

**Centrálisan adott inzulin hatása a reprodukcióra experimentális
diabéteszes patkány modellben**

Dr. Kovács Péter

Kaáli Intézet, Budapest

Programvezető: Prof Dr. Szabó István

PhD program: Reproductív Endokrinológia

Pécsi Orvostudományi Egyetem, Általános Orvostudományi Kar

Szülészet-Nőgyógyászati Klinika

Tartalomjegyzék	oldal
Rövidítések jegyzéke	4-5
Az értekezés témakörébe tartozó saját közlemények	6
Az értekezés témakörébe tartozó saját előadások, posztterek	6-7
Bevezetés	8-9
Célkitűzések	9
Módszerek	9-13
a. Állatok előkészítése	9-10
b. Szexuális receptivitás vizsgálata	10
c. LH csúcs vizsgálata	11
d. Immunohisztokémia - GnRH és c-Fos	11
e. Immunohisztokémia - ösztrogén receptor (ER)	12
f. Wortmannin kísérlet	13
g. Statisztikai analízis	13
Eredmények	13-25
a. ICV inzulin hatása a szexuális receptivitásra	13-17
b. ICV inzulin hatása az LH csúcsra	18-20
c. ICV inzulin hatása a GnRH neuronok aktivitására	20-22
d. ICV inzulin hatása az ER-ra	22-25
e. ICV wortmannin hatása a szexuális receptivitásra	25-26
Megbeszélés	
a. Diabétesz hatása a humán reprodukcióra	27

b. PCOS és inzulin rezisztencia	27
c. Hypothalamus-hypophysis-ovárium tengely működése	28
d. Diabétesz hatása állatmodellekben	28-29
e. Inzulin hatása kísérletes diabétesz kapcsán állatmodellekben	30
f. Diabétesz és centrálisan adott inzulin hatása a szexuális receptivitásra	31
g. Diabétesz és centrálisan adott inzulin hatása az LH termelődésre	31-32
h. Diabétesz és centrálisan adott inzulin hatása a GnRH neuronok aktivitására	33-34
i. Diabétesz és centrálisan adott inzulin hatása az ösztrogen receptorra	34-36
j. Centrálisan adott wortmannin hatása a szexuális receptivitásra	36-37
k. PCOS	38-39
l. Inzulin szenzitizáló gyógyszerek és PCOS	40
Következtetések	40-41
Köszönetnyilvánítás	42-43
Irodalomjegyzék	43-50

Rövidítések jegyzéke:

ANOVA: variancia analízis

AUC: görbe alatti terület (area under the curve)

c-Fos: korai aktivációs antigén

CC: clomiphen citrát

CIT: citromsav

DbB: haránt Broca köteg (diagonal band of Broca)

2-DG: 2-deoxyglükóz

ER: ösztrogén receptor

FSH: follikulus stimuláló hormon

GnRH_a: gonadotropin releasing hormon agonista

GnRH: gonadotropin releasing hormon

GTI-7: immortalizált GnRH sejttenyészet

ICC: immunohisztokémia

ICV: intra-cerebro-ventrikuláris

INZ: inzulin

ip: intraperitoneális

LH: luteinizáló hormon

NICHD: National Institute of Child Health and Human Development

NIDDK: National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases

NIH: National Institute of Health

NIRKO: central nervous system insulin receptor knock-out

NS: nem szignifikáns

OVL: organum vasculosum laminae terminalis

PBS: Phosphate Buffered Saline, foszfáttal pufferolt fiziológias sóoldat

PCOS: polycisztás ovárium szindróma

PI3K: foszfatidil-inositol 3-kinase

POA: látóideg kereszteződés előtti terület (anterior preoptikus area)

PVN: nucleus paraventricularis

RIA: radioimmunoassay

rpm: rotation per minute

SAL: fiziológias sóoldat

SEM: standard error of the mean

STZ: streptozotocin

TBS: Tris Buffered Saline, Trissel pufferolt fiziológias sóoldat

Az értekezés témakörébe tartozó saját közlemények:

Kovács P, Parlow AF, Karkanias GB Effect of Centrally Administered Insulin on Gonadotropin Releasing Hormone Neuron Activity and Luteinizing Hormone Surge in the Diabetic Female Rat *Neuroendocrinology* 2002;76:357-365 (IF: 2.511)

Kovács P, Morales JC, Karkanias GB Central Insulin Administration Maintains Reproductive Behavior in Diabetic Female Rats *Neuroendocrinology* 2003;78:90-95 (IF: 2.511)

Kovács P, Polycystic Ovary Syndrome – Report from the Endocrine Society’s 83rd Annual Meeting, June 2001, Denver, Colorado –, - [www.medscape.com/women's health/ conference coverage](http://www.medscape.com/women's_health/conference_coverage)

Kovács P, Metformin alkalmazása PCOs betegek meddőségének kezelésében – *Magyar Nőorvosok Lapja* közlésre elfogadva

Kovács P, Morales JC, Karkanias GB Inhibition of Hypothalamic Phosphatidylinositol 3-kinase Attenuates Reproductive Behavior in Female Rats *Neuroendocrinology* elbírálás alatt

Kovács P, Karkanias GB The effect of diabetes and centrally administered insulin on anterior hypothalamic estrogen receptor immunoreactivity *Brain Research* elbírálás alatt

Az értekezés témakörébe tartozó saját előadások, poszterek:

Kovács P, Karkanias GB: The effect of diabetes and insulin on immunocytochemical staining of GnRH neurons in adult female rats – Poszter 2-388 Endocrine Society 83rd. Annual Meeting Denver, 2001, június

Kovács P, Karkanias GB: The effect of centrally administered insulin on luteinizing hormone surge in the diabetic female rat – Poszter-546 Society for Gynecologic Investigation Annual Meeting Los Angeles, 2002, március

Kovács P: The effect of centrally administered insulin on luteinizing hormone releasing hormone neuron activity and luteinizing hormone surge in the diabetic female rat – New York Obstetrical Society Resident and Fellow Research Night, New York 2002, április

Kovács P: The effect of diabetes and centrally administered insulin on luteinizing hormone releasing hormone neuron activity in the female rat – Albert Einstein College of Medicine, New York, 2002, június

Bevezetés

Diabétesz a populáció 5-6%-át érinti (1). Az esetek körülbelül 10%-a inzulin hiányos vagy I-es típusú diabétesz. A jellegzetes anyagcsere problémákon túl a reprodukciós rendszer is érintett lehet, különösen a nem megfelelően kezelt esetekben. Gyakran a menstruáció később jelentkezik és rendszertelen lehet, vagy akár hosszabb időre ki is maradhat. Az ovulációs zavar meddőséget okozhat, de sikeres terhesség esetén is gyakoribbak a szövődmények (2, 3).

Hasonló reprodukciós deficit figyelhető meg a különböző állat-modellekben melyekkel a diabétesz vizsgálható (4, 5, 6). Oligo-, anovuláció, csökkent gonadotropin termelés, illetve csökkent szexuális érdeklődés tapasztalható a kísérletes körülmények között cukorbetegé tett nőstény állatok között (7, 8, 9, 10, 11, 12).

A nem kezelt diabétesz kapcsán a hypothalamus-hypophysis-ovárium tengely bármely része érintett lehet, illetve az anyagcsere eltérések befolyásolhatják ezek működését. Eddigi kísérletek azt mutatták, hogy a diabéteszt kísérő testsúly csökkenés önmagában nem magyarázza meg a reprodukciós elégtelenséget (11, 12). A hypophysis megfelelően reagál exogén gonadotropin releasing hormon agonistára (GnRHa), így annak feltételezett elégtelen működése sem magyarázza meg a reprodukciós deficitet (8, 13, 14, 15).

Korábbi vizsgálatok igazolták, hogy a reprodukciós hiány hátterében nem a hyperglykaemia, hanem a hypoinzulinémia áll (12). Inzulin kezelés mellett mind a petefészek rendszeres működése, mind a gonadotropinok termelődése visszaáll a normál szintre (11, 12, 13). Inzulin azonban a perifériás anyagcsere eltéréseket is normalizálja, így nem lehet tudni, hogy a javulás az inzulinnak, vagy az anyagcsere eltérések korrigálódásának tudható-e be.

Eddigi kísérletek azt igazolták, hogy inzulinhiányos diabétesz esetén inzulin adagolás mellett a reprodukció visszaállítható a normálhoz közeli szintre. Szubkután, perifériás

adagolás viszont nem ad választ arra, hogy az inzulin ezt a hatását valamilyen perifériás szignál megváltoztatásán keresztül, vagy közvetlenül a központi idegrendszerben fejtje-e ki.

A GnRH neuronok a mediobazális hypothalamusban helyezkednek el. Az általuk képzett hálózatnak pacemaker jellegű pulzáló működése van. A pulzus frekvenciát és amplitúdót szteroid hormonok, ill. neurotranszmitterek szabályozzák. Inzulin hiányában, diabétesz kapcsán ennek a hálózatnak a működése nem megfelelő. Kísérleteink során inzulinnak a közvetlen, központi idegrendszeri szerepére kerestük a választ.

Célkitűzések:

1. Centrálisan (ICV) adott inzulin hatásának vizsgálata a szexuális receptivitásra kasztrált, szteroid-kezelt nőstény állatokban kísérletes diabétesz során.
2. Centrálisan (ICV) adott inzulin hatásának vizsgálata az LH csúcsra kasztrált, szteroid-kezelt nőstény állatokban kísérletes diabétesz során.
3. Centrálisan (ICV) adott inzulin hatásának vizsgálata a mediobazális hypothalamusban levő GnRH neuronok aktivitásása kasztrált, szteroid-kezelt nőstény állatokban kísérletes diabétesz során.
4. Centrálisan (ICV) adott inzulin hatásának vizsgálata a mediobazális hypothalamusban levő ER számára kasztrált, szteroid-kezelt nőstény állatokban kísérletes diabétesz során.
5. A szexuális receptivitás vizsgálata kasztrált, szteroid-kezelt nőstény állatokban az inzulin szignál mediálásában résztvevő PI3K wortmanninal történő gátlása során.

Módszerek

Állatok előkészítése

Kísérleteink a Helsink Deklaráció állatkísérletekre vonatkozó előírásait követték.

Kísérleteink során felnőtt, nőstény Sprague-Dawley (Taconic Farms, Germantown, NY, USA)

patkányokat használtunk. Az állatok átlag súlya 175-200 gm közé esett. Megérkezésüket követően két-három napig akklimatizálódtak az állatok, majd ketamin anesztéziában mindkét ováriumukat eltávolítottuk. A műtét során intraperitoneális (ip.) streptozotocinnal (STZ, 75 gm/kg 0.1 M citromsavban oldva) diabéteszt idéztünk elő. A kontroll állatokat ip. citromsavval kezeltük. A műtéti beavatkozás végén sztereotaxikus műtéttel, a korábban kiszámított koordinátáknak megfelelően intra-cerebro-ventrikuláris (ICV) katétert helyeztünk a harmadik agykamrába. A katétert ozmotikus pumpához (Alzet ozmotikus pumpa, 0.5 µl/óra áramlási sebesség, Alza Corp., CA, USA) kötöttük, melyet a hát bőre alá implantáltunk. A pumpa a kontroll állatok esetében fizioológias sóoldatot, míg a kezelt állatok esetében híg inzulin oldatot tartalmazott (humán lente inzulin, 100 µU/óra). A beavatkozást követően az állatokat hasonló körülmények között tartottuk (élelem ad libitum, 10/14 órás világos/sötét periódusok). Vércukor szintet a farokból vett vérből határoztuk meg. Ha a vércukor szint meghaladta a 200 mg/dl értéket, a kísérleti állatot diabéteszesnek tekintettük. Tíz nappal a műtétet követően, a kísérleteket megelőzően 48 és 24 órával 2 µg estradiol benzoátot adtunk sc., majd 3-4 órával a kísérlet előtt 500 µg progeszteront.

Szexuális receptivitás vizsgálata

Az ösztrusz fázisban levő, vagy ösztrogén-progeszteron előkezelt kasztrált nőstény állat a hím közeledésére jellegzetes testtartással reagál (lordózis). Ennek vizsgálatához szexuálisan tapasztalt hím patkányokat helyeztünk a hormon kezelt nőstényekkel azonos ketrecbe. Harminc perc adaptációt követően vizsgáltuk a nőstények reakcióját a hím közeledésére. A lordózis jelenlétét és annak jellemzőit vizsgáltuk (16). A lordózis hányadost az alábbi formulával számítottuk: lordózis jelenléte/ hím próbkozása X 100. A lordózis fokozatát 0-3-ig osztályoztuk: 0=lordózis hiánya, 1=enyhe lordózis, 2=közepesen hajló gerinc, 3= kifejezett lordózis. A lordózis jelenlétén kívül, az állatok általános aktivitását is vizsgáltuk (két lábra állás, mozgás a ketrecen belül).

Az LH csúcs vizsgálata

Ebben a kísérletben az első ösztradiol injekció beadásakor, ketamin anesztéziában a vena jugularisba katétert helyeztünk. A progeszteron injekciót követően ezen a katéteren keresztül vettünk vért LH meghatározáshoz. A vérvételeket (400µl alkalmanként) 1 órával a progeszteron injekciót követően kezdtük. A harmadik órától a tizedik óráig óránként vettünk vért, majd további két alkalommal két-két óránként. Az utolsó mintát 24 órával a progeszteron injekció után vettük le. Minden mintát 2 percig 12,000 rpm-en centrifugáltuk, majd a szérumot Eppendorf csőben lefagyasztottuk, és fagyasztva tároltuk az LH meghatározásig. Radioimmunoassayt (RIA) alkalmaztunk, az NIDDK által rendelkezésünkre bocsátott reagensekkel a minták LH tartalmának meghatározásához. Az egyes állatoknál így kapott értékeket használtuk fel az LH görbe, ill. az LH termelés meghatározásához.

Immunohisztokémia

GnRH és c-Fos

A GnRH neuronok aktivitását kettős immunhisztokémiai vizsgálattal (GnRH és c-Fos) elemeztük. A progeszteron injekciót követően 5-6 órával, a nappali ciklus utolsó órájában az állatokat ketamin anesztéziában dekapitáltuk, majd a koponyából az agyat eltávolítottuk és immunhisztokémiához feldolgoztuk. Az anesztéziát követően az állatok mellkasát megnyitottuk és a szíven keresztül először sóoldattal, majd 4%-os paraformaldehiddel perfundáltuk őket. Miután az agyat eltávolítottuk, 24 órára surcose oldatba helyeztük. Ezt követően 40µm-es metszeteket készítettünk, majd a fagyasztás káros hatásától védő oldatban tároltuk a hisztokémiáig. A festés során a metszeteket szoba hőmérsékletre hoztuk, majd 0.1 M PBS oldattal öblítettük. Nátrium borohidrátos kezelést követően 4 °C-on 48 órán át c-Fos antitesttel (1:30.000) inkubáltuk. A harmadik napon újabb PBS öblítést követően hozzáadtuk a kecskében termelődött nyúl ellenes („goat anti-rabbit IgG”) másodlagos antitestet. Újabb PBS öblítést követően Elit avidin-biotin komplex-szel kezeltük a metszeteket, majd 0.175 M

nátrium acetát-ot adtunk hozzá. Nikkel szulfátot, hidrogén peroxidot és diaminobenzidint tartalmazó oldattal tettük láthatóvá a c-Fos-t tartalmazó sejteket. Ezt követően PBS-sel öblítettük a metszeteket, majd a második antitestet hozzáadtuk (GnRH, 1:100.000) a metszetekhez. A megjelenítő oldat ebben az esetben Tris puffert, hidrogén peroxidot és diaminobenzidint tartalmazott. Ezt követően a metszeteket tárgylemezre helyeztük, alkoholban dehidráltuk majd fedőlemezzel lefedtük. A kiértékelés során azokat a metszeteket elemeztük, ahol a haránt Broca köteg (diagonal band of Broca (DbB)), oragnum vasculosum laminae terminalis (OVLT) vagy a látóideg kereszteződés előtti terület (anterior preoptikus area (PoA)) volt felismerhető. Csak azokat a metszeteket elemeztük, melyek épek voltak és mindkét agyfél jól látszott. Átlagban 24 metszetet elemeztünk egy-egy állatnál. Az elemzés során a kezelés nem volt ismert, a metszetek kódolva voltak. Minden metszeten megszámoltuk a csak GnRH-val, csak c-Fos-sal, ill. mindkettővel festődő neuronok számát. Az átlag festett neuron számot mindhárom régióban a neuron szám/metszet szám formulával kaptuk.

Ösztrogén receptor

A metszetek előkészítése az előzőekben leírtakhoz hasonlóan történt. Miután a metszeteket szobahőmérsékletre hoztuk, TBS pufferrel öblítettük. Ezt követően a nem specifikus kötődés kivédésére blokkoló reagenssel (20%-os kecske („goat”) szérum + szarvasmarha szérum antigén („bovine serum antigen”) + hidrogén peroxid) kezeltük. Ösztrogen receptor (ER) kimutatásához ER715 antitestet (1:100 hígítás) használtunk (AF Parlow-tól, NIH Hormone and Peptide Program). A harmadik napon újabb TBS öblítést követően „goat anti-rabbit IgG”-t adtunk a metszetekhez másodlagos antitestnek, majd „ELITE avidin-biotin” komplexszel kezeltük őket. A megjelenítő oldat ebben az esetben is Tris puffert, hidrogén peroxidot és diaminobenzidint tartalmazott. Ezt követte a metszetek dehidrációja és tárgylemezre helyezése. A metszeteket ebben a kísérletben is kódoltuk. Az

elemzés során az OVLT-t és a nucleus paraventricularis (PVN) régiókat vizsgáltuk. Külön számoltuk azokat a sejteket ahol csak a sejtmag festődött, ill. azokat a sejteket, ahol csak a cytoplazma festődött. A kettő összege egy adott régióban adta meg az összes ER pozitív sejtek számát. Hasonlóan az előző kísérlethez itt is az átlag neuron szám/ metszet számot hasonlítottuk össze a különböző csoportok, ill. régiók között.

Wortmannin kísérlet

Az állatok műtéti előkészítése hasonlóan folyt a korábban leírtakhoz. A subcután ozmotikus pumpából ebben a kísérletben vagy fiziológias sóoldat vagy hígított wortmannin (25 $\mu\text{mol/l}$) áramlott a harmadik agykamrába. Ebben a vizsgálatban szintén a nőstény állatok szexuális receptivitását elemeztük, szteroid kezelést követően. A vizsgálat menete a fent leírtakkal megegyezően történt.

Statisztikai analízis

A szexuális receptivitást vizsgáló kísérletekben ANOVA-t használtunk, a post hoc analízishez t próbát. A GnRH ICC vizsgálatnál ANOVA-t alkalmaztunk a diabétesz és inzulin kezelés hatásának külön-külön és a kettő interakciójának elemzéséhez. A vércukorszintek összehasonlítása a cukorbeteg és kontroll csoportokon belül t próbával történt. Az LH csúcs vizsgálat során a kapott LH értékekből átlag görbe alatti terület (area under the curve (AUC)) értékeket számítottuk, és ezeket hasonlítottuk össze. A wortmannin kísérletben t próbát használtunk a lórdozis jelenlétének és minőségének összehasonlítására.

Eredmények

1. ICV inzulin hatása a szexuális receptivitásra

Négy kísérletes állatcsoport volt (STZ + INZ, STZ + SAL, CIT + INZ, CIT + SAL); 8-14 állattal csoportonként. STZ kezelés minden állatnál diabéteszt eredményezett. A cukorbeteg, ICV inzulinnal vagy fiziológias sóoldattal kezelt állatok vércukorszintje között nem volt különbség (I. táblázat). Az állatok általános aktivitása hasonló volt (1. ábra). Az

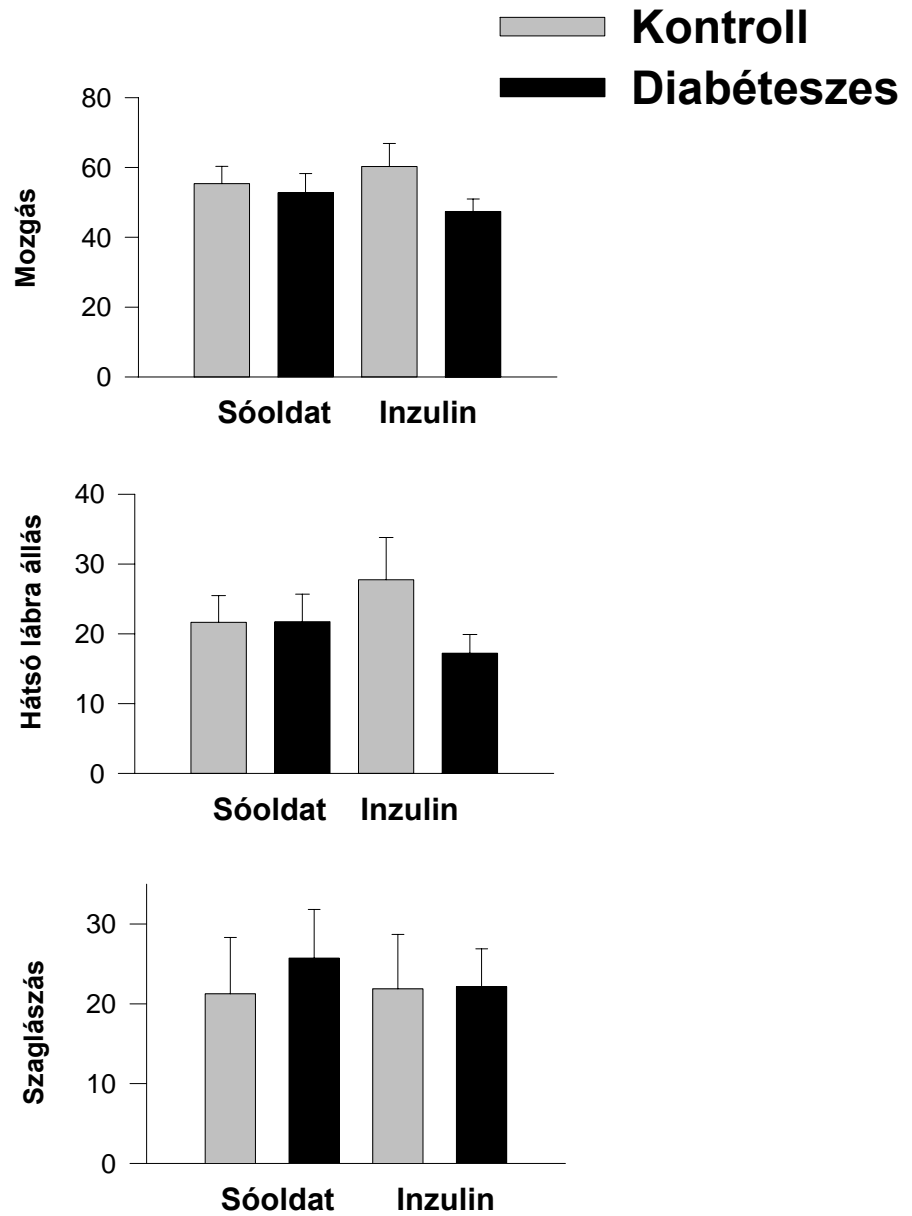
STZ-vel kiváltott diabétesz a lordózis hányados jelentős csökkenéséhez vezetett (2. ábra).

ICV inzulin sikeresen meggátolta ezt a csökkenést (2. ábra). A kontroll csoportban ICV inzulin kezelés mellett kisfokú lordózis hányados emelkedés volt tapasztalható (2. ábra). Ha lordózis jelen volt, annak minősége lényegesen rosszabb volt a cukorbeteg állatok között (3. ábra). ICV inzulin ezt a minőségbeli csökkenést is sikeresen meggátolta (3. ábra). A kontroll csoportban a lordózis minősége nem változott inzulin kezelés mellett.

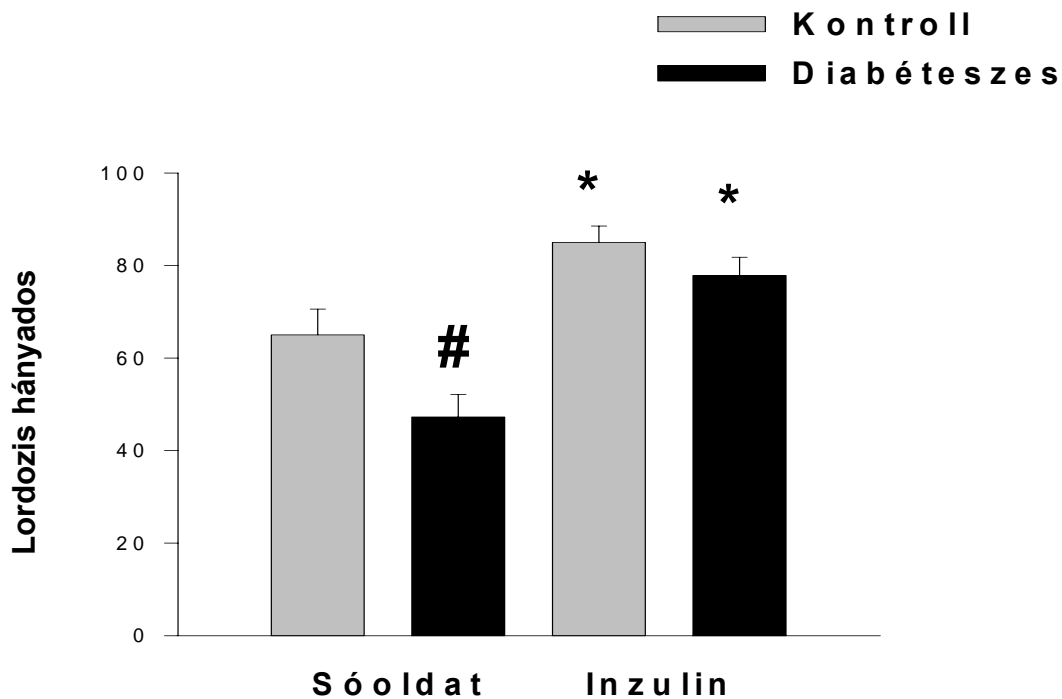
	Alap vércukor érték (mg/dl +/-SEM) ^a	Átlag vércukor érték a 2. posztoperatív napon (mg/dl +/- SEM) ^b	Átlag vércukor érték a kísérlet végén (mg/dl +/- SEM) ^c
STZ + INZ (n=6)	43.6+/-4.0	325.5+/-22.4	333+/-14.8
STZ + SAL (n=4)	45.5+/-4.9	308+/-27.5	383.2+/-18.1
CIT + INZ (n=6)	52.3+/-4.0	79.3+/-22.4	122.3+/-14.8
CIT + SAL (n=6)	57.6+/-4.0	72.8+/-22.4	125.1+/-14.8

I Táblázat. Vércukor szint a négy kísérletes csoportban a szexuális receptivitás vizsgálata során (alapérték, 2. posztoperatív nap, kísérlet végén)

- a. Az alapértékek nem különböznek
- b. A második posztoperatív napon a vércukor értékek STZ + INZ és STZ + SAL csoportokban > CIT + INZ és CIT + SAL ($P < 0.05$), vércukor értékek a STZ + INZ és STZ + SAL csoportokban nem különböznek és CIT + INZ és CIT + SAL is hasonlóak voltak
- c. A kísérlet végén a vércukor értékek a STZ + INZ és STZ + SAL > CIT + INS és CIT + SAL ($P < 0.05$), vércukor értékek a STZ + INZ és STZ + SAL nem különböznek és CIT + INZ és CIT + SAL is hasonlóak voltak



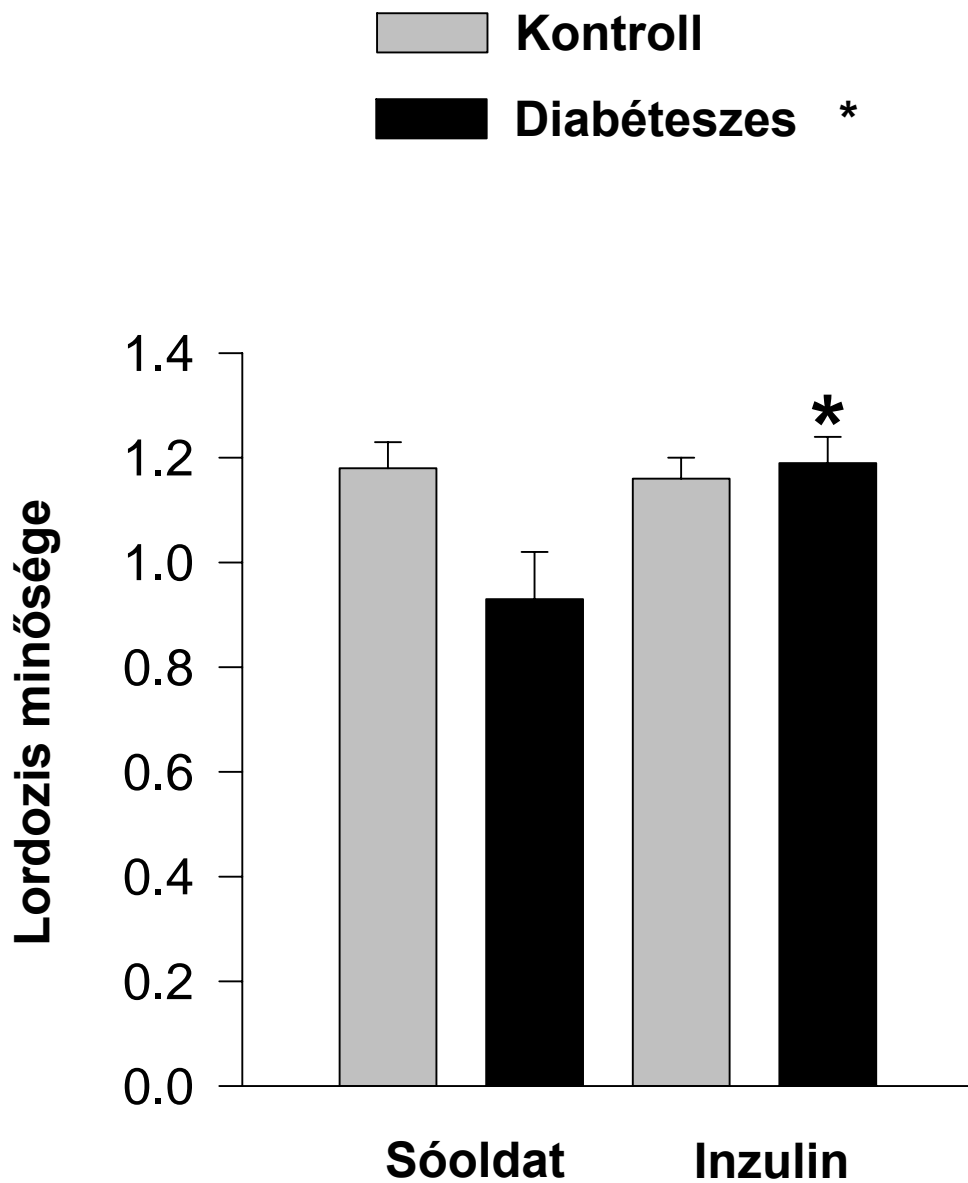
1. Ábra. Általános aktivitás változása a négy kísérletes csoportban. A csoportok között nem volt szignifikáns különbség (ANOVA, $p > 0.10$).



2.Ábra. A szexuális receptivitást felmérő lordosis hányados változásának vizsgálata a négy kísérletes csoportban. Diabétesz mellett szignifikánsan csökkent a lordosis hányados ($p < 0.05$; $n = 8-14$). ICV inzulin kezelés mellett a lordosis hányados jelentősen emelkedett.

Különbözik a kontroll sóoldattal kezelt csoporttól ($p < 0.05$)

*Különbözik a sóoldattal kezelt csoportoktól ($p < 0.001$; $n = 8-14$)



3. Ábra. A lordózis minőségének vizsgálata kísérletes körülmények között. Diabétesz mellett a lordózis foka szignifikánsan csökkent ($p < 0.05$; $n = 8-14$). ICV inzulin javította a lordózis minőségét a diabéteszes csoportban. *Szignifikánsan különbözik a cukorbeteg sóoldattal kezelt csoporttól ($p < 0.001$; $n = 8-14$).

2. ICV inzulin hatása az LH csúcsra

Ebben a vizsgálatban is négy kísérletes csoport volt (STZ + INZ {n=6}, STZ + SAL {n=5}, CIT + INZ {n=5}, CIT + SAL {n=6}). STZ kezelés minden állatban diabéteszt eredményezett. A cukorbeteg, ICV inzulinnal és fiziológiás sóoldattal kezelt állatok vércukorszintje között nem volt különbség (II. táblázat).

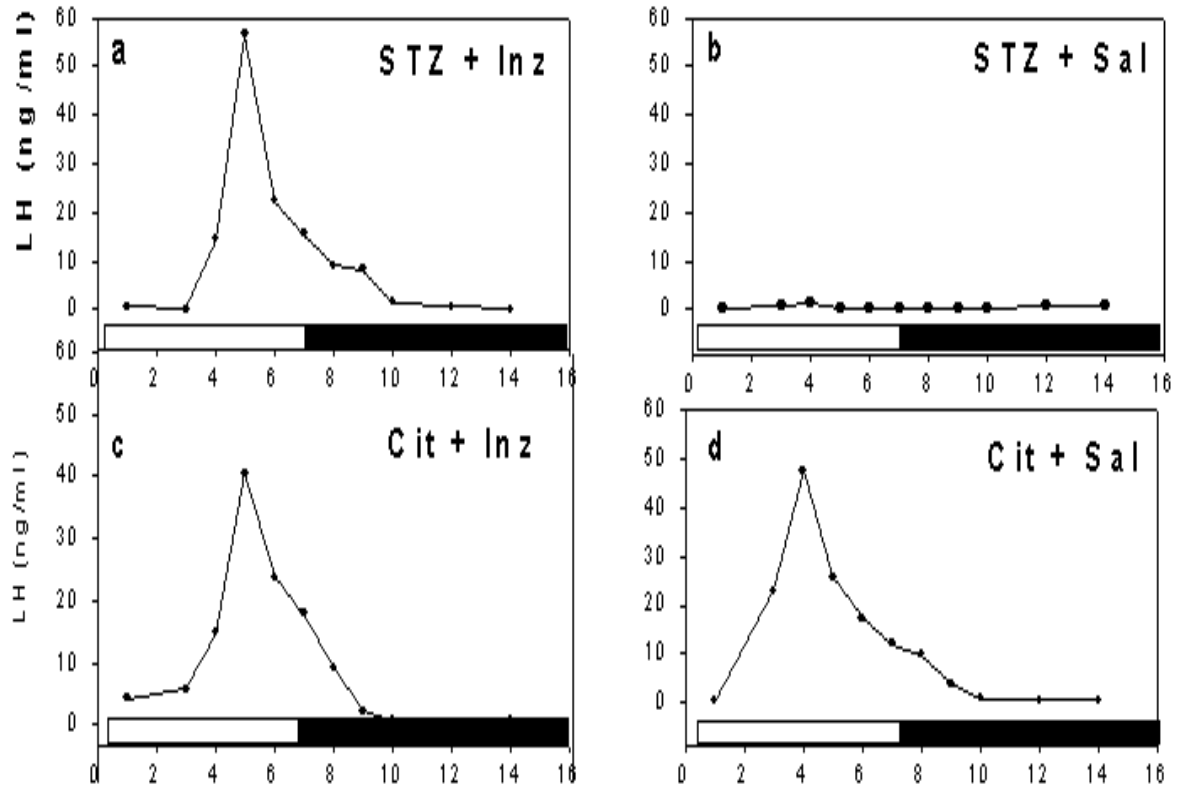
	Alap vércukor értékek (mg/dl +/- SEM) ^a	Átlag vércukor értékek a vérkollekció napján (mg/dl +/- SEM) ^b	Átlag AUC LH (ng/ml plazma 13 óra +/- SEM alatt) ^c
STZ + INS (N=6)	82.6 +/- 16.62	360.5 +/- 28.2	74.3 +/- 18.8
STZ + SAL (N=5)	73.6 +/- 4.9	383.2 +/- 30.9	3.3 +/- 0.8
CIT + INS (N=5)	95.2 +/- 12.2	109.2 +/- 21.2	48.6 +/- 25.0
CIT + SAL (N=6)	82.6 +/- 9.6	136.6 +/- 13.6	54.1 +/- 17.8

II. Táblázat. Vércukor szint és LH görbe alatti terület (AUC) a négy kísérletes csoportban a szexuális receptivitás vizsgálata során

a. Az alapértékek nem különböznek

b. A vér mintavételek napján a vércukor érték az STZ + INZ és STZ + SAL csoportokban > CIT + INZ és CIT + SAL csoportokban ($p < 0.05$), vércukor értékek a STZ + INZ és STZ + SAL csoportokban nem különböznek és CIT + INZ és CIT + SAL is hasonlóak voltak

c. A log transzformált LH AUC értékek. Az STZ + SAL csoportban az érték szignifikánsan alacsonyabb mint a másik három csoportban: $p = 0.015$



4. Ábra. LH termelődés a négy különböző csoportban egy-egy reprezentatív állat értékei alapján. Az X tengelyen az időt jelöltük órákban. Az Y tengelyen az LH értékeket ng/ml-ben. A fekete és fehér horizontális oszlopok a nappali és sötét periódust mutatják. Az STZ + SAL csoportban egyik kísérleti állatnál sem volt LH csúcs megfigyelhető.

Az STZ + SAL csoportban egyik állatban sem volt LH emelkedés megfigyelhető (4. ábra b), az összes mért érték 2.5 ng/ml alatt maradt. A többi 17 állatból 13-nál LH csúcs kimutatható volt (4. ábra a,c,d). Az LH csúcserték többnyire a világos periódus utolsó két órájában volt megfigyelhető. Az LH AUC szignifikánsan magasabb volt a STZ + INZ, CIT + INZ és CIT + SAL csoportokban összehasonlítva a STZ + SAL csoporttal (II. táblázat).

3. ICV inzulin hatása a GnRH neuronok aktivitására

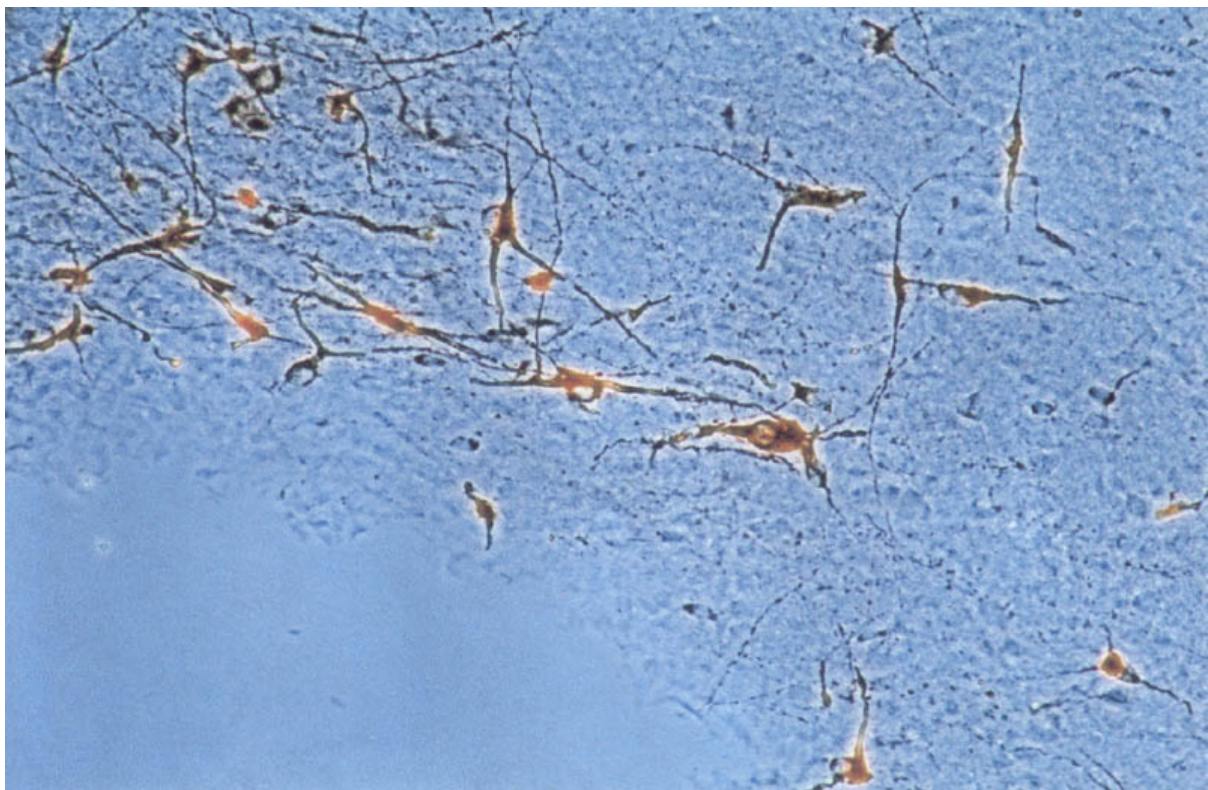
Ebben a kísérletben is négy csoport volt (STZ + INZ, STZ + SAL, CIT + INZ, CIT + SAL). Hasonlóan a fenti kísérletekhez STZ minden állatban diabéteszt eredményezett, és a centrálisan adott inzulin nem okozott lényeges változást a vércukor értékekben. A csak GnRH-val festődő neuronok száma hasonló volt a négy kísérletes csoportban mindhárom vizsgált régióban (DbB, OVLT, POA) (III. táblázat, 5. ábra). A c-Fos + GnRH-val kettősen festődő neuronok száma is hasonló volt a négy csoportban az elemzett régiókban (IV. táblázat, 6. ábra). Az OVLT régióban az aktív, kettősen festődő neuronok aránya az összes GnRH neuronhoz képest is hasonló volt a négy kísérletes csoportban (STZ + INZ: 64%, STZ + SAL: 59%, CIT + INZ: 75%, CIT + SAL: 72%, $p=NS$).

	Broca	POA	OVLT
STZ + INZ (n=6)	9.8+/-2.0	8.3+/-1.6	12.1+/-3.1
STZ+ SAL (n=4)	9.0+/-2.5	4.5+/-2.0	11.0+/-3.8
CIT + INZ (n=6)	11.0+/-2.0	6.3+/-1.6	8.2+/-3.1
CIT+ SAL (n=6)	10.7+/-2.0	6.1+/-1.6	7.8+/-3.1

III. Táblázat. A csak GnRH-val festődő neuronok metszetenkénti átlag száma három különböző anterior hypothalamusbeli régióban (diagonal band of Broca (Broca), anterior preoptic area (POA) és organum vasculosum laminae terminalis (OVLT)). A különbségek nem szignifikánsak [$p=NS$]

	Broca	POA	OVLTL
STZ + INZ (n=6)	1.3+/-0.7	7.9+/-1.8	21.2+/-3.4
STZ + SAL (n=4)	0.7+/-0.9	8.6+/-2.2	16.0+/-4.2
CIT + INZ (n=6)	2.2+/-0.7	11.2+/-1.8	24.9+/-3.4
CIT + SAL (n=6)	2.1+/-0.7	8.2+/-1.8	20.8+/-3.7

IV. Táblázat. A kettősen festődő (GnRH és c-Fos) neuronok metszetenkénti átlag száma három különböző anterior hypothalamusbeli régióban (diagonal band of Broca (Broca), anterior preoptic area (POA) és organum vasculosum laminae terminalis (OVLTL). A különbségek nem szignifikánsak [p=NS]



5. Ábra. Inaktív GnRH neuron az anterior hypothalamusban. A sejtmagban nem mutatható ki c-Fos pozitivitás (sötét festődés hiánya). A cytoplazmában diffúz GnRH immunopozitivitás látható.



6. Ábra. Aktív GnRH neuron az anterior hypothalamusban. A sejtmag sötéten festődik c-Fossal, míg a cytoplazma GnRH pozitivitást mutat.

4. ICV inzulin hatása az ER-ra

A korábbi kísérletekhez hasonlóan négy kísérletes csoport volt (STZ + INZ {n=6}, STZ + SAL {n=6}, CIT + INZ {n=6}, CIT + SAL {n=5}). A vércukor szintek is hasonlóan alakultak a korábbi kísérletekhez. Hasonló számú metszetet vizsgáltunk meg a négy csoportban. Az immunfestés intenzitása a PVN régióban magasabb volt mint az OVLT-ben. A PVN régióban magasabb volt azon neuronok aránya, ahol a sejtmag festődött és nem a cytoplazma (7., 8. ábra). Az OVLT kevés ER pozitív neuront tartalmazott, és csak a sejtmagban, vagy csak a cytoplazmában festődő neuronok aránya hasonló volt. ICV inzulin mellett az ER pozitív neuronok száma nőtt a PVN régióban, de csak a diabéteszes állatok között. Ugyanebben a régióban csak a cytoplazmában festődő neuronok aránya is magasabb volt, de ez a különbség nem ért el szignifikáns szintet. A cukorbeteg, ICV inzulin kezelt

állatok esetében az ER pozitív neuronok száma hasonló volt a két kontroll csoportéhoz (V. táblázat). A PVN-hez képest az OVLT-ben az ER pozitív neuronok száma alacsonyabb volt és nem volt különbség a négy csoport között (VI. táblázat).

	PVN csak sejtmag festődik (átlag +/- SEM)	PVN csak cytoplasma festődik (átlag +/- SEM)	PVN együtt (átlag +/- SEM)
STZ + INZ (n=6)	82.9 +/- 8.4 ^a	24.7 +/- 3.7 ^b	107.6 +/- 10.5
STZ + SAL (n=6)	47.8 +/- 3.9 ^{a,c}	14.1 +/- 1.2 ^{b,c}	61.9 +/- 4.6 ^c
CIT + INZ (n=6)	51.7 +/- 3.3 ^c	19.8 +/- 2.1 ^c	71.5 +/- 4.6 ^c
CIT + SAL (n=5)	51.4 +/- 8.2 ^c	14.0 +/- 3.2 ^c	65.5 +/- 10.2 ^c

V. Táblázat. Az ER immunhisztokémia eredménye a PVN régióban

- a. Inzulin növeli a sejtmagban festődő neuronok számát a cukorbeteg állatok között ($p < 0.05$)
- b. A csak a cytoplazmában festődő neuronok számára nem volt szignifikáns hatása az inzulinnak a cukorbeteg állatok között ($p = \text{NS}$)
- c. A két kontroll csoport között nem volt különbség, és a STZ + SAL csoport is hasonló volt ($p = \text{NS}$)

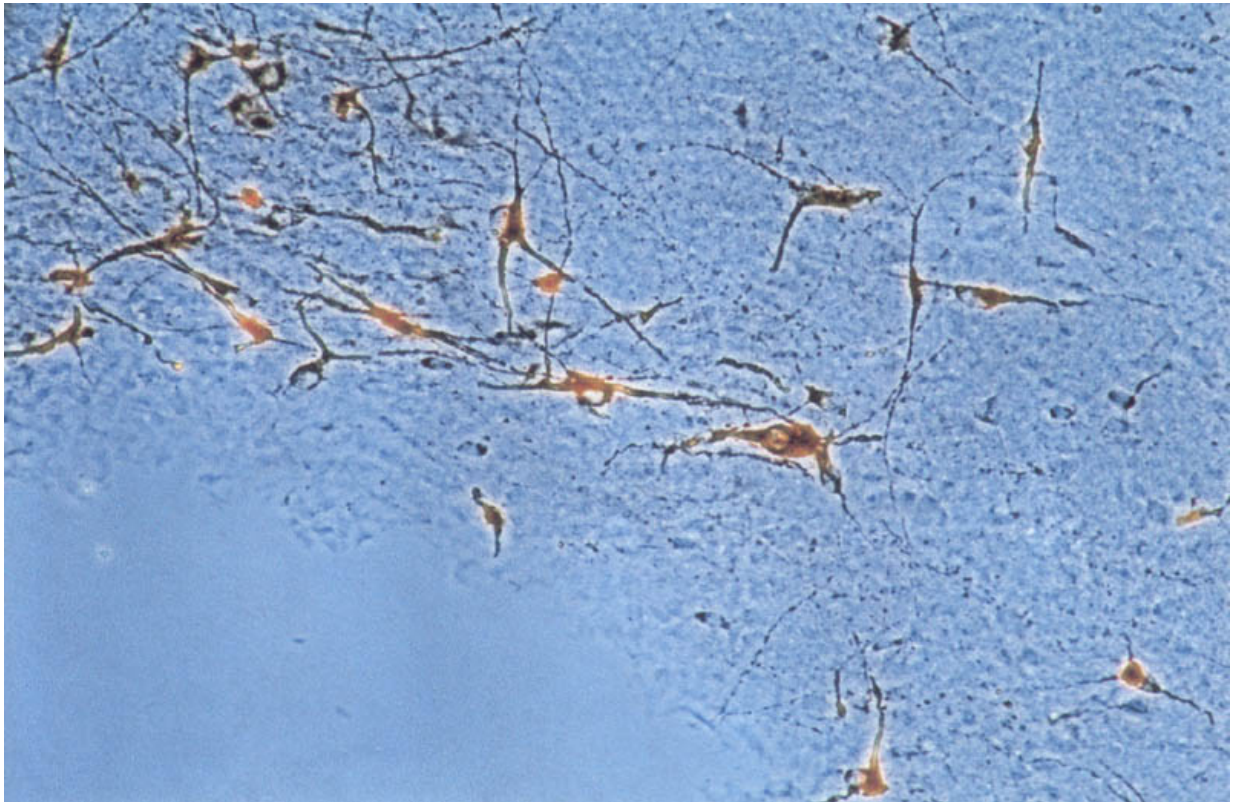
	OVLT csak nukleáris festődés (átlag +/- SEM)	OVLT csak cytoplazmában festődő neuronok (átlag +/- SEM)	OVLT összes festdősejt (átlag +/- SEM)
STZ + INZ (n=6)	3.5 +/- 2.0	3.4 +/- 1.4	6.9 +/- 3.4
STZ + SAL (n=6)	2.2 +/- 1.1	2.2 +/- 0.8	4.4 +/- 1.8
CIT + INZ (n=6)	1.8 +/- 0.65	1.8 +/- 0.5	3.6 +/- 1.1
CIT + SAL (n=5)	0.6 +/- 0.1	1.0 +/- 0.0	1.6 +/- 0.1

VI. Táblázat. Az ER immunhisztokémia eredménye az OVLT régióban

A csoportok között nem volt lényeges különbség



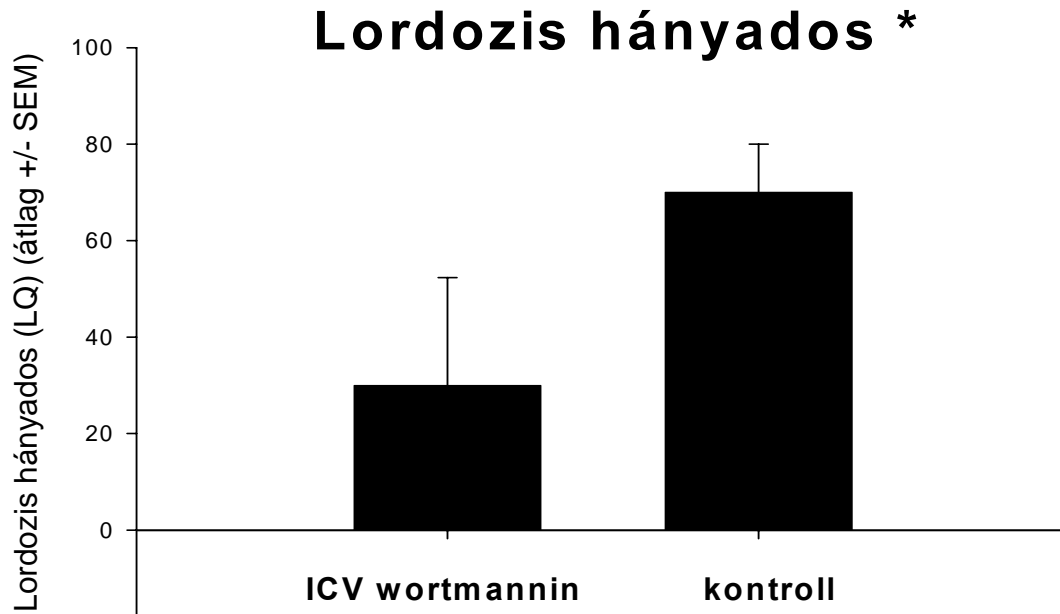
7. Ábra. Csak sejtmagban festődő ER immunoreaktív neuron a PVN régióban.



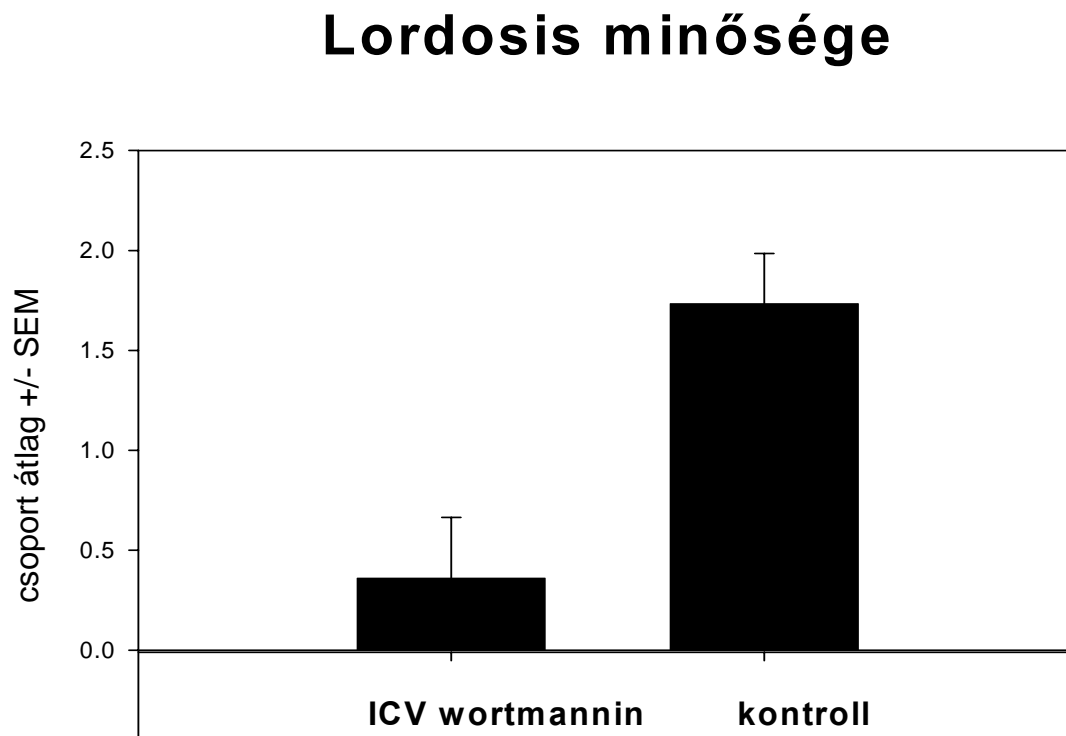
8. Ábra. Csak cytoplazmában festődő ER immunoreaktív neuron a PVN régióban.

5. ICV wortmannin hatása a szexuális receptivitásra

Ebben a kísérletben két állat csoport volt (wortmannin {n=5}, kontroll {n=3}). ICV wortmannin szignifikánsan csökkent lordózis hányadoshoz vezetett (wortmannin: 30 +/- 10.0 SEM, kontroll: 70 +/- 5.7 SEM, p=0.01; 9. ábra). ICV wortmannin kezelés mellett a lordózis minősége is kifejezetten rosszabb volt (wortmannin: 0.36 +/- 0.13 SEM, kontroll: 1.7 +/- 0.14 SEM, p=0.001; 10. ábra).



9. Ábra. A szexuális receptivitást felmérő lordosis hányados alakulása a PI3K wortmanninnal történő blokkolását követően (wortmannin: 30 +/- 10.0 SEM, kontroll: 70 +/- 5,7 SEM; *p=0.01).



10. Ábra. A lordosis minőségének alakulása a PI3K wortmanninnal történő blokkolását követően (wortmannin: 0.36 +/- 0.13 SEM, kontroll: 1.7 +/- 0.14 SEM; *p=0.001)

Megbeszélés

Diabetesz az átlag népesség 5-6%-át érinti (1). Diabéteszes nők között a petefészek működésének zavara gyakrabban figyelhető meg. Mielőtt inzulin rendelkezésünkre állt a cukorbetegség kezelésére, a normális szexuális differenciálódás és menarché ritka volt a cukorbeteg lányoknál. Az inzulin bevezetése előtt a nők 90%-ában hypogonadizmus és meddőség volt tapasztalható. Azonban még megfelelő inzulin terápia mellett is késhet a menarche és a ciklusok a továbbiakban is rendszertelenek maradhatnak, vagy kimaradhatnak. Amennyiben a diabéteszt már 10 éves kor előtt diagnosztizálják az első menszesz átlagban egy évvel később jelentkezik. Primér amenorrhoea négyszer, szekunder amenorrhoea kétszer gyakrabban fordul elő inzulin dependens diabéteszben. Ezen felül oligoovuláció, anovuláció, meddőség és kora-terhesség alatti problémák egyaránt gyakrabban fordulnak elő, még megfelelő gyógyszeres kezelés mellett is (2). Humán adatok arra utalnak, hogy a GnRH termelés nem megfelelő diabéteszben. *South* és csoportja 8 inzulin hiányos cukorbeteg nőnél vizsgálta a GnRH pulzusok frekvenciáját és amplitúdóját. A diabéteszes csoportban csökkent pulzus frekvenciát figyeltek meg a kontroll csoporthoz képest. Exogén GnRH adására a hypophysis a diabéteszes pácienseknél magasabb gonadotropin termeléssel reagált mint a kontroll csoportban (3). *La Marca* és kollégái hasonló választ figyeltek meg diabéteszes nőknél exogén GnRH-ra mint az egészséges kontroll csoportban (17). Más csoportok a különböző stimuláló és gátló hatású neurotranszmitterek szintjének változásában keresték a választ a megfigyelt reprodukciós rendellenességekre (2).

A páciensek egy további, speciális csoportjában is megfigyelhető a nem megfelelő inzulin működés reprodukcióra gyakorolt negatív hatása. Polycystás ovárium szindrómát (PCOS) menstruációs rendellenesség és hyperandrogenizmus jellemzi. A kórkép pontos etiológiája nem ismert, de egyre több adat utal arra, hogy a probléma hátterében inzulin rezisztencia (IR)

áll (18). Az inzulin rezisztencia mértéke nem azonos a különböző szervekben, így míg egyes szervek nem reagálnak inzulinra megfelelően, addig mások funkciója megtartott. Mivel az ovárium inzulin érzékenysége kevésbé érintett, itt az inzulinnak stimuláló hatása van és fokozza a petefészek androgén termelését. Az emelkedett lokális androgén szint viszont nem kedvez a folliculogenezisnek, a kis és közepméretű tüszők atréziájához vezet. Megfelelő tüszőérés hiánya rendszertelen ciklusokat és meddőséget okoz.

A mediobazális hypothalamusban található GnRH neuronok pulzálva termelnek GnRH-t, mely a hypophysis nyélben futó spirális artériákon keresztül éri el a hypophysis elülső lebenyét. Hatására onnan FSH és LH szabadul fel, ezek a keringésbe jutva érik el a petefészeket. Ezen gonadotropinok és egyéb lokális faktorok felelősek a folliculogenesis beindításáért és fentartásáért. Ha ennek a tengelynek bármely része nem megfelelően működik az a peteérés, ill. az ovárium hormon termelő funkciójának a zavarához vezethet, és változatos tüneteket okozhat.

Több állatmodell áll rendelkezésünkre a diabétesz és inzulin reprodukcióra gyakorolt hatásának vizsgálatára. A patkányok ciklusa öt napos. Ovuláció a két napos „follikuláris” fázist (proestrus) követően a nappali periodus utolsó óráiban következik be. Ha a nőstény patkány ováriumait eltávolítjuk, exogén ösztrogén és progeszteron kezeléssel a spontán ciklushoz hasonló hormonális változások idézhetők elő. Progeszteron az LH csúcsot kifejezettebbé teszi, ill. ha a megfelelő fázisban adjuk akkor előrébb is hozza (5, 6). **Brown-Grant** és kollégái gonadektomizált, nőstény patkányokban vizsgálták a ciklusközepi LH csúcs jelenlétét. Kísérleteik során azt találták, hogy ösztrogén adása önmagában is elegendő LH csúcs kiváltásához. Ha proestrus során (késői follikuláris fázis) progeszteron injekciót is kaptak az állatok az LH csúcs lényegesen kifejezettebbé vált. Az LH csúcs a nappali periodus utolsó óráiban volt megfigyelhető (6). **Mann** és kollégái, hasonlóan az előző kísérlethez,

ösztrogén kezelt patkányoknál progeszteron injekciót követően négy órával már emelkedett LH szintet találtak (5).

Kísérleteinkben hasonló modellt alkalmazva, felnőtt nőstény patkányokon vizsgáltuk a diabétesz és inzulin hatását. Kísérleteink során, a beavatkozás előtt 48 és 24 órával szubkután adtunk ösztrogént, majd a nappali (világos) periódus vége előtt hat órával kaptak az állatok progeszteront. Ilyen körülmények között az LH csúcs 4-6 órával a progeszteron injekció után várható. Diabéteszt lehet indukálni kísérletes körülmények között STZ-vel, mely elpusztítja a hasnyálmirigy inzulin termelő béta sejtjeit. STZ intraperitoneális adását követően 24-48 órán belül hyperglükémia jelentkezik.

Kísérletes diabétesz során számtalan szervrendszer elégtelensége megfigyelhető. A diabéteszt kísérő anyagcserezavar egyik jele a szignifikáns súlyvesztés. Ez önmagában is felelős lehetne a ciklus zavaraiért. Kezeletlen diabétesz során csökken a szexuális érdeklődés, csökkent LH termelődés, ritkább vagy hiányzik az ovuláció és terhesség esetén kevesebb utód figyelhető meg (7, 8, 9, 10, 11).

A szexuális érdeklődést a nőstény állat jellegzetes testtartásbeli változásán keresztül lehet vizsgálni (16). Intakt, szexuálisan receptív nőstény állat a hím közeledésére gerinci lordózissal reagál. Ennek jelenléte, ill. a lordózis foka változhat diabétesz kapcsán (7, 8, 9, 10).

Kísérletes diabétesz során a hypophysis GnRH iránti érzékenysége megtartott, exogén GnRH-ra megfelelő gonadotropin termelődéssel reagál (8, 13, 14, 15). A testsúly csökkenése sem magyarázza a reprodukív deficitet. *Katayama* és kollégái az LH termelődést vizsgálták csökkent kalória bevitel mellett. A csökkent kalória bevitel ellenére az LH pulzusok frekvenciája és időbeli lefolyása a kontroll csoportéhoz hasonló volt. Ugyanebben a kísérletben, STZ-vel előidézett diabétesz mellett, mely hasonló mértékű testsúly csökkenést eredményezett, mint a kevesebb kalória bevitel, ritkább és kisebb amplitúdójú LH termelődést

figyeltek meg. (11). *Karkanias* és csoportja, hasonlóan az előző kísérlethez kalória bevitel korlátozással nem figyelt meg lényeges szexuális receptivitásbeli különbséget a kontroll csoporthoz képest (12).

Amennyiben cukorbeteg állatokat inzulinnal kezelünk mind a csökkent szexuális érdeklődés, mind az LH termelés normálizálódik és a kontroll szintre hozható (11, 12, 13). *Karkanias* és kollégái azt vizsgálták, hogy a kísérletes diabétesz során megfigyelhető reprodukciós deficit háttérében hypoinzulinémia vagy hyperglykaemia áll-e. STZ-vel kezelt patkányok egy részénél phlorizin hozzáadásával a vércukorszint a normálisra csökkent inzulin adagolása nélkül. Ilyen körülmények között azonban a szexuális receptivitás nem normalizálódott. Amikor azonban a normoglykaemiát inzulinnal érték el az állatok szexuális érdeklődése a kontroll állatokéval volt megegyező. Diabétesz során azonban nem a hyperglykaemia az egyetlen anyagcsere eltérés, és inzulin kezelés mellett a többi rendellenesség is normalizálódik. Annak vizsgálatára, hogy mi az inzulin pontos szerepe a reprodukciós eltérésekben egy olyan kísérletes patkány modellt állítottunk be, melyben az inzulint nem perifériásan, hanem közvetlenül a GnRH neuronok környezetébe, a harmadik agykamrába juttattuk. Az ICV katétert sztereotaxikus műtét során, a patkány agy anatómiai atlaszából nyert koordináták segítségével ültettük be. A katéter egy ozmotikus szubkután pumpához volt csatlakoztatva, melyből hígított inzulin, ill. kontroll állatok esetében fiziológias sóoldat áramlott.

Kísérleteink során intraperitoneális STZ minden állatban diabéteszt eredményezett. Vércukor szintet a farkból vett vérből határoztunk meg és minden esetben 200 mg/dl feletti értéket kaptunk. A hyperglykaemia a kísérletek egész tartama alatt megmaradt. Centrálisan, az ICV katéteren át adott inzulinnak nem volt szignifikáns perifériás hatása, a vércukor értékek a cukorbeteg inzulinnal, ill. sóoldattal kezelt állatokban hasonlóak voltak. Centrálisan

adott inzulinnak a kontroll állatok esetében sem volt jelentős hatása, hypoglikaemia nem volt megfigyelhető.

Első kísérletünkben a szexuális receptivitás hiányát, ill. ha jelen volt akkor nagyfokú minőségbeli (lordózis foka) csökkenését figyeltük meg. Centrálisan adott inzulin mellett azonban hasonló deficitet nem tapasztaltunk, mind a lordózis jelenléte, mind annak minősége a kontroll csoportokéhoz volt hasonló. A két kontroll csoport (inzulin kezelt, ill. sóoldat kezelt) között nem volt lényeges különbség. Ezen eredmények arra utalnak, hogy a hypothalamus-hypophysis intakt működéséhez inzulinra elsősorban centrálisan és nem a periférián van szükség.

Második kísérletünkben a hypophysis LH termelését vizsgáltuk. Gonadektomizált nőstény állatokban ösztrogén és progeszteron adásával az LH csúcs kiváltható. *Katayama* és társai kísérleteik során az LH termelődést vizsgálták cukorbeteg, kalória megvont és kontroll patkányoknál. STZ-vel indukált diabétesz hatására csökkent ovulációs rátát és csökkent LH pulzus frekvenciát figyeltek meg. Perifériás inzulin adagolás mellett mind az ovuláció gyakorisága, mind az LH pulzusok a kontroll állatokéhoz hasonló szintre álltak vissza. A csökkent kalória bevitelű csoportban hasonló mértékű fogyást tapasztaltak mint a cukorbeteg állatoknál. Ennek ellenére az ovuláció gyakorisága és az LH termelődés nem tért el a kontroll csoportnál megfigyelttől (11). Hasonló deficit figyelhető meg diabéteszes hím patkányoknál is. Mind az LH pulzusok frekvenciája, mind amplitudója csökkent. A nőstényhez hasonlóan a szubkután adagolt inzulin korrigálja a deficitet (13). Ezek, és még számos más kísérlet bizonyította, hogy a diabéteszhez társuló reproduktív deficitet szubkután adagolt inzulinnal korrigálni lehet. Miután az ilyen módon adott inzulin egyéb anyagcsere eltéréseket is korrigál, nem bizonyítható az inzulin közvetlen szerepe. A mi kísérletünk arra keresett választ, hogy az STZ-vel indukált diabétesz hogyan befolyásolja az LH csúcsot, ill. hogy centrálisan adott inzulin befolyásolja-e az LH csúcs jellegét. A kísérlet során a fent leírt módon inzulint

adagoltunk ICV katéteren keresztül. Kísérletünk során azt tapasztaltuk, hogy a diabéteszes, fiziológias sóoldattal kezelt állatok egyikénél sem volt LH csúcs jelen ösztrogén és progeszteron kezelést követően. Mivel a vérmintákat 12 órán át gyűjtöttük, és a várt LH csúcs ennek a periodusnak a közepére esett volna az sem valószínű, hogy diabétesz hatására az LH csúcs időben eltolódott volna. A másik három csoportban az állatok nagyobb részénél az LH csúcs egyértelműen igazolható volt. Ezekben az esetekben az LH csúcs a várakozásoknak megfelelően a nappali periodus végére esett. Az LH csúcs jelenléte, ill. az LH termelődés mértéke ezekben a csoportokban hasonló volt. Ez a kísérlet is azt igazolja, hogy az inzulinnak a hypothalamus-hypophysis működésére gyakorolt hatása elsősorban centrális és nem perifériás szignálok megváltoztatásán alapul. A diabéteszes, centrálisan inzulinnal kezelt patkányokban a vércukor szint az egész kísérlet során emelkedett volt és a sóoldattal kezelt állatokétól nem volt szignifikánsan eltérő. Az inzulinnak hasonló hatását írták le más állatmodellekben is. **Tanaka** és csoportja kísérletesen előidézték diabéteszt követően vizsgálta az inzulin szerepét gonadektomizált bányókban. Centrálisan, ICV katéteren keresztül adott inzulinnal lényegesen nagyobb LH pulzus frekvenciát figyeltek meg mint a fiziológias sóoldattal kezelt kontroll állatok között (19). Az inzulinnak a központi idegrendszeri szerepét igazolja az az egér modell, melyben az inzulin receptorokat csak a központi idegrendszerben pusztítják el („central nervous system insulin receptor knock-out” NIRKO). Ezekben az állatokban is lényegesen csökken az LH szint a keringésben, és ennek következtében csökken fertilitásuk is (20). Mindezek az eredmények az inzulinnak fontos szerepet tulajdonítanak a központi idegrendszerben az LH termelődésének szabályozásában.

A továbbiakban arra kerestünk választ, hogy mi lehet a pontos mechanizmusa a diabétesznek és inzulinnak a reprodukciós mechanizmusokra. Miután több korábbi kísérlet megtartott, ép hypophysis működést írt le kísérletesen kiváltott diabétesz mellett, mi elsősorban a hypothalamusban található GnRH neuronok működését vizsgáltuk. Az LH csúcs

kiváltásában szerepet játszó GnRH neuronok a mediobazális hypothalamusban találhatóak. Az általuk kibocsátott GnRH a hypophysis nyélben futó spirális artériákon keresztül jut el a hypophysis elülső lebenyében levő gonadotrop sejtekhez. A harmadik kísérletünk során megfigyelhettük a mediobazális hypothalamusban található GnRH neuronok számát, ill. aktivitásbeli különbségüket kísérletes cukorbetegség és centrális inzulin kezelés mellett. A c-Fos egy a sejtaktiváció korai fázisában megjelenő antigén. *Hoffman* és kollegái kimutatták, hogy c-Fos ösztrogén és progeszteron adását követően, a várható LH csúcs idején a GnRH neuronokban megjelenik és 6-8 órán át kimutatható (21). *Lee* és csoportja szintén kimutatta c-Fos jelenlétét a GnRH neuronokban a LH csúcs idején (22). Mindkét csoport úgy találta, hogy c-Fos jól felhasználható a GnRH neuronok aktiválódásának követésére. Harmadik kísérletünkben gonadektomizált, ösztrogénnel és progeszteronnal kezelt cukorbeteg, ill. kontrol patkányokban a várt LH csúcs idejében kettős immunhisztokémiai vizsgálattal a mediobazális GnRH neuronok aktivitását vizsgáltuk. Elsősorban az OVLT és a közvetlen környezetébe tartozó régiókat vizsgáltuk, mert ez a régió játszik szerepet a LH csúcs kiváltásában. A legintenzívebb festődést és a legtöbb GnRH neuront az OVLT régióban találtuk. Bár úgy tűnt, hogy inzulin emelte a kettősen festődő GnRH neuronok számát, ez a különbség nem volt szignifikáns. Hozzánk hasonlóan más csoportok sem találtak lényeges változást az anterior hypothalamus GnRH tartalmában kísérletesen előidézett diabéteszt követően (15, 23). Mindezen eredményeket együttevve, úgy tűnik, hogy a diabétesz nem befolyásolja a GnRH termelődését, sőt az aktiv GnRH neuronok számát sem befolyásolja. Az viszont elképzelhető, hogy inzulin hiányában a sejtek nem képesek GnRH-t megfelelő mennyiségben szekretálni. Ezt az elképzelést támogatná *Arias* és kollegái megfigyelése, melynek során inzulin hatását vizsgálták a GnRH szekrécijára GnRH sejtenyészetben. Kísérletük során immortalizált, GTI-7 GnRH neuron sejtenyészetben azt találták, hogy inzulin

dózisfüggően emelte a GnRH szekréciónak (24). Inzulin hiányában, kísérletes diabétesz során ezen szekréciónak mechanizmusok működhetnek hiányosan.

A GnRH neuronok működését számtalan neurotranszmitter és különböző szteroid hormonok szabályozzák. Diabétesz során több GnRH termelődést stimuláló, vagy gátló neurotranszmitter rendellenes termelődését is leírták (8, 9, 25). Inzulin közvetlenül szerepet játszhat ezen neurotranszmitterek termelődésének szabályozásában. Ösztrogén is befolyásolja a GnRH neuronok aktivitását direkt, vagy indirekt mechanizmusokon át (26, 27, 28, 29). A sejtmagbéli ösztrogén kötő kapacitás csökkenését kísérletes diabétesz során többen leírták (30, 31). Ösztrogén a hatását intracelluláris ER α vagy ER β receptorokon keresztül fejti ki. Ezek a receptorok különböző szervekben és több központi idegrendszeri magban is megtalálhatók (26). A receptorok szerepe jól tanulmányozható a receptor knock-out állat modellekben. Az ER α knock-out egér fenotípusára többek között meddőség is jellemző. Az ER β knock-out egérre is csökkent fertilitás jellemző melynek hátterében valószínűleg ovárium működésbeli zavar áll (32, 33). Ezek az eredmények arra utalnak, hogy az ösztrogén feed-back működési zavara egy további lehetséges magyarázatául szolgálhat a diabétesz kapcsán megfigyelt reprodukív deficitnek. Amikor a táplálék fogytán van, az állatok a legfontosabb funkciókra limitálják aktivitásukat a növekedés és a reprodukció rovására (34). Táplálék hiányában az LH pulzus frekvencia és a szexuális receptivitás csökkent. **Dudley** és csoportja csökkent szexuális receptivitást figyelt meg diabéteszes patkányok között. Magas zsírtartalmú diéta mellett a szexuális érdeklődés fokozódott, de nem érte el a kontroll szintet. A cukorbeteg állatoknál csökkent nukleáris ösztrogén felvételt figyelt meg (35). **Ahdiéh** és kollégái hasonlóan csökkent szexuális érdeklődést figyelt meg kísérletes diabéteszben. Magas zsírtartalmú diéta mellett az érdeklődés a kontroll szintjére emelkedett. Inzulinpótlás mellett emelkedett a cytoplazmatikus ösztrogén receptor szint (36). **Siegal** és kollégái szintén azt mutatták ki, hogy inzulin megvonása a csökkent szexuális receptivitáson túl, csökkent

nukleáris ER szintet eredményezett a hypothalamusban (30). Ezek a kísérletek arra utalnak, hogy a szükséges energia alternatív módon történő pótlása (glükóz helyett lipid) önmagában csak részben korrigálja a reprodukciós hiányt. A megfelelő inzulin működés és ezen keresztül a vércukor felhasználásának fontosságát hangsúlyozzák a 2-deoxyglükózzal (2-DG), a glükóz felhasználás kompetitív inhibitorával végzett kísérletek. **Nagatani** és kollegái, 2-DG-vel kezelt ovariektomizált patkányoknál csökkent szexuális receptivitást és csökkent LH termelődést találtak (37). **Berriman** és kollégái csökkent GnRH neuron aktivitást találtak 2-DG kezelést követően hörcsögökben (38). Ezek a kísérletek arra utalnak, hogy a csökkent kalória bevitel, vagy diabétesz hasonló reprodukciós hiányt eredményez. Ennek pontos patomechanizmusa nem ismert, de az ER számbeli, lokalizációbeli (nukleáris, cytoplazmatikus), vagy funkcionális eltérése mint lehetséges magyarázat szóba jöhet.

További kísérletünkben arra kerestünk választ, hogy az STZ-vel kiváltott diabétesz és a centrális inzulin kezelés hogyan befolyásolja az ösztrogén receptorok számát a mediobazális hypothalamus OVLT és környező régióiban. Ezeket a régiókat azért választottuk, mert itt található legnagyobb számban a GnRH neuronok, és ezen régiók szerepe a legfontosabb a LH termelés szabályozásában (26). GnRH neuronokban eddig csak ER β jelenlétét igazolták. E receptorok aktivitásbeli változása befolyásolhatja a GnRH neuronok működését. Számos olyan régióból érkeznek azonban axonnyúlványok az OVLT környezetébe, melyek mindkét receptor altípust nagy számban tartalmazzák. E régiókban az ER változása indirekt módon befolyásolhatja a GnRH neuronok működését. Kísérletünk során nem vizsgáltuk a két receptor típust külön-külön, mivel receptor specifikus hatásokat egyelőre nem írtak le. A két vizsgált hypothalamus régió közül (PVN és OVLT) az immunfestés intenzitása és a festődő neuronok száma a PVN-ben lényegesen magasabb volt. Ebben a régióban arányában több neuron festődött a sejtmagban. Egyes elképzelések szerint a sejtmagban és a cytoplazmában lokalizálódó festődés hátterében a különböző receptor típusok állnak. Mivel a kívánt hatás

eléréséhez a cytoplazmából a receptoroknak a sejtmagba kell áthelyeződniük a különböző lokalizáció hátterében egy esetleges funkciózavar állhat. A mi kísérletünkben a cukorbeteg, inzulinnal kezelt állatoknál a PVN-ben emelkedett ER immunreaktivitást találtunk. A cukorbeteg fiziológiás sóoldattal kezelt kontroll állatoknál azonban nem volt ER immunreaktivitásbeli csökkenés. Inzulinnak nem volt szignifikáns hatása a két nem cukorbeteg kontroll csoportban sem. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy diabétesz nem befolyásolja a vizsgált régiókban a nem specifikus ER immunreaktivitást. Kísérletes diabétesz során egymásnak ellentmondó ER immunhisztokémiai eredményeket publikáltak. A változatos eredmények hátterében a kísérletes elrendezés különbsége (centrális vagy perifériás inzulin bevitel), kezelésbeli különbségek (szteroid kezelt, nem kezelt állatok) állhatnak. A mi eredményeink alapján kijelenthetjük, hogy STZ-vel indukált kísérletes diabétesz során nem volt ER immunreaktivitásbeli különbség a centrálisan inzulinnal kezelt és kontroll patkányok között. A jelen eredmények biológiai jelentősége kérdéses. Elképzelhető, hogy más szintén az OVLT-t befolyásoló, általunk nem vizsgált neuronokban szignifikáns különbségek találhatóak, melyek megmagyaráznák az egymásnak néha ellentmondó eredményeket.

Az inzulin a sejtmembránban elhelyezkedő receptoraihoz kötődik. A ligand-receptor interakció következő lépéseként a receptor intracelluláris része autofoszforylálódik és inzulin receptor szubsztrátok mediálják a további intracelluláris folyamatokat. Az inzulin a hatását több intracelluláris mechanizmuson keresztül éri el. Ezen pályák egyike a foszfatidil-inositol-3-kináz (PI3K) szekundér messenger rendszer. A PI3K pálya mind a periférián, mind a hypothalamusban részt vesz az inzulin hatás elérésében (39, 40). Wortmannin egy gombák által termelt kémiai anyag, mely a PI3K irreverzibilis és kompetitív inhibitora (41). Wortmannin könnyen átjut sejtmembránokon. Miután a PI3K-nak a hypothalamusban fontos szerepe van az inzulin hatásának elérésében, és ezt a hatásmechanizmust wortmanninnal gátolni lehet, utolsó kísérletünkben wortmannint adtunk ICV. Mivel korábbi kísérleteink

fontos szerepet tulajdonítottak az inzulinnak a reprodukció központi idegrendszeri szabályozásában, ezzel a kísérlettel további bizonyítékot kerestünk e szerep igazolásához. A kísérlet során wortmanninal kezelt nőstény patkánynál ritkábban figyeltünk meg megfelelő szexuális érdeklődést a hím közeledésére. Ha a szexuális érdeklődés során megfigyelt háti lordózis jelen volt, az kevésbé volt kifejezett a wortmannin csoportban. Wortmannin kezelés mellett csak a szexuális érdeklődés volt csökkent, egyéb szteroid hormonfüggő viselkedésben változást nem figyeltünk meg. A szexuális receptivitást a hypothalamusban elhelyezkedő GnRH neuronok szabályozzák. Korábbi kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy inzulin hiányában mind a szexuális receptivitás, mind az LH termelés csökkent. Inzulin kezelés mellett a megfigyelt reprodukív deficit a kontroll állatokéhoz hasonló szintre hozható vissza. ICV inzulin adagolás azt bizonyítja, hogy az inzulinnak közvetlenül a központi idegrendszerben van szerepe. Az utolsó kísérletünk tovább erősíti korábbi megfigyeléseinket a centrális inzulin hatásról. ICV wortmannin kezelés mellett, az inzulin hiányos állapothoz hasonlóan, hiányzó, ill. csökkent reprodukív működés volt tapasztalható. Miután wortmannin az inzulin hatásmechanizmusában szerepet játszó PI3K pályát blokkolja, kísérletünk azt igazolja, hogy az inzulinnak a PI3K mechanizmuson keresztül fontos szerepe van a szexuális receptivitás szabályozásában. A reprodukív folyamatok szabályozásában a szteroid (ösztrogén és progeszteron) hormonoknak fontos szerepe van. E hormonoknak és receptoraiknak a kísérletes diabétesz során megfigyelt eltéréseit, szemben a mi eredményeinkkel, többen leírták. Így nem zárhatjuk ki, hogy wortmannin az általunk megfigyelt hatását a szteroid receptorok megváltoztatásán keresztül érte el.

A fentiekben megbeszélt kísérleteink azt mutatják, hogy kísérletesen előidézett diabétesz során többféle reprodukív deficit figyelhető meg. A szexuális receptivitás nagymértékben csökkent, és csökkent LH termelés figyelhető meg. Inzulin hozzáadása után ezek az eltérések korrigálódnak és a kontroll állatokéhoz hasonló szintre változnak. Inzulinra

ehhez a központi idegrendszeren belül, a hypothalamus közvetlen környezetében van szükség. ICV inzulin adagolás mellett, melynek jelentős perifériás hatása nincs, mind a szexuális receptivitás, mind az LH termelés normál szintre emelkedik. ICV wortmannin, mely az inzulin hatásmechanizmusában szerepet játszó PI3K gátolja, a diabéteszhez hasonló csökkent receptivitást eredményezett, alátámasztva az inzulin szerepét. További kísérleteinkben a mediobazális hypothalamusban nem találtunk GnRH neuron aktivitásbeli különbséget a különböző kísérletes csoportok között. Szintén nem találtunk lényeges különbséget az ER-ok számában. További mechanizmusok, melyek megmagyarázhatják a megfigyelt reprodukciós deficitet, lehetnek az inzulinak a GnRH szekrécióra, vagy egyéb a GnRH neuronok hatását befolyásoló neurotranszmitterekre gyakorolt hatásai.

Nem megfelelő inzulin termelés, vagy nem megfelelő inzulin működés kóros hatása a humán reprodukcióban is megfigyelhető. I.-es típusú diabétesz esetén a hasnyálmirigy béta sejtjei ellen irányuló autoimmun folyamat következményeként csökken az inzulin termelés. Inzulin pótlás hiányában jellegzetes anyagcsere és reprodukciós zavarok lépnek fel. Amennyiben inzulin nem megfelelően fejti ki hatását inzulin rezisztencia lép fel, és II.-es típusú diabéteszről beszélünk.

PCOS a reprodukív korú nők 5-10 %-at érinti (18, 42). Először 1935-ben írták le, amikor az ovulációs zavart és a hyperandrogén jeleket a jellegzetes petefészek morfológiával hozták kapcsolatba (43). Azóta a diagnosztikus kritériumok többször változtak. Eleinte ultrahang kritériumok és a rendszertelen ciklusok játszották a fő szerepet a diagnózis felállításában (44). A jelenleg leginkább elfogadott diagnosztikus kritériumokat a National Institute of Child Health and Human Development (NICHD) állította fel. Ezek alapján a PCOS szindrómát a rendszertelen ciklusok és hyperandrogenizmus (laboratóriumi vagy klinikai) alapján lehet diagnosztizálni, ha más eredetét a hyperandrogenizmusnak ki lehet zárni (hyperprolactinemia, adrenális eredet, stb.). Az NICHD diagnosztikus kritériumok

között ultrahang leletek nem szerepelnek. Elsősorban azért, mert polycystás ovárium található a rendszeres ciklusú reprodukív korú nők 20%-ában (18). Ezen felül a hosszú- és rövidtávú szövődmények (hyperandrogenizmus, hypercholesterolemia, hypertriglyceridemia, hypertensio, diabétesz [syndrome X]) nem a polycystás ováriumokkal, hanem a hyperandrogenizmussal és a legtöbbször kimutatható inzulin rezisztenciával állnak kapcsolatban.

Több teória létezik, mely a PCOS eredetét próbálja magyarázni (45, 46, 47, 48). Jelenleg leginkább anyagcsere problémaként magyarázzák a szindrómát (48, 49). Mindsovány mind túlsúlyos páciensek között gyakran mutatható ki IR. Normoglycemia fenntartásához több inzulin termelődésére van szükség. Az inzulin viszont stimuláló hatású a petefészek androgén termelődésére a saját és az insulin-like growth factor (IGF) receptorokon keresztül. Az emelkedett ovarialis androgén szint a normális tüszőérést zavarja és ez anovulációhoz vezet. Az ovulációs ciklusok visszaállítását különböző gyógyszerekkel lehet elérni (clomiphen citrát (CC), gonadotropinok). Az utóbbi években egyre több adat utal arra, hogy inzulin szenzitizáló szerek is sikeresen visszaállítják a ciklusokat.

IR-át többféleképpen lehet diagnosztizálni. Legpontosabban a “hyperinsulinemic euglycemic clamp” speciális vizsgálattal lehet a diagnózist felállítani (inzulin és glükóz infúzió bekötése melletti több órás beavatkozás, mely a vércukor háztartást vizsgálja). Ez a klinikai gyakorlatban nem praktikus így több más, bár kevésbé pontos, módszer létezik mellyel az esetek zömében a diagnózis felállítható. Miután a legtöbb PCOS páciensnek IR-ja van (> 50%) és a tesztek nem diagnosztizálják az IR-t az összes esetben, kérdéses, hogy feltétlenül törekedni kell-e az IR diagnózisának felállítására az egyébként megfelelően diagnosztizált PCOS páciensek körében (50).

Több inzulin hatásfokozó szer sikeres használatát írták le a PCOS-ás pácienseket érintő problémák, elsősorban ovulációs zavar/ meddőség kezelésében (metformin,

rosiglitazone, pioglitazone, troglitazone, d-chiro-inositol, stb.) (42, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61). Az inzulin hatását fokozó különböző szerek közül a legtöbb tapasztalat metforminnal halmozódott fel. Metformin növeli a hepatikus gluconeogenezist, a vázizmok glükóz felvételét, ill. csökkenti a glükóz gastrointestinális felszívódását így csökkenti az IR-t.

Metformin használata mellett az esetek 70%-ban a rendszeres ciklusok visszaállnak és az esetek 50%-ban ez rendszeres ovulációt is jelent. Így sok esetben további stimuláció szükségtelessé válik. Abban az esetben, ha metformin mellett spontán ciklusok nem állnak vissza, a páciensek egy része, akik addig rezisztensek voltak CC-ra, újra stimulálhatóvá válik. Így elkerülhető a drágább gonadotropinok használata. Továbbá a kezelés is biztonságosabbá válik, mert kevesebb többesterhesség lesz és a hyperstimuláció veszélye is csökken (52, 53, 54).

Az egyelőre kérdéses, hogy meddig célszerű a metformin szedését folytatni. Eddigi adatok alapján szedése terhesség alatt biztonságos, nincs ismert teratogen hatása. Ráadásul kevesebb spontán vetélést írtak le használatával (62). Amennyiben az egész terhesség alatt folytatja valaki használatát a gesztációs diabétesz előfordulása valószínűleg ritkább (63).

Miután az egész kórkép pontos etiológiája egyelőre nem ismert, nem kizárható, hogy az inzulin rezisztencia a legfelsőbb, hypothalamusban levő reprodukciót befolyásoló központok működésére is hatással van. Ennek eredményeként léphet fel a nem megfelelő gonadotropin termelés és irreguláris petefészek működés.

Következtetések

Kísérleteink során az experimentális diabéteszes patkány modellben a reprodukciós folyamatok nagyfokú csökkenését figyeltük meg. Inzulinnal, melynek jelenléte elsősorban a központi idegrendszeren belül fontos, a deficit korrigálható volt. Az inzulin pontos szerepe egyelőre nem tisztázott. Elképzelhető, hogy a ritmusos GnRH szekréciójához fontos a

jelenléte. A különböző stimuláló és gátló hatású neurotranszmitterek regulációjára is hatással lehet az inzulin. Továbbá nem kizárt az sem, hogy az inzulin jelenléte vagy hiánya az ösztrogén receptorok valamelyikének az expressziójára van hatással és így a szteroid feedback megváltoztatásán keresztül játszik döntő szerepet.

Kutatásaink eredményeiből levonható következtetéseinket az alábbiakban foglalhatjuk össze:

1. STZ-vel előidézett kísérletes diabétesz során csökkent a nőstény állatok szexuális érdeklődése. ICV inzulin kezelés mellett a szexuális receptivitás a kontroll állatokéhoz hasonló szintre állt vissza.
2. STZ-vel előidézett kísérletes diabétesz során csökkent a nőstény állatok LH termelődése. ICV inzulin kezelés mellett az LH termelődés a kontroll állatokéhoz hasonló szintre állt vissza.
3. Az inzulin hiányában megfigyelt deficit háttérében nem találtunk GnRH neuron aktivitásbeli eltérést.
4. A kísérletes csoportokban nem találtunk a hypothalamusban ER immunoreaktivitásbeli különbséget, mely a reprodukciós eltérést magyarázhatná a szteroid feedback mechanizmusok elégtelenségével.
5. Wortmannin ICV infúziója során hasonló deficitet figyeltünk meg mint diabéteszben, mely további bizonyítékul szolgál az inzulin szerepéhez a normális reprodukciós folyamatok fenntartásához.

Az inzulin fontos szerepe a humán reprodukcióban is megfigyelhető. A különböző inzulin rezisztenciával járó állapotokban változatos reprodukciós eltérések tapasztalhatók. Bizonyos esetekben inzulin szenzitizáló szerekkel ezek az eltérések javíthatók. Az állatkísérletek eredményeiből levonható következtetések alapján, az inzulin szerepe a

reprodukcióban pontosabban megismerhető. Ez segíthet az inzulin rezisztens állapotok eredményesebb kezelésében, ill. új terápiás módszerek kifejlesztésében.

Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet szeretném kifejezni Dr. Nanette F. Santoronak és Dr. Irwin M. Merkatznek akik a hétéves amerikai tartózkodásom alatt biztosították, hogy mind szülészeti-nőgyógyászatból, mind reprodukciós endokrinológiából minél többet el tudjak sajátítani. Fontos szerepük volt abban, hogy a képzésem mind szakmailag, mind emberileg meghatározó legyen. A klinikai gyakorlatban és a kutatás területén olyan példát állítottak elém, melyet mindig szívesen fogok követni.

Nagy szeretettel gondolok Dr. George B. Karkaniasra, aki mellett két éven át dolgoztam a laborban. Ez a két év alatt nemcsak különböző labor technikákat sajátítottam el, de sokat segített abban is, hogy megtanuljam hogyan kell egyes problémákat kritikusan kiértékelni, és a megoldásukhoz a kutatást megtervezni. Mindig szívesen fogok visszaemlékezni azokra a hosszú beszélgetésekre, vagy email váltásokra melyeket egyes problémák megoldása során váltottunk.

Szertném megköszönni Prof. Dr. Szabó Istvánnak a PhD munkám sikeres elvégzéséhez nyújtott segítségét.

Szeretném megköszönni jelen munkahelyem vezetőinek Prof. Dr. Gáti Istvánnak, Prof. Dr. Kaáli Gézának és Prof. Dr. Bernárd Artúrnak a napi klinikai és tudományos munkához nyújtott segítségüket.

Szeretném megköszönni szüleimnek Prof. Dr. Kovács Lászlónak és Dr. Varga Zsuzsannának, hogy képzésem során itthon és külföldön is minden segítséget megadtak. Édesapám és nagyapám szakmai, klinikai példamutatása döntő volt abban, hogy a családban immár a harmadik generáció képviselőjeként én is a szülészeti-nőgyógyászatot választottam.

Édesapám jelenleg is a legfontosabb szakmai kapcsolat számomra, akinek a véleményét mindig kikérhetem a napi klinikai problémák, vagy tudományos kérdések megoldásához.

Végül, de nem utolsó sorban, szeretném megköszönni feleségemnek, Sonkodi Barbarának, hogy a pályám során mindig mellettem állt, és mindent megtett azért, hogy minél több energiámat tudjam a munkának szentelni. Ez különösen az USA-ban eltöltött hét évre igaz, amikor sokszor nem is igen láttak a beosztásomnak köszönhetően. Az általa megteremtett biztos családi háttér nélkül nem tudtam volna eljutni idáig. Remélem, hogy a külföldön eltöltött évek olyan tapasztalatot jelentenek majd fiaimnak Márknak, Milánnak és Martinnak melyet később, a saját karrierjük építése során ők is a hasznukra tudnak majd váltani.

Irodalomjegyzék:

1. **Felig P, Baxter JD, Frohman LA** Endocrinology and Metabolism 3rd Edition McGraw-Hill Inc. 1995. page 1179
2. **Griffin ML, South SA, Yankov VI, Booth RA Jr., Asplin CM, Veldhuis JD, Ewans WS** (1994) Insulin-dependent diabetes mellitus and menstrual dysfunction *Ann Med* 26:331-340
3. **South SA, Asplin CM, Carlsen EC, Booth RA Jr., Weltman JY, Johnson ML, Veldhuis JD, Ewans WS** (1993) Alterations in luteinizing hormone secretory activity in women with insulin-dependent diabetes mellitus and secondary amenorrhea *J Clin Endo Metab* 76:1048-1053
4. **Bell RH Jr., Hye RJ** (1983) Animal models of diabetes mellitus: physiology and pathology *J Surg Res* 35:433-460

5. **Mann DR, Korowitz CD, Macfarland LA, Cost MG** (1976) Interactions of the light-dark cycle, adrenal glands and time of steroid administration in determining the temporal sequence of LH and prolactin release in female rats *Endocrinology* 99:1252-1262
6. **Brown-Grant K, Naftolin F** (1972) Facilitation of luteinizing hormone secretion in the female rat by progesterone *J Endocrinol* 53:37-46
7. **Gentry RT, Wade GN, Blaustein JD** (1977) Binding of [³H] estradiol by brain cell nuclei and female rat sexual behavior: inhibition by experimental diabetes *Brain Res.* 130:135-146
8. **Kienast GS, Fadden C, Steger RW** (1993) Streptozotocin-induced diabetes blocks the positive feedback release of luteinizing hormone in the female rat *Brain Research Bulletin* 32:399-405
9. **Steger RW, Kienast GS, Pillai S, Rabe M** (1993) Effects of streptozotocin-induced diabetes on neuroendocrine responses to ovariectomy and estrogen replacement in female rats *Neuroendocrinology* 57:525-531
10. **Li H-Y, Wade GN, Blaustein J** (1994) Manipulations of metabolic fuel availability alter estrous behavior and neural estrogen receptor immunoreactivity in syrian hamsters *Endocrinology* 135:240-247
11. **Katayama S, Brownschidle CM, Wootten V, Lee JB, Shimaoka K** (1984) Absent or delayed preovulatory luteinizing hormone surge in experimental diabetes mellitus *Diabetes* 33:324-327
12. **Karkanias GB, Morales JC, Li C** (1997) Deficits in reproductive behavior in diabetic female rats are due to hypoinsulinemia rather than hyperglycemia *Hormones and Behavior* 32:19-29
13. **Dong Q, Lazarus RM, Wong LS, Vellios M, Handelsman DJ** (1991) Pulsatile LH secretion in streptozotocin-induced diabetes in the rat *J Endocrinol* 131:49-55

14. **Bestetti G, Locatelli V, Tirone F, Rossi GL, Muller EE** (1985) One month of streptozotocin-diabetes induces different neuroendocrine and morphological alterations in the hypothalamo-pituitary axis of male and female rats *Endocrinology* 117:208-216
15. **Valdes CT, Elkind-Hirsch KE, Rogers DG, Adelman JP** (1991) The hypothalamic-pituitary axis of streptozotocin-induced diabetic female rats is not normalized by estrogen replacement *Endocrinology* 128:433-440
16. **Hardy DF, Debold JF** (1972) Effects of coital stimulation upon behavior of the female rat *J Comp Physiol Psychol* 78:400-408
17. **La Marca A, Morgante G, De Leo V** (1999) Evaluation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis in amenorrhoeic women with insulin-dependent diabetes *Hum Reprod* 14:298-302
18. **Dunaif A, Thomas A** (2001) Current concepts in the polycystic ovary syndrome *Ann Rev Med* 52:401-419
19. **Tanaka T, Nagatani S, Bucholtz DC, Ohkura S, Tsukamura H, Maeda K, Foster DL** (2000) Central action of insulin regulates pulsatile luteinizing hormone secretion in the diabetic sheep model *Biol Reprod* 62:1256-1261
20. **Bruning JC, Gautam D, Burks DJ, Gillette J, Schubert M, Orban PC, Klein R, Krone W, Muller-Wieland D, Kahn CR** (2000) Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction *Science* 289:2122-2125
21. **Hoffman GE, Lee WS, Attardi B, Yann V, Fitzsimmons MD** (1990) Luteinizing hormone-releasing hormone neurons express *c-Fos* antigen after steroid activation *Endocrinology* 126:1736-1741
22. **Lee WS, Smith MS, Hoffman GE** (1990) Luteinizing hormone-releasing hormone neurons express Fos protein during the proestrous surge of luteinizing hormone *Proc Natl Acad Sci* 87:5163-5167

23. **Clough RW, Kienast GS, Steger RW** (1998) Reproductive endocrinopathy in acute streptozotocin-induced diabetic male rats *Endocrine* 8:37-43
24. **Arias P, Rodriguez M, Szwarcfarb B, Sinay IR, Moguilevsky JA** (1992) Effect of insulin on LHRH release by perfused hypothalamic fragments *Neuroendocrinology* 56:415-418
25. **Ohtani N, Ohta M, Sugano T** (1997) Microdialysis study of modification of hypothalamic neurotransmitters in streptozotocin-diabetic rats *J Neurochemistry* 69:1622-1628
26. **Laflamme N, Nappi RE, Drolet G, Labrie C, Rivest S** (1998) Expression and neuropeptidergic characterization of estrogen receptors (ER α and ER β) throughout the rat brain: anatomical evidence of distinct roles of each subtype *J Neurobiol* 36:357-378
27. **Butler JA, Sjoberg M, Coen CW** (1999) Evidence for oestrogen receptor α -immunoreactivity in gonadotrophin-releasing hormone-expressing neurons *J Neuroendocrinology* 11:331-335
28. **Hrabovszky E, Shughrue PJ, Merchenthaler I, Hajszan T, Carpenter CD, Liposits Z, Petersen SL** (2000) Detection of estrogen receptor- β messenger ribonucleic acid and ^{125}I -estrogen binding sites in luteinizing hormone-releasing hormone neurons of the rat brain *Endocrinology* 141:3506-3509
29. **Hrabovszky E, Steinhauser A, Barabas K, Shughrue PJ, Petersen SL, Merchenthaler I, Liposits Z** (2001) Estrogen receptor- β immunoreactivity in luteinizing hormone-releasing hormone neurons of the rat brain *Endocrinology* 142:3261-3264
30. **Siegel LI, Wade GN** (1979) Insulin withdrawal impairs sexual receptivity and retention of brain cell nuclear estrogen receptors in diabetic rats *Neuroendocrinology* 29:200-206

31. **Coirini H, Weisenberg L, Tornello S, De Nicola AF** (1980) Effect of experimental diabetes on estradiol binding by the anterior pituitary and hypothalamus in ovariectomized rats *Experientia* 36:683-685
32. **Korach KS** (2000) Estrogen receptor knock-out mice: molecular and endocrine phenotypes *J Soc Gynecol Invest* 7(No1 Suppl):S16-S17
33. **Krege JH, Hodgin JB, Couse JF, Enmark E, Warner M, Mahler JF, Sar M, Korach K, Gustaffson JA, Smithies O** (1998) Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor β *Proc Natl Acad Sci* 95:15677-15682
34. **Wade GN, Schneider JE, Li HY** (1996) Control of fertility by metabolic cues *Am J Physiology* 270 (Endocrinol. Metab. 33) E1-E19
35. **Dudley SD, Ramirez I, Wade GN** (1981) Estrous behavior and pituitary and brain cell nuclear retention of [3 H] estradiol in chronically insulin-deficient female rats *Neuroendocrinology* 33:7-11
36. **Ahdieh HB, Hamilton JM, Wade GN** (1983) Copulatory behavior and hypothalamic estrogen and progestin receptors in chronically insulin-deficient female rats *Physiol Behav* 31:219-223
37. **Nagatani S, Bucholtz DC, Murahashi K, Estacio MA, Tsukamura H, Foster DL, Maeda KI** (1996) Reduction of glucose availability suppresses pulsatile luteinizing hormone release in female and male rats *Endocrinology* 137:1166-1170
38. **Berriman SJ, Wade GN, Blaustein JD** (1992) Expression of Fos-like proteins in gonadotropin-releasing hormone neurons of Syrian hamsters: effects of estrous cycles and metabolic fuels *Endocrinology* 131:2222-2228
39. **Saltiel AR, Pessin JE** (2002) Insulin signaling pathways in time and space. *Trends Cell Biol* 12:65-71

40. **Niswender KD, Morrison CD, Clegg DJ, Olson R, Baskin DG, Myers MG, Seeley RJ, Schwartz MW** (2003) Insulin activation of phosphatidylinositol 3-kinase in the hypothalamic arcuate nucleus *Diabetes* 52:227-231
41. **Ui M, Okada T, Hazeki K, Hazeki O** (1995) Wortmannin as a unique probe for an intracellular signaling protein, phosphoinositide 3-kinase *TIBS* 303-306
42. **Taylor AE** (2000) Insulin-lowering medications in polycystic ovary syndrome *Obstet Gynecol Clin North Am* 27:583-595
43. **Stein IF, Leventhal MF** (1935) Amenorrhea associated with bilateral polycystic ovaries *Am J Obstet Gynecol* 29:181-186
44. **Rowe PJ, Comhaire FH, Hargreave TB, Mellows HJ** WHO manual for the standardized investigation and diagnosis of the infertile couple 1993 Cambridge University Press, Cambridge 54-55
45. **Dunaif A** (1992) Adrenal disorders and polycystic ovary syndrome *Horm Res* 37:39-44
46. **McCartney CR, Eagleson CA, Marshall JC** (2002) Regulation of gonadotropin secretion: implications for polycystic ovary syndrome *Semin Reprod Med* 20:317-326
47. **Moran C, Azziz R** (2001) The role of the adrenal cortex in polycystic ovary syndrome *Obstet Gynecol Clin North Am* 28:63-75
48. **Nestler JE** (1997) Role of hyperinsulinemia in the pathogenesis of the polycystic ovary syndrome and its clinical applications *Semin Reprod Endocrinol* 15:111-122
49. **Dunaif A** (1999) Insulin action in the polycystic ovary syndrome *Endocrinol Metab Clin North Am* 28:341-359
50. **Kaufmann RP, Castracane VD** Assessing insulin sensitivity *Medscape Women's Health Journal* www.medscape.com/viewarticle/448691

51. **Ghazeeri G, Kuttah WH, Bryer-Ash M, Haas D, Ke RW** (2003) Effect of rosiglitazone on spontaneous and clomiphene citrate – induced ovulation in women with polycystic ovary syndrome *Fertil Steril* 79:562-566
52. **Costello MF, Eden JA** (2003) A systematic review of the reproductive system effects of metformin in patients with polycystic ovary syndrome *Fertil Steril* 79:1-13
53. **Haas DA, Carr BR, Attia GR** (2003) Effects of metformin on body mass index, menstrual cyclicity, and ovulation induction in women with polycystic ovary syndrome *Fertil Steril* 79:469-481
54. Use of insulin sensitizing agents in the treatment of polycystic ovary syndrome *ASRM Practice Committee Report* April 2000
55. **Nestler JE** (2002) Should patients with polycystic ovarian syndrome be treated with metformin?: an enthusiastic endorsement *Hum Reprod* 17:1950-3
56. **Kocak M, Caliskan M, Simsir C, Haberal A** (2002) Metformin therapy improves ovulatory rates, cervical scores, and pregnancy rates in clomiphene citrate-resistant women with polycystic ovary syndrome *Fertil Steril* 77:101-6
57. **Vandermolen DT, Ratts VS, Evans WS, Stovall DW, Kauma SW, Nestler JE** (2001) Metformin increases the ovulatory rate and pregnancy rate from clomiphene citrate in patients with polycystic ovary syndrome who are resistant to clomiphene citrate alone *Fertil Steril* 75:310-5
58. **Nestler JE, Jakubowicz DJ, Reamer P, Gunn RD, Allan G** (1999) Ovulatory and metabolic effects of D-chiro-inositol in the polycystic ovary syndrome *N Engl J Med* 340:1314-20
59. **Papp S** (2002) A metformin szerepe a PCOS kezelésében *Magyar Nőorv L* 65:201-207

60. **Vajda M, Drávucz S, Murányi Z, Dospod J** (2002) Metformin-kezelés hatása a folliculogenezisre insulinrezisztens és hyperinsulinaemiás infertilis betegeknél *Magyar Nőorv L* 65:431-434
61. **Lord J, Flight I, Norman R** (2003) Insulin-sensitising drugs (metformin, troglitazone, rosiglitazone, pioglitazone, D-chiro-inositol) for polycystic ovary syndrome *Cochrane Database Syst Rev* 3:CD003053
62. **Glueck CJ, Wang P, Goldenberg N, Sieve-Smith L** (2002) Pregnancy outcomes among women with polycystic ovary syndrome treated with metformin *Hum Reprod* 17:2858-64
63. **Glueck CJ, Wang P, Kobayasi S, Phillips H, Sieve-Smith L** (2002) Metformin therapy throughout pregnancy reduces the development of gestational diabetes in women with polycystic ovary syndrome *Fertil Steril* 77:520-5