

**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 Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar

Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika

Bevezetés:

1. Diabétesz a populáció 5-6 %-át érinti. Az ezek 10%-a I.-es típusú, inzulin hiányos diabétesz.
2. Ovulációs zavarok (késői menarché, oligoovuláció, amenorrhoea, meddőség) gyakrabban fordulnak elő diabétesz mellett, még kellő vércukorszint beállítás esetén is.
3. Több állatmodell áll rendelkezésünkre a diabétesz vizsgálatára. Experimentális diabétesz indukálható biokémiai úton, streptozotocin (STZ) adásával. Ösztrogén-progeszteron kezeléssel normális ciklusoknak megfelelő hormonális változások idézhetőek elő kasztrált nőstény állatoknál (patkány modell).
4. STZ-nal előidézett diabétesz esetén a nőstény állatoknál csökken a lordózis mértékében kifejezett szexuális viselkedés, ovuláció, gonadotropin termelés és terhesség ritkábban fordul elő.
5. Állatkísérletek eredményei alapján, a diabéteszt kísérő testsúly csökkenés a reprodukciós változásokat nem magyarázza meg.
6. Gonadotropin-releasing hormon (GnRH) stimulációra a hypophysis megfelelően reagál, így feltételezhetően nem hypophysis eredetű oka van az eltéréseknek.
7. Inzulin adása a fent említett reprodukciós rendellenességeket korrigálja.

Célkitűzések:

1. Centrálisan, intracerebro-ventrikulárisan (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 aktivitására kasztrált, szteroid-kezelt nőstény állatokban kísérletes diabétesz során.
4. Centrálisan (ICV) adott inzulin hatásának vizsgálata a mediobazális hypothalamusban levő ösztrogén receptorok (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:

1. Kísérleteink során felnőtt, nőstény Sprague-Dawley patkányokat használtunk.
2. Kellő akklimatizálódás után a 175-200 gramm súlyú nőstény patkányok adnexumait eltávolítottuk, és sztereotaxikus műtét során az előre megállapított koordinátáknak megfelelően ICV kanült ültettünk be. A kanül egy subcután miniozmotikus pumpához volt csatlakoztatva, melyből vagy hígított inzulin ($100\mu\text{U}/\text{óra}$), vagy fiziológias sóoldat áramlott $0.5\ \mu\text{l}/\text{óra}$ mennyiségben. A műtét során intraperitoneális (ip.) streptozotocinnal diabéteszt idéztünk elő. A kontroll állatokat ip. citromsavval kezeltük.
3. Vércukor szintet a farokból vett vérből határoztuk meg. Ha a vércukor szint meghaladta a $200\ \text{mg}/\text{dl}$ értéket, a kísérleti állatot diabéteszesnek tekintettük.
4. Tíz nappal a műtétet követően, a kísérleteket megelőzően 48 és 24 órával $2\ \mu\text{g}$ estradiol benzoátot adtunk sc., majd 3-4 órával a kísérlet előtt $500\ \mu\text{g}$ progeszteront.
5. A szexuális viselkedést szteroid kezelést követően, szexuálisan aktív hím patkány jelenlétében vizsgáltuk. A hím közeledésére kiváltott gerinci lordózis változását vizsgáltuk. Egyfelől vizsgáltuk, hogy a hím tíz próbálkozásából hányszor váltott ki lordózis változást, továbbá milyen mértékben (0=lórdózis hiánya, 1=enyhe lordózis, 2=kifejezett lordózis).
6. GnRH neuronok aktivitását kettős immunohisztokémiai vizsgálattal (GnRH és c-fos) vizsgáltuk.
7. LH termelődést szteroid kezelés után 12 órán át óránként levett vérből (véna juguláris kanülön át) radio immunoassay-vel vizsgáltuk.
8. Ösztrogén receptor- α szintén immunohisztokémiai festéssel vizsgáltuk.
9. Az utolsó kísérletben a kasztrált nőstény állatok vagy ICV wortmannint ($25\ \mu\text{mol}/\text{l}$), vagy fiziológias sóoldatot kaptak.

Eredmények:

1. STZ-vel kiváltott diabétesz csökkent szexuális viselkedést eredményezett, melyet centrálisan adott inzulin a kontroll állatokéhoz hasonló szintre állított vissza.
2. A mediális hypothalamusban elhelyezkedő GnRH neuronok aktivitásában nem figyeltünk meg statisztikailag szignifikáns különbséget, bár inzulin adása mellett az aktív sejtek aránya magasabb volt mind a diabéteszes, mind a kontroll állatok között.
3. STZ-vel kiváltott diabétesz csökkent LH termeléshez vezetett, melyet a centrálisan adott inzulin visszaállított a kontroll állatokéhoz hasonló szintre.
4. Az ösztrogén receptor-alpha eloszlásában, illetve az immunoreaktív sejtek számában nem találtunk különbséget a cukorbeteg és kontroll, illetve inzulin kezelt és kontroll állatok között.
5. ICV wortmannin kezelés mellett csökkent szexuális viselkedés volt megfigyelhető a nőstény állatok között.

Következtetések:

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 feed-back mechanizmusok elégtelenségével.
5. Wortmannin ICV infúziója során hasonló deficitet figyeltünk meg mint diabéteszben, mely további bizonyítékul szolgál az inzulin szerepéhez a normális reprodukciós folyamatok fenntartásában.
6. Az inzulin fontos szerepe a humán reprodukcióban is megfigyelhető. A különböző inzulin rezisztenciával járó állapotokban változatos reprodukciós eltérések tapasztalhatók. Bizonyos esetekben inzulin szenitizáló szerekekkel 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 szülészet-nőgyógyászatból, mind reprodukciós endokrinológiából minél többet el tudjak sajátítani.

Nagy szeretettel gondolok Dr. George B. Karkaniasra, aki mellett két éven át dolgoztam a laborban. A két év alatt nemcsak különböző labor technikákat sajátítottam el, de sokat segített abban is, hogy megtanuljam hogyan kell egyes problémákat kritikusan értékelni, és a megoldásukhoz a kutatást megtervezni.

Szertném megköszönni Prof. Dr. Szabó Istvánnak 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 jelenleg is a legfontosabb szakmai kapcsolat számomra, akinek a véleményét mindig kikérhetem a napi klinikai problémák, vagy tudományos problémák 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. 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.

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* 2004;67:149-152

Kovács P, Karkanias GB The effect of diabetes and centrally administered insulin on anterior hypothalamic estrogen receptor immunoreactivity *Acta Diabetologica* publikációra elfogadva

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