



## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การแสดงออกของตัวรับอินซูลินในรังไข่ของหนูที่  
ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวาน

โดย อาจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร.อนงค์นาฏ อัสวชีพ

ธันวาคม 2557

สัญญาเลขที่ MRG5380155

## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การแสดงออกของตัวรับอินซูลินในรังไข่ของหนูที่  
ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวาน

อาจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร.อนงค์นาฏ อัสวชีพ  
คณะสัตวแพทยศาสตร์  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

รูปแบบ Abstract (บทคัดย่อ)

---

**Project Code : MRG5380155**

**Project Title :** การแสดงออกของตัวรับอินซูลินในรังไข่ของหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวาน

**Investigator :** อาจารย์สัตวแพทย์หญิง ดร.อนงค์นาฏ อัสวชิพ คณะสัตวแพทยศาสตร์  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**E-mail Address :** [sanongna@hotmail.com](mailto:sanongna@hotmail.com), [Anongnart.S@chula.ac.th](mailto:Anongnart.S@chula.ac.th)

**Project Period :** 15 มิถุนายน 2553 – 14 มิถุนายน 2555 (ขยายเวลา 14 ธันวาคม 2557)

**Keywords :** Diabetes, Insulin receptor substrate protein-4 (IRS-4), Ovary, Theca, Granulosa, Rat, Streptozotocin

## **Abstract**

Diabetes causes alterations in female reproductive function including impair the function of insulin receptor and signaling in the ovary. Insulin receptor substrate protein-4 (IRS-4) is widely distributed throughout ovarian compartments, including theca, granulosa and stromal tissues. The experiment was determined the expression of IRS-4 in rat ovary with streptozotocin-induced diabetes. Twenty-six Wistar rats, weight 200-250 g, 8 wks of age were used. Animals were divided into 2 groups: treatment (n=13) and control (n=13). Animals in treatment group were injected (i.p.) with a single dose of streptozotocin (STZ, 70 mg/kg). The plasma glucose level was significantly increased in the treatment group compared to control group ( $P<0.05$ ). The mean body weight tended to decrease in treatment group. The degeneration of pancreatic acini (H&E staining) was observed in treatment group. Immunohistochemistry showed the expression of IRS-4 in theca and granulosa cells from both groups, but the results were not significantly different. The IRS-4 expression from treatment groups tended to be decreased in theca and granulosa cells. The results from this study suggested that the alterations in IRS-4 in the ovary may partly be associated with the STZ-induced diabetes. This information provides basis for further study the impact of diabetes on female reproductive function.

**Keywords:** Diabetes, Insulin receptor substrate protein-4 (IRS-4), Ovary, Theca, Granulosa, Rat, Streptozotocin

### บทคัดย่อ

โรคเบาหวานเป็นสาเหตุทำให้เกิดความผิดปกติในระบบสืบพันธุ์เพศเมียได้ รวมทั้งเกิดความผิดปกติของตัวรับอินซูลินในรังไข่ พบว่าตัวส่งผ่านตัวรับอินซูลินชนิด IRS-4 (Insulin receptor substrate protein-4; IRS-4) พบกระจายทั่วไปในรังไข่ เช่น theca, granulosa และเนื้อเยื่อของรังไข่ การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการแสดงออกของ IRS-4 ในรังไข่ของหนูแรทที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวานด้วย streptozotocin (STZ) โดยทำการทดลองในหนูแรทสายพันธุ์ Wistar จำนวน 26 ตัว น้ำหนักเฉลี่ย 200-250 กรัม อายุ 8 สัปดาห์ แบ่งเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มทดลอง (n=13) และกลุ่มควบคุม (n=13) หนูในกลุ่มทดลองจะถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวานด้วยการฉีด STZ ในขนาด 70 มก./กก. เข้าช่องท้อง ผลการทดลองพบว่า ระดับน้ำตาลในเลือดสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) ในกลุ่มทดลอง และพบว่าน้ำหนักตัวมีแนวโน้มลดลงในกลุ่มทดลอง พบการฝ่อตัวของเซลล์ในตับอ่อนในกลุ่มทดลอง พบการแสดงออกของ IRS-4 ใน Theca และ granulosa cells ทั้งในกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุมแต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ( $P > 0.05$ ) แต่พบว่าการแสดงออกของ IRS-4 มีแนวโน้มลดลงในกลุ่มทดลอง ผลการศึกษาในครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่าการเปลี่ยนแปลงของการแสดงออกของ IRS-4 ในรังไข่อาจมีส่วนเกี่ยวข้องกับภาวะที่สัตว์เป็นเบาหวาน ซึ่งข้อมูลที่ได้นี้จะประโยชน์ต่อการศึกษถึงผลของเบาหวานต่อความผิดปกติของระบบสืบพันธุ์ในเพศเมียต่อไป

คำสำคัญ เบาหวาน ตัวส่งผ่านตัวรับอินซูลิน-4 (IRS-4) รังไข่ ทีคาเซลล์ แกรนูโลซาเซลล์ หนูแรท สเตรปโตโซโทซิน

## การแสดงออกของตัวรับอินซูลินในรังไข่ของหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวาน

### วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาการแสดงออกของตัวรับและตัวส่งผ่านตัวรับอินซูลินในรังไข่ของหนูที่เป็นโรคเบาหวาน
2. เพื่ออธิบายถึงความสำคัญของอินซูลินต่อฮอร์โมนในระบบสืบพันธุ์และการสังเคราะห์ฮอร์โมนในรังไข่
3. เพื่อเป็นแบบในการศึกษาผลของโรคเบาหวานต่อระบบสืบพันธุ์ในคน

### บทนำ

ข้อมูลองค์การอนามัยโลกระบุว่าโรคเบาหวานเป็นโรคที่มีอันตรายสูง พบข้อมูลผู้เสียชีวิตจากโรคเบาหวานถึงปีละประมาณ 3 ล้านคนทั่วโลก โรคเบาหวานเป็นโรคที่มีความสำคัญต่อสุขภาพของคนไทย จากสถิติในรอบ 10 ปีที่ผ่านมา พบว่าแนวโน้มผู้ป่วยและผู้เสียชีวิตจากโรคเบาหวานเพิ่มขึ้นทุกปี แสดงให้เห็นว่าโรคมีความรุนแรงมากขึ้น สถิติของกรมการแพทย์ระบุว่าเบาหวานเป็น 1 ใน 10 โรคที่มีจำนวนผู้ป่วยมากที่สุดในประเทศไทย โรคเบาหวานเป็นความผิดปกติของการเผาผลาญคาร์โบไฮเดรต เนื่องจากมีระดับฮอร์โมนอินซูลินน้อยลงกว่าปกติหรือไม่มีเลย ทำให้เซลล์ร่างกายไม่สามารถใช้น้ำตาลได้ เบาหวานเป็นโรคเรื้อรังอันตรายเมื่อเป็นแล้วมักจะเกิดภาวะแทรกซ้อนตามมา เช่น โรคหัวใจ ไตวาย ตาบอด รวมทั้งความผิดปกติในระบบสืบพันธุ์ทั้งในเพศหญิงและเพศชาย

จากการศึกษาพบว่าสัตว์ที่เป็นเบาหวาน จะพบความผิดปกติในระบบสืบพันธุ์ เช่น การผสมไม่ติด (infertility), เกิดกลุ่มอาการที่เรียกว่า polycystic ovary syndrome (PCOS) ซึ่งเป็นผลเนื่องจากร่างกายเกิดปฏิกิริยาต่อต้านอินซูลิน (insulin resistance) อินซูลินมีบทบาทสำคัญในกระบวนการสังเคราะห์สเตียรอยด์ฮอร์โมนในรังไข่ สัตว์ที่เป็นเบาหวานมักพบว่า การทำหน้าที่ของตัวรับอินซูลิน (insulin receptor) รวมทั้งตัวส่งผ่านตัวรับ (insulin receptor substrate proteins; IRS) มีความผิดปกติ หรือทำหน้าที่ได้ไม่สมบูรณ์ ส่งผลให้เกิดความผิดปกติหรือความบกพร่องในกระบวนการสังเคราะห์สเตียรอยด์ฮอร์โมน ซึ่งจะนำไปสู่ความผิดปกติเกี่ยวกับระบบสืบพันธุ์ต่อไป

อินซูลินเป็นฮอร์โมนที่สำคัญ ที่มีหน้าที่ควบคุมเมตาบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรตในร่างกาย โดยนำน้ำตาลกลูโคสจากกระแสเลือดไปเก็บในเซลล์ กลูโคสเป็นสารอาหารที่สำคัญต่อเซลล์โดยเป็นแหล่งของพลังงานที่เซลล์จะนำไปใช้ประโยชน์ได้ง่ายและรวดเร็วที่สุด ผลของการขาดอินซูลินจะทำให้ร่างกายไม่สามารถนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ได้ อินซูลินยังมีหน้าที่สำคัญอื่นๆ ได้แก่ เป็นตัวกลางสำคัญในขบวนการเมตาบอลิซึม การสังเคราะห์ DNA, RNA และโปรตีน อีกทั้งยังเกี่ยวข้องกับขบวนการแบ่งตัวและการเจริญเติบโตของเซลล์ การทำงานของอินซูลินต้องอาศัยตัวรับอินซูลินและตัวส่งผ่านตัวรับอินซูลิน เมื่ออินซูลินจับกับ

insulin receptor จะเกิดปฏิกิริยา autophosphorylation และกระตุ้นการเริ่มต้นการส่งสัญญาณการทำงานไปตามลำดับขั้น การกระตุ้น insulin receptor จะไปเพิ่มการเกิด phosphorylation ของ IRS จากนั้น phosphorylated-IRS จะกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ต่างๆ ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการเป็นลำดับขั้นต่อไป

Streptozotocin (STZ) เป็นยาในกลุ่มปฏิชีวนะที่ถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลายในงานทดลองต่างๆ เพื่อเหนี่ยวนำให้สัตว์ทดลองเกิดเบาหวาน เพื่อศึกษาผลของโรคเบาหวานที่มีต่อระบบสืบพันธุ์ เช่น มีรายงานว่า หนูแรทที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวานด้วยการฉีด streptozotocin จะพบความผิดปกติเกี่ยวกับระบบสืบพันธุ์คือ การพัฒนาของฟอลลิเคิลผิดปกติ จำนวนอสุจิเสื่อมลดลง และยังพบว่าระดับของสเตียรอยด์ฮอร์โมนลดลง นอกจากนี้ หนูแรทที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวานโดยการฉีด streptozotocin จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในระบบสืบพันธุ์ คือ ผสมไม่ติด ระดับของฮอร์โมน FSH และ LH ในซีรัมลดลงอย่างมีนัยสำคัญ รวมทั้งมีการเปลี่ยนแปลงของ FSH และ LH receptor ในรังไข่อีกด้วย แต่ยังไม่พบการศึกษาที่รายงานถึงการแสดงออกของ insulin receptor และ IRS ในรังไข่ของสัตว์ทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวาน

การเกิดความผิดปกติในการทำงานของ insulin receptor และ IRS ในรังไข่ จะนำไปสู่ความบกพร่องในกระบวนการสังเคราะห์สเตียรอยด์ฮอร์โมน ส่งผลให้เกิดความผิดปกติในระบบสืบพันธุ์ได้ ซึ่งจะพบได้ในผู้ป่วยหรือสัตว์ป่วยที่เป็นเบาหวาน ฉะนั้นความสำคัญของการศึกษาความสัมพันธ์ของอินซูลินต่อระบบสืบพันธุ์จะเป็นประโยชน์อย่างมากต่อการพัฒนาความรู้เกี่ยวกับโรคเบาหวานที่มีผลต่อระบบสืบพันธุ์ เพื่อเป็นแนวทางในการศึกษากลไกการเกิดโรคในระดับอณูชีววิทยา เพื่อนำไปสู่การป้องกัน รักษาโรค หรือคิดค้นพัฒนายาที่มีคุณภาพต่อไป

ดังนั้น การศึกษารังไข่ จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อ ศึกษาการแสดงออกของตัวรับและตัวส่งผ่านตัวรับอินซูลินในรังไข่ของหนูที่เป็นเบาหวาน โดยศึกษาความสัมพันธ์ของอินซูลินและการสังเคราะห์ฮอร์โมนในรังไข่ เพื่อจะได้ทราบถึงกลไกการทำงานในระดับอณูชีววิทยาของฮอร์โมนอินซูลินที่มีผลต่อระบบสืบพันธุ์ เพื่อเป็นแบบในการศึกษาผลของโรคเบาหวานต่อระบบสืบพันธุ์ในคน โดยองค์ความรู้ที่ได้จากผลการศึกษาวิจัยในครั้งนี้จะก่อประโยชน์ในเชิงวิชาการด้านอณูชีววิทยาทางการแพทย์ของโรคเบาหวาน ที่มีผลต่อระบบสืบพันธุ์ในเพศหญิง

## การทดลอง Phase 1

### **Preliminary Study**

ได้ทำการทดลอง Preliminary Study ในหนู Wistar Rat เพศเมีย จำนวน 4 ตัว ที่สั่งซื้อจากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล โครงการทดลองนี้ได้รับการรับรองจากคณะกรรมการจริยบรรณการใช้สัตว์ทดลองของคณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (เลขที่ใบอนุญาต 1031012) สัตว์ทดลองทั้งหมดถูกเลี้ยงภายใต้หลักการเลี้ยงสัตว์ทดลองที่ถูกต้อง ได้รับอาหารและน้ำสะอาดอย่างพอเพียง กำหนดให้อุณหภูมิห้องเลี้ยงสัตว์ทดลองอยู่ที่ 20-25 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ที่ 50-60% และอัตราส่วนความสว่าง : ความมืด อยู่ที่ 12 : 12 ชั่วโมง แบ่งสัตว์ทดลองเป็นหนูควบคุมจำนวน 1 ตัว (C1) และหนูในกลุ่มทดลอง จำนวน 3 ตัว (T1, T2, T3) ทำการเหนี่ยวนำหนูในกลุ่มทดลองให้เป็นเบาหวานด้วยการฉีด Streptozocin (STZ; Sigma®) ในขนาด 70 mg/kg เข้าช่องท้องครั้งเดียว และได้ทำการเก็บเลือดหนูทุกตัว โดยเก็บจากเส้นเลือดที่หาง (tail clip) เพื่อตรวจวัดระดับกลูโคสในเลือด เพื่อยืนยันว่าหนูเป็นเบาหวาน โดยต้องมีค่ากลูโคสในเลือด 400-500 mg/dL มีรายละเอียดดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงระดับกลูโคสในเลือด (Preliminary Study)

| Groups         | Blood glucose (mg/dl)                       |     |     |     |
|----------------|---------------------------------------------|-----|-----|-----|
|                | Time relative to STZ induced-diabetes (day) |     |     |     |
|                | -1                                          | +2  | +5  | +6  |
| Control (C1)   | 164                                         | 134 | 276 |     |
| Treatment (T1) | 140                                         | 998 |     |     |
| Treatment (T2) | 142                                         | 270 |     |     |
| Treatment (T3) | 138                                         | 208 | 392 | 490 |

- หมายเหตุ 1. หนู T1 และ T2 ตายในวันที่ 5 หลังการเหนี่ยวนำ
- การุณยฆาตหนู C1 (Thiopental 30 mg/kg i.p.) วันที่ 5 หลังการเหนี่ยวนำ
  - การุณยฆาตหนู T3 (Thiopental 30 mg/kg i.p.) วันที่ 6 หลังการเหนี่ยวนำ

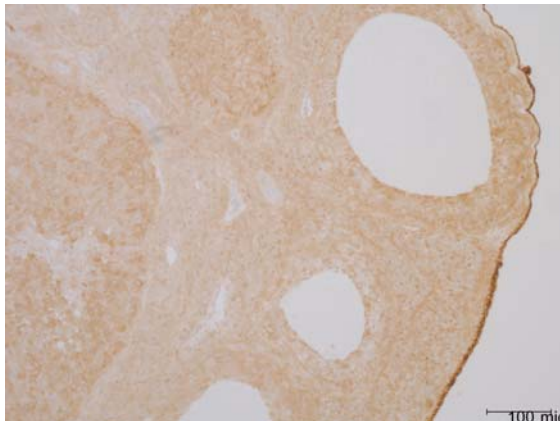
จากการทดลอง Preliminary Study ได้ทำการเก็บเลือดจากหางโดยวิธีการคลิบปลายหาง โดยต้องการเลือดเพื่อใช้ในการตรวจกลูโคสประมาณ 200-300 ul. ซึ่งเป็นปริมาณที่มาก จึงไม่สามารถเก็บเลือดทุกวันได้ และได้ส่งตรวจระดับกลูโคสในเลือดที่ห้องปฏิบัติการภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ต่อมาได้ปรับปรุงวิธีการตรวจกลูโคสใหม่ โดยใช้เครื่องตรวจ Blood glucose meter (Accu-chek<sup>®</sup>) ซึ่งใช้เลือดปริมาณเล็กน้อยเพียง 2-3 ul เท่านั้น จึงสามารถตรวจได้ทุกวันและตรวจได้เอง

ได้ปรับปรุงวิธีการทดลอง โดยดูจากระดับกลูโคสในเลือดเป็นเกณฑ์ โดยมีเกณฑ์การทดลองว่าถ้าระดับกลูโคสในเลือด  $\geq 500$  mg/dL จะถือว่าหนูเป็นเบาหวานและทำการการุณยฆาต (Thiopental 30 mg/kg i.p.)

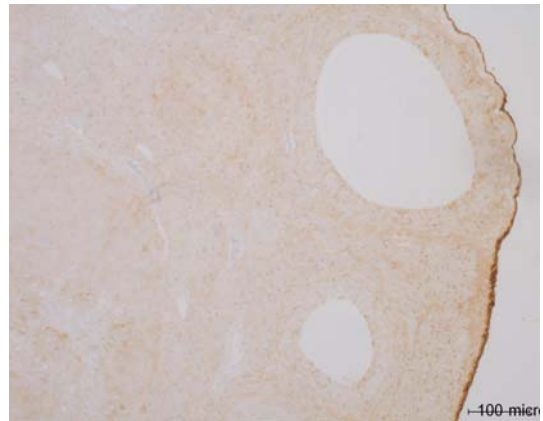
ทำการเก็บชิ้นเนื้อตับอ่อนและรังไข่ ในน้ำยา Formaldehyde 10% จากนั้น 24 ชั่วโมง เปลี่ยนเป็น Ethyl Alcohol 70% จากนั้นนำมาผ่านขั้นตอนการเตรียมเนื้อเยื่อทางจุลกายวิภาคศาสตร์ โดยใส่ตัวอย่างในบล็อกพาราฟิน และตัดชิ้นเนื้อตัวอย่างให้มีความหนาประมาณ 4-5 ไมโครเมตร นำมาวางลงบนสไลด์แก้ว Super-Frost นำมาอบในตู้อบ ผ่านกระบวนการทางอิมมูโนฮิสโตเคมีเพื่อตรวจหา IRS-4 กระบวนการทางอิมมูโนฮิสโตเคมี จะใช้เทคนิค Avidin-Biotin-Peroxidase (Vectastain ABC-Elite standard; Vector Laboratories) ได้ทดลองใช้ anti-IRS-4 ที่ความเข้มข้น 1:50 และ 1:200 ทั้งในหนูกลุ่มควบคุมและทดลอง พบว่า ที่ความเข้มข้น 1:50 เซลล์ติดสีเข้มเกินไป ส่วนที่ความเข้มข้น 1:200 พบการติดสีที่ชัดเจนและสามารถแยกแยะชนิดเซลล์ รวมทั้งการติดสีได้ดีกว่า ผลการทดลองพบการติดสีมากที่บริเวณ theca externa และบางส่วนใน granulosa cells ผลการตรวจ IRS-4 ใน ovary เป็นดังภาพที่ 1

ได้ปรับปรุงวิธีการตรวจทางกระบวนการทางอิมมูโนฮิสโตเคมี ได้แก่ การปรับระดับความเข้มข้นของ anti-IRS-4 และระยะเวลาในการบ่มที่ทำให้การติดสีของเซลล์มีความชัดเจนมากยิ่งขึ้น เพื่อนำเทคนิคต่างๆ ที่ได้ นำไปใช้ในการทดลองใน Phase 2 ต่อไป

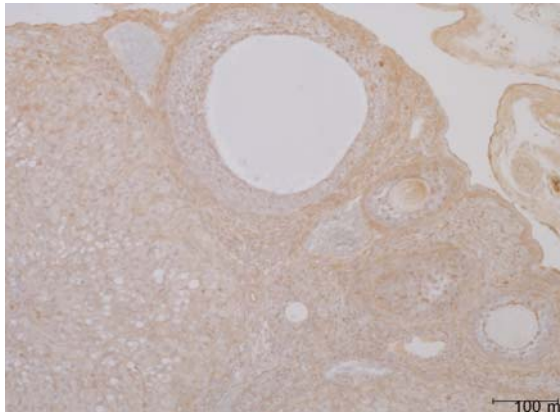
a. control anti-IRS-4 1:50



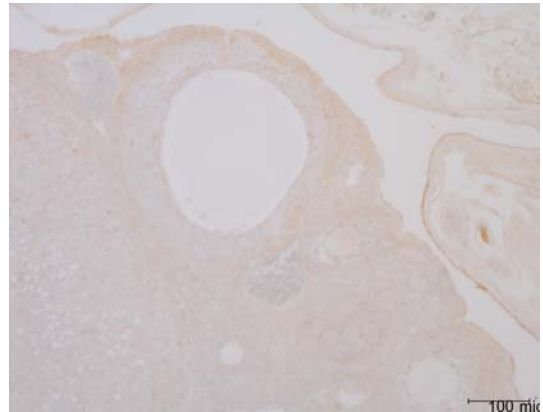
b. control anti-IRS-4 1:200



c. treatment anti-IRS-4 1:50



d. treatment anti-IRS-4 1:200



ภาพที่ 1 แสดงการตรวจทางอิมมูโนฮิสโตเคมี IRS-4 ในรังไข่จากหนูกลุ่มควบคุม (a and b) และกลุ่มทดลอง (c and d) ที่ระดับความเข้มข้นของ anti-IRS-4 1:50 และ 1:200

## **การทดลอง Phase 2**

### **วิธีทดลอง**

#### **อุปกรณ์และวิธีการ**

##### **สัตว์ทดลอง**

ทำการศึกษาในหนูแรทเพศเมีย สายพันธุ์ Wistar น้ำหนักเฉลี่ย 200-250 กรัม อายุ 8 สัปดาห์ จำนวน 26 ตัว ซึ่งสั่งซื้อจากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล โครงการทดลองนี้ได้รับการรับรองจากคณะกรรมการจริยธรรมการใช้สัตว์ทดลองของคณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (เลขที่ใบอนุญาต 1031012) สัตว์ทดลองทั้งหมดถูกเลี้ยงภายใต้หลักการเลี้ยงสัตว์ทดลองที่ถูกต้อง ได้รับอาหารและน้ำสะอาดอย่างพอเพียง กำหนดให้อุณหภูมิห้องเลี้ยงสัตว์ทดลองอยู่ที่ 20-25 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ที่ 50-60% และอัตราส่วนความสว่าง : ความมืด อยู่ที่ 12 : 12 ชั่วโมง

##### **การเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวาน**

แบ่งสัตว์ทดลองเป็น 2 กลุ่ม โดยเป็นกลุ่มทดลองจำนวน 13 ตัว และกลุ่มควบคุมจำนวน 13 ตัว ทำการเหนี่ยวนำหนูในกลุ่มทดลองให้เป็นเบาหวานด้วยการฉีด Streptozotocin (STZ; Sigma®) ในขนาด 70 mg/kg ใน 0.1M sodium citrate buffer (pH 4.5) เข้าช่องท้องครั้งเดียว ส่วนหนูในกลุ่มควบคุมทำการฉีดน้ำเกลือ (normal saline; vehicle injection; i.p.)

##### **การเก็บเลือด**

ทำการเก็บเลือดหนูทุกตัว โดยเก็บจากเส้นเลือดที่หาง (lateral tail vein) เริ่มตั้งแต่วันที่ 1 วันก่อนการเหนี่ยวนำด้วย STZ จนกระทั่งวันที่ 6 หลังการเหนี่ยวนำ เพื่อตรวจระดับกลูโคสเพื่อยืนยันว่าหนูเป็นเบาหวาน โดยดูจากระดับกลูโคสในเลือดเป็นเกณฑ์ โดยมีเกณฑ์ว่าถ้าระดับกลูโคสในเลือด  $\geq 500$  mg/dL จะถือว่าหนูเป็นเบาหวานและทำการการุณยฆาต (Thiopental 30 mg/kg i.p.)

##### **การชั่งน้ำหนัก**

ทำการชั่งน้ำหนักหนูทุกตัวทุกวัน เริ่มตั้งตั้งแต่วันที่ 1 วันก่อนการเหนี่ยวนำด้วย STZ จนกระทั่งวันที่ 6 หลังการเหนี่ยวนำ

##### **การตรวจทางจุลพยาธิวิทยา (Histopathological studies) และ**

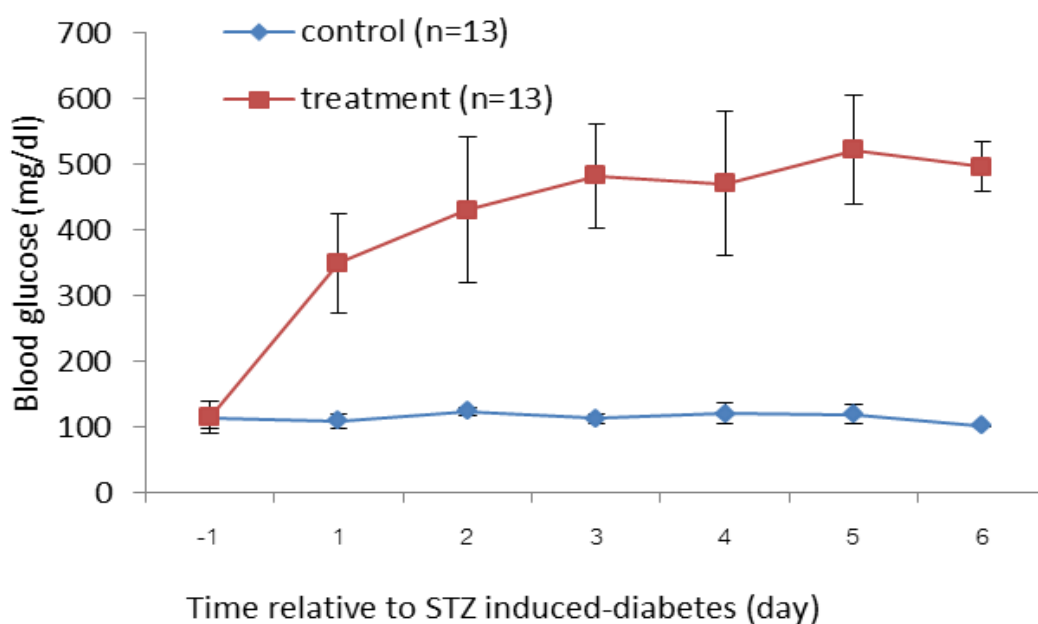
##### **Immunohistochemistry**

หลังจากทำการการุณยฆาตหนู จะเก็บตับอ่อนและรังไข่ทันที และนำไปแช่ในน้ำยา Formaldehyde 10% จากนั้น 24 ชั่วโมงเปลี่ยนเป็น Ethyl Alcohol 70% จากนั้นนำมาผ่านขั้นตอนการเตรียมเนื้อเยื่อทางจุลพยาธิวิทยา โดยใส่ตัวอย่างในบล็อกพาราฟิน และตัดชิ้นเนื้อตัวอย่างให้มีขนาดหนาประมาณ 4-5 ไมโครเมตร แล้วย้อมสี H&E ตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แสงสว่าง หรือผ่านกระบวนการทางอิมมูโนฮิสโตเคมีเพื่อตรวจหา IRS-4 โดยกระบวนการทางอิมมูโนฮิสโตเคมี จะใช้เทคนิค Avidin-Biotin-Peroxydase (Vectastain ABC-Elite standard; Vector Laboratories)

## ผลการทดลอง

### ระดับน้ำตาลในเลือด

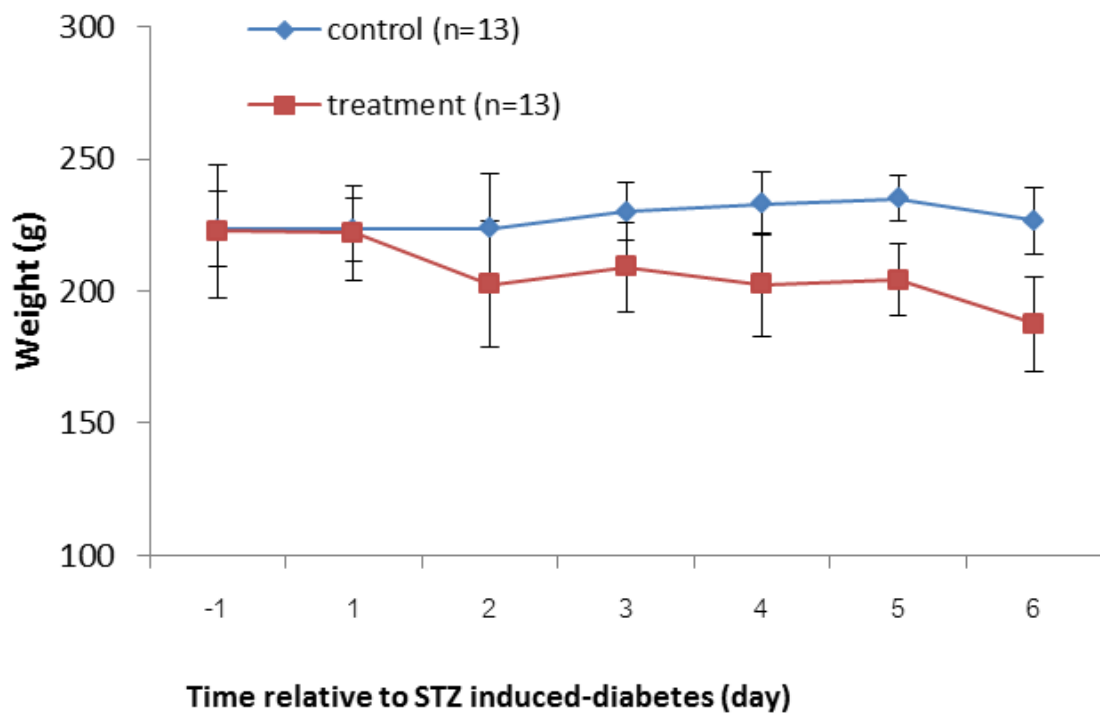
พบว่า การเหนี่ยวนำด้วยการฉีด STZ ในขนาด 70 mg/kg ใน 0.1M sodium citrate buffer (pH 4.5) เข้าช่องท้องเพียงครั้งเดียว สามารถเหนี่ยวนำให้หนูเป็นเบาหวานได้ภายในระยะเวลา 6 วัน โดยพบระดับของน้ำตาลในเลือดเพิ่มขึ้นในกลุ่มทดลองซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) ดังแสดงในภาพที่ 2



ภาพที่ 2 แสดงค่าเฉลี่ยของระดับกลูโคสในเลือด (mg/dl) (mean  $\pm$  SEM) ในหนูกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม

### น้ำหนักตัว

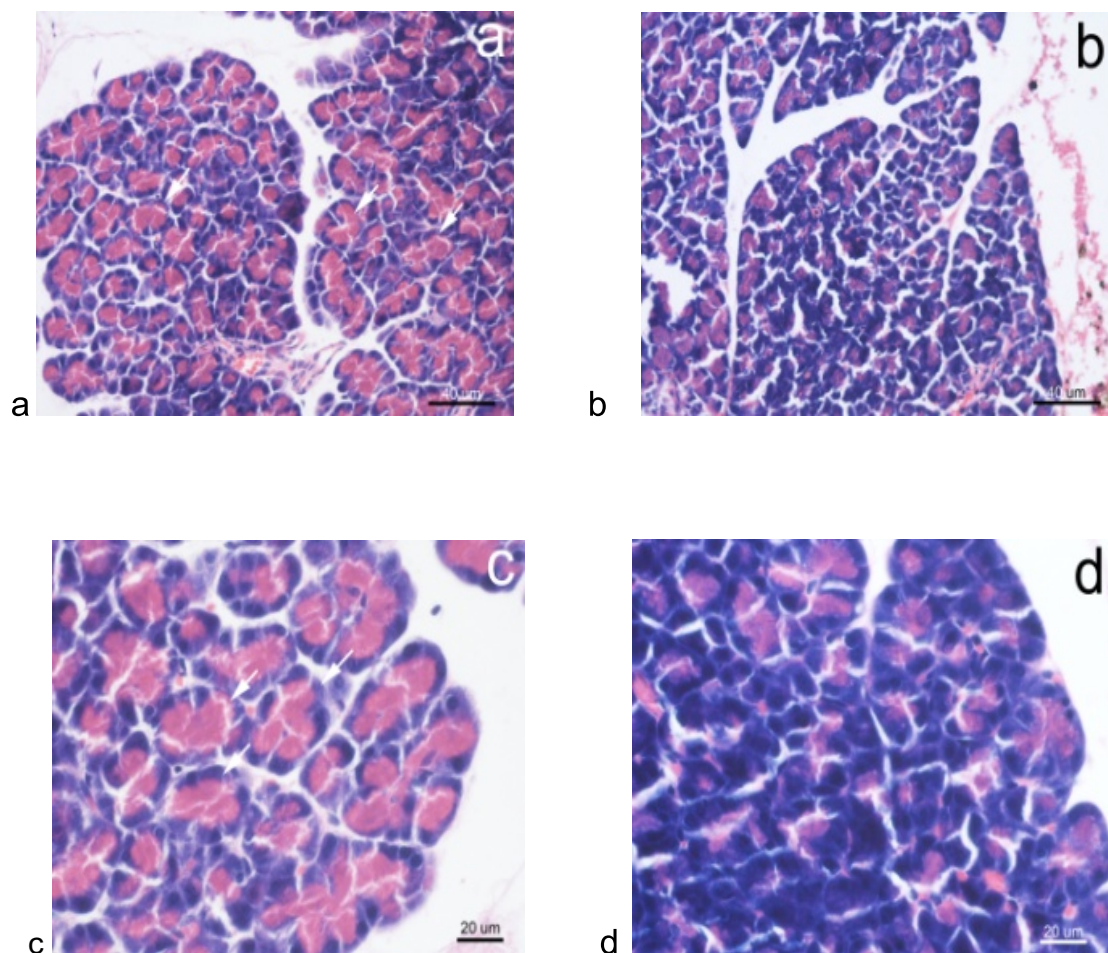
ผลการทดลองพบว่าน้ำหนักตัวของหนูในกลุ่มทดลองมีแนวโน้มลดลง ดังแสดงในภาพที่ 3 ซึ่งการลดลงของน้ำหนักตัวเป็นอาการทางคลินิกอย่างหนึ่งของการเกิดภาวะเบาหวาน นอกจากนี้อาการทางคลินิกอื่นๆที่สังเกตพบร่วมด้วย ได้แก่ ปัสสาวะมากและกินน้ำมากขึ้น



ภาพที่ 3 แสดงค่าเฉลี่ยน้ำหนักตัวหนู (g) (mean  $\pm$  SEM) ในกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม

### การศึกษาทางจุลพยาธิวิทยาของตับอ่อน

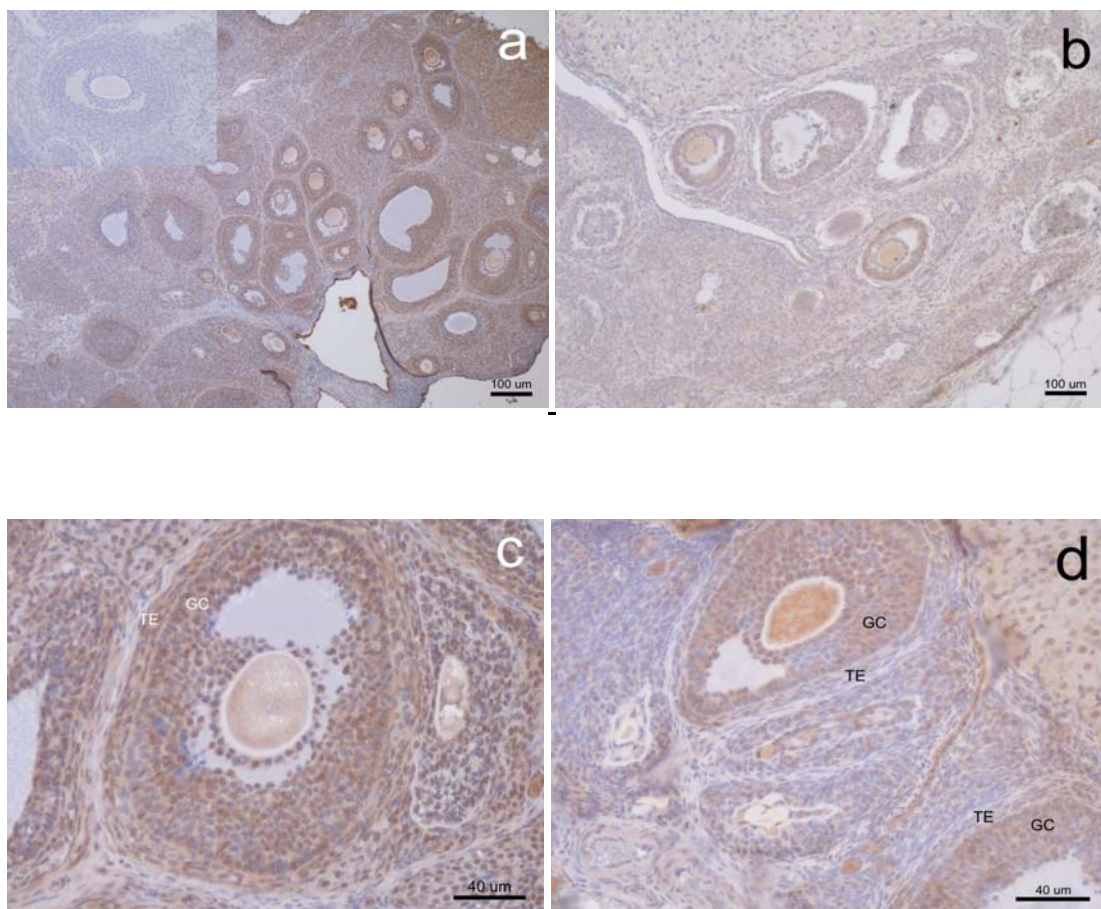
การศึกษาทางจุลพยาธิวิทยาของตับอ่อน พบการฝ่อตัวของ pancreatic acini อย่างเด่นชัดในกลุ่มทดลอง (แสดงในภาพที่ 4) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการฝ่อตัวของ Beta cells ใน pancreatic islets จากผลของการเหนี่ยวนำให้สัตว์ทดลองเป็นเบาหวานด้วย STZ



**ภาพที่ 4** แสดงจุลพยาธิวิทยาของตับอ่อนที่ย้อมด้วยสี Hematoxylin and Eosin จากหนูกลุ่มควบคุม (a and c) และกลุ่มทดลอง (b and d)

### การศึกษาทางอิมมูโนฮิสโตเคมีเพื่อตรวจหา IRS-4 ในรังไข่

การศึกษาทางอิมมูโนฮิสโตเคมี พบการแสดงออกของ IRS-4 ใน Theca และ granulosa cells ในรังไข่ของหนูทั้งในกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม โดยพบว่าการแสดงออกของ IRS-4 ใน Theca และ granulosa cells ทั้งในกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุมไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ( $P>0.05$ ) แต่พบว่าการแสดงออกของ IRS-4 มีแนวโน้มลดลงในกลุ่มทดลอง ดังแสดงในภาพที่ 5



**ภาพที่ 5** แสดงการตรวจทางอิมมูโนฮิสโตเคมี IRS-4 ในรังไข่จากหนูกลุ่มควบคุม (a and c) และกลุ่มทดลอง (b and d), ภาพเล็กมุมบนซ้ายในภาพ a แสดง negative control, TE = Theca externa cells; GC = granulosa cells.

## สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

การศึกษาทางด้านชีวการแพทย์ (Biomedical research) โดยใช้สัตว์ทดลองเป็นต้นแบบของการศึกษาเป็นการศึกษาที่สำคัญและมีความจำเป็น โดยเฉพาะการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับสาเหตุของการเกิดโรคที่มีความสำคัญต่อมนุษย์ เช่น เบาหวาน ซึ่งเป็นโรคเรื้อรังที่พบบ่อยกว้างขวางทั่วโลก รวมทั้งในประเทศไทย โรคเบาหวานเป็นความผิดปกติของการเผาผลาญคาร์โบไฮเดรต เนื่องจากมีระดับฮอร์โมนอินซูลินน้อยกว่าปกติหรือไม่มีเลย ทำให้เซลล์ร่างกายไม่สามารถใช้น้ำตาลได้ สถิติของกรมการแพทย์ระบุว่าเบาหวานเป็น 1 ใน 10 โรคที่มีจำนวนผู้ป่วยมากที่สุดในประเทศไทย จากการศึกษาพบว่าสัตว์ที่เป็นเบาหวาน จะพบความผิดปกติในระบบสืบพันธุ์ เช่น การผสมไม่ติด (infertility), เกิดกลุ่มอาการที่เรียกว่า polycystic ovary syndrome (PCOS) ซึ่งเป็นผลเนื่องจากร่างกายเกิดปฏิกิริยาต่อต้านอินซูลิน (insulin resistance) อินซูลินมีบทบาทสำคัญในกระบวนการสังเคราะห์สเตียรอยด์ฮอร์โมนในรังไข่ สัตว์ที่เป็นเบาหวานมักพบว่า การทำหน้าที่ของตัวรับอินซูลิน (insulin receptor) รวมทั้งตัวส่งผ่านตัวรับ (insulin receptor substrate proteins; IRS) มีความผิดปกติ หรือทำหน้าที่ได้ไม่สมบูรณ์ ส่งผลให้เกิดความผิดปกติหรือความบกพร่องในกระบวนการสังเคราะห์สเตียรอยด์ฮอร์โมน ซึ่งจะนำไปสู่ความผิดปกติเกี่ยวกับระบบสืบพันธุ์

Streptozotocin หรือ Streptozocin หรือ Izostazin หรือ Zanosar (STZ) เป็นยาในกลุ่มปฏิชีวนะที่ถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลายในงานทดลองต่างๆ เพื่อเหนี่ยวนำให้สัตว์ทดลองเกิดเบาหวาน (Konrad et al, 2001; Akbarzadeh et al, 2007) โดย STZ จะไปทำลาย beta cells ของตับอ่อนส่งผลให้สัตว์เกิดภาวะเบาหวานตามมา (Wu and Huan, 2008) เพื่อศึกษาผลของโรคเบาหวานที่มีต่อระบบสืบพันธุ์ เช่น การทดลองของ McLean และคณะ (1996) รายงานว่าหนูแรทที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวานด้วยการฉีด STZ จะพบความผิดปกติเกี่ยวกับระบบสืบพันธุ์คือการพัฒนาของฟอลลิเคิลผิดปกติ จำนวนคอร์ปัสลูเทียมลดลง และยังคงพบวาระดับของสเตียรอยด์ฮอร์โมนลดลง ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Ballester และคณะ (2007) ที่พบว่า หนูแรทที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวานโดยการฉีด STZ จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในระบบสืบพันธุ์ คือ ผสมไม่ติด ระดับของฮอร์โมน FSH และ LH ในซีรัมลดลงอย่างมีนัยสำคัญ รวมทั้งมีการเปลี่ยนแปลงของ FSH และ LH receptor ในรังไข่อีกด้วย แต่ยังไม่พบการศึกษาที่รายงานถึงการแสดงออกของ insulin receptor และ IRS ในรังไข่ของสัตว์ทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวาน

จากการทดลองในครั้งนี้พบว่าการเหนี่ยวนำด้วยการฉีด STZ ในขนาด 70 mg/kg ใน 0.1M sodium citrate buffer (pH 4.5) เข้าช่องท้องเพียงครั้งเดียว สามารถเหนี่ยวนำให้หนูแรทเป็นเบาหวานได้ภายในระยะเวลา 6 วัน โดยพบระดับของน้ำตาลในเลือดเพิ่มสูงขึ้นในกลุ่มทดลองซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) ดังนั้นหนูแรทจึงเป็นสัตว์ทดลองที่ดีที่สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดเบาหวานเพื่อใช้ศึกษาถึงผลของเบาหวานต่อระบบสืบพันธุ์ในเพศเมียได้

นอกจากนี้ ผลการทดลองยังพบว่าน้ำหนักตัวของหนูในกลุ่มทดลองมีแนวโน้มลดลง ซึ่งการลดลงของน้ำหนักตัวเป็นอาการทางคลินิกอย่างหนึ่งของการเกิดภาวะเบาหวาน โดยมักพบร่วมกับอาการทางคลินิกอื่นๆ ได้แก่ ปัสสาวะมากขึ้นและกินน้ำมากขึ้น

การศึกษาทางจุลพยาธิวิทยาของตับอ่อน พบว่า ตับอ่อนในกลุ่มทดลองพบการฝ่อตัวของ pancreatic acini อย่างเด่นชัด (แสดงในภาพที่ 4) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการฝ่อตัวของ Beta cells ใน pancreatic islets จากผลของการเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวานด้วย STZ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Holemans และคณะ (1997) และ Akbarzadeh และคณะ (2007)

การศึกษาทางอิมมูโนฮิสโตเคมีเพื่อตรวจหา IRS-4 ในรังไข่ ผลการทดลองพบการแสดงออกของ IRS-4 ทั้งในเซลล์ชนิด granulosa และ theca ทั้งในกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ( $P>0.05$ ) แต่ทั้งนี้ เป็นที่น่าสังเกตว่าพบการแสดงออกของ IRS-4 ในกลุ่มทดลองมีแนวโน้มลดลงใน granulosa และ theca cells ซึ่งผลการทดลองนี้น่าเชื่อว่า การเปลี่ยนแปลงของการแสดงออกของ IRS-4 ใน granulosa และ theca cells มีผลเกี่ยวข้องโดยตรงจากการเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวาน จากการตรวจเอกสารพบว่า มีงานวิจัยเพียงไม่กี่เรื่องที่ได้ทำการศึกษาการแสดงออกของ IRS ในรังไข่ เช่น การศึกษาของ Richards (1994) รายงานพบ IRS-1 ในรังไข่หนูแรท การศึกษาของ Dunaif และคณะ (2001) และ Yen และคณะ (2004) รายงานพบ IRS-1 ในรังไข่ของคน การศึกษาของ Negavova และคณะ (2007) ตรวจพบ IRS-1 และ IRS-2 ใน theca และ granulosa cell ในรังไข่ของหนูไม่ซี การศึกษาของ Somchit-Assavacheep และคณะ (2013) ตรวจพบ IRS-1,2 และ 4 ในรังไข่ของแกะ ซึ่ง IRS-1, IRS-2 และ IRS-4 นี้มีส่วนสำคัญในกระบวนการเจริญเติบโตและการแบ่งเซลล์ของไข่ รวมไปถึงการตกไข่ โดย IRS ทำหน้าที่เกี่ยวข้องในกระบวนการสังเคราะห์ฮอร์โมนแอนโดรเจนและเอสโตรเจน

IRS ที่ค้นพบในปัจจุบันมี 4 ตัว ได้แก่ IRS-1, 2, 3 และ 4 (Sun et al, 1991; Laven et al, 1997ab; Giovannone et al, 2000; Fantin et al, 2000) พบว่า IRS-1 มักเกี่ยวข้องกับการบวนการแบ่งตัวและการเจริญเติบโตของเซลล์ (Withers et al, 1998; Kido et al, 2000) การศึกษาทดลองในหนูตัดแต่งพันธุกรรม (gene knockout) ที่ไม่มี IRS-2 จะพบความผิดปกติในการพัฒนาของเบตาเซลล์ในตับอ่อน เกิดภาวะต้านอินซูลิน (insulin resistance) นำไปสู่การเกิดโรคเบาหวาน นอกจากนี้ จากการศึกษาของ Withers (2001) รายงานว่า หนูตัดแต่งพันธุกรรมที่ไม่มี IRS-2 จะพบความไม่สมบูรณ์พันธุ์เนื่องจากเกิดความผิดปกติที่ไฮโปทาลามัสต่อมพิทูอิทารี และรังไข่ ทำให้ระบบสืบพันธุ์ผิดปกติคือ รังไข่มีขนาดเล็ก จำนวนฟอลลิเคิลลดลง ไม่มีคอร์ปัสลูเทียม และเกิดภาวะไม่ตกไข่ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Fantin และคณะ (2000) ที่ทำการศึกษาในหนูตัดแต่งพันธุกรรมที่ไม่มี IRS-4 ก็พบความผิดปกติเกี่ยวกับกลูโคส เมตาบอลิซึมรวมทั้งพบความผิดปกติที่รังไข่เช่นกัน ส่วน IRS-3 พบว่าไม่มีความเกี่ยวข้องกับกลูโคสเมตาบอลิซึม เนื่องจากการศึกษาในหนูตัดแต่งพันธุกรรม ที่ไม่มี IRS-3 พบว่าสัตว์ทดลองเหล่านั้นไม่แสดงอาการที่ผิดปกติเกี่ยวกับกลูโคสเมตาบอลิซึมแต่อย่างใด รวมทั้งไม่

พบความผิดปกติในระบบสืบพันธุ์ด้วย (Liu et al, 1999) จากผลการศึกษาจากงานทดลองต่างๆ ที่กล่าวข้างต้น แสดงให้เห็นว่า IRS-2 และ 4 เป็นตัวส่งผ่านตัวรับอินซูลินที่มีความสำคัญและเกี่ยวข้องกับกลูโคสเมตาบอลิซึมมากที่สุด (Giovannone et al, 2000; Fantin et al, 2000)

อินซูลินมีความเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สเตียรอยด์ฮอร์โมนในรังไข่ (Downing et al, 1999; Wu et al, 2000; Wu et al, 2003; Scaramuzzi et al, 2006) รวมถึงเกี่ยวข้องกับการพัฒนาของฟอลลิเคิลและการแบ่งตัวของ theca และ granulosa cell (Adashi et al, 1997; Poretsky et al, 1999) พบว่า insulin receptor อยู่กระจายทั่วไปในรังไข่ของคนและสัตว์หลายชนิด โดยพบ insulin receptor ที่บริเวณ theca, granulosa, oocyte และเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (Poretsky et al, 1999)

สมมติฐานการทำงานของอินซูลินในกระบวนการสังเคราะห์สเตียรอยด์ฮอร์โมนในรังไข่ เริ่มจากอินซูลินกระตุ้น insulin receptor และ IRS จากนั้น IRS จะส่งสัญญาณควบคุมการทำงานผ่านทาง gonadotrophin-stimulated cAMP/PKA signaling pathway ซึ่งจะนำไปสู่การสังเคราะห์สเตียรอยด์ฮอร์โมนใน theca และ granulosa cell มีการศึกษาพบว่า IRS มีความสำคัญต่อระบบสืบพันธุ์ซึ่งเกี่ยวข้องโดยตรงกับ insulin signaling pathway (Burks et al, 2000; Johnston et al, 2003; Yen et al, 2004)

การทดลองภายนอกตัวสัตว์ (in vitro) พบว่า อินซูลินกระตุ้นการสังเคราะห์สเตียรอยด์ฮอร์โมนใน theca และ granulosa cell ในรังไข่ของสัตว์หลายชนิด ได้แก่ แกะ (Campbell et al, 1996; Campbell et al, 1998), โค (Spicer et al, 1993; Gutierrez et al, 1997) และสุกร (Zhang et al, 2000) โดยพบว่าอินซูลินเกี่ยวข้องกับการทำงานของฮอร์โมน FSH ต่อการสังเคราะห์ฮอร์โมนเอสโตรเจนและโปรเจสเตอโรนใน granulosa cell และ เกี่ยวข้องกับการทำงานของฮอร์โมน LH ต่อการสังเคราะห์ฮอร์โมนแอนโดรเจนใน theca cell (Nobels and Dewailly, 1992) การศึกษาของ Poretsky และ Kalin (1987) พบว่า อินซูลินหรืออินซูลินร่วมกับฮอร์โมน LH สามารถกระตุ้นการสร้างฮอร์โมนแอนโดรเจนในรังไข่ได้ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Dunaif (1997) ที่พบว่า ภาวะการเกิด hyperinsulinemia จะทำให้เกิด hyperandrogenism ตามมา ซึ่งพบได้ในผู้ป่วยที่แสดงอาการของ polycystic ovary syndrome (Corbould, 2008) แสดงให้เห็นว่าอินซูลินเป็นตัวควบคุมที่สำคัญตัวหนึ่งต่อการสังเคราะห์สเตียรอยด์ฮอร์โมน

การเกิดความผิดปกติในการทำงานของ insulin receptor และ IRS ในรังไข่ จะนำไปสู่ความบกพร่องในกระบวนการสังเคราะห์สเตียรอยด์ฮอร์โมน ส่งผลให้เกิดความผิดปกติในระบบสืบพันธุ์ได้ ซึ่งจะพบได้ในผู้ป่วยหรือสัตว์ป่วยที่เป็นเบาหวาน (Krook et al, 2000) ฉะนั้น การศึกษาในครั้งนี้ที่พบการเปลี่ยนแปลงของการแสดงออกของระดับ IRS-4 ในรังไข่ในหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวานจึงมีความสำคัญในการศึกษาถึงผลของภาวะเบาหวานต่อความผิดปกติของระบบสืบพันธุ์ในเพศเมียต่อไป ซึ่งจะเป็นประโยชน์อย่างมากต่อการพัฒนาความรู้เกี่ยวกับโรคเบาหวานที่มีผลต่อระบบสืบพันธุ์ เพื่อเป็นแนวทางในการศึกษาพยาธิกำเนิดของ

โรค กลไกการเกิดโรคในระดับอนุชีววิทยา เพื่อนำไปสู่การป้องกัน รักษาโรค หรือคิดค้นพัฒนา ยาที่มีคุณภาพต่อไป

### เอกสารอ้างอิง

- Adashi, E.Y., Resnick, C.E., Payne, D.W., Rosenfeld, R.G., Matsumoto, T., Hunter, M.K., Gargosky, S.E., Zhou, J. and Bondy, C.A. (1997). The mouse intraovarian insulin-like growth factor I system: departures from the rat paradigm. *Endocrinology*. 138(9): 3881-3890.
- Akbarzadeh, A., Norouzian, D., Mehrabi, M.R., Jamshidi, S., Farhangi, A., Verdi, A.A., Mofidian, S.M.A. and Rad, B.L. (2007). Induction of diabetes by streptozotocin in rats. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*. 22(2:) 60-64.
- Ballester, J., Munoz, M.C., Dominguez, J., Palomo, M.J., Rivera, M., Rigau, T., Guinovart, J.J. and Rodriguez-Gil, J.E. (2007). Tungstate administration improves the sexual and reproductive function in female rats with streptozotocin-induced diabetes. *Human Reproduction*. 22(8): 2128–2135.
- Burks, D.J., Font de Mora, J., Schubert, M., Withers, D.J., Myers, M.G., Towery, H.H., Altamuro, S.L., Flint, C.L. and White, M.F. (2000). IRS-2 pathways integrate female reproduction and energy homeostasis. *Nature*. 407: 377-382.
- Campbell, B.K., Scaramuzzi, R.J. and Webb, R. (1996). Induction and maintenance of oestradiol and immunoreactive inhibin production with FSH by ovine granulosa cells cultured in serum-free media. *Journal of Reproduction and Fertility*. 106(1): 7–16.
- Campbell, B.K., Baird, D.T. and Webb, R. (1998). Effects of dose of LH on androgen production and luteinization of ovine theca cells cultured in a serum-free system. *Journal of Reproduction and Fertility*. 112: 69–77.
- Corbould, A. (2008). Effects of androgens on insulin action in women: is androgen excess a component of female metabolic syndrome? *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*. 24(7): 520-532.
- Downing, J.A., Joss, J. and Scaramuzzi, R.J. (1999). The effect of a direct arterial infusion of insulin and glucose on the ovarian secretion rates of androstenedione and oestradiol in ewes with an autotransplanted ovary. *Journal of Endocrinology*. 163: 531-541.

- Dunaif, A. (1997). Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome: mechanism and implications for pathogenesis. *Endocrine Reviews*. 18(6): 774-800.
- Dunaif, A., Wu, X., Lee, A. and Diamanti-Kandarakis, E. (2001). Defects in insulin receptor signaling in vivo in the polycystic ovary syndrome (PCOS). *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism*. 281(2): E392-E399.
- Fantin, V.R., Wang, Q., Lienhard, G.E. and Keller, S.R. (2000). Mice lacking insulin receptor substrate 4 exhibit mild defects in growth, reproduction, and glucose homeostasis. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 278: E127-E133.
- Giovannone, B., Scaldaferri, M.L., Federici, M., Porzio, O., Lauro, D., Fusco, A., Sbraccia, P., Borboni, P., Lauro, R. and Sesti, G. (2000). Insulin receptor substrate (IRS) transduction system: distinct and overlapping signaling potential. *Diabetes Metabolism Research and Reviews*. 16: 434-441.
- Gutiérrez, C.G., Campbell, B.K. and Webb, R. (1997). Development of a long-term bovine granulosa cell culture system: induction and maintenance of estradiol production, response to follicle-stimulating hormone, and morphological characteristics. *Biology of Reproduction*. 56: 608-616.
- Holemans, K. Van Bree R., Verhaeghe J., Meurrens K. and Van Assche F.A. (1997). Maternal semistarvation and streptozotocin-diabetes in rats have different effects on the in vivo glucose uptake by peripheral tissues in their female adult offspring. *Journal of Nutrition*. 127:1371-1376.
- Johnston, A.M., Pirola, L. and Van Obberghen, E. (2003). Molecular mechanisms of insulin receptor substrate protein-mediated modulation of insulin signalling. *Federation of European Biochemical Societies Letters*. 546: 32-36.
- Kido, Y., Burks, D.J., Withers, D., Bruning, J.C., Kahn, C.R., White, M.F. and Accili, D. (2000). Tissue-specific insulin resistance in mice with mutations in the insulin receptor, IRS-1, and IRS-2. *Journal of Clinical Investigation*. 105(2): 199-205.
- Konrad, R.J., Mikolaenko, I., Tolar, J.F., Liu, K. and Kudlow, J.E. (2001). The potential mechanism of the diabetogenic action of streptozotocin : inhibition of pancreatic b-cell O-GlcNAc-selective N-acetyl-b-D-glucosaminidase. *Biochemistry Journal*. 356: 31-41.
- Krook, A., Björnholm, M., Galuska, D., Jiang, X.J., Fahlman, R., Myers, M.G., Wallberg-Henriksson, H. and Zierath, J.R. (2000) Characterization of signal

- transduction and glucose transport in skeletal muscle from type 2 diabetic patients. *Diabetes*. 49: 284-292.
- Lavan, B.E., Lane, W.S. and Lienhard, G.E. (1997a). The 60-kDa phosphotyrosine protein in insulin-treated adipocytes is a new member of the insulin receptor substrate family. *The Journal of Biological Chemistry*. 272(17): 11439-11443.
- Lavan, B.E., Fantin, V.R., Chang, E.T., Lane, W.S., Keller, S.R. and Lienhard, G.E. (1997b). A novel 160-kDa phosphotyrosine protein in insulin-treated embryonic kidney cells is a new member of the insulin receptor substrate family. *The Journal of Biological Chemistry*. 272(34): 21403-21407.
- Liu, S.C.H., Wang, Q., Lienhard, G.E. and Keller, S.R. (1999). Insulin receptor substrate 3 is not essential for growth or glucose homeostasis. *The Journal of Biological Chemistry*. 274(25): 18093-18099.
- McLean, M.P., Warden, J.K., Sandhoff, T.W., Irby, R.B. Hales, D.B. (1996). Altered ovarian sterol carrier protein expression in the pregnant streptozotocin-treated diabetic rat. *Biology of Reproduction*. 55: 38-46.
- Neganova, I., Al-Qassab, H., Heffron, H., Selman, C., Choudhury, A.I., Lingard, S.J., Diakonov, I., Patterson, M., Ghatei, M., Bloom, S.R., Franks, S., Huhtaniemi, I., Hardy, K. and Withers, D.J. (2007). Role of central nervous system and ovarian insulin receptor substrate 2 signaling in female reproductive function in the mouse. *Biology of Reproduction*. 76: 1045-1053.
- Nobels, F. and Dewailly, D. (1992). Puberty and polycystic ovarian syndrome: the insulin/insulin-like growth factor 1 hypothesis. *Fertility and Sterility*. 58: 655-666.
- Poretsky, L. and Kalin, M.F. (1987). The gonadotropic function of insulin. *Endocrine Reviews*. 8: 132-141.
- Poretsky, L., Cataldo, N.A., Rosenwaks, Z., Giudice, L.C. (1999). The insulin-related ovarian regulatory system in health and disease. *Endocrine Reviews*. 20: 535-582.
- Richards, J.S. (1994). Hormonal control of gene expression in the ovary. *Endocrine Reviews*. 15(6): 725-751.
- Scaramuzzi, R.J., Campbell, B.K., Downing, J.A., Kendall, N.R., Khalid, M., Muñoz-Gutiérrez, M. and Somchit, A. (2006). A review of the effects of supplementary nutrition in the ewe on the concentrations of reproductive and metabolic hormones and the mechanisms that regulate folliculogenesis and ovulation rate. *Reproduction Nutrition Development*. 46(4): 339-354.

- Somchit-Assavacheep, A., Campbell, B.K., Khalid, M., Kendall, N.R. and Scaramuzzi, R.J. (2013). The effect of short-term nutritional supplementation of ewes with lupin grain (*Lupinus luteus*) on folliculogenesis, the concentrations of hormones and glucose in plasma and follicular fluid and the follicular levels of P<sub>450</sub> aromatase and IRS-1, 2 and 4. *Reproduction*. 145: 319-333.
- Spicer, L.J., Alpizar, E. and Echternkamp, S.E. (1993). Effects of insulin, insulin-like growth factor I, and gonadotropins on bovine granulosa cell proliferation, progesterone production, estradiol production, and(or) insulin-like growth factor I production in vitro. *Journal of Animal Science*. 71: 1232-1241.
- Sun, X.J., Rothenberg, P., Kahn, C.R., Backer, J.M., Araki, E., Wilden, P.A., Cahill, D.A., Goldstein, B.J. and White, M.F. (1991). Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein. *Nature*. 352: 73-77.
- Withers, D.J. (2001). Insulin receptor substrate proteins and neuroendocrine function. *Biochemical Society Transactions*. 29: 525-529.
- Withers, D.J., Gutierrez, J.S., Towery, H., Burks, D.J., Ren, J.M., Previs, S, Zhang, Y., Bernal, D., Pons, S., Shulman, G.I., Bonner-Weir, S. and White M.F. (1998). Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. *Nature*. 391: 900-904.
- Wu, K.K. and Huan, Y. (2008). Streptozotocin -induced diabetic models in mice and rats. *Current Protocols in Pharmacology*. 40(5): 1-5.
- Wu, X.K., Sallinen, K., Anttila, L., Mäkinen, M., Luo, C., Pöllänen, P. and Erkkola, R. (2000). Expression of insulin-receptor substrate-1 and -2 in ovaries from women with insulin resistance and from controls. *Fertility and Sterility*. 74(3): 564-572.
- Wu, X.K., Zhou, S.Y., Liu, J.X., Pöllänen, P., Sallinen, K., Mäkinen, M. and Erkkola, R. (2003). Selective ovary resistance to insulin signaling in women with polycystic ovary syndrome. *Fertility and Sterility*. 80(4): 954-965.
- Yen, H-W., Jakimiuk, A.J., Munir, I. and Magoffin, D.A. (2004). Selective alterations in insulin receptor substrates-1, -2 and -4 in theca but not granulosa cells from polycystic ovaries. *Molecular Human Reproduction*. 10(7): 473-479.
- Zhang, G., Garmey, J.C. and Veldhuis, J.D. (2000). Interactive stimulation by luteinizing hormone and insulin of the steroidogenic acute regulatory (StAR) protein and 17 $\alpha$ -hydroxylase/17, 20-lyase (CYP17) genes in porcine theca cells. *Endocrinology*. 141(8): 2735-2742.

### Output จากโครงการวิจัย

1. Somchit-Assavacheep, A., Tienthai, P. and Techakumphu, M (2012). The expression of insulin receptor substrate protein-4 (IRS-4) in rat ovary with streptozotocin-induced diabetes. *Proceeding of the 12<sup>th</sup> Thailand Research Fund annual meeting*. Thailand. P 162
2. Anongnart Assavacheep and Paisan Tienthai. (2011). Rat is a suitable animal model for streptozotocin-induced diabetes. *Proceeding of the 10<sup>th</sup> Chulalongkorn University Veterinary Annual Conference*. Thailand. P S30-31.

## ภาคผนวก

# The expression of insulin receptor substrate protein-4 (IRS-4) in rat ovary with streptozotocin-induced diabetes

Anongnart Assavacheep<sup>1\*</sup>, Paisan Tienthai<sup>2</sup> and Mongkol Techakumphu<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Department of Animal Husbandry, <sup>2</sup>Department of Anatomy, <sup>3</sup>Department of Obstetrics & Gynaecology, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand 10330

\*Corresponding author: Anongnart.S@chula.ac.th



## INTRODUCTION & OBJECTIVE

- Biomedical research associated with animal model for diabetes has been developed.
- Diabetes causes alterations in female reproductive function including impair the function of insulin receptor and signaling in the ovary.
- Insulin receptor substrate protein-4 (IRS-4) is widely distributed throughout ovarian compartments, including theca, granulosa and stromal tissues.
- Streptozotocin (STZ) is a broad spectrum antibiotic and anti-neoplastic activity. A single large dose of STZ can produce diabetes in rodents, resulted from the degeneration of the beta cells of Langerhans islets.
- The experiment was determined the expression of IRS-4 in rat ovary with streptozotocin-induced diabetes.

## MATERIALS & METHODS

- **Animals:** Twenty-six Wistar rats, weight 200-250 g, 8 wks of age were used. All animals were fed with a standard diet and chlorinated water *ad libitum*. The animal room was maintained the temperature at 20-25°C, relative humidity at 50-60%, light : dark cycle at 12 : 12 hrs.
- **Induction of diabetes:** Animals were divided into 2 groups: treatment (n=13) and control (n=13). Animals in treatment group were injected (i.p.) with a single dose of STZ (Sigma®; 70 mg/kg), the animals in control group were injected with normal saline (vehicle injection).
- **Blood collection:** Blood samples were collected from lateral tail vein from all animals starting at a day before STZ induction until day 6.
- **Body weight:** All animals were weighed once a day from the day before STZ induction until day 6.
- **Evaluation of diabetes status:** Animal that had plasma glucose level  $\geq 500$  mg/dL, was considered diabetes status and was euthanized at this time.
- **Euthanasia:** All animals were euthanized at the end of experiment.
- **Immunohistochemistry:** Pancreas and ovaries were removed for further analysis by H&E staining and Immunohistochemistry, respectively.

## DISCUSSION & CONCLUSION

- In this study, we ensured induction of diabetes in rats, in which clinical signs of diabetes such as hyperglycemia, weight loss, polyuria and polydipsia were seen within 6 days of STZ injection.
- The degeneration of pancreatic acini were observed in treatment group, these results might be associated with the destruction of the beta cells of Langerhans islets.
- Immunohistochemistry showed the expression of IRS-4 in theca and granulosa cells from both groups, but the results were not significant different. The IRS-4 expression from treatment groups tended to be decreased in theca and granulosa cells.
- The results from this study suggested that the alterations in IRS-4 in the ovary may partly be associated with the STZ-induced diabetes.
- This information provides basis for further study the impact of diabetes on female reproductive function.

## RESULTS

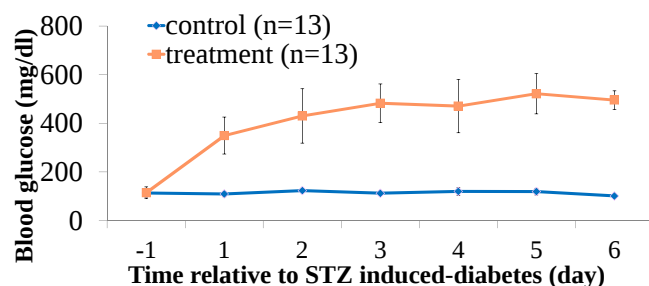


Figure 1 The mean  $\pm$  SEM plasma glucose concentrations (mg/dL) in control (n=13) and treatment group (n=13)

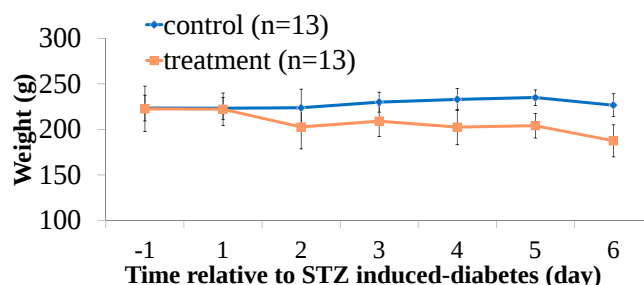


Figure 2 The mean  $\pm$  SEM body weight (g) in control (n=13) and treatment group (n=13)

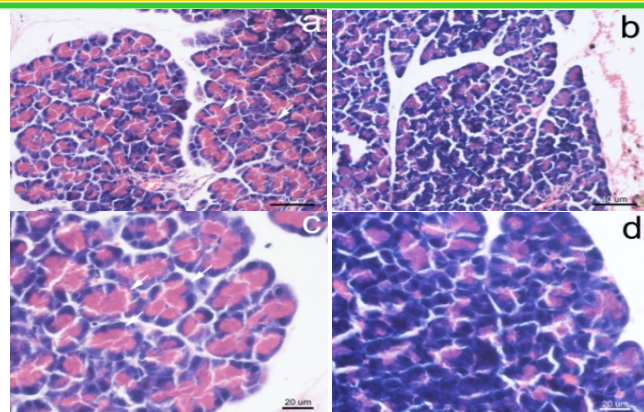


Figure 3 Histopathological of pancreas staining with Hematoxylin and Eosin from control group (a and c) and treatment group (b and d). Arrows indicate pancreatic acini.

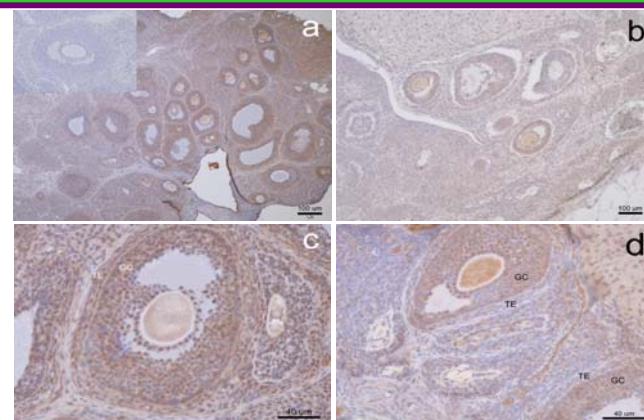


Figure 4 Immunohistochemistry of ovary showed the expression of IRS-4 in theca and granulosa cells from control group (a and c) and treatment group (b and d). Inset in (a) showed negative control. TE = Theca cells; GC = granulosa cells.

**ACKNOWLEDGEMENT:** This research work was granted by Thailand Research Fund (TRF)