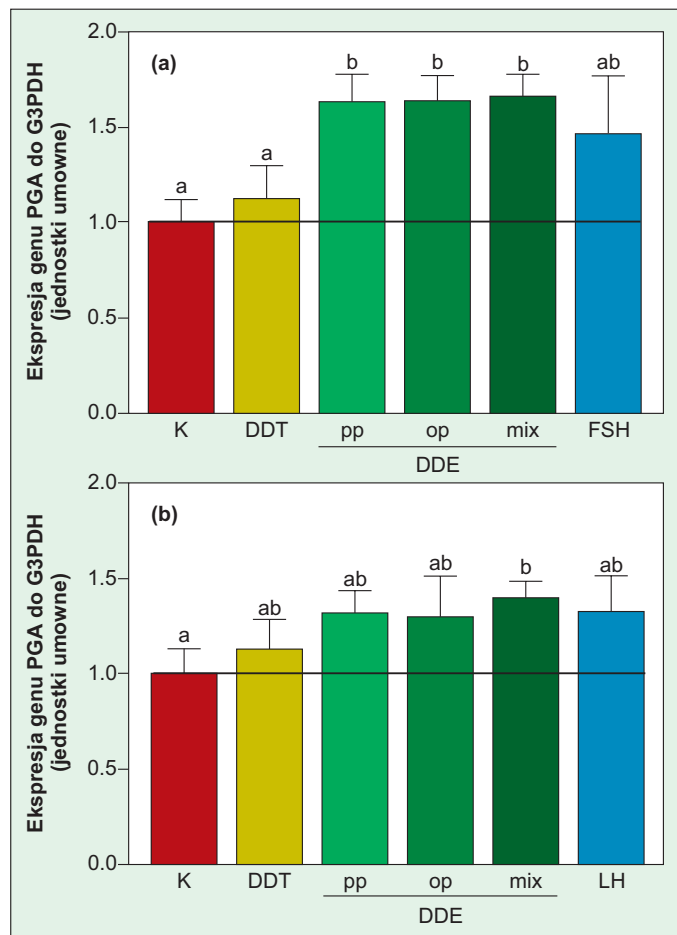


Ryc. 1. Średnia (\pm SEM, $n = 3$) ekspresja genu NP-1/OT do G3PDH, po inkubacji (6 h) komórek granulozy (a) i lutealnych (b) z DDT, p,p'-DDE, o,p'-DDE i mieszaniną (mix) obu izomerów DDE (10 ng/ml). FSH i LH (100 ng/ml) użyto jako kontroli pozytywnych

Objaśnienie: a, b, c – $p < 0,05$

nalnego miejsca promotorowego dla receptora estradiolowego, a jedynie sekwencję pół-palindromową (27). Stąd wpływ ich jako czynników estrogenopodobnych na ekspresję genu NP-I/OT w komórkach granulozy i lutealnych byłaby bezpośrednio poprzez ten receptor jest problematyczny. Nie jest więc wykluczone, że ksenobiotyki te mogą być ligandem jeszcze innych receptorów odpowiedzialnych za regulację ekspresji genu NP-I/OT. Może nim być sierocy, jądrowy receptor steroidowy SF-1 (Steroidogenic Factor-1). Jego pobudzenie koreluje z maksymalną ekspresją genu NP-I/OT u bydła, który zawiera kompletny i funkcjonalny element promotorowy dla tego czynnika transkrypcyjnego (28). Ligandami tego receptora mogą być różne steroidy, w tym glukokortykoidy. Biorąc pod uwagę fakt, że podobne budową ksenobiotyki z grupy PCBs oddziałują na procesy komórkowe poprzez receptor glikokortykoidowy (14), można z dużym prawdopodobieństwem założyć, że również DDT i jego metabolity mogą oddziaływać tą drogą na komórkę.

Mechanizm działania PCBs na ekspresję genu PGA jest nieznan, gdyż nie określono, jakie czynniki transkrypcyjne są zaangażowane w tym procesie w jajniku krowy. Dotychczas wykazano, że noradrenalina zwiększa sekrecję OT (10) poprzez wpływ na aktywność PGA, wzmagając potranslacyjne przemiany jej prekursora (1). Wzrost

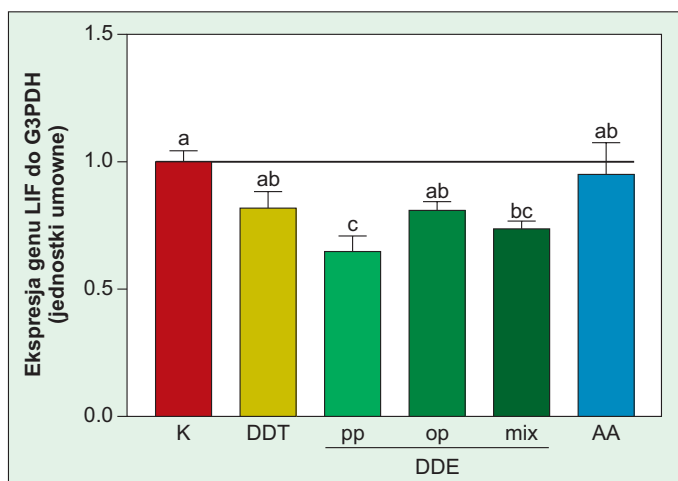


Ryc. 2. Średnia (\pm SEM, $n = 3$) ekspresja genu PGA do G3PDH, po inkubacji (6 h) komórek granulozy (a) i lutealnych (b) z DDT, p,p'-DDE, o,p'-DDE i mieszaniną (mix) obu izomerów DDE (10 ng/ml). FSH i LH (100 ng/ml) użyto jako kontroli pozytywnych

Objaśnienie: jak na ryc. 1.

sekrecji OT z komórek jajnika, pod wpływem krótkotrwałego stresu, może być pożądaną w pewnych okresach cyklu rujowego (11), ale nadmierna sekrecja OT może prowadzić do zaburzeń w czynności jajnika i macicy. Na przykład, wzrost stężenia tego hormonu w płynie pęcherzykowym może prowadzić do przedwczesnej luteinizacji komórek w pęcherzykach przedowulacyjnych, a następnie hamowania owulacji. Możliwość stymulacji sekrecji OT drogą przez receptor glikokortykoidowy w czasie długotrwałego stresu jest jedną z przyczyn powstawania cyst jajnikowych u bydła (2). Stąd możliwe, że DDT i jego metabolity stymulując sekrecję OT, mogą być jedną z przyczyn powstawania cyst. Jak zaznaczono wcześniej, OT może zarówno wspierać funkcję ciała żółtego, jak i działać luteolitycznie, w zależności od fazy cyklu. Dlatego ciągła sekrecja tego hormonu powodowana przez PCBs, może powodować zarówno wydłużenie czasu trwania ciała żółtego (ciało żółte przetrwałe), ale także przyspieszenie luteolizy. Ponadto nadmiernie wydzielana OT może powodować zmiany w motoryce macicy (26), co może wpływać niekorzystnie na proces implantacji blastocysty, zwiększając zamieralność zarodków lub być przyczyną poronień (21).

Mieszanina techniczna izomerów oraz p,p'-DDE zmniejszyły ($p < 0,05$) ekspresję genu LIF w komórkach



Ryc. 3. Średnia (\pm SEM, $n = 4$) ekspresja genu LIF do G3PDH, po inkubacji (6 h) komórek *endometrium* z DDT, p,p'-DDE, o,p'-DDE i mieszaniną (mix) obu izomerów DDE (10 ng/ml). Kwasu arachidonowego (AA; 20 μ g/ml) użyto jako kontroli pozytywnej

Objaśnienie: jak na ryc. 1.

endometrium krwi (ryc. 3). Sekrecja LIF jest stymulowana w *endometrium* (24) i w jajowodzie (18) poprzez E2. Mimo że zarówno DDT, jak i DDE mają właściwości estrogenopodobne, to nie zmieniły one względnej ilości mRNA dla LIF. Warto zauważyć, że 4-dniowa inkubacja krowich komórek nabłonka jajowodu i fibroblastów z dużymi dawkami (0,1-10 μ M) hydroksypochodnych PCBs lub fitoestrogenów, zwiększała sekrecję LIF (17). Możliwe więc, że istnieją w tym względzie różnice między nabłonkiem jajowodu a *endometrium* na działanie E2 i związków estrogenopodobnych, lub został uruchomiony nieznan mechanizm hamujący ekspresję genu LIF. Podobne różnicowanie we wpływie na syntezę LIF wykazuje P4, który hamuje ją w *endometrium*, ale nie w jajowodzie (18). Zatem bioakumulacja aromatycznych związków chloroorganicznych, wykazujących powinowactwo do receptorów estrogenowych, jak DDT i jego izomery (3) lub hydroksypochodne PCBs, może być istotnym czynnikiem wpływającym na proces implantacji, przez zmniejszenie lub zwiększenie (18) sekrecji LIF. We wcześniejszych badaniach własnych (29) wykazano, że DDT i jego metabolity zwiększają sekrecję P4 z komórek lutealnych, co może dodatkowo pogłębić uzyskany tu efekt DDT na ekspresję genu LIF.

Uzyskane obecnie dane wskazują, że DDT i jego metabolity zakłócają ekspresję genów: NP-I/OT i PGA w komórkach lutealnych i granulocyty oraz LIF w *endometrium* krwi. W efekcie tych zmian mogą powstać w macicy niekorzystne warunki dla implantacji blastocysty i dalszego rozwoju zarodka.

Piśmiennictwo

- Bogacki M., Kotwica J.: Influence of noradrenaline on progesterone synthesis and post-translational processing of oxytocin synthesis in the bovine corpus luteum. *Theriogenology* 1999, 52, 91-102.
- Bosu W. T. K., Peter A. T.: Evidence of a role on intrauterine infections in the pathogenesis of cystic ovaries in postpartum dairy cows. *Theriogenology* 1987, 28, 725-736.
- Chedrese P. J., Feyles F.: The diverse mechanism of action of dichlorodiphenyl-dichloroethylene (DDE) and methoxychlor in ovarian cells in vitro. *Reprod. Toxicol.* 2001, 15, 693-698.

- Cui S., Selwood L.: cDNA cloning, characterization, expression and recombinant protein production of leukemia inhibitory factor (LIF) from the marsupial, the brushtail possum (*Trichosurus vulpecula*). *Gene* 2000, 243, 167-178.
- Ireland J. J., Murphree R., Coulson P. B.: Accuracy of predicting stages of bovine estrous cycle by gross appearance of the corpus luteum. *J. Dairy Sci.* 1980, 63, 155-160.
- Jo M., Fortune J. E.: Oxytocin inhibits LH-stimulated production of androstenedione by bovine theca cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2002, 188, 151-159.
- Kamarianos A., Karamanlis X., Goulas P., Theodosiadou E., Smokovitis A.: The presence of environmental pollutants in follicular fluid of farm animals (cattle, sheep, goats and pigs). *Reprod. Toxicol.* 2003, 17, 185-195.
- Kelce W., Stone C., Laws S., Gray L., Kemppainen J., Wilson E.: Persistent DDT metabolite, p,p'-DDE is a potent androgen receptor antagonist. *Nature* 1995, 375, 581-585.
- Kimber S. J.: Leukaemia inhibitory factor in implantation and uterine biology. *Reproduction* 2005, 130, 131-145.
- Kotwica J., Skarzynski D., Jaroszewski J.: Coccygeal artery as a route for the administration of drugs into the reproductive tract of cattle. *Vet. Rec.* 1990, 127, 38-40.
- Kotwica J., Skarzynski D., Bogacki M., Melin P., Starostka B.: The use of an oxytocin antagonist to study the function of ovarian oxytocin during luteolysis in cattle. *Theriogenology* 1997, 48, 1287-1299.
- Miyamoto A., Schams D.: Oxytocin stimulates progesterone release from microdialyzed bovine corpus luteum in vitro. *Biol. Reprod.* 1991, 44, 1163-1170.
- Młynarczuk J., Kotwica J.: Effect of polychlorinated biphenyls on the secretion of oxytocin from luteal and granulosa cells in cow: possible involvement of glucocorticoid receptors. *Vet. Med.-Czech* 2006, 51, 391-398.
- Młynarczuk J., Kotwica J.: Influence of polichlorinated biphenyls on the secretion of oxytocin from bovine luteal cells and from granulosa cells obtained from the follicles of different size. *Pol. J. Vet.Sci.* 2005, 8, 261-267.
- Młynarczuk J., Niewiadomska A., Kotwica J.: Polychlorinated biphenyls impair FSH-stimulated effect on the secretion of steroids and oxytocin from bovine granulosa cells. *Bull. Vet. Inst. Pulawy* 2005, 49, 411-417.
- Okuda K., Uenoyama Y., Fujita Y., Iga K., Sakamoto K., Kimura T.: Functional oxytocin receptors in bovine granulosa cells. *Biol. Reprod.* 1997, 56, 625-631.
- Reinhart K. C., Dubey R. K., Keller P. J., Lauper U., Rosselli M.: Xeno-estrogens and phyto-estrogens induce the synthesis of leukaemia inhibitory factor by human and bovine oviduct cells. *Mol. Hum. Reprod.* 1999, 5, 899-907.
- Reinhart K. C., Dubey R. K., Mummery C. L., van Rooijen M., Keller P. J., Rosselli M.: Synthesis and regulation of leukaemia bovine oviduct cells by hormones. *Mol. Hum. Reprod.* 1998, 4, 301-308.
- Rodriguez A., De Frutos C., Diez C., Caamano J. N., Facal N., Duque P., Garcia-Ochoa C., Gomez E.: Effects of human versus mouse leukemia inhibitory factor on the in vitro development of bovine embryos. *Theriogenology* 2007, 67, 1092-1095.
- Roselli M., Reinhart K., Imthurn B., Keller P. J., Dubey R. K.: Cellular and biochemical mechanisms by which estrogens influence reproductive function. *Hum. Reprod. Update* 2000, 6, 332-350.
- Seiler P., Fisher B., Lindenau A., Beier H. M.: Effects of persistent chlorinated hydrocarbons on fertility and embryonic development in the rabbit. *Hum. Reprod.* 1994, 9, 1920-1926.
- Sheldrick E. L., Flint A. P. F.: Post-translational processing of oxytocin-neurophysin prohormone in the ovine corpus luteum: activity of peptidyl glycine α -amidating mono-oxygenase and concentrations of its cofactor, ascorbic acid. *J. Endocrinol.* 1989, 122, 313-322.
- Stewart C. L., Kaspar P., Brunet L. J., Bhatt H., Gadi I., Köntgen F., Abbondanzo S. J.: Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukemia inhibitory factor. *Nature* 1992, 359, 76-79.
- Takabatake K., Fujiwara H., Goto Y., Nakayama T., Higuchi T., Fujita J., Maeda M., Mori T.: Splenocytes in early pregnancy promote embryo implantation by regulating endometrial differentiation in mice. *Hum. Reprod.* 1997, 12, 2102-2107.
- Tallam S. K., Walton J. S., Johnson W. H.: Effects of oxytocin on follicular development and duration of the estrous cycle in heifers. *Theriogenology* 2000, 53, 951-962.
- Tsai M.-L., Clinton Webb R., Loch Caruso R.: Increase of oxytocin induced oscillatory contractions by 4-hydroxy-2',4',6'-trichlorobiphenyl is estrogen receptor mediated. *Biol. Reprod.* 1997, 56, 347-357.
- Walther N., Wehrenberg U., Brackmann B., Ivell R.: Mapping of the bovine oxytocin gene control region: identification of binding sites for luteal nuclear proteins in the 5' non-coding region of the gene. *J. Neurosci.* 1991, 3, 540-549.
- Wehrenberg U., Ivell R., Jansen M., von Goedecke S., Walther N.: Two orphan receptors binding to common site are involved in the regulation of the oxytocin gene in the ovary. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994, 91, 1440-1444.
- Wróbel M., Młynarczuk J., Kotwica J.: Wpływ DDT i jego metabolitów na czynność sekrecyjną komórek granulocyty, lutealnych i *endometrium* krwi. *Medycyna Wet.* 2008 (w druku).
- Wróbel M., Kotwica J.: Influence of polychlorinated biphenyls (PCBs) and phytoestrogens on prostaglandin F2 α and E2 secretion from bovine endometrial cells at a postovulatory stage of the oestrous cycle. *Vet. Med.-Czech.* 2005, 50, 487-495.

Adres autora: lek. wet. Jarosław Młynarczuk, ul Tuwima 10, 10-747 Olsztyn; e-mail: jarecki@pan.olsztyn.pl