

# Wpływ DDT i jego metabolitów na czynność sekrecyjną komórek lutealnych, granulozy i endometrium krowy

MICHAŁ WRÓBEL, JAROSŁAW MŁYNARCZUK, JAN KOTWICA

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

Wróbel M., Młynarczuk J., Kotwica J.

## Influence of DDT and its metabolites on the secretory function of luteal, granulosa and endometrial cells in cows

### Summary

Dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) is a persistent insecticide, recognized as an environmental pollutant. Due to its lipophilic properties, DDT and its metabolite (DDE) are accumulated in tissues of farm animals. The aim of the study was to examine the influence of DDT and DDE on estradiol, progesterone and oxytocin secretion from the ovary and on prostaglandin (F2 $\alpha$  and E2) secretion from the uterus, was investigated. Granulosa, luteal and endometrial cells from cows at 8-12 days of the estrous cycle were treated for 24-72 h with 0.1-10 ng/ml of DDT, p,p'-DDE, o,p'-DDE or with a technical mixture of DDE isomers. Neither DDT nor DDE were found to affect the viability of cells compared to the control. They also did not affect the secretion of estradiol from granulosa cells. The utilized pollutants increased ( $P < 0.05-0.001$ ) the progesterone and oxytocin secretion from luteal and granulosa cells. They also stimulated ( $P < 0.05$ ) PGF2 $\alpha$  secretion but simultaneously reduced ( $P < 0.001$ ) PGE2 secretion from endometrial cells. Hence the ratio of PGF2 $\alpha$  to PGE2 was markedly changed, from 1:1 in the control, up to 1:4-10 in treated cells. It has been concluded that DDT and its metabolites may impair regulation of the estrous cycle in cows by stimulation of oxytocin secretion from luteal and granulosa cells and by stimulation of PGF2 $\alpha$  and the simultaneous inhibition of PGE2 secretion from endometrial cells.

**Keywords:** DDT, ovary, uterus

Warunkiem prawidłowego funkcjonowania układu rodowego jest ściśle współdziałanie macicy, jajowodu oraz jajnika, które stanowią fizjologiczną jedność. Środkowo-lutealna faza cyklu rujowego jest krytycznym okresem dla przygotowania układu rodowego do ciąży. Dlatego wszelkie zakłócenia w lokalnej regulacji czynności układu rodowego w tym czasie mogą prowadzić do istotnych zakłóceń w płodności zwierząt. Wraz z rozwojem przemysłu, do środowiska przedostało się szereg substancji (tzw. ksenobiotyków), które mogą wpływać na czynność układu rodowego. Jako ligandy receptorów (m.in. estradiolu, androgenowego oraz AhR) i także działając na komórkę prawdopodobnie przez jądrowe receptory sieroce np. SF1 (6), mogą one zmieniać sekrecję lub syntezę oksytocyny (14) oraz prostaglandyn (28), aktywnie uczestniczących w regulacji cyklu płciowego. Insektycyd DDT (dwuchlorodwufenylotrójchloroetan), należy do tej grupy związków. Z uwagi na jego szkodliwość dla środowiska, używanie DDT w Europie i USA zostało zakazane (22). Mimo to, jest on nadal stosowany w krajach Afryki i Azji, w programach zwalczania chorób

zakaźnych np. malarii i tyfusu (23) oraz jako insektycyd w rolnictwie (22). DDT wprowadzony do organizmu, podlega powolnemu metabolizmowi i łatwo kumuluje się w tkankach, zwłaszcza w tkance tłuszczowej (22). Również w środowisku jego biodegradacja przebiega opornie, a powstałe w tym procesie metabolity: p,p'-DDE i o,p'-DDE, posiadają nawet większą trwałość i aktywność biologiczną niż samo DDT (9). Mieszanina techniczna DDT zawiera izomery, głównie p,p' (65-80%) i o,p' (15-21%), stąd w środowisku znalazły się również analogiczne metabolity (95% p,p'-DDE i 5% o,p'-DDE). Ta widoczna zmiana proporcji jest związana z większą trwałością izomeru p,p'-DDE (19).

We wcześniejszych badaniach własnych stwierdzono, że polichlorowane bifenyle (PCBs), również wykazujące powinowactwo do receptorów estrogenowych (1), zakłócają czynność sekrecyjną jajnika (14, 15) i macicy krowy (28). Zmiany powodowane przez te związki mogą przyspieszać luteolizę oraz zwiększać aktywność motoryczną mięśniówki macicy (27) i w efekcie upośledzać rozpoczęcie i utrzymanie ciąży.

Ponieważ w płynie pęcherzykowym krów z regionu Warmii i Mazur stwierdzono obok PCBs (14) również obecność p,p'-DDE (dane niepublikowane), dlatego celem niniejszych badań było określenie, czy DDT i jego metabolity w warunkach przewidywanych w doświadczeniach wpływają: (a) na przeżywalność komórek granulocy i lutealnych oraz *endometrium*, (b) na sekrecję estradiolu (E2) oraz oksytocyny (OT) z komórek warstwy ziarnistej pęcherzyka jajnikowego, (c) na sekrecję progesteronu (P4) i OT z komórek lutealnych, (d) na sekrecję prostaglandyn F2 $\alpha$  i E2 z komórek *endometrium*.

### Materiał i metody

**Pozyskiwanie komórek do badań.** Materiał do badań stanowiły jajniki oraz przyległe rogi macicy krowy z 8.-12. dnia cyklu (5), pobrane poubojowo. Narządy transportowano do laboratorium w 0,9% NaCl (4°C). Komórki warstwy ziarnistej pęcherzyków jajnikowych o średnicy < 1 cm i > 1 cm uzyskiwano poprzez ich nakłucie i energiczne przepłukiwanie własnym płynem folikularnym (24). Komórki lutealne pozyskiwano przez enzymatyczną dyspersję ciała żółtego drogą perfuzji przez tętnicę jajnikową (14). Komórki *endometrium* pozyskiwano przez enzymatyczne trawienie (28). Liczbę żywych komórek określano przez barwienie 0,04% błękitem trypanu i zliczano używając komory Bürkera (Brandt, Niemcy). Do badań używano komórek, z których żywych było co najmniej: 65% dla granulocy z pęcherzyków < 1 cm, 75% dla granulocy z pęcherzyków > 1 cm oraz 80% dla komórek lutealnych i *endometrium*.

**Hodowle komórkowe.** Komórki (2  $\times$  10<sup>5</sup>/ml) w medium DMEM/F-12 HAM + 10% FCS przenoszono na płytki (Nunclon  $\Delta$ -Surface, NUNC, Dania), w objętości 0,5 ml zawiesiny na dołek. Komórki lutealne i granulocy preinkubowano przez 24 h, zaś *endometrium* przez 72 h (38°C, atmosfera 95% powietrza i 5% CO<sub>2</sub>, wilgotność względna 100%, Heraeus BB-6060, Niemcy). Następnie komórki 2-krotnie płukano medium M-199 + 0,1% BSA i zastępowano 0,5 ml DMEM/F-12 HAM + 0,1% BSA. Wszystkie media używane w czasie pozyskiwania i hodowli komórek zawierały dodatek gentamycyny (20  $\mu$ g/ml). Odczynniki używane w niniejszych doświadczeniach, pochodziły z Sigma (Polska), chyba że podano inaczej.

**Doświadczenia wstępne.** W celu oceny przeżywalności komórek, przy użyciu TOX-1 In Vitro Toxicology Assay Kit MTT Based, poddano je działaniu DDT i izomerów DDE (p,p'-DDE i o,p'-DDE) oraz ich mieszaniny (95% p,p'-DDE + 5% o,p'-DDE) w dawce 10 ng/ml, przez 72 h. Jako kontroli negatywnej użyto aktynomycyny D (Act D, 500 ng/ml).

**Doświadczenie 1.** Komórki granulocy inkubowano (72 h) z DDT, izomerami DDE (p,p'-DDE i o,p'-DDE) oraz ich mieszaniną (95% p,p'-DDE + 5% o,p'-DDE) w dawkach 1 i 10 ng/ml. FSH (100 ng/ml, podane na ostatnie 24 h inkubacji, dar dr A.P.F. Parlow, NHPP, Harbor-UCLA, Medical Center, USA) i hydrokortyzon (Kort, 1  $\times$  10<sup>-5</sup> M, Serva, Francja) użyto jako kontroli pozytywnej dla uwalniania OT (10).

**Doświadczenie 2.** Komórki lutealne inkubowano (72 h) z DDT, izomerami DDE (p,p'-DDE i o,p'-DDE) oraz ich mieszaniną (95% p,p'-DDE + 5% o,p'-DDE) w dawkach 1 i 10 ng/ml. LH (100 ng/ml, podane na ostatnie 24 h inkubacji, dar dr A.P.F. Parlow, NHPP, Harbor-UCLA, Medical Center, USA) i hydrokortyzon użyto jako kontroli pozytywnej odpowiednio dla sekrecji P4 i OT.

**Doświadczenie 3.** Komórki *endometrium* inkubowano (24 h) z DDT, izomerami DDE (p,p'-DDE i o,p'-DDE) oraz ich mieszaniną (95% p,p'-DDE + 5% o,p'-DDE) w dawkach 0,1, 1 i 10 ng/ml. Jako kontroli pozytywnej użyto kwasu arachidonowego (AA, 20  $\mu$ g/ml).

**Oznaczanie stężenia hormonów w medium.** Po zakończeniu doświadczeń media zbierano i przechowywano (-18°C) do czasu wykonania oznaczeń, przy użyciu metody enzymoimmunologicznej, stężenia E2, P4, OT, PGFM i PGE2. Do oznaczenia P4 użyto króliczych przeciwciał (IFP4, dar prof. S. Okrasy, UWM, Olsztyn) w rozcieńczeniu 1 : 100 000. Progesteronu znakowanego peroksydazą chrzanową (Boehringer Mannheim) użyto w rozcieńczeniu 1 : 80 000. Pomiar wykonano na płytkach (ROLL, Włochy) pokrytych owczą  $\gamma$ -globuliną anty-króliczą (15). Do oznaczenia E2 użyto króliczej surowicy anty-estradiolowej (dar prof. G. L. Williamsa, Texas, A&M University, Beeville, USA) w rozcieńczeniu 1 : 30 000. Reakcje krzyżowe przeciwciał wobec estronu, 17 $\beta$ -estradiolu i benzoenu estradiolu wynosiły, odpowiednio: 9,0, 2,2 i 70,8%. Znakowanego peroksydazą chrzanową E2 użyto w rozcieńczeniu 1 : 150 000 (14). Do oznaczenia OT użyto surowicy anty-OT (R-1, dar prof. G. Kotwicy, UWM, Olsztyn) w rozcieńczeniu 1 : 30 000. Biotynylowanej OT użyto w rozcieńczeniu 1 : 50 000. Znakowanie białyną przeciwciał przeciw OT przeprowadzono we własnym zakresie z użyciem zestawu Biotin Labelling Kit (Boehringer Mannheim) (14). Do oznaczenia PGF2 $\alpha$  wykonano pomiar koncentracji skorelowanego z nią PGFM. Użyto przeciwciał przeciw PGFM (dar prof. W. Silvii, University of Kentucky, Lexington, USA) w rozcieńczeniu 1 : 80 000, II przeciwciała (owcze przeciw  $\gamma$ -globulinie króliczej) oraz PGFM znakowane końską peroksydazą chrzanową w rozcieńczeniu 1 : 140 000 (28). Dla oznaczenia PGE2 użyto przeciwciał króliczych (dar prof. W. W. Thatcher, University of Florida, Gainesville, USA) w rozcieńczeniu 1 : 35 000, II przeciwciał (owcze przeciw  $\gamma$ -globulinie króliczej) oraz PGE2 znakowanego końską peroksydazą chrzanową w rozcieńczeniu 1 : 30 000. Koncentrację prostaglandyn wyrażano w przeliczeniu na miligram białka w komórkach (28). Parametry oznaczania poszczególnych hormonów podano w tab. 1.

Tab. 1. Parametry oznaczeń poszczególnych hormonów metodą EIA

Hormon	Zasięg krzywej (ng/ml)	Czułość metody (ng/ml)	Zmienność wewnątrz-seryjna	Zmienność między-seryjna	Współczynnik regresji (r) (n = 4)
P4	0,1-25	0,15	8,8%	10,2%	0,95
E2	0,00625-1,6	0,002	9,8%	12,3%	0,91
OT	0,0039-1,0	0,0018	9,6%	12,0%	0,92
PGFM	0,0312-16	0,041	8,9%	11,24%	0,97
PGE2	0,039-20	0,048	9,9%	13,7%	0,96

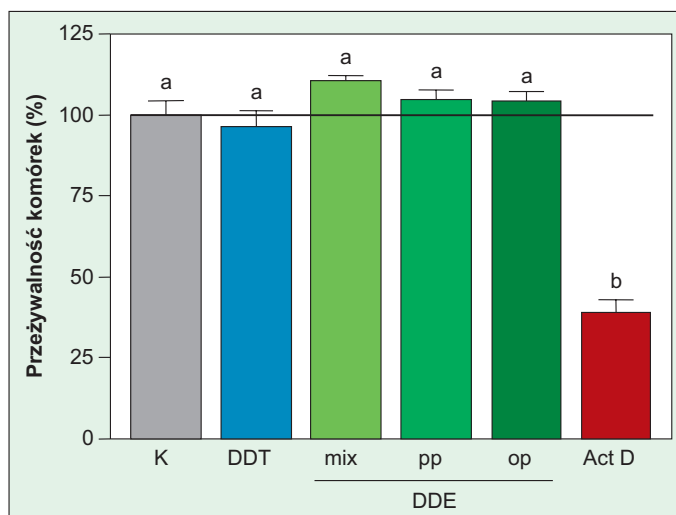
**Analiza statystyczna.** Średnie ( $\pm$  SEM) wartości poszczególnych pomiarów były poddane analizie wariancji oraz post-testu Newman-Keulsa dla poszczególnych kolumn (Prism 2.0, GraphPad Software Inc. USA), a następnie zamieniono je na procent wobec kontroli.

### Wyniki i omówienie

Wykazano, że  $p,p'$ -DDE jest wykrywalny (0,02-0,03 ng/ml, dane niepublikowane) w płynie pęcherzykowym krów pochodzących z regionu Warmii i Mazur. Wartości te są niższe niż stwierdzono u bydła i innych zwierząt gospodarskich w Grecji (7). Świadczy to, że mimo nie stosowania DDT jako insektycydu, wciąż stanowi on istotne środowiskowe zanieczyszczenie. Dawki ksenobiotyków użyte w niniejszych doświadczeniach, nie zmieniały przeżywalności komórek lutealnych (ryc. 1) ani też granulocy i *endometrium* (dane nie przedstawione na ryc.) w przeciwieństwie ( $p < 0,001$ ) do Act D (ryc. 1). Stąd do dalszych badań użyto 10 ng/ml DDT i DDE w czasie do 72 h inkubacji. Taka wielkość nie wpływała także na syntezę DNA i proliferację komórek granulocy krów (22). Dlatego sądzimy, że obserwowane zmiany w czynności wydzielniczej jajnika i macicy były wynikiem wpływu ksenobiotyków na nieuszkodzoną komórkę. Potwierdza to również fizjologiczna reakcja tych komórek na czynniki użyte jako kontrola pozytywna.

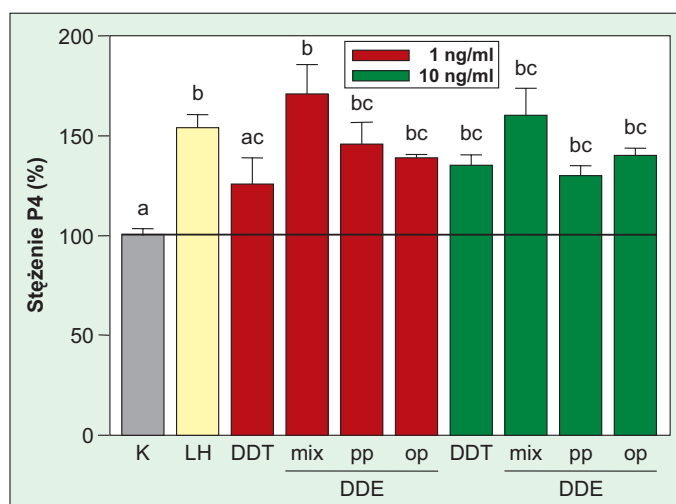
Zarówno DDT i DDE, podobnie jak PCBs (14) nie wpływały na sekrecję E2 z komórek granulocy z pęcherzyków obu wielkości (dane nie przedstawione na ryc.). Hamujący wpływ DDT na sekrecję E2, z komórek granulocy, zaobserwowano (22) dopiero po użyciu wyższej dawki (1  $\mu$ g/ml). Świadczyć to może o pewnej odporności krów na wpływ tych związków, ponieważ u świń już niskie (4 ng/ml) stężenia zarówno DDT, jak i DDE hamowały sekrecję E2 z komórek granulocy (25). Mimo braku wpływu wymienionych związków na podstawową sekrecję E2 z komórek granulocy, mogą one hamować stymulujący wpływ gonadotropin na sekrecję E2 z tych komórek. Taki efekt stwierdzono w komórkach Leydiga poddanych wpływowi hCG oraz bisfenolu A (18), i w komórkach granulocy traktowanych FSH i PCBs (14). Z kolei DDT oraz DDE zwiększały ( $p < 0,05$ ) sekrecję P4 z komórek lutealnych (ryc. 2), podobnie jak PCBs (15). Efekt stymulacji sekrecji P4 przez DDT zaobserwowano także w hodowlach luteinizujących komórek granulocy szczurów (17) i steroidogennych komórek łożyska człowieka. Proces ten odbywał się przez zwiększanie aktywności cytochromu P450sc (26). Obserwowany wzrost sekrecji P4 z komórek lutealnych pod wpływem DDT i jego metabolitów zmienia stosunek E2 do P4, co może upośledzić implantację blastocysty (4).

DDT (1 ng/ml) i jego metabolity zwiększały ( $p < 0,05-0,001$ ) sekrecję OT (ryc. 3a) w hodowlach komórek granulocy z pęcherzyków  $< 1$  cm. Natomiast DDE w dawce 1 ng/ml, zwiększał ( $p < 0,01$ ) sekrecję OT w hodowlach komórek z pęcherzyków  $> 1$  cm,



**Ryc. 1.** Średnia ( $\pm$  SEM,  $n = 4$ ) przeżywalność komórek: granulocy (a), lutealnych (b), *endometrium* (c) po inkubacji (72 h) z DDT,  $p,p'$ -DDE,  $o,p'$ -DDE i mieszaniną (mix) tych izomerów DDE (10 ng/ml). Aktynomycyna D (Act D, 500 ng/ml) była użyta jako kontrola negatywna

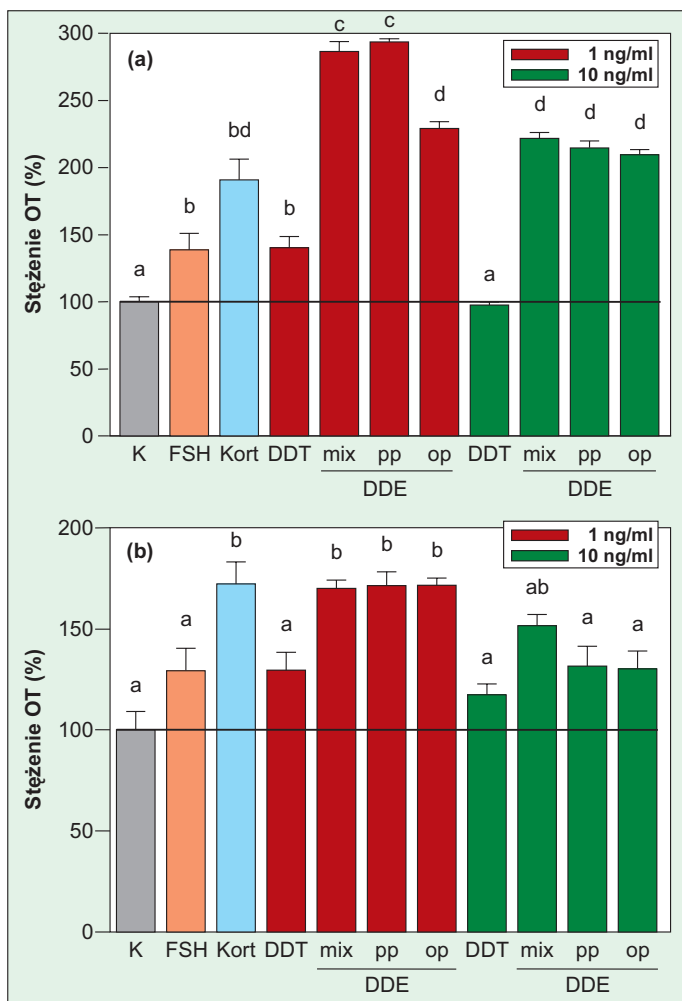
Objaśnienie: a, b –  $p < 0,01$



**Ryc. 2.** Średnie ( $\pm$  SEM,  $n = 4$ ) stężenie P4 po inkubacji (72 h) komórek lutealnych z DDT,  $p,p'$ -DDE,  $o,p'$ -DDE i mieszaniną (mix) izomerów DDE (1, 10 ng/ml). LH (100 ng/ml) użyto jako kontroli pozytywnej

Objaśnienie: a, b, c –  $p < 0,05$

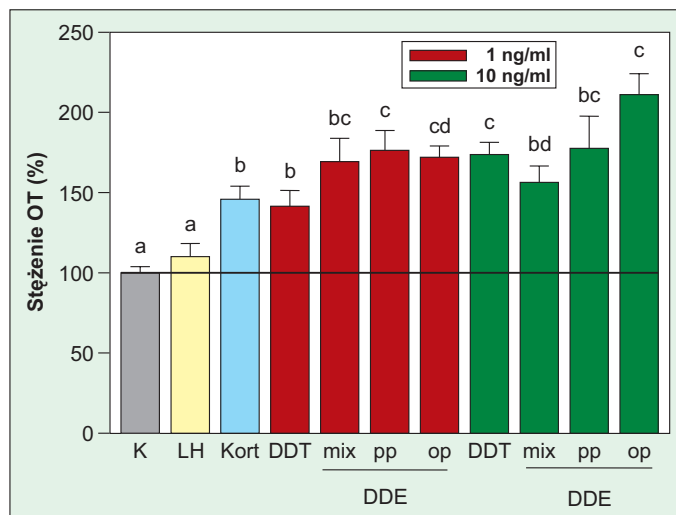
(ryc. 3b). DDT i DDE, w obu użytych dawkach (1 i 10 ng/ml) także zwiększały ( $p < 0,05$ ) sekrecję OT z komórek lutealnych (ryc. 4). Należy podkreślić, że OT produkowana i wydzielana przez komórki warstwy ziarnistej pęcherzyka jajnikowego i komórki lutealne krowy, ma istotny wpływ na lokalną regulację czynności układu rozrodczego we wszystkich fazach cyklu (21). Jest ona także jednym z czynników regulujących wzrost pęcherzyków jajnikowych, dojrzewanie oocytów oraz procesy luteinizacji komórek osłonki wewnętrznej i warstwy ziarnistej pęcherzyka jajnikowego (3). Syntetyzowana w ciałku żółtym OT początkowo wspiera formowanie ciałka żółtego (13), a w późniejszych fazach cyklu bierze udział w jego luteolizie poprzez stymulację sekrecji prostaglandyny F2 $\alpha$



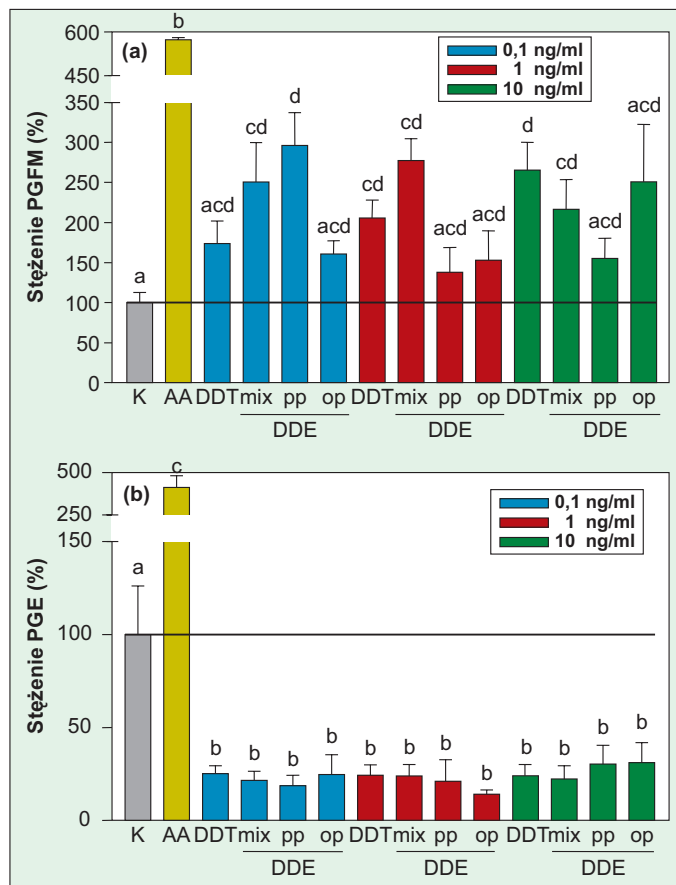
Ryc. 3. Średnie ( $\pm$  SEM,  $n = 4$ ) stężenie OT po inkubacji (72 h) komórek granulocy, z: (a) małych, (b) dużych pęcherzyków jajnikowych, z DDT, p,p'-DDE, o,p'-DDE i mieszaniną (mix) izomerów DDE (1, 10 ng/ml). FSH (100 ng/ml) i hydrokortyzonu (Kort,  $1 \times 10^{-5}$  M) użyto jako kontroli pozytywnych. Objaśnienie: a, b, c, d –  $p < 0,05$

z macicy (12). Stąd wszelkie zakłócenia w jej syntezie i sekrecji mogą mieć ujemne konsekwencje dla prawidłowego przebiegu cyklu rujowego.

Wykazano, że E2 wpływa dwojako na sekrecję OT z komórek warstwy ziarnistej pęcherzyka jajnikowego była: niskie dawki pobudzają, a wyższe hamują sekrecję OT z tych komórek (24). Ponieważ DDT i jego metabolit DDE naśladują działanie E2, dlatego możliwe, że działają jak jego niskie dawki, wykazując 100 do 1000 razy słabsze powinowactwo do receptora E2 niż naturalny hormon (8). Ponieważ jednak komórki granulocy wytwarzają znaczne ilości E2 w czasie inkubacji (średnio 200-250 pg/ml), stąd użyte dawki DDT i DDE mogą być za niskie, by mogły stymulować sekrecję OT. Natomiast komórki lutealne posiadają małą ilość receptorów E2 w badanym okresie cyklu (29), dlatego nie obserwowano wpływu DDT i DDE na sekrecję OT. Możliwe więc, że DDT i jego metabolity wpływają na sekrecję OT z komórek granulocy i lutealnych, z pominięciem receptorów E2, np. przez receptor glikokortykoidowy, jak w przypadku PCBs (16).



Ryc. 4. Średnie ( $\pm$  SEM,  $n = 4$ ) stężenie OT po inkubacji (72 h) komórek lutealnych z DDT, p,p'-DDE, o,p'-DDE i mieszaniną (mix) izomerów DDE (1, 10 ng/ml). LH (100 ng/ml) i hydrokortyzonu (Kort,  $1 \times 10^{-5}$  M) użyto jako kontroli pozytywnych. Objaśnienie: jak na ryc. 3.



Ryc. 5. Średnie ( $\pm$  SEM,  $n = 5$ ) stężenie PGFM (a) i PGE2 (b) po inkubacji (24 h) komórek endometrium z DDT, p,p'-DDE, o,p'-DDE i mieszaniną (mix) izomerów DDE (0,1, 1, 10 ng/ml). Kwasu arachidonowego (AA, 20  $\mu$ g/ml) użyto jako kontroli pozytywnej. Objaśnienie: jak na ryc. 3.

DDT (1 i 10 ng/ml), p,p'-DDE (0,1 ng/ml) oraz mieszanina izomerów DDE zwiększały ( $p < 0,05$ ) ilość PGFM w medium po hodowli komórek endometrium (ryc. 5a). Podobny wzrost sekrecji PGF2 $\alpha$  z endomet-



rium wystąpił pod wpływem PCBs (28). Jednocześnie DDT i DDE zmniejszały ( $p < 0,001$ ) sekrecję PGE2 z komórek *endometrium* (ryc. 5b). Przeciwnie działanie DDT i metabolitów na sekrecję PGF2 $\alpha$  i PGE2 zakłócało ich wzajemny stosunek ilościowy. O ile w grupie kontrolnej stosunek PGF2 $\alpha$  do PGE2 wynosił 1 : 1 o tyle pod wpływem DDT i jego metabolitów zmieniał się na 1 : 4-10 (ryc. 5). Zmiana ta może zwiększać aktywność motoryczną macicy, jak i przyspieszać luteolizę. Warto zauważyć, że również PCBs zaburzały wzajemny stosunek PGF2 $\alpha$  i PGE2, choć nie wykazywały wpływu na sekrecję PGE2 (28). Wpływ DDT na syntezę prostaglandyn w układzie rodym ssaków nie był dotychczas badany. Natomiast u drobiu wykazano, że izomer p,p'-DDE wyraźnie hamował syntezę zarówno PGE2, jak i PGF2 $\alpha$ , prawdopodobnie przez wpływ na syntezę ich prekursora (PGH). Prowadziło to do upośledzenia wytwarzania skorupy jaj (11). U krów DDT i DDE działały przeciwnie na uwalnianie PGF2 $\alpha$  i PGE2, podobnie jak wykazano to dla PCBs (28). Sądzić można zatem, że insektycyd ten upośledza syntezę prostaglandyn u krowy, raczej na poziomie specyficznych syntaz niż podczas syntezy ich wspólnego prekursora.

Uzyskane dane wskazują, że DDT i DDE wpływają na przebieg cyklu rujowego krów głównie poprzez stymulację sekrecji OT z komórek lutealnych i granulocyzy oraz wzrost sekrecji PGF2 $\alpha$  z komórek *endometrium*. Ponieważ między uwalnianiem OT i PGF2 $\alpha$  zachodzi dodatnie sprzężenie zwrotne w końcowej fazie cyklu (2, 20), wpływ DDT i jego metabolitów, zakłócający czynność układu rodym krowy, może ulec dodatkowemu wzmocnieniu.

## Piśmiennictwo

- Andric S. A., Kostic T. S., Stanko S. S., Kovacevic R. Z.: Inhibition of rat testicular androgenesis by a polychlorinated biphenyl mixture Aroclor 1248. *Biol. Reprod.* 2000, 62, 1882-1888.
- Flint A. P. F., Sheldrick E. L., McCann T. J., Jones D. S. C.: Luteal oxytocin: characteristic and control of synchronous episodes of oxytocin and PGF2 $\alpha$  secretion at luteolysis in ruminants. *Domest. Anim. Endocrinol.* 1990, 7, 111-124.
- Furuya K., Mizumoto Y., Makimura N., Mitsui C., Murakami M., Tokuoka S., Ishikawa N., Nagata I., Kimura T., Ivell R.: A novel biological aspect of ovarian oxytocin: gene expression of oxytocin, and oxytocin receptor in cumulus/luteal cells and the effect of oxytocin on embryogenesis in fertilized oocytes. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1995, 395, 523-528.
- Harper M. J. K.: Gamete and zygote transport, [w:] Knobil E., Neill J. (wyd.): *The Physiology of Reproduction*. Raven Press, New York 1988, 103-134.
- Ireland J. J., Murphee 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.
- Janošek J., Hilscherová K., Bláha L., Holoubek I.: Environmental xenobiotics and nuclear receptors – interactions, effects and in vitro assessment. *Toxicol. in Vitro* 2006, 20, 18-37.
- 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, 185-190.
- Kuiper G. G. J. M., Lemmen J. G., Carlsson B., Corton J. C., Safe S. H., van der Saag P. T., van der Burg B., Gustafsson J. A.: Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor. *Endocrinology* 1998, 139, 4252-4263.
- Longnecker M. P., Klebanoff M. A., Dunson D. B., Guo X., Chen Z., Zhou H., Brock J. W.: Maternal serum level of the DDT metabolite DDE in relation to fetal loss in previous pregnancies. *Environ. Res.* 2005, 97, 127-133.
- Luck M. R.: Enhanced secretion of oxytocin from bovine granulosa cells treated with adrenal steroids. *J. Reprod. Fertil.* 1988, 83, 901-907.
- Lundholm C. E.: DDE-induced eggshell thinning in birds: effects of p,p'-DDE on the calcium and prostaglandin metabolism of the eggshell gland. *Comp. Biol. Physiol.* 1997, 118, 113-128.
- McCracken J. A., Schramm W., Okulicz W.: Hormone receptor control of pulsatile secretion of PGF2 $\alpha$  from the ovine uterus during luteolysis and its abrogation in early pregnancy. *Anim. Reprod. Sci.* 1984, 7, 31-55.
- 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 polychlorinated biphenyls on LH-stimulated secretion of progesterone and oxytocin from bovine luteal cells. *Pol. J. Vet. Sci.* 2006, 9, 101-108.
- 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.
- Nejaty H., Lacey M., Whitehead S. A.: Differing effects of endocrine-disrupting chemicals on basal and FSH-stimulated progesterone production in rat granulosa-luteal cells. *Exp. Biol. Med.* 2001, 226, 570-576.
- Nikula H., Talonpoika T., Kaleva M., Toppari J.: Inhibition of hCG stimulated steroidogenesis in cultured mouse Leydig tumor cells by bisphenol A and octylphenols. *Biochem. Pharmacol.* 1999, 157, 166-173.
- Rogan W. J., Chen A.: Health risks and benefits of bis(4-chlorophenyl)-1,1,1-trichloroethane (DDT). *Lancet* 2005, 366, 763-773.
- Silvia W. J., Lewis G. S., McCracken J. A., Thatcher W. W., Wilson L. Jr.: Hormonal regulation of uterine secretion of prostaglandin F2 $\alpha$  during luteolysis in ruminants. *Biol. Reprod.* 1991, 45, 655-663.
- Stormshak F.: Biochemical and endocrine aspects of oxytocin production by the mammalian corpus luteum. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2003, 1, 92.
- Tiemann U., Pöhland R., Schneider F.: Influence of organochlorine pesticides on physiological potency of cultured granulosa cells from bovine preovulatory follicles. *Theriogenology* 1996, 46, 253-265.
- Trigg P. I., Kondrachine A. V.: Commentary: malaria control in the 1990s. *Bull. World Health Organ.* 1998, 76, 11-16.
- Voss A. K., Fortune J. E.: Estradiol-17 $\beta$  has biphasic effect on oxytocin secretion by bovine granulosa cells. *Biol. Reprod.* 1993, 48, 1404-1409.
- Wójtowicz A. K., Gregoraszczuk E. L., Ptak A., Falandysz J.: Effect of single and repeated in vitro exposure of ovarian follicles to o,p'-DDT and p,p'-DDT and their metabolites. *Pol. J. Pharmacol.* 2004, 56, 465-472.
- Wójtowicz A. K., Milewicz T., Gregoraszczuk E. L.: DDT and its metabolite DDE alter steroid hormone secretion in human term placental explants by regulation of aromatase activity. *Toxicol. Lett.* 2007, 173, 24-30.
- Wróbel M., Kamiński K., Kotwica J.: In vitro effects of polychlorinated biphenyls (PCBs) on the contractility of bovine myometrium from the periovulatory stage of the estrous cycle. *Reprod. Biol.* 2005, 5, 303-319.
- Wróbel M., Kotwica J.: Influence of polychlorinated biphenyls (PCBs) and phytoestrogens on prostaglandin F2 $\alpha$  and E2 secretion from bovine endometrial cells at a postovulatory stage of the oestrous cycle. *Vet. Med.-Czech* 2005, 50, 487-495.
- Zava D. T., Blen M., Duwe G.: Estrogenic activity of natural and synthetic estrogens in human breast cancer cells in culture. *Environ. Health. Perspect.* 1997, 105, 637-645.

Adres autora: mgr Michał Wróbel, ul. Tuwima 10, 10-747 Olsztyn; e-mail: wrobel@pan.olsztyn.pl