

Wpływ podawania deksametazonu i alfa-ketoglutaranu ciężarnym maciorom na poziom wybranych hormonów we krwi noworodków*)

EWA ŚLIWA, MARCIN R. TATARA, GRZEGORZ S. PIERZYNOWSKI*, TADEUSZ STUDZIŃSKI

Katedra Biochemii i Fizjologii Zwierząt Wydziału Medycyny Weterynaryjnej AR, ul. Akademicka 12, 20-950 Lublin,

*Department of Cell and Organism Biology, Lund University, SE-223 62 Lund, Szwecja

Śliwa E., Tataro M. R., Pierzynowski G. S., Studziński T.

Influence of dexamethasone and alpha-ketoglutarate administration to pregnant sows on the level of some hormones in the blood plasma of newborn un-suckled piglets

Summary

The aim of the study was to establish the influence of dexamethasone and alpha-ketoglutarate administration to pregnant sows on the prenatal programming of the growth hormone level, cortisol, insulin and IGF-I in the blood serum of newborn piglets assessed just after their birth and prior to suckling. The foetal development is dependent on and determined by hormones such as glucocorticoids as well as nutrient supply through the sow, especially from the digestive tract. All these factors determine pre- and neonatal growth. The experiment was conducted over the final 24 days of pregnancy in sows treated *i.m.* with dexamethasone at a dose of 3 mg per sow every second day or alpha-ketoglutarate administered orally daily at a dose of 0.4 g/kg b.w. The blood samples were collected from the subclavian vein of un-suckled piglets immediately following their birth and were centrifuged straight away and the serum stored at -25°C until further analysis. Hormone concentrations were determined using ELISA kit. The obtained results indicate that maternal administration of dexamethasone increased the level of cortisol while alpha-ketoglutarate increased the levels of cortisol and IGF I whereas simultaneous administration of dexamethasone and AKG significantly increased the growth hormone. These results of separate or simultaneous maternal administration of dexamethasone and alpha-ketoglutarate during the last 24 days of pregnancy indicated the activation of different mechanisms and different prenatal effects on the levels of cortisol, growth hormone and IGF I in serum assessed immediately following the birth of the piglets.

Keywords: piglets, dexamethasone, alpha-ketoglutarate, growth hormone

Łożysko u świni zaliczane jest do typu nabłonkowo-kosmówkowego i jako bariera zmienia się w trzecim miesiącu ciąży, kiedy w wyniku wrastania naczyń krwionośnych płodu do trofoblastu następuje odkształcanie jego komórek. W nabłonku macicy tworzą się wtedy kapilary śródnabłonkowe (1). Układ ten przypomina naczynia włosowate w kłębku nerkowym, co sprawia, że w ostatnich tygodniach ciąży u macior dochodzi do dużych zmian w grubości łożyska, którego bariera staje się łatwiejsza do pokonania dla wielu związków, które przechodzą przez łożysko na skutek dyfuzji prostej lub transportu aktywnego (1). W miarę rozwoju ciąży coraz większe ilości składników pokarmowych są przekazywane z organizmu matki do rozwijających się płodów, co decyduje o sposobie żywienia i odmiennego traktowania farmakologicznego ciężarnych macior.

Stężenie leków we krwi zmniejsza się u ciężarnych samic po podaniu tych samych dawek, co jest wyrazem zwiększenia objętości osocza i płynu pozakomórkowego pod koniec ciąży determinującego zmiany w dystrybucji leku. Jednak przez zmniejszone wiązanie leków z białkami osocza w ciąży, ze względu na fizjologiczną, pod ko-

niec ciąży, hipoalbuminemię może dochodzić do zwiększenia odsetka leku wolnego. Zwiększa się wtedy pula, która wnika do tkanek i wywiera efekt biologiczny, co może równoważyć małe stężenie leku całkowitego.

Dotychczas poznano tylko niektóre fizjologiczne mechanizmy prenatalnego i postnatalnego rozwoju układu kostnego i mięśni szkieletowych, a także układu pokarmowego, które umożliwiły pełniejsze wykorzystanie potencjalnych możliwości rozwoju organizmu w okresie postnatalnym (15). Brak jest jednak danych o wpływie alfa-ketoglutaranu (AKG) oraz hormonów steroidowych, a w tym i deksametazonu, na regulację hormonalną w okresie prenatalnym. Uzasadnienia do określenia wpływu deksametazonu, będącego syntetycznym glikokortykosteroidem, na rozwój prenatalny prosiąt, dostarcza ciągłe jego stosowanie w okresie ciąży u kobiet, a także w praktyce lekarsko-weterynaryjnej u zwierząt w okresie neonatalnego i postnatalnego rozwoju, co powiązane jest często z upośledzeniem wzrostu i rozwoju noworodka (1).

Celem badań było określenie wpływu łącznego i wyłączonego stosowania alfa-ketoglutaranu (AKG) oraz deksametazonu (Dex), podawanego *i.m.* ciężarnym maciorom na poziom wybranych hormonów we krwi prosiąt badanych w pierwszej godzinie ich życia.

*) Praca wykonana w ramach grantu KBN nr 2 P06K/00828.

Materiał i metody

Badania przeprowadzono na 8 ciężarnych maciorach i 40 nowo narodzonych prosiąt rasy wielka biała polska. Ciężarne maciory przebywały w standardowych warunkach hodowlanych, jakie obowiązują w chowie świń i prosiąt oraz karmione były dwa razy dziennie mieszanką standardową przeznaczoną dla loch ciężarnych i karmiących. Badania obejmowały okres prenatalny ostatnich 24 dni ciąży, tj. od 91. dnia ciąży do momentu porodu. Ciężarne maciory zostały podzielone na matki prosiąt grupy kontrolnej (K) nie podlegające wpływom żadnych środków farmakologicznych i czynników biologicznie czynnych oraz matki prosiąt grup doświadczalnych, które otrzymywały Dex i AKG łącznie lub oddzielnie. Dawki i schemat doświadczenia w okresie prenatalnym przedstawia tab. 1. Od nowo narodzonych prosiąt niessących, zarówno kontrolnych, jak i z każdej grupy doświadczalnej była pobierana krew z żyły podobojczykowej przed upływem pierwszej godziny ich życia.

Pobrane próbki krwi zostały odwirowane w celu uzyskania surowicy, w której określono poziom kortyzolu przy użyciu testu Cortisol Elisa Kit (IBL), IGF-I (Quantikine Human IGF-I Elisa Kit – R&D), hormonu wzrostu (Porcine GH Elisa Kit – DSL) i insuliny (Insulin ELISA Kit – DSL).

Wyniki badań przedstawiono w postaci średnich wartości z błędami standardowymi (średnia \pm SE). Wartość $p \leq 0,05$ została uznana za próg istotności statystycznej.

Wyniki i omówienie

Średnia masa ciała prosiąt nowo narodzonych w grupie kontrolnej wynosiła $1270 \text{ g} \pm 82$, w grupie AKG $1680 \text{ g} \pm 74$, w grupie AKG + Dex $1650 \text{ g} \pm 79$ i w grupie Dex $1560 \text{ g} \pm 98$. Deksametazon i alfa-ketoglutaran podawane zarówno łącznie, jak i oddzielnie maciorom przez ostatnie 24 dni ciąży, tj. od 91. dnia do momentu porodu, podwyższały istotnie masy urodzeniowe prosiąt w porównaniu z masą prosiąt grupy kontrolnej.

Poziom hormonu wzrostu w surowicy krwi prosiąt uległ istotnemu podwyższeniu pod wpływem łącznego stosowanego deksametazonu i AKG w czasie ciąży u macior w porównaniu z kontrolą i pozostałymi grupami, w których prosięta pozostawały pod wyłącznym wpływem deksametazonu lub AKG i wynosił $7,9 \text{ pg/ml}$. W grupie kontrolnej poziom hormonu wzrostu wynosił $7,26 \text{ pg/ml}$, w grupie Dex $7,22 \text{ pg/ml}$, zaś w grupie AKG $7,08 \text{ pg/ml}$.

Alfa-ketoglutaran stanowi prekursor glutaminy, która wykazuje działanie systemowe, stymuluje procesy wzrostowe, przez co może oddziaływać na wzrost i rozwój całego organizmu. Z α -ketoglutaranu powstają w organizmie aminokwasy, takie jak glutamina, asparagina, arginina oraz prolina, które są niezbędne w syntezie białek kolagenowych (2, 8, 10). Suplementacja α -ketoglutaranem diety dla tuczników powoduje wzrost zawartości wymienionych aminokwasów w mięśniach szkieletowych, stymulując procesy ich wzrostu (4, 10). Badania przeprowadzone nad rozwojem płodów u bydła dowiodły istnienia syntezy hormonu wzrostu u embrionu w wieku 8 dni, zaś u kurcząt ekspresję GH stwierdzano już po 3 dniach od zapłodnienia (17).

Do najbardziej poznanych stymulatorów hormonalnych wzrostu należą somatotropina i somatomedyny (IGF I i IGF II), a także estrogeny i androgeny. Dla normalnego wzrostu organizmu jest konieczny wzajemnie sprzężony system między hormonem wzrostu a czynnikami insulinopodobnymi. IGF I jest kluczowym czynnikiem wzrostu

Tab. 1. Schemat doświadczenia z nowo narodzonymi prosiętami niessącymi grup kontrolnej i doświadczalnej

Grupa	Opis grupy	Liczba prosiąt w grupie
Kontrola Niessące	Prosięta z ciąży macior kontrolnych, niepodlegających wpływom żadnych środków farmakologicznych i czynników biologicznie czynnych, których matki otrzymywały od 91. dnia ciąży do dnia porodu <i>per os</i> płyn fizjologiczny w ilości 300 ml/szrukę i płyn fizjologiczny <i>i.m.</i> w ilości 1,5 ml/szrukę co 48 h	n = 10
Niessące AKG	Prosięta będące pod wpływem AKG podawanego <i>per os</i> ich matkom w ilości 0,4 g/kg m.c. codziennie od 91. dnia ciąży do dnia porodu	n = 10
Niessące AKG + Dex	Prosięta będące pod wpływem AKG podawanego <i>per os</i> ich matkom w ilości 0,4 g/kg m.c. codziennie w połączeniu z deksametazonem podawanym <i>i.m.</i> w ilości 3 mg co 48 h od 91. dnia ciąży do dnia porodu	n = 10
Niessące Dex	Prosięta będące pod wpływem deksametazonu podawanego <i>i.m.</i> ich matkom w ilości 3 mg co 48 h od 91. dnia ciąży do dnia porodu	n = 10

podczas życia płodowego, dodatkowo skorelowany również z ilością tkanki tłuszczowej (6).

Poziom IGF I w surowicy krwi prosiąt uległ istotnemu podwyższeniu pod wpływem podawania AKG ciężarnym maciorom i wynosił $286 \text{ } \mu\text{g/ml}$. W grupie kontrolnej poziom IGF I wynosił $205 \text{ } \mu\text{g/ml}$, w grupie AKG + Dex $196 \text{ } \mu\text{g/ml}$, zaś w grupie Dex $189 \text{ } \mu\text{g/ml}$. Doświadczenia na zwierzętach wykazały, że IGF odgrywa główną rolę w rozwoju płodowym w powiązaniu z ilościowym i jakościowym poziomem składników odżywczo-budulcowych dostarczanych przez jednostkę maczyno-łożyskową (3). Należy podkreślić, że hormon wzrostu podnosi wątrobowa syntezę IGF I i poprzez oddziaływanie autokryne i parakryne stymuluje uwalnianie IGF I (11). Badania noworodków z makrosomią od matek chorych na cukrzycę insulinozależną, a które w czasie ciąży otrzymywały insulinę, wykazały wzrost poziomu IGF I w surowicy krwi. Natomiast badania nad wpływem czasu trwania terapii deksametazonowej i wysokości użytych dawek wykazały spadek poziomu IGF I w surowicy krwi płodów u ludzi i szczurów przy zastosowanych zróżnicowanych dawkach tego steroidu (16).

Działanie prenatalne deksametazonu istotnie zwiększyło u prosiąt stężenie insuliny, które wyniosło $2,97 \text{ } \mu\text{IU/ml}$ w porównaniu z grupą prosiąt będących pod wpływem AKG podawanego maciorom. W grupie AKG stężenie insuliny wynosiło $2,25 \text{ } \mu\text{IU/ml}$. Deksametazon jako egzogeny glikokortykoid, podawany maciorom w ciąży, wywołał efekty anaboliczne u płodów, ujawniające się wzrostem neonatalnej masy ciała badanych prosiąt. Było to spowodowane prawdopodobnie zarówno zwiększonym dowozem energetycznych i budulcowych substratów, a w tym także glukozy przez łożysko, jak i towarzyszącej stymulacji hormonalnych procesów wzrostowych płodu. Glukoza przenika przez łożysko zgodnie z gradientem stężeń, wyższych po stronie krwi matki, a niższych po stronie krwi płodu (12). Hiperglikemia matek powoduje hiperglikemię płodów, co jest przyczyną insulinowej otyłości płodu, urodzonego przez te matki. Badania nad metabolizmem glu-

Tab. 2. Masa ciała i wybrane hormony w surowicy krwi nowo narodzonych prosiąt grupy kontrolnej i doświadczalnych $\bar{x} \pm SE$, (n = 10)

Badany parametr	Kontrola		AKG		AKG + Dex		Dex	
Masa ciała (g)	1270 ^a	82	1680 ^b	74	1650 ^b	79	1560 ^b	98
Hormon wzrostu (pg/ml)	7,26 ^a	0,24	7,08 ^a	0,18	7,90 ^b	0,28	7,22 ^a	0,24
Kortyzol (µg/ml)	23,10 ^a	2,62	40,20 ^b	6,55	34,20 ^{ab}	7,32	53,80 ^b	3,27
Insulina (µIU/ml)	2,76 ^{ab}	0,60	2,25 ^a	0,24	2,80 ^{ab}	0,32	2,97 ^b	0,20
IGF I (µg/ml)	205 ^a	28,20	286 ^b	19,60	196 ^a	27,50	189 ^a	23,50

Objaśnienie: a, b, c, d – istotność przy $p < 0,05$

kozy u ciężarnych szczurów wykazały, że dieta bogata w białko jest ważnym czynnikiem modulującym metabolizm ogólny w późnym okresie ciąży i aminokwasy mogą potencjalnie podnosić syntezę glukozy nawet o 40% (7). Alfa-ketoglutaran, łącząc procesy transaminacji z glukoneogenezą, mógł również wywołać ten efekt anaboliczny u płodów. Alfa-ketoglutaran jest donorem energii w organizmie oraz pełni rolę zmiatacza jonów amonowych przez ich transformację do glutamianu w wątrobie oraz jest prekurorem aminokwasów i ketokwasów (15, 18).

Wyniki badań nad deksametazonem podawanym ciężarnym małpom wykazały wzrost insuliny w surowicy krwi płodu już po jednej niskiej dawce (9). Insulina jako hormon białkowy nie przenika przez łożysko z organizmu matki do płodu. W łożysku obecne są insuliny, które rozkładają insulinę matki, ale np. płód ludzki już po 12. tygodniu życia płodowego sam zaczyna syntetyzować i uwalniać insulinę, której stężenie jest zarówno odzwierciedleniem stężenia glukozy we krwi płodu, jak też stężenia glukozy we krwi matki (12). Hiperglikemiczny stan płodów w okresie prenatalnym uwarunkowany hiperglikemią matki wykazuje anaboliczno-wzrostowy efekt obserwowany nie tylko w grupie prosiąt stymulowanych przez egzogenne glikokortykoidy.

Działanie prenatalne deksametazonu wyzwolone jego podawaniem maciorom zwiększyło u prosiąt nowo narodzonych poziom kortyzolu w surowicy krwi, który wynosił 53,8 µg/ml w porównaniu z grupą kontrolną, w której stwierdzono poziom 23,1 µg/ml. Istotnie wyższe stężenie kortyzolu odnotowano także w grupie AKG prosiąt, którego wartość średnia wynosiła 40,2 µg/ml. W pierwszym i drugim trymestrze łożyskowa 11β-dehydrogenaza steroidowa katalizuje reakcje, w której matczyne kortyzol jest przekształcany w biologicznie nieaktywny metabolit, jakim jest kortyzon (13). Stężenie kortyzolu po stronie matki jest trzykrotnie wyższe w porównaniu ze stężeniem we krwi płodu. Oś podwzgórzowo-przysadkowo-nadnerczowa u płodu ma ograniczoną zdolność wpływu na syntezę kortyzolu, a jednak istnieje silny wpływ poziomu matczyne kortyzolu na funkcjonowanie tej osi w okresie prenatalnym. Chociaż kortyzol uczestniczy w mechanizmach prowadzących do porodu, to nadmiar glikokortykoidów wywiera negatywny wpływ na rozwój płodu (14). Egzogenne glikokortykoidy przyspieszają poza tym rozwój i dojrzewanie takich narządów, jak płuca, wątroba, nerki i jelita, a efekty neonatalnego i postnatalnego ich działania są dość dobrze poznane, mimo że postnatalne następstwa prenatalnej terapii przy wyłącznym stosowaniu deksameta-

zonu lub alfa-ketoglutaranu bądź w łącznym ich podawaniu u nowo narodzonych prosiąt w odniesieniu do regulacji hormonalnej są całkowicie niepoznane.

Poznanie procesów dojrzewania i regulacji hormonalnej u płodu świni w uwarunkowaniu od glikokortykoidów i metabolitów trawienia oraz przemian metabolicznych i hormonalnych stwarza możliwości prowadzenia nowych badań w dziedzinie neonatologii na gatunku i modelu biologicznie podobnym i najbliższym człowiekowi.

Możliwość wpływu na regulację procesami hormonalnymi w okresie prenatalnym poprzez podawanie czynników aktywnych biologicznie ciężarnej samicy w ostatnich tygodniach ciąży mogłaby przyspieszyć rozwój i dojrzałość prosiąt w okresie neonatalnym.

Piśmiennictwo

- Egerman R., Anderson R., Umstot E., Carr T., Sibai B.: A comparison of the bioavailability of oral and intramuscular dexamethasone in women in late pregnancy. *Obstetr. Gynecol.* 1997, 189, 276-280.
- Graham T. E., Sgro V., Friars D., Gibala M. J.: Glutamate ingestion: the plasma and muscle free amino acid pools of resting humans. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2000, 278, E83-E89.
- Godfrey K. M.: The role of the placenta in fetal programming—a review. *Placenta* 2002, 23, S20-S27.
- Hammarqvist F., Wernerman J., Ali R., Vinnars E.: Effects of an amino acid solution enriched with either branched chain amino acids or ornithine-α-ketoglutarate on the postoperative intracellular amino acid concentration of skeletal muscle. *Br. J. Surg.* 1990, 77, 214-218.
- Hixt U., Muler H. J.: L-alanyl-glutamine – a glutamine dipeptide for parenteral nutrition. *Environmental Health Perspectives* 1996, 12, 72-76.
- Javaid M. K., Godfrey K. M., Taylor P., Shore S. R., Breier B., Arden N. K., Cooper C.: Umbilical venous IGF-I concentration, neonatal bone mass and body composition. *J. Bone Miner. Res.* 2004, 19, 56-63.
- Jimenez-Gancedo B., Agis-Torres A., Lopez-Oliva M. E., Munoz-Martinez E.: Dietary protein concentration correlates in a complex way with glucose metabolism and growth performance in pregnant rats. *Dom. Anim. Endocrinol.* 2004, 26, 277-289.
- Jones C., Palmer A., Griffiths R.: Randomized clinical outcome study of critically ill patients given glutamine-supplemented enteral nutrition. *Nutrition* 1999, 15, 109-116.
- Kay H. H., Bird I. M., Coe C., Dudley D. J.: Antenatal steroid treatment and adverse fetal effects: what is the evidence? *J. Soc. Gynecol. Invest.* 2000, 7, 269-278.
- Kristensen N. B., Jungvid H., Fernandes J. A., Pierzynowski S. G.: Absorption and metabolism of alpha-ketoglutarate in growing pigs. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 2002, 86, 1-7.
- Lackey B. R., Gray S., Henricks D. M.: The insulin-like growth factor (IGF) system and gonadotropin regulation: actions and interactions. *Cytokine Growth Factor Rev.* 1999, 10, 201-217.
- Nissim I.: Newer aspects of glutamine/glutamate metabolism: the role of acute pH changes. *Am. Physiological Soc.* 1999, F493-F497.
- Petraglia F., Micheroux A., Florio P., Salvatori M., Gallinelli A., Cela V., Palumbo M. A., Genazzani A. R.: Steroid-protein interaction in human placenta. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 1995, 53, 227-231.
- Sun K., Yang K., Challis J. R. G.: Glucocorticoid actions and metabolism in pregnancy: implications for placental function and fetal cardiovascular activity. *Placenta* 1998, 19, 353-360.
- Śliwa E., Kowalik S., Tatara M. R., Studziński T.: Effect of maternal administration of dexamethasone during last weeks of pregnancy on foetal skeletal system in pigs. *Bull. Vet. Inst. Pulawy* 2004, 48, 449-452.
- Thakur A., Sase M., Lee J. J., Thakur V., Buchmiller T. L.: Effect of dexamethasone on insulin-like growth factor-1 expression in a rabbit model of growth retardation. *J. Pediatr. Surg.* 2000, 35, 898-905.
- Waters M. J., Kaye P. L.: The role of growth hormone in fetal development. *Growth Hormone IGF Res.* 2002, 12, 137-146.
- Wren M., Permert J., Larsson J.: α-Ketoglutarate-supplemented enteral nutrition: effects on postoperative nitrogen balance and muscle catabolism. *Nutrition* 2002, 18, 725-728.

Adres autora: dr Ewa Śliwa, ul. Akademicka 12, 20-950 Lublin; e-mail: ewaRST@interia.pl