

# Wpływ aktywnych metabolitów fitoestrogenów na wrażliwość steroidogennych komórek ciała żółtego krowy na wybrane cytokiny prozapalne\*)

ANNA KORZEKWA\*\*), ANNA ROGOZIŃSKA, IZABELA WOCLAWEK-POTOCKA\*\*),  
DARIUSZ J. SKARŻYŃSKI

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

Korzekwa A., Rogozińska A., Woclawek-Potocka I., Skarżyński D. J.

## Influence of phytoestrogen metabolites on the sensitivity of steroidogenic cells of bovine corpus luteum on selected proinflammatory cytokines

### Summary

Due to a similar chemical structure to  $17\beta$ -estradiol ( $E_2$ ), phytoestrogens may inhibit or modulate endogenous estrogen action. Although the authors demonstrated that phytoestrogens did not influence basal progesterone (P4) secretion, nonetheless it simultaneously inhibited the stimulation of luteinizing hormone (LH) and prostaglandin (PG)  $E_2$  on P4 release in bovine corpus luteum (CL) in vitro. Since phytoestrogens are luteolytic factors in the late luteal stage (enhanced  $PGF_{2\alpha}$  secretion in vitro and the level in plasma), these factors possibly also play some role in cytokine action (mediators of  $PGF_{2\alpha}$  during luteolysis) in cattle. The aim of this study was to determine the influence of phytoestrogen metabolites on the sensitivity of bovine corpus luteum cells on tumor necrosis factor  $\alpha$ , interferon  $\gamma$  and interleukin  $1\beta$  action, by measuring the level of  $PGF_{2\alpha}$  and stable metabolites of nitric oxide and by determining the viability of CL cells on day 15 of the estrous cycle. Phytoestrogens can increase functional luteolysis by enhancing  $PGF_{2\alpha}$  and NO synthesis stimulated by cytokines. Moreover, phytoestrogens can modulate structural luteolysis by increasing the sensitivity of steroidogenic cells on the cytotoxic action of cytokines in bovine CL.

**Keywords:** phytoestrogens, cytokines,  $PGF_{2\alpha}$ , corpus luteum, cattle

Główną funkcją ciała żółtego (CL) jest synteza i wydzielanie progesteronu (P4) dla zapewnienia właściwych warunków do rozwoju zarodka, jego implantacji i utrzymania ciąży. W przypadku braku ciąży dalsze utrzymanie CL na jajniku nie ma uzasadnienia i dlatego u krowy w 16.-17. dniu od owulacji rozpoczyna się proces regresji CL zwany luteolizą. Celem tego procesu jest eliminacja czynnego CL (regresja) z jajnika, aby umożliwić rozwój kolejnych pęcherzyków jajnikowych. Czynnikiem indukującym luteolizę u krowy jest  $PGF_{2\alpha}$  syntetyzowana w błonie śluzowej macicy i uwalniana z niej pulsacyjnie pod koniec fazy lutealnej (8). Dyskusyjny jest jednak mechanizm bezpośredniego – luteolitycznego wpływu  $PGF_{2\alpha}$  na steroidogenne komórki CL krowy (8). Rolę pośredników działania  $PGF_{2\alpha}$  w CL podczas luteolizy pełnią produkty innych, dodatkowych komórek CL (śródbłonna naczyń, tkanki łącznej i komórki immunologiczne) (6, 13, 14). W czasie luteolizy dochodzi do wzrostu liczby komórek immunologicznych w CL krowy, a głównymi czynnikami pośredniczącymi w regresji CL krowy są cytokiny: czynnik martwicy nowotworu  $\alpha$  (TNF), interleukina 1

(IL- $1\alpha$  i  $1\beta$ ) i interferon  $\gamma$  (IFN) oraz tlenek azotu (NO) (17, 19, 22).

Wydzielanie i działanie  $PGF_{2\alpha}$  oraz innych mediatorów luteolizy, takich jak cytokiny, jest zależne od steroidów jajnikowych, a szczególnie od  $17\beta$ -estradiolu ( $E_2$ ) (7, 12, 11). Wykazano ponadto, że  $E_2$  może pełnić auto-, parakrynne funkcje w CL krowy (3, 24). Zaburzenia we wpływie hormonów jajnika na układ immunologiczny mogą być przyczyną wielu dysfunkcji w regulacji CL, co w efekcie potencjalnie prowadzi do zaburzeń cyklu płciowego i wczesnej ciąży. Oprócz dysfunkcji jajnika będących przyczyną zaburzeń w syntezie i uwalnianiu endogennych estrogenów, egzogennym źródłem związków estrogenowych może być pasza i jej nieodżywcze składniki – fitoestrogeny (1, 3, 7, 15).

Fitoestrogeny ze względu na strukturę chemiczną podobną do  $E_2$  mogą wykazywać aktywność agonistyczną lub antagonistyczną do naturalnych estrogenów, poprzez swoją konkurencyjność dla receptorów  $E_2$  (3, 9, 15, 24). W osoczu krwi karmionych śrutą sojową wykazano wysokie stężenie aktywnych metabolitów izoflawonów: ekwolu – metabolitu daizeiny i formononetyny oraz par-etyl-fenolu – metabolitu genisteiny i biochaniny A (24). Fitoestrogeny mogą modulować steroidogenezę CL krowy i regulować syntezę  $PGF_{2\alpha}$  (15, 24). Brak jest jednak

\*) 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.

danych określających potencjalny wpływ związków estrogenopodobnych na immuno-endokryne mechanizmy regulujące proces regresji CL krwi. Dlatego celem pracy było określenie wpływu aktywnych metabolitów fitoestrogenów i  $E_2$  na wrażliwość steroidogennych komórek na luteolityczne działanie wybranych cytokin.

### Materiał i metody

Materiał stanowiły jajniki jałówek (rasy nizinnej czarno-białej z 50-80% dolewem krwi krów holendersko-fryzyjskich) w 15. dniu cyklu jajnikowego, pobierane po uboju zwierząt (Zakłady Mięsne Morliny – Ostróda). Komórki steroidogenne CL izolowano enzymatycznie i hodowano zgodnie z procedurą opisaną wcześniej (5).

**Doświadczenie 1.** Wykazanie wpływu  $17\beta$ -estradiolu i metabolitów fitoestrogenów na wrażliwość steroidogennych komórek CL na luteolityczne działanie wybranych cytokin.

Komórki steroidogenne CL w systemie hodowli jednowarstwowej preinkubowano 24 h z  $E_2$  ( $10^{-9}$  M) i metabolitami fitoestrogenów: ekwolem i para-etyl-fenolem ( $10^{-8}$  M), w dawkach wybranych w poprzednich badaniach (15, 25). Następnie komórki stymulowano przez kolejne 24 h cytokinami: TNF (50 ng/ml), IFN (50 ng/ml), IL- $1\beta$  (50 ng/ml) oraz endotoksyną bakteryjną (Endotoksyna-1, Ex; lipopolisacharydy ze szczepu *Escherichia coli* – serotyp 055: B5 LPS; Sigma, # L 2808; 50 ng/ml). Po hodowli w medium oznaczono stężenie  $PGF_{2\alpha}$  metodą immunoenzymatyczną (EIA) oraz  $NO_2/NO_3$  metodą kolorymetryczną wg Korzekwa i wsp. (5).

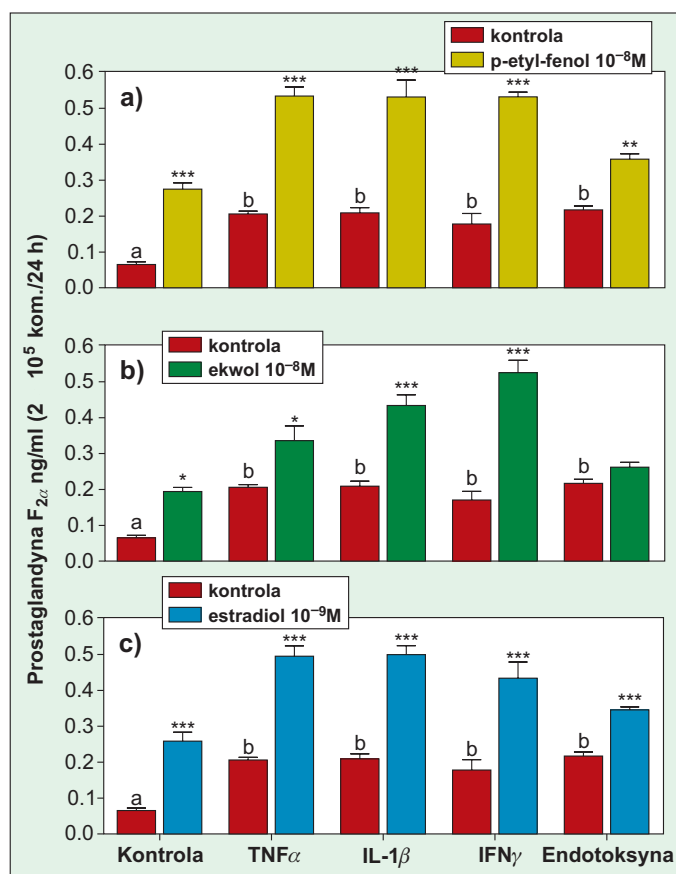
**Doświadczenie 2.** Wykazanie wpływu para-etyl-fenolu, ekwołu oraz  $17\beta$ -estradiolu na regulowaną cytokinami żywotność steroidogennych komórek CL.

Komórki steroidogenne CL w systemie hodowli jednowarstwowej preinkubowano 24 h metabolitami fitoestrogenów i  $E_2$ , a w następnych 24 h hodowli stymulowano cytokinami: TNF (50 ng/ml), IFN (50 ng/ml), IL- $1\beta$  (50 ng/ml) oraz Fas Ligandem (Fas L; kontrola pozytywna – cytokina należąca do rodziny cytokin TNF, której główną funkcją jest indukcja apoptozy w wielu typach komórek; 50 ng/ml). Po zakończeniu hodowli mierzono żywotność komórek za pomocą metody z użyciem MTT wg Korzekwa i wsp. (5).

### Wyniki i omówienie

**Doświadczenie 1.** Wykazanie wpływu  $17\beta$ -estradiolu i metabolitów fitoestrogenów na wrażliwość steroidogennych komórek CL na luteolityczne działanie wybranych cytokin.

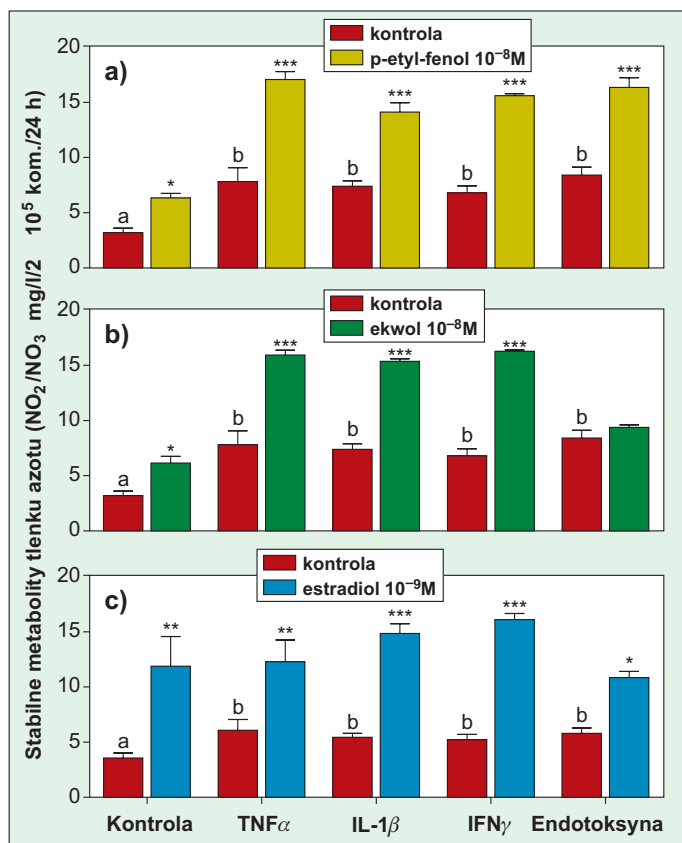
Wydzielanie  $PGF_{2\alpha}$  wzrosło w grupie komórek kontrolnych po podaniu TNF o 216% ( $p < 0,001$ ), IL- $1\beta$  o 221% ( $p < 0,001$ ), IFN o 173% ( $p < 0,05$ ) oraz endotoksyny o 234% ( $p < 0,001$ , ryc. 1). Para-etyl-fenol i ekwoł stymulowały wydzielanie  $PGF_{2\alpha}$  w komórkach kontrolnych o 323% i 198%, odpowiednio ( $p < 0,001$ ; ryc. 1a). Gdy preinkubowane z para-etyl-fenolem komórki stymulowano później cytokinami, wykazano wzrost wydzielania  $PGF_{2\alpha}$ , odpowiednio, po podaniu TNF o 159% ( $p < 0,001$ ), IL- $1\beta$  o 154% ( $p < 0,001$ ), IFN o 200% ( $p < 0,001$ ), endotoksyny bakteryjnej o 65% ( $p < 0,01$ ). Gdy preinkubowane z ekwolem komórki stymulowano później cytokinami, wykazano wzrost wydzielania  $PGF_{2\alpha}$  po podaniu TNF o 63% ( $p < 0,05$ ), IL- $1\beta$  o 108% ( $p < 0,001$ ), IFN o 208% ( $p < 0,001$ ). Ekwoł nie uwrażliwiał komórek na działanie endotoksyny ( $p > 0,05$ ). Wydzielanie  $PGF_{2\alpha}$  po pre-inkubacji z  $E_2$  wzrosło o 300%



**Ryc. 1.** Wpływ para-etyl-fenolu (a), ekwołu (b) oraz  $17\beta$ -estradiolu (c) na stymulowaną cytokinami (TNF, IL- $1\beta$ , IFN) oraz z endotoksyną bakteryjną syntezę  $PGF_{2\alpha}$  w steroidogennych komórkach CL krwi. Różne litery wskazują różnice statystyczne między komórkami kontrolnymi a komórkami kontrolnymi stymulowanymi cytokinami (ab –  $p < 0,05$ ). Gwiazdki określają różnice statystyczne między komórkami preinkubowanymi bądź nie z fitoestrogenami i później stymulowanymi cytokinami (\* –  $p < 0,05$ ; \*\* –  $p < 0,01$ ; \*\*\* –  $p < 0,001$ )

( $p < 0,001$ ; ryc. 1c). Preinkubowane z  $E_2$  komórki stymulowano później cytokinami i wykazano wzrost wydzielania  $PGF_{2\alpha}$  odpowiednio, po podaniu TNF o 140% ( $p < 0,001$ ), IL- $1\beta$  o 140% ( $p < 0,001$ ), IFN o 144% ( $p < 0,001$ ), endotoksyny o 60% ( $p < 0,001$ ).

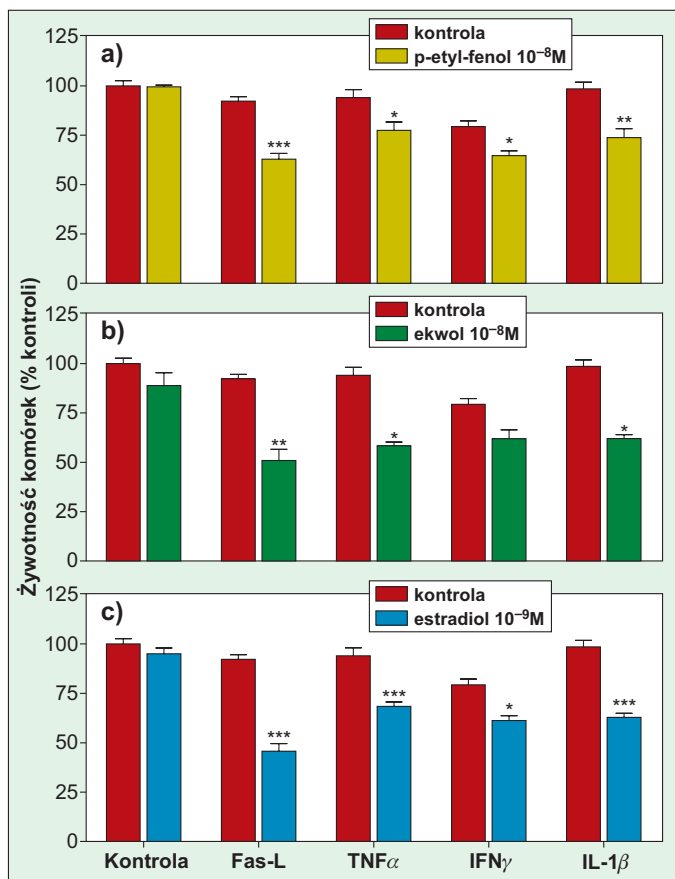
Stężenie  $NO_2/NO_3$  wzrastało w medium inkubacyjnym odpowiednio po podaniu TNF o 144% ( $p < 0,001$ ), IL- $1\beta$  o 131% ( $p < 0,05$ ), IFN o 113% ( $p < 0,05$ ), endotoksyny o 163% ( $p < 0,001$ ) w hodowlach komórek kontrolnych (preinkubowanych tylko w samym medium, bez dodatku związków estrogenowych; ryc. 2). Para-etyl-fenol i ekwoł stymulowały produkcję NO w komórkach kontrolnych o 98% i 92%, odpowiednio ( $p < 0,05$ ; ryc. 2a). Gdy komórki preinkubowane z para-etyl-fenolem stymulowano później cytokinami, wykazano wzrost stężenia  $NO_2/NO_3$ , odpowiednio, po podaniu TNF o 118% ( $p < 0,01$ ), IL- $1\beta$  o 91% ( $p < 0,05$ ), IFN o 130% ( $p < 0,01$ ), endotoksyny o 94% ( $p < 0,01$ ). Gdy preinkubowane z ekwolem komórki stymulowano cytokinami, wykazano wzrost  $NO_2/NO_3$ , odpowiednio, po podaniu TNF o 104% ( $p < 0,001$ ), IL- $1\beta$  o 107% ( $p < 0,001$ ), IFN o 140% ( $p < 0,001$ ). Stężenie  $NO_2/NO_3$  po preinkubacji komórek kontrolnych z  $E_2$  wzrastało o 149% ( $p < 0,01$ ; ryc. 2c).



Ryc. 2. Wpływ para-etylfenolu (a), ekwolu (b) oraz 17 $\beta$ -estradolu (c) na stymulowaną cytokinami (TNF, IL-1 $\beta$ , IFN) oraz z endotoksyną bakteryjną syntezę NO w steroidogennych komórkach CL krwi. Różne litery wskazują różnice statystyczne między komórkami kontrolnymi a komórkami kontrolnymi stymulowanymi cytokinami (ab –  $p < 0,05$ ). Gwiazdki określają różnice statystyczne między komórkami preinkubowanymi bądź nie z fitoestrogenami i później stymulowanymi cytokinami (\* –  $p < 0,05$ ; \*\* –  $p < 0,01$ ; \*\*\* –  $p < 0,001$ )

Preinkubowane z E<sub>2</sub> komórki stymulowano później cytokinami i wykazano wzrost NO<sub>2</sub>/NO<sub>3</sub>, odpowiednio, po podaniu TNF o 122% ( $p < 0,01$ ), IL-1 $\beta$  o 133% ( $p < 0,001$ ), IFN o 151% ( $p < 0,001$ ), endotoksyny o 105% ( $p < 0,05$ ).

W badaniach określono wpływ para-etylfenolu, ekwolu oraz E<sub>2</sub> na wrażliwość steroidogennych komórek CL na działanie cytokin (TNF, IFN, IL-1 $\beta$ ). Jako miernik wrażliwości komórek przyjęto zmiany w wydzielaniu PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  oraz NO (pomiar stabilnych metabolitów NO - NO<sub>2</sub>/NO<sub>3</sub>). Wykazano znaczny wzrost syntezy PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  (ponad 800%) w komórkach preinkubowanych z aktywnymi metabolitami fitoestrogenów lub E<sub>2</sub> i później stymulowanych cytokinami w porównaniu do komórek kontrolnych preinkubowanych w samym medium inkubacyjnym. Wykazano również, że poziom akumulacji metabolitów NO gwałtownie wzrósł w komórkach preinkubowanych wcześniej z fitoestrogenami i E<sub>2</sub>, a później stymulowanych cytokinami (ponad 500%;  $p < 0,001$ ). Sugeruje to, że estrogeny endogenne, jak i roślinne uwrażliwiają steroidogenne komórki CL na luteolityczne działanie cytokin. Rola cytokin jako pośredników luteolitycznego działania PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  została po raz pierwszy zasugerowana przez Pate i wsp. (14). Z kolei wydzielanie i działanie PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  jest zależne również od steroidów jajnikowych, między



Ryc. 3. Wpływ para-etylfenolu (a), ekwolu (b) oraz 17 $\beta$ -estradolu (c) na regulowaną cytokinami (Fas-L, TNF, IFN, IL-1 $\beta$ ) żywotność steroidogennych komórek CL krwi. Gwiazdki określają różnice statystyczne po stymulacji cytokinami w porównaniu do odpowiednich kontroli (\* –  $p < 0,05$ ; \*\* –  $p < 0,01$ ; \*\*\* –  $p < 0,001$ )

innymi od E<sub>2</sub> (12). W pracy wykazano, że aktywne metabolity fitoestrogenów, podobnie jak E<sub>2</sub>, stymulują syntezę NO i PGF<sub>2 $\alpha$</sub> , mogą działać jak naturalne estrogeny, a tym samym mogą modulować regresję CL, co jest zgodne z wcześniejszymi badaniami (15, 25). Mimo że fitoestrogeny nie wpływały na podstawowe pulsacyjne wydzielanie P4 w CL krwi, to hamowały stymulacyjny efekt LH na wydzielanie P4 w CL krwi *in vitro* (15). Fitoestrogeny nie zmieniały również poziomu P4 w hodowli komórek steroidogennych CL, ale jednocześnie silnie stymulowały wydzielanie PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  (25), co wskazuje, że związki te mogą zaburzać funkcje CL krwi poprzez zakłócenie steroidogenezy i uwrażliwienie CL na luteolityczne działanie endogennych czynników będących – z jednej strony – mediatorami luteolizy, a z drugiej strony – mediatorami stanów zapalnych. Wykazano, że aktywne metabolity estrogenów roślinnych i endogenne E<sub>2</sub> mogą regulować działanie cytokin podczas procesu regresji CL krwi. Potwierdzają to badania, w których wykazano, że estrogeny mogą wzmacniać procesy immunologiczne zależne od limfocytów klasy T, stymulując proliferację komórek immunologicznych oraz syntezę w nich cytokin (2). Z kolei zwiększona ilość komórek immunologicznych pociąga za sobą wzrost ilości cytokin, a tym samym wzrost syntezy i uwalniania czynników luteolitycznych: PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  i NO, i może wzmacniać mechanizm regresji CL krwi.

**Doświadczenie 2.** Wykazanie wpływu para-etyl-fenolu, ekwolu oraz 17- $\beta$ -estradiolu na regulowaną cytokinami żywotność steroidogennych komórek CL.

Nie wykazano bezpośredniego wpływu para-etyl-fenolu, ekwolu i  $E_2$  na żywotność komórek (ryc. 3). Również cytokiny podane samodzielnie nie wpływały na żywotność hodowanych komórek. Preinkubacja komórek z aktywnymi metabolitami fitoestrogenów lub  $E_2$  uwrażliwiła komórki na cytotoksyczne działanie wszystkich stosowanych cytokin. Żywotność komórek steroidogennych preinkubowanych z para-etyl-fenolem (ryc. 3a) obniżyła się po podaniu FAS-L o 32% ( $p < 0,001$ ), TNF o 18% ( $p < 0,05$ ), IFN o 18% ( $p < 0,05$ ), IL-1 $\beta$  o 25% ( $p < 0,01$ ). Żywotność komórek preinkubowanych z ekwolem (ryc. 3b) obniżyła się po podaniu FAS-L o 55% ( $p < 0,01$ ), TNF o 38% ( $p < 0,05$ ), IL-1 $\beta$  o 37% ( $p < 0,05$ ). Żywotność komórek preinkubowanych z  $E_2$  (ryc. 3c) obniżyła się po podaniu FAS-L o 50%, TNF o 30% ( $p < 0,001$ ), IFN o 23% ( $p < 0,05$ ), IL-1 $\beta$  o 36% ( $p < 0,001$ ).

Dwa główne steroidy jajnikowe ( $P_4$  i  $E_2$ ) odgrywają przeciwstawne role w regulacji śmierci komórek CL. Progesteron jest czynnikiem chroniącym CL przed apoptozą (10),  $E_2$  może wzmacniać procesy doprowadzające do śmierci steroidogennych komórek CL (4). W prezentowanych badaniach nie wykazano jednak bezpośredniego wpływu  $E_2$  i aktywnych metabolitów fitoestrogenów na żywotność steroidogennych komórek CL krowy. Ponadto nie wykazano bezpośredniego cytotoksycznego wpływu cytokin podawanych oddzielnie na hodowane komórki. Jednakże żywotność steroidogennych komórek CL obniżyła się, gdy wcześniej preinkubowano je z estrogenami (endogennymi lub roślinnymi), a później stymulowano cytokinami (Fas L, TNF, IFN, IL-1 $\beta$ ). Apoptoza jest mechanizmem, poprzez który cytokiny i pośrednio PGF $_{2\alpha}$  mogą indukować proces strukturalnej regresji CL (śmierć i eliminacja komórek CL) (16, 17, 19-22). Jednakże dopiero łączne podanie cytokin (TNF i IFN) indukuje śmierć steroidogennych komórek CL krowy (5, 20). Głównym aktywatorem apoptozy w CL krowy jest inny przedstawiciel superrodziny cytokin TNF – Fas L, wydzielany przez limfocyty T (20). Wykazano, że ekspresja mRNA dla Fas-L i Fas receptora wzrasta podczas procesu luteolizy i jest indukowana przez inne cytokiny, w tym IFN i TNF (20). Ponadto NO jest silnym stymulatorem procesu apoptozy w komórkach CL człowieka (23) i krowy (5). Wszystkie te badania dowodzą, że do indukcji apoptozy konieczne jest uwrażliwienie komórek na cytotoksyczne działanie innych cytokin. W prezentowanych badaniach wykazano ponadto, że  $E_2$  i fitoestrogeny stymulują uwalnianie NO w komórkach CL krowy. Można sugerować, że fitoestrogeny oprócz bezpośredniego uwrażliwienia komórek na cytotoksyczne działanie cytokin mogą również wpływać na proces strukturalnej regresji CL pośrednio, poprzez wzrost stężenia NO.

### Podsumowanie

Aktywne metabolity fitoestrogenów: para-etyl-fenol oraz ekwol uwrażliwiają steroidogenne komórki CL krowy na luteolityczne działanie cytokin. Mogą pobudzać proces funkcjonalnej luteolizy poprzez wzmożenie stymulowanej przez cytokiny syntezy PGF $_{2\alpha}$  i NO w CL krowy. Ponadto mogą modulować proces strukturalnej lu-

teolizy, uwrażliwiając steroidogenne komórki CL krowy na cytotoksyczne działanie cytokin. Aktywne metabolity izoflawonów: para-etyl-fenol oraz ekwol działają jako agoniści naturalnych estrogenów modulując proces regresji CL zależny od komórek układu immunologicznego (24).

### Piśmiennictwo

1. Adams N. R.: Detection of the effects of phytoestrogens on sheep and cattle. *J. Anim. Sci.* 1995, 73, 1509-1515.
2. Beagley K. W., Gockel Ch. M.: Regulation of innate and adaptive immunity by the female sex hormones oestradiol and progesterone. *Immunol. Med. Microbiol.* 2003, 38, 13-22.
3. Dusza L., Ciereszko R., Skarzynski D. J., Nogowski L., Opalka M., Kaminska B., Nynca A., Kraszewska O., Słomczynska M., Wocławek-Potocka I., Korzekwa A., Pruszyńska-Oszmalek E., Szkudelska K.: Mechanism of phytoestrogens action in reproductive processes of mammals and birds. *Reprod. Biol.* 2006, 6, 151-174.
4. Goodman S. B., Kugu K., Chen S. H., Preuttipan S., Tilly K. I., Tilly J. L.: Estradiol-mediated suppression of apoptosis in the rabbit corpus luteum is associated with a shift in expression of bcl-2 family members favoring cellular survival. *Biol. Reprod.* 1998, 59, 820-827.
5. Korzekwa A., Murakami S., Wocławek-Potocka I., Bah M. M., Pilawski W., Okuda K., Skarzynski D. J.: Nitric oxide induces apoptosis in bovine luteal cells. *J. Reprod. Dev.* 2006, 52, 353-361.
6. Korzekwa A. J., Jaroszewski J. J., Wocławek-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, oddano do druku.
7. Lundh T. J.-O.: Metabolism of estrogenic isoflavones in domestic animals. *P.S.E.B.M.* 1995, 208, 33-39.
8. McCracken J. A., Custer E. E., Lamsa J. C.: Luteolysis: a neuroendocrine-mediated event. *Physiol. Rev.* 1999, 79, 263-323.
9. Nowicka E., Szkudelski R., Nogowski L.: Działanie fitoestrogenów na organizm człowieka i zwierząt. *Medycyna Wet.* 2006, 62, 736-738.
10. Okuda K., Korzekwa A., Shibaya M., Murakami S., Nishimura R., Tsubouchi M., Wocławek-Potocka I., Skarzynski D. J.: Progesterone is a suppressor of apoptosis in bovine luteal cells. *Biol. Reprod.* 2004, 71, 2065-2071.
11. Okuda K., Miyamoto Y., Skarzynski D. J.: Regulation of endometrial prostaglandin  $F_{2\alpha}$  synthesis during luteolysis and early pregnancy in cattle. *Dom. Animal Endocrinol.* 2002, 23, 255-254.
12. Okuda K., Uenoyama Y., Berisha B., Lange I. G., Taniguchi H., Kobayashi S., Kobayashi S., Miyamoto A., Schams D.: Estradiol-17 $\beta$  is produced in bovine corpus luteum. *Biol. Reprod.* 2001, 65, 1634-1639.
13. Pate J. L., Keyes P. L.: Immune cells in the corpus luteum: friends or foes? *Society for Reproduction and Fertility* 2001, 122, 665-676.
14. Pate J. L., Townson D. H.: Novel local regulators in luteal regression. *J. Anim. Sci.* 1994, 72, 34-42.
15. Piotrowska K. K., Wocławek-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.
16. Petroff M. G., Petroff B. K., Pate J. L.: Mechanism of cytokine-induced death of cultured bovine cells. *Journals of Reproduction and Fertility* 2001, 121, 753-760.
17. Skarzynski D. J., Bah M. M., Wocławek-Potocka I., Deptula K., Korzekwa A., Shibaya M., Pilawski W., Okuda K.: Roles of tumor necrosis factor- $\alpha$  of the estrous cycle in cattle: an in vivo study. *Biol. Reprod.* 2003, 69, 1907-1913.
18. Skarzynski D. J., Bogacki M., Kotwica J.: Involvement of ovarian steroids in basal and oxytocin-stimulated PGF $_{2\alpha}$  secretion by the bovine endometrium in vitro. *Theriogenology* 1999, 52, 385-397.
19. Skarzynski D. J., Jaroszewski J. J., Okuda K.: Role of TNF- $\alpha$  and nitric oxide in luteolysis in cattle. *Dom. Animal. Endocrinol.* 2005, 29, 340-346.
20. Taniguchi H., Yokomizo Y., Okuda K.: Fas-fas ligand system mediated luteal cell death in bovine corpus luteum. *Biol. Reprod.* 2002, 66, 754-759.
21. Terranova P. F., Hunter V. J., Roby K. F., Hunt J. S.: Tumor necrosis factor- $\alpha$  in the female reproductive tract. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1995, 209, 325-342.
22. 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.
23. Vega M., Urrutia L., Iniguez G., Gabler F., Devoto L., Johnson M. C.: Nitric oxide induces apoptosis in the human corpus luteum in vitro. *Mol. Hum. Reprod.* 2000, 6, 681-687.
24. Wocławek-Potocka I., Bober A., Korzekwa A., Okuda K., Skarzynski D. J.: Equol and para-ethyl-phenol stimulate PGF $_{2\alpha}$  secretion in bovine corpus luteum: intracellular mechanisms of action. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2006, 79, 287-297.
25. Wocławek-Potocka I., Okuda K., Acosta T. J., Korzekwa A., Pilawski W., Skarzynski D. J.: Phytoestrogen metabolites are much more active than phytoestrogens themselves in increasing PGF $_{2\alpha}$  synthesis via PGF $_{2\alpha}$  synthase-like 2 stimulation in bovine endometrium. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2005, 78, 201-217.

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