

**ANTENATALIS STEROID TERÁPIA ANYAI ÉS  
MAGZATI HATÁSAINAK VIZSGÁLATA**

**PhD értekezés tézisei**

**Dr. Lányi Éva**

**Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika  
Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar**

**Témavezető : Dr. Szabó István**

**2008**

**Pécs**



## 1. Összefoglalás

Az antenatalis steroid terápia hatékonysága a koraszülöttek Respirációs Distress Szindrómájának (RDS) megelőzésében bizonyított, az ezzel kapcsolatos protokoll kidolgozott, s minden részletében evidenciákon alapul. A glükokortikoidok prenatális szerepével kapcsolatban azonban egyre világosabban látszik, hogy a hatás nem korlátozódik pusztán a tüdőre, azaz egyre inkább beszélhetünk a glükokortikoidoknak a prenatális időszakban kifejtett „hormonális imprinting” hatásáról.

Az értekezés első része, mely a humán főtális tüdő glukokortikoid recepciójának kialakulásával foglalkozik, mai szemmel nézve nem tartalmaz tudományos újdonságot, egyetlen érdeme, hogy „kiállta az idő próbáját”, azaz korszerűbb módszerekkel megerősítést nyert.

Az értekezés második része azonban egy viszonylag új peptid, a ghrelin lehetséges szerepével foglalkozik, egy relatíve új megvilágításból. A ghrelinnek a táplálkozás szabályozásában betöltött szerepéről jelentős mennyiségű irodalmi adat áll rendelkezésre, azonban kevés adat van a humán placentában is termelődő hormonnak a reprodukcióban játszott szerepével kapcsolatban. Hiányosak az adatok a korai magzati élet alatti ghrelin koncentrációkról, arról, hogy a feto-placentáris egység mely kompartmentjében játszódik le a ghrelin acylációja, s hogyan viszonyul egymáshoz az un. acylált ghrelin és a totál ghrelin mennyisége az anyában és a magzatban. További tisztázatlan kérdés a ghrelinnek a hypothalamo-hypophyseo-adrenális tengely mentén kifejtett hatása, azaz a glukokortikoidok és a ghrelin kapcsolata. Jelen kutatás a fenti kérdések megválaszolásához kíván adatokat szolgáltatni.

## 2. Bevezetés

Az antenatalis cortisosteroidokat Liggins and Howie vezette be a human prenatalis medicinába 1972-ben. Azóta számos randomizált kontroll vizsgálat és ezek meta-analízise erősítette meg az antenatalis steroid kezelés hatékonyságát és 1994-ben az amerikai National Institutes of Health konszenzusos ajánlásává lépett elő ennek rutin használata a 24-34 gestációs hét között született újszülöttek esetében. Magyarországon Szabó és munkatársai elsők között kezdték alkalmazni a steroid profilaxist fenyegető koraszülések esetén, s számoltak be rövid és hosszú távú követéses vizsgálatokról a glükokortikoid kezeléssel kapcsolatban.

A klinikai vizsgálatok arra is egyértelmű választ adtak, hogy az antenatalis corticosteroid terápiának nem csupán a tüdő fejlődésére van hatása, hanem csökkenti az intraventriculáris hemorrhagia, valamint a necrotizáló enterocolitis gyakoriságát is, elsősorban az extrém alacsony súlyú újszülöttekben.

Nincs bizonyíték arra vonatkozóan, hogy az ismételt dózisok növelnék a hatékonyságot, azonban hosszú távú hatásként leírták, hogy 14 éves követéses vizsgálat után mind a systolés, mind pedig a dyastolés vérnyomás emelkedettebb volt azoknál, akik ismételt dózisokat kaptak.

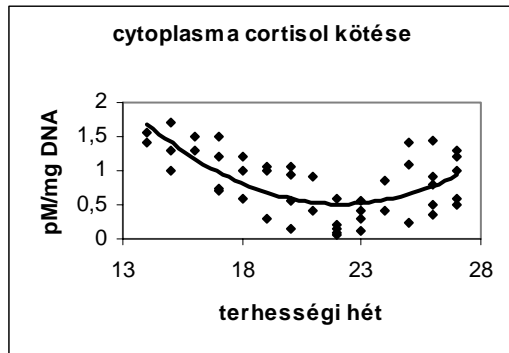
Annak ellenére, hogy évtizedeken keresztül halmozódtak adatok mind a klinikai, mind pedig az alap kutatások szintjén, a glükokortikoid-indukálta tüdő érés pontos mechanizmusa a mai napig nem ismeretes.

Mai tudásunk szerint az antenatalis corticosteroidok legfőbb hatása a tüdő anatómiai fejlődésének programozása, s ehhez képest csupán addicionális és rövid távú hatás a surfactant szintézisének serkentése.

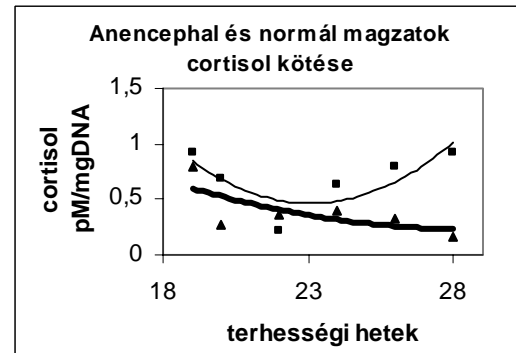
Az általunk vizsgált terület egyrészt a humán főtális tüdő cortisol recepciójának fizikokémiai jellemzése volt, másrészt annak igazolása, hogy a hypothalamo-hypophyseoadrenalis tengely épsége szükséges a normál tüdő steroid recepciójának kilakulásához.

A humán főtális tüdő cortisol recepcióját a terhesség 14-28. hete között vizsgáltuk, az akkori standardok szerint abortusként definiált főtusokban. Vizsgálataink bizonyították, hogy magas affinitású, specifikus és telíthető cortisol receptorok vannak jelen a tüdőben, s indirekt bizonyítékot szolgáltatott arra vonatkozóan, hogy nem minden sejttípus glükokortikoid célsejt. A tüdő celluláris proliferációja a 22-24. hétre befejeződik, ez az a periódus, melyben a canaliculáris fejlődési fázist felváltja a sacculáris fázis. A csökkenő

receptor koncentráció az intenzív sejtproliferációt jelzi. Mivel nem minden sejttípus glükokortikoid célsejt, a sejtproliferációval szinkron csökken az egységnyi DNA-ra vonatkoztatott receptorszám.(1.ábra)



1.Ábra Humán főtális tüdő cytoplasmatiskus cortisol receptió n=47, Spearman k= 0.015



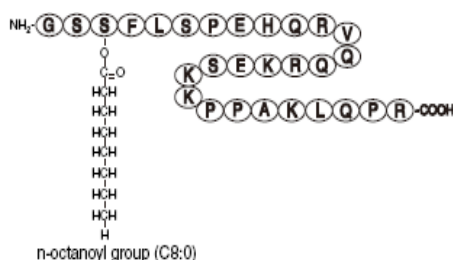
2.Ábra Anencephal (▲) n=9 és normál (■)n= 18 magzati tüdők cortisol receptor átlagértékei

Az anencephal magzatok vizsgálata pedig megerősítette, hogy a hypothalamo-hypophyseo-adrenalis tengely működésének sérülése befolyásolja a magzati tüdő cortisol receptiójának fejlődését . (2.ábra)

Két évtizeddel később jelent meg egy cikk, mely 7-40 gestációs hétre született főtusok tüdejének neuroendokrin sejtjeiben egy új peptid, a ghrelin immunoreaktivitását mutatta ki, s kereste azt a „cut off” pontot a terhességi hetekben, mely szignifikáns különbséget produkál az immunoreaktivitás mértékében. Ez a pont a 18-20 hétre esett, mely a pseudoglanduláris és canaliculáris fázist elválasztó időpont. A vizsgálat azt mutatta, hogy a főtális tüdő neuroendokrin sejtjei olyan mértékben expresszálják a ghrelint, mint a gyomor oxyntic mucosa sejtjei, a főtális tüdő tehát bizonyosan az egyik forrása a ghrelinnek .

A ghrelin-t 1999-ben fedezték fel, valójában az addig csak mesterséges molekulákként létrehozott growth hormone secretagogues (GHS) molekulák után megtalálták a receptor endogén ligandját.

## Ghrelin szerkezete



A ghrelin egy 28 aminosavból álló peptid, melynek N-terminális végén, a 3-as pozícióban lévő serin aminosavhoz kapcsolódik egy octánsav. Ez a tulajdonság adja a peptid egyelőre unikális jellegét, ez ugyanis az első olyan bioaktív peptid, melyhez egy poszttranszlációs mechanizmus során szerves sav kapcsolódik, ezt a formát hívjuk acylált ghrelinnek, vagy aktív ghrelinnek. A ghrelin elsődleges termelődési helye a gyomor, azonban kisebb mértékben, de termeli a bélrendszer, a pancreas, a hypophysis, a hypothalamus és a placenta. A főtáplis élet alatt azonban a gyomor után a tüdő neuroendokrin sejtjeinek és a pancreas insulin termelő B sejtjeinek a legnagyobb a ghrelin expresszálo képessége.

Bár az eredeti felfedezés alapja az acylált ghrelin GH release hatása volt, azonban a ghrelinnek számos egyéb perifériás, endokrin és non-endokrin hatása is van. A GHS receptor (GHS-R) klónozása utáni funkcionális vizsgálatokból kiderült, hogy a ghrelin receptornak két szubtípusa van. A GHS-R1a, mely az evolúció során egy feltűnően konzervált struktúra, és az elülső hypophysis, a hypothalamus bizonyos területei, a hippocampus valamint a substantia nigra tartalmazzák, továbbá a perifériás szövetek közül a szív, a mellékvese és a pajzsmirigy. Ehhez a receptorhoz a ghrelinnek csak az acylált formája képes kötődni. A másik szubtípus a GHS-R1b, mely egy rövidebb izoform, és számos perifériás szövetben megtalálható, s a ghrelinnek a nem acylált formáját köti. Az a tény, hogy maga az acyláció megváltoztatja a hormon receptorhoz való kötésének képességét, valamint a vér-agy gáton való átjutását, erősíti azt az elképzelést, hogy a ghrelin felfedezése kapcsán nem csupán egy új biológiailag fontos peptidet ismertünk meg, hanem egy eddig ismeretlen jelenséget is. A ghrelin az első olyan biológiailag aktív peptid, melynek acylációja bizonyítottan befolyásolja a peptid hatását ill. hatásának helyét.

Számos hypothalamikus peptid képes étvágy stimulálásra centrális adagolás után, azonban ezek a peptidek hatástalanok, ha perifériásan adják őket. A ghrelin az első olyan peptid, mely szisztémás adás után is képes evést provokálni, vagyis étvágyat stimulálni.

Humán kísérletekben is bizonyítást nyert a ghrelin étvágyat és kalóriefelvételt serkentő hatása, s ez a hatás független a GH-release hatástól. Általánosabban megfogalmazva, ha pozitív energia-egyensúly állapotában van a szervezet akár akut, (evés) akár krónikus (obesitas) stádiumban, akkor a keringő ghrelin szint csökken, a negatív energia-egyensúly állapotában pedig, akár akut (éhezés), akár krónikus (anorexia) stádiumban, a ghrelin szint emelkedik.

A ghrelint, mint placenta eredetű hormont humán placentában 2001-ben írták le először, majd igazolták a GHS-R1b típusú, a ghrelin acylációját nem igénylő receptor mRNA jelenlétét is.

Humán köldökvérben is kimutatható a keringő ghrelin jelenléte, azonban annak eredetéről az irodalomban ellentmondó adatok láttak napvilágot. Az a kérdés, hogy a főként keringő ghrelin anyai, magzati vagy placentáris eredetű-e, jelenleg egyértelműen nem megválaszolható, továbbá az sem egyértelmű, hogy az acylálás lejátszódik-e valamennyi kompartmentben.

Magasabb umbilicális ghrelin koncentrációt találtak kis súlyú újszülöttekben a normál súlypercentillel születettekhez képest, és alacsonyabbat a relatíve magas súllyal születettekben. A kis súllyal születettek gyorsult növekedése régóta ismert jelenség, bár az emögött álló fiziológiai mechanizmus ismeretlen.

A ghrelinnek a terhesség alatti szerepét állatkísérletes modellen is vizsgálták. Patkánykísérletben igazolható volt, hogy az acyl-ghrelin az anyának adagolva képes a placentán való átjutásra, s krónikusan adagolva növeli a fötus születési súlyát akkor is, ha az anya kalóriabevitelét a kontroll csoport szintjén tartották. Ez a hatás a des-acyl ghrelinnel nem volt elérhető.

A ghrelin GH-release melletti további neuroendokrin hatása az ACTH release. Az acylált-ghrelin adása utáni ACTH-releaset humán kísérletekben is igazolták az ennek megfelelő cortisol szint emelkedéssel együtt. A cortisol diurnális ritmusával ellentétesen változik ugyanakkor az acylált-ghrelin koncentrációja folyamatos éhezés kapcsán. Ez felveti annak a lehetőségét, hogy létezik egy feed-back mechanizmus a hypothalamo-hypophyseo-adrenális tengely mentén, bár ennek pontos helyét és mechanizmusát nem ismerjük. A glukokortikoidok és a ghrelin összefüggése még korántsem tisztázott, bár vannak állatkísérletes adatok a glukokortikoidoknak a ghrelin mRNA expresszióra kifejtett direkt hatásáról gyomor és hypophysis vonatkozásában.

### **3. Célkitűzések**

1. Steroid profilaxisban részesült anyák és magzataik serum biomarkereinek mérése közvetlenül a szülés után: acyl-ghrelin, total-ghrelin, leptin, insulin, glukóz, GH, cortisol
2. Multivariációs regressziós analízissel korreláció vizsgálat az anthropometriai adatok, a steroid profilaxis ideje, valamint a meghatározott biomarkerek között.

### **4. Betegek és módszerek**

#### **4.1 Betegek**

A vizsgálatba bevont terhesek 25-35 gestációs hét közöttiek voltak, akiknél valamilyen ok miatt koraszülés következett be. Azokat a terheseket, akiknél pre-eclampsia, hipertenzió vagy diabetes volt igazolható, a vizsgálatból kizártuk. Irodalomból ismert, hogy ezen faktorok befolyásolhatják a keringő ghrelin szinteket. Három esetben volt ikerterhesség, mindhárom esetben közös placentával, és nyolc esetben volt császármetszés. A császármetszést, mint külön csoportképző tényezőt vizsgálva nem találtunk eltérést egyik mért paraméter vonatkozásában sem.

Valamennyi anya steroid profilaxisban részesült, a steroid adása és a születés között eltelt idő 10 órától 7 napig változott, a statisztikai számításoknál ezt, mint korrekciós faktort szerepeltettük.

Az anthropometriai adatok tartalmazták a placenta súlyokat, valamint a magzatok súlyát, hosszát, fejkörfogatát. Csak azok a magzatok szerepeltek a végső vizsgálati protokollban, akiknek a születési súlyuk megfelelt a gestációs hétnek. A magyar standard alapján megállapított születési súly átlagtól kevesebb mint 1.5 SD-vel való eltérést vettünk csak figyelembe. Mindezen szempontok érvényesítése után 26 koraszülött és 23 anya vizsgálati mintáját elemeztük.



## **4.2. Laboratóriumi módszerek**

A minta vétele az anyától a cubitális vénából, a magzattól a köldökvénából történt. A vérmintát EDTA-t és aprotinint tartalmazó csövekbe gyűjtöttük, azt azonnal jégbe tettük, s egy órán belül megtörtént a plazma leválasztása, aliquotokban eltéve azokat -70C-ra. Az acylált ghrelin, totál ghrelin, valamint a leptin mérése Linco USA Res. Inc. RIA KIT-el, a cortisol, az insulin és a GH mérése az Isotope Inst. Kft. Hungary RIA ill. IRMA KIT-el történt. A glukóz mérésére hexokinase módszert használtunk.

## **4.3 Statisztikai módszerek**

A korreláció vizsgálatát Spearman féle korreláció számítással végeztük valamint a Multivariációs Regressziós analízis „stepwise” modelljét alkalmaztuk. Valamennyi statisztikai számítást az SPSS 11.5 (SPSS Inc. Chicago, IL, USA) software segítségével végeztük, a  $p \leq 0.05$  szintet tekintettük statisztikailag szignifikánsnak.

# **5. Eredmények**

## **5.1 Anthropometriai adatok és hormonális paraméterek**

Nem találtunk korrelációt az antropometriai paraméterek valamint a hormonális paraméterek között. Szignifikáns korrelációt találtunk a placenta súlyok és a magzati acylált ghrelin szintek ( $r=0.396$ ,  $p=0.045$ ), valamint a placenta súlyok és a magzati GH szintek ( $r=0.483$ ,  $p=0.008$ ) között. ( I. Táblázat)

I.Táblázat Spearman-féle korrelációs koefficiens értéke a vizsgált hormonok, glukóz, valamint az anthropometriai paraméterek között magzati vérben \*  $p < 0.05$

	Acyl-ghrelin	Total ghrelin	Cortisol	Inzulin	Glukóz	Leptin	GH
Gestációs hét	0.266 p=0.190	-0.221 p=0.268	0.480 p=0.010*	0.131 p=0.498	0.005 p=0.980	0.362 p=0.075	-0.195 p=0.310
Születési súly	0.038 p=0.855	-0.104 p=0.604	0.422 p=0.025	0.247 p=0.196	0.008 p=0.968	0.334 p=0.103	-0.304 p=0.109
Placenta súly	0.396 <b>p=0.045*</b>	0.158 p=0.431	0.149 p=0.448	0.171 p=0.375	-0.161 p=0.422	0.085 p=0.685	0.483 <b>p=0.008*</b>
Acyl-ghrelin	1.00	0.050 p=0.812	0.547 <b>p=0.005*</b>	0.004 p=0.984	0.213 p=0.306	0.076 p=0.737	-0.009 p=0.966
Total Ghrelin		1.00	0.260 p=0.200	0.039 p=0.846	0.154 p=0.453	-0.243 p=0.264	-0.234 p=0.239
Cortisol			1.00	-0.040 p=0.841	0.254 p=0.201	-0.029 p=0.890	0.035 p=0.861
Inzulin				1.00	0.509 <b>p=0.007*</b>	0.184 p=0.379	-0.367 <b>p=0.050*</b>
Glukóz					1.00	-0.083 p=0.700	-0.031 p=0.878
Leptin						1.00	-0.267 p=0.197
GH							1.00

## 5.2 Anyai és magzati hormonális paraméterek

Az acylált- és totál ghrelin valamennyi mintában detektálható volt. A II. táblázat tartalmazza az anyai és a magzati vizsgált hormonok koncentrációit, valamint azok statisztikai összehasonlítását.

II. Táblázat Anyai és magzati hormon koncentrációk

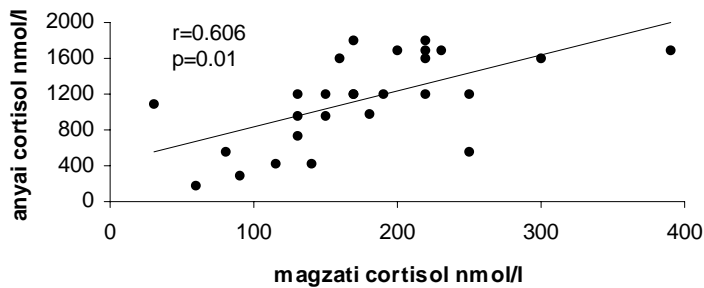
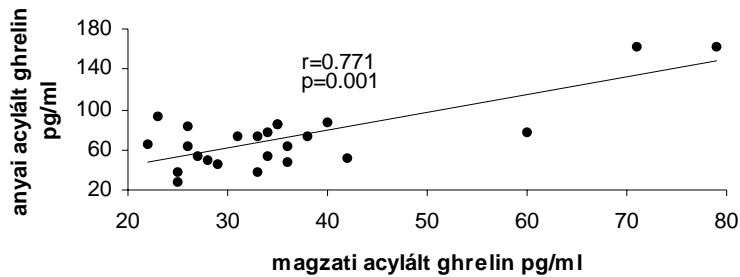
	Any (n=23)	Magzat (n=26)
Acyl-ghrelin (pg/ml)	73.1±33.1	36.5±14.6*
Total ghrelin (pg/ml)	295.9±41.3	611.9±183.2*
Cortisol (nmol/l)	1082.6±528.8	174.1±74.6*
Inzulin (mU/l)	44.2±43.5	15.4±15.6*
Glukóz (mmol/l)	7.4±2.3	5.6±1.2*
Leptin (ng/ml)	28.9±13.3	0.86±0.76*
GH (µg/l)	2.6±3.8	60.2±33.2*

n=esetszám, az adatok átlag±S.D. formájában vannak feltüntetve, \*  $p < 0.01$  Mann-Whitney teszt

Az acylált ghrelin koncentrációja magasabb volt az anyában, mint a magzatban ( $73.1 \pm 33.1$  vs  $36.5 \pm 14.6$  pg/ml,  $p < 0.01$ ), továbbá korreláció volt az anyai és a magzati acylált ghrelin koncentrációk között (3.ábra  $r = 0.771$ ,  $p = 0.001$ ).

A totál ghrelin koncentráció a magzatban szignifikánsan magasabb volt ( $611.9 \pm 183.2$  vs  $295.9 \pm 41.3$  pg/ml  $p < 0.01$ ), azonban nem volt korreláció az anyai és a magzati koncentrációk között.

3.Ábra Anyai és magzati acylált ghrelin, valamint cortisol értékek közötti korreláció



### 5.3.3 Korreláció a hormonális paraméterek között

A magzati hormonális és anthropometriai paraméterek bivariációs korreláció vizsgálata során (I.táblázat) szignifikáns korrelációt találtunk a köldökvér acylált ghrelin és cortisol értékei között ( $r = 0.547$ ,  $p = 0.005$ ). A total ill. acylált ghrelin szintek semmilyen más hormonális paraméterrel nem korreláltak a magzatban.

Az anya hormonális paramétereinek bivariációs korrelációvizsgálata (III.Táblázat) során negatív korrelációt találtunk a totál ghrelin és a glukóz anyai koncentrációi között ( $r=-0.577$ ,  $p=0.003$ ), valamint a totál ghrelin és az insulin szintek között ( $r=-0.510$ ,  $p=0.008$ ). Az acylált ghrelin szintek az anyában nem korreláltak egyetlen vizsgált hormonális paraméterrel sem.

III. Táblázat Spearman-féle korrelációs koefficiens értéke a vizsgált hormonok és glukóz között az anyai vérben \*  $p<0.05$

	Acyl-ghrelin	Total ghrelin	Cortisol	Inzulin	Glukóz	Leptin	GH
Acyl-ghrelin	1.00	-0.290 $p=0.169$	-0.019 $p=0.930$	0.165 $p=0.452$	0.101 $p=0.656$	-0.175 $p=0.425$	-0.066 $p=0.759$
Total ghrelin		1.00	0.096 $p=0.641$	-0.510 <b><math>p=0.008^*</math></b>	-0.577 <b><math>p=0.003^*</math></b>	0.215 $p=0.291$	0.131 $p=0.516$
Cortisol			1.00	0.035 $p=0.865$	0.229 $p=0.271$	-0.396 <b><math>p=0.041^*</math></b>	0.027 $p=0.893$
Inzulin				1.00	0.772 <b><math>p=0.0001^*</math></b>	0.047 $p=0.820$	0.087 $p=0.665$
Glukóz					1.00	-0.020 $p=0.924$	0.005 $p=0.981$
Leptin						1.00	-0.121 $p=0.547$
GH							1.00

Azonban, mint az a 3. ábrán látható, szignifikáns univariációs korrelációt találtunk az anyák és magzataik acylált ghrelin koncentrációja között ( $r=0.771$ ,  $p=0.001$ ), valamint az anyai és magzati cortisol koncentrációk között ( $r=0.606$ ,  $p=0.01$ ). Az anyai és magzati cortisol koncentrációk közötti korreláció megmaradt akkor is, ha a korrigáltuk a modellt az utolsó betamethason injekció óta eltelt idővel.

### 5.3.4 Multivariációs Regressziós Analízis

Az univariációs regressziós analízisek után a „stepwise” multivariációs regressziós modellt alkalmaztuk. Először a Spearman-féle korrelációvizsgálattal a keresztkorrelációkat is megnéztük, azaz a vizsgált hormonok vonatkozásában az anya és a magzat paramétereit szerepeltettük egymással szemben.(IV.Táblázat)

IV. Táblázat Spearman-féle korrelációs koefficiens értéke az anya és magzat között  
\*p<0.05

anya magzat	Acyl- ghrelin	Total ghrelin	Cortisol	Inzulin	Glukóz	Leptin	GH
Acyl- ghrelin	0.771 <b>p=0.001*</b>	-0.176 p=0.390	0.368 p=0.070	0.156 p=0.457	0.296 p=0.151	0.191 p=0.360	0.084 p=0.683
Total ghrelin	-0.342 p=0.101	0.187 p=0.350	0.363 p=0.069	0.155 p=0.450	0.132 p=0.520	-0.143 p=0.486	0.036 p=0.859
Cortisol	0.061 p=0.770	-0.186 p=0.342	<b>0.606</b> <b>p=0.01*</b>	-0.095 p=0.637	0.369 p=0.053	-0.230 p=0.238	-0.082 p=0.679
Inzulin	0.144 p=0.482	-0.296 p=0.120	0.020 p=0.921	0.279 p=0.151	<b>0.390</b> <b>p=0.040*</b>	0.140 p=0.476	-0.178 p=0.356
Glukóz	0.023 p=0.915	-0.431 <b>p=0.025*</b>	-0.029 p=0.887	0.141 p=0.493	<b>0.618</b> <b>p=0.001*</b>	0.306 p=0.121	0.186 p=0.353
Leptin	0.119 p=0.599	0.068 p=0.748	-0.233 p=0.263	-0.244 p=0.251	-0.180 p=0.390	0.325 p=0.134	-0.178 p=0.356
GH	0.067 p=0.743	0.078 p=0.687	-0.159 p=0.420	-0.143 p=0.469	-0.132 p=0.504	0.070 p=0.722	0.283 p=0.137

Ezután a multivariációs regressziós modellt úgy építettük fel, hogy a függő változók voltak a magzati ill. az anyai acylált- és totál ghrelin. Valamennyi változó szerepelt a modellben, melyre az univariációs korrelációs vizsgálatban szignifikáns korrelációt kaptunk, s a „stepwise” modell lényegéből fakad, hogy a modell nem súlyozza a beléptetett független változókat, hanem a korreláció erősségének csökkenése esetén az újonnan beléptetett változót kiejti a modellből.

A vizsgálat végeredménye, hogy az anyai acyl-ghrelin ill. a magzati totál ghrelin, mint függő változó esetében nem találtunk független prediktort. Azonban a magzati acylált-ghrelin ill. az anyai totál ghrelin esetében független prediktort találtunk.(V.Táblázat) Ekkor a vizsgálatba bevont változók a placenta súly, az anyai acyl-ghrelin, a magzati cortisol, továbbá az anyai glukóz, anyai insulin és a magzati glukóz voltak.

A magzati acyl-ghrelin független prediktora az anyai acyl-ghrelin ( $\beta=0.733$ ,  $p=0.0001$ ), valamint a magzati cortisol ( $\beta=0.286$ ,  $p=0.038$ ) voltak. Az anyai totál ghrelin egyetlen független prediktora az anyai glukóz volt ( $\beta=0.467$ ,  $p=0.019$ ).

V.Táblázat Multivariációs regressziós modell, magzati acyl-ghrelin és anyai totál ghrelin, mint függő változók,  $\beta$ =regressziós együttható, \* $p < 0.05$

	Magzati acyl-ghrelin	Anyai totál ghrelin
	$R^2=0.639$	$R^2=0.184$
Anyai acyl-ghrelin	$\beta=0.733, p=0.0001$	
Magzati cortisol	$\beta=0.286, p=0.038$	
Anyai glukóz		$\beta=-0.467, p=0.019$

## 6. Eredmények összefoglalása

A ghrelint mint GH release-t okozó hormont fedezték fel és ismert, hogy a terhesség előrehaladásával a placentárisan termelődő GH mennyisége nő. Mi szintén korrelációt találtunk a placenta súly és a magzati GH szintek között. Azonban a ghrelin és a GH keringő szintjének korrelációjáról ellentmondásos adatok állnak rendelkezésre. Ennek egyik lehetséges oka, hogy a totál ghrelin szint vizsgálata nem feltétlenül tükrözi az aktuális acylált ghrelin koncentrációját, ugyanakkor a GH release aktivitás az acylált ghrelinhez köthető. Vizsgálataink ezért párhuzamosan mérték a totál és az acylált ghrelin koncentrációkat, azonban másokhoz hasonlóan szintén nem támasztották alá azt a feltételezést, hogy a terhesség alatti magas GH koncentrációk létrejöttében a ghrelinnek szerepe lenne.

Azonban szignifikáns korrelációt találtunk a főtusok keringő acylált ghrelin szintje és a placenta súly között. Ez ellentmondásban van Yokota és társai által leírtakkal, akik inverz korrelációt találtak a köldökvér acylált ghrelin szintje és a placenta súly között. Azonban ebben a vizsgálatban csak időre született magzatokat vizsgáltak, továbbá nem volt kizáró ok, ha a születési súly nem felelt meg a gesztációs kornak. Ismert azonban, hogy a gesztációs korhoz képest kis súlyú újszülöttek ghrelin szintje magasabb. További vizsgálatok szükségesek annak tisztázására, vajon a placenta szerepet játszik-e az acyláció folyamatában a gesztáció folyamán.

Másokhoz hasonlóan mi sem találtunk korrelációt az anyai és a magzati totál ghrelin koncentráció között, azonban az acylált ghrelin koncentrációk között szignifikáns összefüggést mutattunk ki. Elképzelhető, hogy az acylált ghrelin átjut a placentán, mint

azt patkányban Nakahara és munkatársai igazolták. A placenta súly és az acylált ghrelin közötti koreláció pedig felveti annak a lehetőségét, hogy a placenta szerepet játszhat az acyláció folyamatában.

A ghrelinnek a táplálék-felvételben, az étvágy szabályozásában, valamint az insulin secretióban játszott szerepe az irodalomban jól dokumentált. A totál ghrelin és a glukóz, valamint a totál ghrelin és az insulin közötti negatív korelációt az anyai oldalon mi is igazoltuk. Farquhar és munkatársa ezt az összefüggést a köldökvér ghrelin és glukóz koncentrációja között is kimutatták. A mi vizsgálatunkban az anyai diabetes kizáró ok volt, az említett vizsgálatban a gesztációs diabetes nem szerepelt kizáró okként, ez magyarázhatja az eltérő eredményeket.

A leptin és a ghrelin egymással ellentétes hatása a táplálékfelvétel szabályozásában ismert. A leptin a köldökvérben már a gesztáció második trimeszterétől detektálható, és pozitív koreláció figyelhető meg az időre született magzatoknál a születési súly és a leptin szint között. Ez látszólag ellentmond a saját adatainknak, tekintettel arra, hogy nem találtunk korelációt a köldökvér leptin szintjével egyik vizsgált paraméter esetében sem. Azonban a placenta által termelt leptin 98%-a az anyai oldalon jelenik meg, így a magzati vérben jelenlévő leptin majdnem teljes egészében a főtális sejtek által termelődik. Az általunk vizsgált gesztációs kor valószínűen olyan korai volt, hogy ekkor még a magzat által termelt leptin szintek alacsonyak. Ezt látszik alátámasztani az a tény is, hogy a fiúk és a lányok között nem találtunk különbséget, bár ismert, hogy a leptin koncentrációja nemenként eltérő.

A multivariációs regressziós modellel kapott összefüggés a magzati cortisol és az acyl-ghrelin között vizsgálatunk egyik új eredménye. Az anyai és a magzati cortisol koncentrációk közötti különbség átlagosan tízszeres volt, ez megfelel az irodalomban található adatoknak. Vizsgálatunk korlátja az a tény volt, hogy valamennyi terhes betamethasone profilaxisban részesült, tekintettel a magyar RDS profilaxis protokollra. Mivel a betamethason nem szubsztrátja a 11- $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase-2 enzimnek, - mely a cortisolt inaktív cortisonná konvertálja -, az anyai és a magzati koncentrációk a betamethasone vonatkozásában hasonlóak. Ismert továbbá, hogy az anyai prenatalis betamethasone kezelés csökkenti az endogén cortisol szintet egészen addig, míg a szintetikus glukokortikoid a keringésben marad, ez az idő egy hét. Míg a szintetikus glukokortikoidok genomikus potenciálja sokkal magasabb, mint a cortisolé, addig a membrán-receptorhoz köthető, ún. nem klasszikus, non-genomikus hatás a cortisol esetében sokkal erősebb. Ez azt mutatja, hogy nincs szoros összefüggés egy

glukokortikoid klasszikus értelemben vett genomikus hatásának erőssége és az ún. non-genomikus hatás erőssége között. Mivel adataink korrelációt mutatnak az acylált ghrelin és a keringő cortisol között a magzati oldalon, ezért elképzelhető, hogy a cortisol szerepet játszhat magának az acylációnak a folyamatában egy nem klasszikus, membránhoz kötött, non-genomikus glukokortikoid hatás révén.

## **7. Az értekezés új megállapításai**

Jelen tanulmány egyik új megállapítása, hogy a gesztáció vizsgált szakaszában - 25-35 hét – a magzati acylált ghrelin koncentrációja alacsonyabb, mint az anyai koncentráció.

A másik új megállapítás, hogy korreláció van az anyai és a magzati acylált ghrelin koncentrációja között.

A harmadik új megállapítás, hogy a magzati acylált ghrelin a magzati cortisolal mutat korrelációt.

Bár a ghrelin fiziológiai szerepe a terhesség alatt ismeretlen, azonban a placenta súlyával való szoros korreláció támogatja azt a hipotézist, hogy a placenta szerepet játszhat a ghrelin acylációjának folyamatában, s ez a folyamat cortisolal befolyásolható.



## **A doktori értekezés alapjául szolgáló közlemények:**

### *Könyvfejezet:*

1. Szabó I, **Lányi É**, Vértes M, Drozgyik I, Csaba I: Glucocorticoid receptors in human fetal lung. Problems of the fetal lung maturation and of insufficient lung maturity in the newborn (Ed.: I. Cretti) Vol. I. 170-187 1988

### *Közlemények:*

1. Szabó I, Vértes M, Bódis J, **Lányi É**, Sauerhering E: Steroid receptors in human fetal lung Lancet 1980 2 751 IF:9.44

2. Szabó I, **Lányi É**, Vértes M: Human magzati tüdő glükokortikoid receptorai. Magyar Nőorvosok Lapja 1986 49 16

3. Szabó I, **Lányi É**, Szilágyi A, Vértes M, Csaba I: Glucocorticoid receptors in human fetal lung. Gynecology and Endocrinology 1990 4 Suppl.1. 113 IF: 0.43

4. Szabó I, **Lányi É**, Vértes M, Csaba I: Glucocorticoid and oestradiol receptors in human fetal lung. Journal of Perinatal Medicine 1991 119 Suppl. 1. 408 IF: 0.34

5. **Lányi É**, Csernus K, Erhardt É, Tóth K, Urbán B, Lénárd L, Molnár D: Plasma levels of acylated ghrelin during an oral tolerance test in obese children. Journal of Endocrinological Investigation 2007 30(2) 133-137 IF:1.47

6. **Lányi É**, Várnagy Á, Kovács A.K, Cermely T, Szász M, Szabó I: Ghrelin and acyl ghrelin in preterm infants and maternal blood : relationship with endocrine and anthropometric measures. European Journal of Endocrinology 2008 158(1) 27-33 IF:3.14

### *Idézhető abstractok:*

1. Szabó I, **Lányi É**, Vértes M, Csaba I: Glucocorticoid and estradiol receptors in human fetal lung. XI. European Congress of Perinatal Medicine Roma 1988

2. Szabó I, **Lányi É**, Vértes M, Drozgyik I, Csaba I : Glucocorticoid And estradiol receptors in human fetal lung. „Problems of the fetal lung maturation and of insufficient lung maturity in the newborn” Symposium Szczecin 1988

3. Szabó I, **Lányi É**, Szilágyi A, Vértes M, Csaba I: Cortisol and dexamethason receptors in human fetal lung. 2<sup>nd</sup> International Symposium on the surfactant system of the lung: Prevention and treatment of neonatal and adult respiratory distress syndrome. Perugia 1989

4.Molnar D, **Lanyi E**, Csernus K, Erhardt E: Active ghreline levels in childhood obesity. Pediatric Research 2005 58(2) Abstr 255 IF:2.88

**Összesített impakt faktor: 17,7**

*Egyéb közlemények:*

**Lányi É**, Székely J, Vértés M: Effect of PGF<sub>2alfa</sub> treatment on the endometrial oestradiol receptor system. Acta Physiologica Hungarica 1985 66 3-4 IF<sub>1985</sub>:0.18

**Lányi É**, Székely J, Vértés M: The effect of PGF<sub>2alfa</sub> treatment on the endometrial oestradiol receptor system. Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids 1988 31 27-30 IF<sub>1988</sub>:1.10

Rózsai B, **Lányi É**, Soltész Gy: Asymptomatic Bacteriuria and Leukocyturia in Type 1 Diabetic Children and Young Adults. Diabetes Care 2003 26 7 IF<sub>2003</sub>: 7.50

**Lányi É.**: Antibiotikum rezisztencia mechanizmusok a beta-laktam antibiotikumokkal szemben: néhány rezisztencia mechanizmus rutin laboratóriumi kimutatásának aktuális kérdései. Infektológia és Klinikai Mikrobiológia 2004 2 39-46

Csernus K, Erhardt E, **Lányi E**, Molnár D: Effect of childhood obesity on glomerular and tubular protein excretion. Int. J. Obesity Relat Metab Disord 2004 28 (Suppl.1.) 42 IF<sub>2004</sub>:3.46

Csernus K, **Lányi É**, Erhardt É, Molnár D: Effect of childhood obesity and obesity-related cardiovascular risk factors on glomerular and tubular protein excretion. European Journal of Pediatrics 2005 164 44-49 IF<sub>2005</sub>: 1.38

**Lányi É**: Extended Spectrum Beta-laktamáz (ESBL) termelő Klebsiella izolátumok jelentősége. Gyermekgyógyászat 2005 56 457-460

Molnar D, **Lanyi E**, Csernus K, Erhardt E.: Active ghreline levels in childhood obesity. Pediatric Research 2005 58(2) 255 IF:2.88

Rózsai B, **Lanyi E**, Berki T, Soltész Gy: Urinary cytokine response to asymptomatic bacteriuria in type 1 diabetic children and young adults. Pediatric Diabetes 2006 7 153-158 IF<sub>2006</sub>: 2.16

Erhardt É, Kozári A, **Lányi É**, Hudák F, Gömöri É, Dóczi T, Soltész Gy: M. Cushing gyermekkori esete. Gyermekgyógyászat 2006 4 472-77

Rózsai B, **Lányi É**, Soltész Gy: Tünetmentes bacteriuria 1-es típusú diabéteszes gyermekekben – ellenség a kapuknál? Magyar Orvos 2007 15 33-35

*Összesített impakt faktor: 18.66*

*Egyéb idézhető absztraktok:*

**Lányi É**, Székely J, Vértes M: PGF<sub>2alfa</sub> kezelés hatása human endometrium valamint patkány uterus oestrogén kötésére. Magyar Nőorvos Társaság 22. Nagygyűlése Szeged 1984 Abstr. 309.

**Lányi É**, Székely J, Vértes M: The effect of PGF<sub>2alfa</sub> treatment on the oestradiol binding parameters in the rat uterus. 3rd Symposium on Biochemical Aspects of Steroid Research Weimar Germany 1984 Abstr. P55

**Lányi É**, Nagy P, Vértes M: Ovarium daganatos szövetek oestradiol receptorainak vizsgálata. MÉT LII. Vándorgyűlés Pécs 1987 Abstr. 86.

**Lányi É**, Sirinathsinghi D.J.S, Lénárd L: NMDA receptor gene expression after chronic antidepressant treatment 58<sup>th</sup> Annual Congress of the Hungarian Physiological Society Debrecen 1993 Abstr. 103.

**Lányi É.**: Süllyedés automatával szerzett tapasztalataink . MLDT 46. Nagygyűlése Miskolc 1996. Abstr. P126

**Lányi É**, Angyal T, Rostás G: A streptococcus "D" csoport előfordulása vegyes vizsgálati anyagban. MLDT 47. Nagygyűlése Szeged 1997. Abstr. P 120.

**Lányi É**, Litter I: Lyme serológiai vizsgálatok és azok interpretációja. MLDT 48. Nagygyűlés Kecskemét 1998. Abstr. P83.

**Lányi É**: Bakteriológiában használt identifikációs algoritmusok összevetése: „hagyományos” és számítógépes identifikálás. MLDT 49. Nagygyűlés Siófok 1999. Abstr. M2

**Lányi É**, Rostás J, Dóri Á: Klebsiella törzsek beta-laktám rezisztenciájának vizsgálata az NCCLS tükrében. MLDT 50. Nagygyűlés Debrecen 2000. Abstr. P7

**Lányi É**: Enterobacter törzsek beta-laktám rezisztenciája: interpretatív eredményközlés. MLDT 51. Nagygyűlés, Gyula 2002 Clinical and Experimental Laboratory Medicine 29(1) 2002 Abst 20/7

**Lányi É**, Csernus K, Erhardt É, Molnár D: Keringő aktív ghrelin szint változása orális glukózterhelés során elhízott gyermekekben. MET V. Kongresszusa Bp. 2004 Obesitologica Hungarica 2004 Suppl. 4(2) 55

**Lányi É**: Pseudomonas aeruginosa törzsek rezisztencia mechanizmusainak rutin laboratóriumi vizsgálata. MLDT 52. Nagygyűlése Sopron 2004 Clinical and Experimental Laboratory Medicine 2004 31 Abst P83

**Lányi É.**, Szász M., Adamovich K.: ESBL termelő Klebsiella izolátumok jelentősége MGYT Nagygyűlés Debrecen 2004 P78

Rózsai B, **Lányi É**, Berki T, Soltész Gy: Decreased expression of CXCR-1 on neutrophils of type 1 diabetic children. Diabetic Medicine 23 (Suppl .4) 662. 2006 IF:2.73

Molnar E, Tiringer I, Szakács I, Soltész Gy, **Lányi É**, Erhardt É, Kozári A, Kállai J: Coping and distress in children with type 1 diabetes: the role of the family and parental attitudes. Diabetic Medicine 23 (Suppl 4 ) p205, 2006 IF: 2.73

Molnár E, Rózsai B, **Lányi É**, Kozári A, Soltész Gy, Kállai J: Predictors of quality of life and glycemic control in adolescents with type 1 diabetes: the role of self-directedness and alexithymia. Ann Behavior Med 35 (Suppl 1): 153, 2008. IF: 2,87

**Lányi É**: Bakteriális meningitis patofiziológiája: elmélet és/vagy gyakorlat? Klinikai és Kísérletes Laboratóriumi Medicina 33 (1) 35, 2008

Rózsai B, Molnár E, **Lányi É**, Kozári A, Soltész Gy, Kállai J: Psychoneuroendocrine and psychosocial variables related to gender: association between internalizing behavior problems, distress and salivary cortisol levels in girls with type-1 diabetes. Ann Behavior Med 35 (Suppl1): 127, 2008. IF: 2,87

*Összesített impakt faktor: 11.2*

# **Effect of antenatal steroid treatment on fetal and maternal endocrine parameters**

## **1. Summary**

Strong evidence exists for the role of antenatal steroids in Respiratory Distress Syndrome (RDS) prevention, the protocol for the steroid administration is evidence based. Glucocorticoids are essential for pulmonary development in fetuses and preterm infants, but the effect is not limited to lung development.

The accelerated maturation of organs might be taken that „hormonal imprinting” effect of glucocorticoids.

The first part of dissertation deals with glucocorticoid receptors of human fetal lung. From the scientific point of view these results are not „novum”. But the second part of dissertation deals with a new peptid, ghrelin and possible correlation with endocrine and anthropometric parameters during pregnancy.

Ghrelin plays an important role in the regulation of appetite and food intake and controls of energy balance. This peptide is produced predominantly by the stomach, whereas lower amounts are derived from the hypothalamus, kidney, heart, pancreatic cells, and the placenta in humans. The presence of significant ghrelin concentrations in human cord blood has been shown, but information about the ghrelin secretion during the fetal life is scarce. It is known that the hypercortisolism in humans decreases ghrelin levels in plasma and that serum cortisol exhibits a negative correlation with ghrelin. The physiological mechanisms behind this relationship are not known, but the glucocorticoids that are used in antenatal therapeutic settings may have an effect on ghrelin secretion.

The point of the present study was to compare acylated and total ghrelin concentration in premature infants and their mothers and to investigate the possible relationship between ghrelin and anthropometric and hormonal parameters, such as leptin, insulin, growth hormone and cortisol.

## 2. Introduction

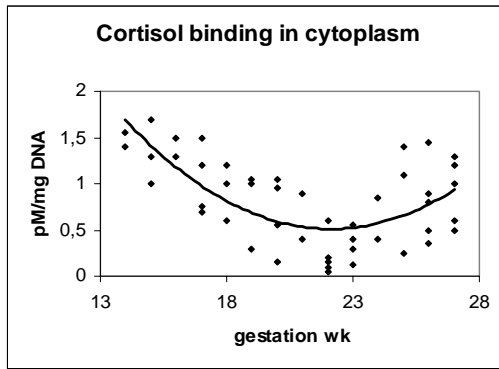
In the 1972 Liggins and Howie were the first to propose the antenatal corticosteroids given to mothers at risk of preterm delivery. Glucocorticoids appear to have, besides the stimulation of surfactant, additional effects on pulmonary maturation. Since then, many other randomized control and meta-analysis have reported the clinical benefits of antenatal corticosteroids. In 1994 the National Institute of Health declared a consensus statement: all pregnant women between 24 and 34 weeks gestation, who are at risk of preterm delivery, should be candidates for antenatal treatment with corticosteroids. In Hungary Szabó and coworkers were the first to introduce the antenatal corticosteroid treatment in the clinical practice.

Antenatal corticosteroids also protect the newborn from intraventricular haemorrhagic and necrotizing enterocolitis especially in extremely low birthweight infants.

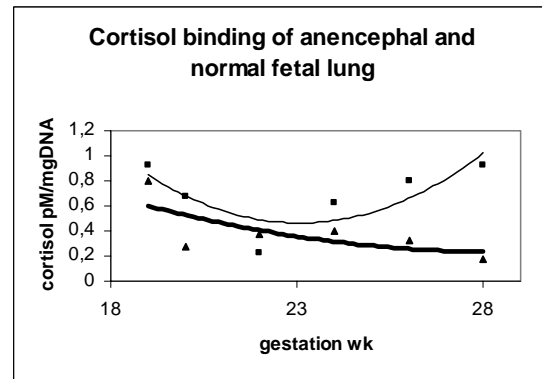
There is no evidence that the repeated courses of prenatal steroids have higher efficiency in the prevention of RDS, but several clinical studies observed, that increasing numbers of antenatal corticosteroid courses were associated with reduction in birthweight.

The exact mechanism of glucocorticoid-induced lung maturation is still unknown. In most species, including humans, a late gestational rise in fetal cortisol production is found combined with a high expression of glucocorticoid receptors in pulmonary tissues. Hypophysectomy in several species causes abnormal lung development, suggesting that low levels of cortisol are linked with an inhibition of pulmonary maturation.

We measured glucocorticoid receptor concentration in human lung cytosol from fetuses of gestational age 14-28 wk. The concentration of cytoplasmic receptor arranged according to the gestational age are presented in Fig.1. Characterization of the in vitro binding of glucocorticoid by lung cytosol showed a high affinity, saturable receptors for natural and synthetic glucocorticoids. In evaluating ontogeny of receptor in human lung tissue showed a decrease in the receptor number at the end of canalicular phase. This time is the end of cellular proliferation of the lung and there is a marked decrease in interstitial tissue.



**Figure 1.** Cortisol cytoplasmic reception in human fetal lung n=47, Spearman k=0.015



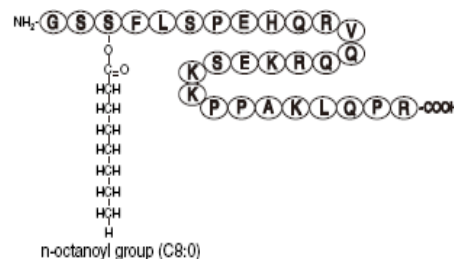
**Figure 2.** Mean cortisol receptor numbers in anencephal ( $\blacktriangle$ ) n=9 and normal ( $\blacksquare$ ) n=18 fetal lung

The cortisol binding examination of anencephal human fetal lung revealed the importance of hypothalamo-hypophyseal-adrenal axis in the normal development of cortisol receptors. (Fig.2.)

In 2002 a new hormone, ghrelin was identified in the neuroendocrine cells of human fetal lung. The extent of ghrelin expression differed according to the gestational age, the cut off point to separate the expression was the 18-20 week of gestation. It was declared, that the human fetal lung is an important source of ghrelin. It can be speculated that ghrelin may play a role in lung maturation and elongation.

The ghrelin was discovered in 1999, through a process of reverse pharmacology has been shown to be a natural ligand of the growth hormone secretagogue (GHS) receptor.

#### Structure of Ghrelin



It is a peptide hormone of 28 amino acids possessing an unusual octanoyl group on the serine in position 3, which is crucial for its GHS activity. This peptide is produced predominantly by the stomach, whereas lower amounts are derived from the hypothalamus, pancreatic cells, kidney and placenta in humans. During the fetal life

after the stomach, the main source of ghrelin the neuroendocrine cells of lung and the pancreas B cells. Although in the beginning it was widely accepted that unacylated ghrelin was devoid of any biological activity, recently is considered as a peptide with wide range actions in different tissues. The best investigated ghrelin receptor, GHS-R1, has two variants, GHS-R1a and GHS-R1b, which result from alternative splicing of the same gene. GHS-R1a is expressed highly in the hypothalamus and pituitary and the octanoylation is essential for binding to it.

The octanoylated ghrelin has the GH-releasing effect and control of appetite, food intake and energy balance. The GHS-R1a and GHS-R1b and ghrelin are present in human endocrine pancreas suggesting that ghrelin may play a role in the glucose metabolism. Depending on the experimental conditions, ghrelin is reported to either inhibit or stimulate insulin secretion in humans. Ghrelin has both orexigenic and adipogenic effects and there is a negative correlation between total ghrelin and body mass index, insulin and leptin in lean and obese humans.

Ghrelin was detected in human placental tissue in 2001, and the receptor type GHS-R1b binding unacylated ghrelin was observed in placental and endometrial tissue. The presence of significant ghrelin concentrations in human cord blood has been shown but information about the ghrelin secretion during fetal life is scarce.

The source of ghrelin on cord plasma is unknown: it may have originated from the maternal compartment, may be secreted by the placenta or may come directly from the fetal tissues. Concentration of total ghrelin in cord blood of small-for-gestational age infants were significantly greater than in appropriate-for-gestational age at different times of gestation. The „catch-up growth” of infants is known, but the physiological mechanism behind it is unknown.

The possible role of ghrelin during pregnancy was examined in rat fetal development. The administration of acyl-ghrelin to female pregnant rats indicated that maternal acyl-ghrelin can easily transit to the fetal circulation. The prolonged maternal treatment with acyl-ghrelin during pregnancy significantly increased the average neonatal body weight at birth in comparison to that of neonates delivered by saline-treated group. No significant changes were observed after treatment with des-acyl ghrelin. When pregnant females treated with acyl-ghrelin consumed the same amount of food as saline-treated pregnant females, neonatal body weight was significantly greater in the ghrelin-treated group.



The multiple activities of ghrelin also include stimulatory effects on the corticotropic system, as systemic administration of ghrelin induces an increase in ACTH and cortisol levels in healthy subjects and shows a remarkable hyper-responsiveness of ACTH and cortisol secretion in patients with active Cushing's syndrome. It is known that the hypercortisolism in humans decreases total ghrelin levels in plasma and that serum cortisol exhibits a negative correlation with total ghrelin. The physiological mechanisms behind this relationship are not known, but the glucocorticoids that are used in antenatal therapeutic settings may have an effect on ghrelin secretion.

### **3. Objectives**

The point of the present study was to compare acylated and total ghrelin concentration in premature infants and their mothers and to investigate the possible relationship between ghrelin and anthropometric and hormonal parameters, such as leptin, insulin, GH and cortisol.

### **4. Patients and methods**

#### **4.1 Patients**

The 26 preterm infants (gestational age 25-35 weeks) and their mothers were involved in the study. Three women with twin pregnancies were included into the protocol together with their newborns. Mothers with pre-eclampsia, hypertension, or diabetes were excluded. Cesarean section was used for eight mothers.

The infants who were appropriate for gestational age participated in this study. It was defined as birth weight from -1.5 to + 1.5 S.D. of the mean birth weight in each gestational age according to current Hungarian standard. All mothers received betamethasone for the prevention of respiratory distress syndrome. The time interval between the steroid injection and the birth varied from 10h to 7 days.

## **4.2 Laboratory methods**

Immediately after delivery, a venous cord blood sample was collected from newborns and also from mothers. The tubes containing EDTA with aprotinin were kept at 4°C before centrifugation and were centrifuged within 1h. The plasma samples were stored at -70°C. Acylated and total ghrelin, and leptin were measured with commercially available RIA kit (Linco Research Inc.USA). Cortisol, insulin and GH were assayed with RIA and IRMA kit (Isotope Ins.Hungary). Glucose was measured by glucose hexokinase method ( Merck ).

## **4.3 Statistical methods**

Comparative analyses between maternal and fetal data were calculated by Mann-Whitney test. The correlations were analyzed by Spearman's correlation test. The Multiple Regression Model was created using stepwise method to verify the influence of different variables on fetal and maternal ghrelin levels. All statistical analysis were performed with SPSS 11.5 software,  $p < 0.05$  was considered statistically significant.

# **5. Results**

## **5.1 Anthropometric data and hormonal parameters**

No significant correlation was observed between anthropometric parameters (sex, mode of birth, gestational age, birth weight) and maternal and fetal hormonal parameters (acylated ghrelin, total ghrelin, cortisol, insulin, leptin). There was a significant correlation (Table 1) between placental weight and acylated ghrelin levels of neonates ( $r=0.396$ ,  $p=0.045$ ) and between placental weight and GH levels of neonates ( $r=0.483$ ,  $p=0.008$ ).

**Table 1** Spearman's correlation coefficient between the various studied hormones, glucose and anthropometric data in the fetus \* p<0.05

	Acylated ghrelin	Total ghrelin	Cortisol	Insulin	Glucose	Leptin	GH
Gestational age	0.266 p=0.190	-0.221 p=0.268	0.480 p=0.010*	0.131 p=0.498	0.005 p=0.980	0.362 P=0.075	-0.195 p=0.310
Birth weight	0.038 p= 0.855	-0.104 p=0.604	0.422 p= 0.025	0.247 p=0.196	0.008 p=0.968	0.334 p=0.103	-0.304 p=0.109
Placental weight	0.396 <b>p=0.045*</b>	0.158 p=0.431	0.149 p= 0.448	0.171 p=0.375	-0.161 p=0.422	0.085 p=0.685	0.483 <b>p=0.008*</b>
Acyl-ghrelin	1.00	0.050 p=0.812	0.547 <b>p=0.005*</b>	0.004 p=0.984	0.213 p=0.306	0.076 p=0.737	-0.009 p = 0.966
Total Ghrelin		1.00	0.260 p = 0.200	0.039 p=0.846	0.154 p=0.453	-0.243 p=0.264	-0.234 p = 0.239
Cortisol			1.00	-0.040 p=0.841	0.254 p=0.201	-0.029 p=0.890	0.035 p = 0.861
Insulin				1.00	0.509 <b>p=0.007*</b>	0.184 p=0.379	-0.367 <b>p=0.050*</b>
Glucose					1.00	-0.083 p=0.700	-0.031 p=0.878
Leptin						1.00	-0.267 p=0.197
GH							1.00

## 5.2 Maternal and fetal hormonal parameters

The acylated and total ghrelin were detectable in all samples. Table 2 shows the maternal and fetal concentrations of ghrelin, cortisol, insulin, glucose, leptin and GH.

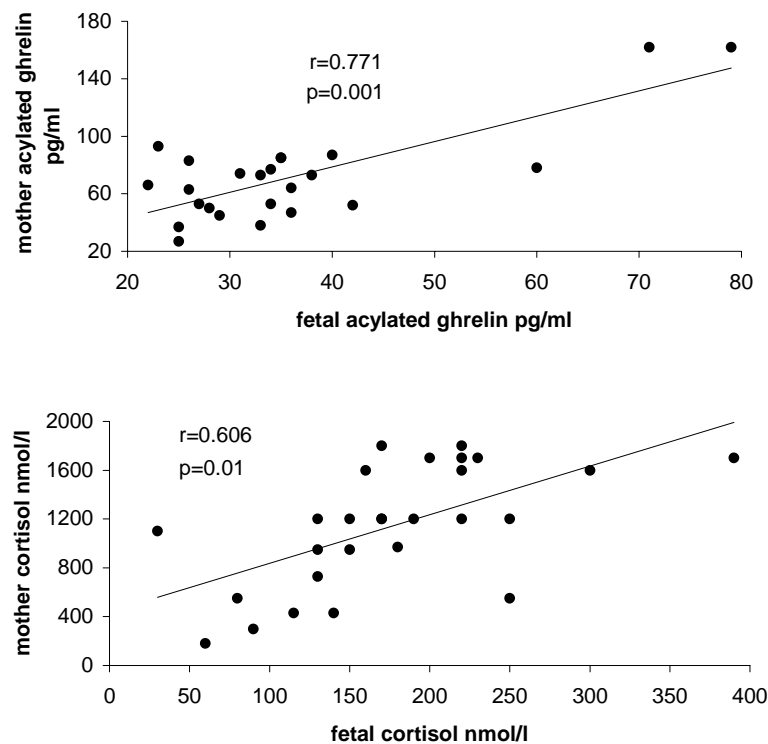
**Table 2** Maternal and fetal concentrations of ghrelin, cortisol, Insulin, glucose, leptin and GH

	Maternal (n=23)	Fetal (n=26)
Acyl-ghrelin(pg/ml)	73.1±33.1	36.5±14.6*
Total ghrelin(pg/ml)	295.9±41.3	611.9±183.2*
Cortisol(nmol/l)	1082.6±528.8	174.1±74.6*
Insulin(mU/l)	44.2±43.5	15.4±15.6*
Glucose(mmol/l)	7.4±2.3	5.6±1.2*
Leptin(ng/ml)	28.9±13.3	0.86±0.76*
GH(µg/l)	2.6±3.8	60.2±33.2*

All data are presented as means±S.D.; n=number of cases, \*p<0.01 versus mother with Mann-Whitney test

The mean level of acylated ghrelin concentration was higher in the maternal vein than in the cord vein ( $73.1 \pm 33.1$  vs  $36.5 \pm 14.6$  pg/ml,  $p < 0.01$ ). Overall, there was a significant correlation (Fig.3) between the fetal and maternal acylated ghrelin levels ( $r = 0.771$ ,  $p < 0.001$ ). The total ghrelin concentration was higher in the neonates, than in the mothers ( $611.9 \pm 183.2$  vs  $295.9 \pm 41.3$  pg/ml,  $p < 0.01$ ), but no significant correlation between the fetal and maternal total ghrelin levels was found.

**Figure 3** Correlation between paired maternal and fetal plasma acylated ghrelin and cortisol concentrations



### 5.3 Correlations among the various hormonal parameters

The bivariate correlations of cord vein hormones (Table1) show a significant correlations between the cord vein acylated ghrelin and cord vein cortisol levels ( $r = 0.547$ ,  $p < 0.005$ ). Total and acylated ghrelin levels in the cord vein were unrelated to other studied hormones in the fetuses.

The bivariate correlations of mother vein hormones (Table 3) show a negative correlation between the total ghrelin and glucose ( $r = -0.577$ ,  $p < 0.003$ ) and between the

total ghrelin and insulin ( $r = -0.510$ ,  $p < 0.008$ ). Acylated ghrelin levels in the mothers were unrelated to the studied hormones.

**Table 3** Spearman’s correlation coefficient between the various studied hormones and glucose in the mothers \* $p < 0.05$

	Acylated ghrelin	Total ghrelin	Cortisol	Insulin	Glucose	Leptin	GH
Acylated Ghrelin	1.00	-0.290 $p=0.169$	-0.019 $p=0.930$	0.165 $p=0.452$	0.101 $p=0.656$	-0.175 $p=0.425$	-0.066 $p=0.759$
Total Ghrelin		1.00	0.096 $p=0.641$	-0.510 <b><math>p=0.008^*</math></b>	-0.577 <b><math>p=0.003^*</math></b>	0.215 $p=0.291$	0.131 $p=0.516$
Cortisol			1.00	0.035 $p=0.865$	0.229 $p=0.271$	-0.396 <b><math>p=0.041^*</math></b>	0.027 $p=0.893$
Insulin				1.00	0.772 <b><math>p=0.0001^*</math></b>	0.047 $p=0.820$	0.087 $p=0.665$
Glucose					1.00	-0.020 $p=0.924$	0.005 $p=0.981$
Leptin						1.00	-0.121 $p=0.547$
GH							1.00

The Figure 3 shows the significant univariate correlations between mothers and their fetuses in the case of acylated ghrelin ( $r=0.771$ ,  $p<0.001$ ) and the cortisol levels ( $r=0.606$ ,  $p<0.01$ ). The correlation between maternal and fetal cortisol concentrations remained significant after correction for the number of hours since the last injection of betamethasone.

#### 5.4 Multivariate regression analysis

The Multiple Regression Model was created by use stepwise method, starting from all variables with a significant univariate correlation with any of the indices. Before the stepwise regression we examined with Spearman’s correlation the relationship the fetal and maternal hormones and glucose (Table 4).

**Table 4** Spearman's correlation coefficient between mothers and fetuses \*  $p < 0.05$

<u>Maternal</u> Fetal	Acyl- ghrelin	Total ghrelin	Cortisol	Insulin	Glucose	Leptin	GH
Acyl- ghrelin	0.771 <b>p=0.001*</b>	-0.176 p=0.390	0.368 p=0.070	0.156 p=0.457	0.296 p=0.151	0.191 p=0.360	0.084 p=0.683
Total ghrelin	-0.342 p=0.101	0.187 p=0.350	0.363 p=0.069	0.155 p=0.450	0.132 p=0.520	-0.143 p=0.486	0.036 p=0.859
Cortisol	0.061 p=0.770	-0.186 p=0.342	0.606 <b>p=0.01*</b>	-0.095 p=0.637	0.369 p=0.053	-0.230 p=0.238	-0.082 p=0.679
Insulin	0.144 p=0.482	-0.296 p=0.120	0.020 p=0.921	0.279 p=0.151	0.390 <b>p=0.040*</b>	0.140 p=0.476	-0.178 p=0.356
Glucose	0.023 p=0.915	-0.431 <b>p=0.025*</b>	-0.029 p=0.887	0.141 p=0.493	0.618 <b>p=0.001*</b>	0.306 p=0.121	0.186 p=0.353
Leptin	0.119 p=0.599	0.068 p=0.748	-0.233 p=0.263	-0.244 p=0.251	-0.180 p=0.390	0.325 p=0.134	-0.178 p=0.356
GH	0.067 p=0.743	0.078 p=0.687	-0.159 p=0.420	-0.143 p=0.469	-0.132 p=0.504	0.070 p=0.722	0.283 p=0.137

The summary of the stepwise multivariate regression analysis for fetal acylated ghrelin and maternal total ghrelin as dependent variables and the placental weight, maternal acylated ghrelin, fetal cortisol and the maternal glucose, maternal insulin, fetal glucose as independent variables is presented in Table 5.

**Table 5** Multiple regression model with indices of fetal acylated and maternal total ghrelin as dependent variables  $\beta$  denotes the regression slope \* $p < 0.05$

	Fetal acylated ghrelin	Maternal total ghrelin
	$R^2=0.639$	$R^2=0.184$
Maternal acylated ghrelin	$\beta=0.733, p=0.0001$	
Maternal cortisol	$\beta=0.286, p=0.038$	
Maternal glucose		$\beta=-0.467, p=0.019$

The adjusted  $R^2$  was 0.639 in the case of fetal acylated ghrelin with maternal acylated ghrelin ( $\beta=0.733, p=0.0001$ ) and with the fetal cortisol ( $\beta=0.286, p=0.038$ ), the variables have statistically significant correlations with the fetal acylated ghrelin. The adjusted  $R^2$  was 0.184 in the case of maternal total ghrelin with maternal glucose ( $\beta=-0.467, p = 0.019$ ), the only variable with statistically significant correlation with maternal total ghrelin. There was no independent predictor when the maternal acyl ghrelin or fetal total ghrelin were used as dependent variables.

## 6. Summary of the results and conclusions

Ghrelin was discovered as a hormone related to GH secretion. With advancing gestational age, the placental production of GH is elevated. We found correlation between placental weight and GH levels of neonates. Data available are not consistent: association among circulating total ghrelin and the GH have been reported by some but not by others. It is generally assumed that the GH-releasing activity of ghrelin is dependent on its acylation in serine<sup>3</sup>. We have not found correlations between acylated or total ghrelin and GH concentration, which support the hypothesis that ghrelin is not contributing to the high GH concentrations observed during gestation.

However, there was a significant correlation between acylated ghrelin levels of neonates and the placental weight. It is contradictory with Yokota et al, however they examined full-term newborns who were not only of the group of adequate-for-gestational age. It is known, that the ghrelin levels of small-for-gestational age are greater than those of appropriate-for-gestational age infants. Further investigation is needed to show the possible relationship between the placenta and the acylation process of ghrelin.

Similarly to others, we didn't find correlation between maternal and newborn total ghrelin, but we found significant correlation between the fetal and maternal acylated ghrelin levels. It is possible that acylated ghrelin could cross the placenta in human as suggested by Nakahara in rat. The hypothesis that the placenta may play a role in the acylation process is supported in part by the relationship between fetal acylated ghrelin concentration and the placental weight.

In addition to its GH-releasing properties, ghrelin appears to be related to regulation of appetite and glucose metabolism. It is known that ghrelin secretion is increased by fasting and decreased by food intake, glucose and insulin in adults, and there is a negative association between ghrelin and insulin secretion. We also found a negative correlation between total ghrelin and glucose, as well as between total ghrelin and insulin concentrations in the mother's blood only. Farquhar et al. found a similar relationship between cord plasma ghrelin and glucose concentrations. However, in our experiment, the mothers with known gestational diabetes were excluded, in contrast to referred authors, where the prevalence of maternal diabetes was considerable.

Leptin is detectable in cord blood from early in the second trimester and circulating levels of cord blood leptin are positively correlated with birth weight and cord plasma

insulin levels in full-term newborns. These results seem to be inconsistent with our findings, because we have not found any correlation with cord blood leptin. The discrepancy may be explained by gestational age, because more than 98% of leptin secreted by placenta goes to the maternal side, presumably the fetal leptin is being produced by fetal adipose or other tissues. The number of studies have shown that there is a sexual dimorphism in plasma leptin concentrations during the later period of life. During the examination period, the concentration of leptin in the cord blood was very low, and we did not see significant differences between male and female infants.

The multiple regression model shows a relationship between the fetal cortisol and fetal acylated ghrelin concentration. We have measured the maternal and fetal plasma cortisol levels in parallel and the results were consistent with others: the maternal plasma cortisol levels were ten times higher than fetal plasma cortisol and there was a significant linear correlation between them. The limitation of our study is the fact that all mothers received betamethasone. The prenatal betamethasone administration to mothers has been shown to result in similar betamethasone concentrations in maternal and fetal serum. It is known that prenatal maternal betamethasone therapy suppresses the cortisol levels within 1 week of betamethasone treatment, as long as the synthetic glucocorticoid remains in circulation. It is known that synthetic glucocorticoids have genomic potencies several times that of cortisol, this support the hypothesis that there is no close relationship between the efficiency of non-genomic and classical genomic responses of different glucocorticoids. Our results show a positive correlation between fetal cortisol and acylated ghrelin, this suggests the possibility that the cortisol may be involved in the acylation process of ghrelin through a non-genomic action.

Several new findings are reported in the present study. These data provide first evidence that in premature newborns umbilical cord acylated ghrelin concentrations are lower than in maternal blood, and the fetal acylated ghrelin correlate with maternal acylated ghrelin and the fetal cortisol. The physiological role of ghrelin during pregnancy remains to be clarified, but it may be related to the degree of acylation. The correlation of the fetal acylated ghrelin with the placental weight supports the hypothesis that the placenta may play a role in the acylation process and may be partly affected by cortisol.



## List of publication

The thesis is based in the following publications:

1. Szabó I, Vértes M, Bódis J, **Lányi É**, Sauerhering E: Steroid receptors in human fetal lung Lancet 1980 2 751 IF:9.44
2. Szabó I, **Lányi É**, Vértes M: Human magzati tüdő glükokortikoid receptorai Magyar Nőorvosok Lapja 1986 49 16
3. Szabó I, **Lányi É**, Vértes M, Drozgyik I, Csaba I.: Glucocorticoid receptors in human fetal lung. Problems of the fetal lung maturation and of insufficient lung maturity in the newborn (Ed.: I. Cretti) Vol. I. 170-187 1988
4. Szabó I, **Lányi É**, Szilágyi A, Vértes M, Csaba I: Glucocorticoid receptors in human fetal lung. Gynecology and Endocrinology 1990 4 Suppl.1. 113 IF: 0.43
5. Szabó I, **Lányi É**, Vértes M, Csaba I: Glucocorticoid and oestradiol receptors in human fetal lung. Journal of Perinatal Medicine 1991 119 Suppl. 1. 408 IF : 0.34
6. **Lányi É**, Csernus K, Erhardt É, Tóth K, Urbán B, Lénárd L, Molnár D: Plasma levels of acylated ghrelin during an oral tolerance test in obese children. Journal of Endocrinological Investigation 2007 30(2) 133-137 IF:1.47
7. **Lányi É**, Várnagy Á, Kovács A.K, Cermely T, Szász M, Szabó I: Ghrelin and acyl ghrelin in preterm infants and maternal blood : relationship with endocrine and anthropometric measures. European Journal of Endocrinology 2008 158(1) 27-33 IF:3.14

Congress abstracts related to the thesis:

- 1.Szabó I, **Lányi É**, Vértes M, Csaba I: Glucocorticoid and estradiol receptors in human fetal lung. XI. European Congress of Perinatal Medicine Roma 1988
2. Szabó I, **Lányi É**, Vértes M, Drozgyik I, Csaba I : Glucocorticoid And estradiol receptors in human fetal lung. „Problems of the fetal lung maturation and of insufficient lung maturity in the newborn” Symposium Szczecin 1988
3. Szabó I, **Lányi É**, Szilágyi A, Vértes M, Csaba I: Cortisol and dexamethason receptors in human fetal lung. 2<sup>nd</sup> International Symposium on the surfactant system of the lung: Prevention and treatment of neonatal and adult respiratory distress syndrome. Perugia 1989
4. Molnar D, **Lanyi E**, Csernus K, Erhardt E: Active ghreline levels in childhood obesity. Pediatric Research 2005 58(2) Abstr 255 IF:2.88

**Cummulative impact factor: 17,7**

Other publications:

1. **Lányi É**, Székely J, Vértes M: Effect of PGF<sub>2alfa</sub> treatment on the endometrial oestradiol receptor system. Acta Physiologica Hungarica 1985 66 3-4 IF<sub>1985</sub>:0.18
2. **Lányi É**, Székely J, Vértes M: The effect of PGF<sub>2alfa</sub> treatment on the endometrial oestradiol receptor system. Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids 1988 31 27-30 IF<sub>1988</sub>:1.10
3. Rózsai B, **Lányi É**, Soltész Gy: Asymptomatic Bacteriuria and Leukocyturia in Type 1 Diabetic Children and Young Adults. Diabetes Care 2003 26 7 IF<sub>2003</sub>: 7.50
4. **Lányi É**: Antibiotikum rezisztencia mechanizmusok a beta-laktam antibiotikumokkal szemben: néhány rezisztencia mechanizmus rutin laboratóriumi kimutatásának aktuális kérdései. Infektológia és Klinikai Mikrobiológia 2004 2 39-46
5. Csernus K, Erhardt E, **Lányi E**, Molnár D: Effect of childhood obesity on glomerular and tubular protein excretion. Int. J. Obesity Relat Metab Disord 2004 28 (Suppl.1.) 42 IF<sub>2004</sub>:3.46
6. Csernus K, **Lányi É**, Erhardt É, Molnár D: Effect of childhood obesity and obesity-related cardiovascular risk factors on glomerular and tubular protein excretion. European Journal of Pediatrics 2005 164 44-49 IF<sub>2005</sub>: 1.38
7. **Lányi É**: Extended Spectrum Beta-laktamáz (ESBL) termelő Klebsiella izolátumok jelentősége. Gyermekgyógyászat 2005 56 457-460
8. Molnar D, **Lanyi E**, Csernus K, Erhardt E.: Active ghreline levels in childhood obesity. Pediatric Research 2005 58(2) 255 IF:2.88
9. Rózsai B, **Lanyi E**, Berki T, Soltész Gy: Urinary cytokine response to asymptomatic bacteriuria in type 1 diabetic children and young adults. Pediatric Diabetes 2006 7 153-158 IF<sub>2006</sub>: 2.16
10. Erhardt É, Kozári A, **Lányi É**, Hudák F, Gömöri É, Dóczy T, Soltész Gy: M. Cushing gyermekkori esete. Gyermekgyógyászat 2006 4 472-77
11. Rózsai B, **Lányi É**, Soltész Gy: Tünetmentes bacteriuria 1-es típusú diabéteszes gyermekekben – ellenség a kapuknál? Magyar Orvos 2007 15 33-35

Cummulative impact factor: 18.66

Other congress abstracts:

1. **Lányi É**, Székely J, Vértes M: PGF<sub>2alfa</sub> kezelés hatása human endometrium valamint patkány uterus oestrogén kötésére. Magyar Nőorvos Társaság 22. Nagygyűlése Szeged 1984 Abstr. 309.

2. **Lányi É**, Székely J, Vértes M: The effect of PGF<sub>2alpha</sub> treatment on the oestradiol binding parameters in the rat uterus. 3rd Symposium on Biochemical Aspects of Steroid Research Weimar Germany 1984 Abstr. P55
3. **Lányi É**, Nagy P, Vértes M: Ovarium daganatos szövetek oestradiol receptorainak vizsgálata. MÉT LII. Vándorgyűlés Pécs 1987 Abstr. 86.
4. **Lányi É**, Sirinathsinghi D.J.S, Lénárd L: NMDA receptor gene expression after chronic antidepressant treatment 58<sup>th</sup> Annual Congress of the Hungarian Physiological Society Debrecen 1993 Abstr. 103.
5. **Lányi É.**: Süllyedés automatával szerzett tapasztalataink . MLDT 46. Nagygyűlése Miskolc 1996. Abstr. P126
6. **Lányi É**, Angyal T, Rostás G: A streptococcus "D" csoport előfordulása vegyes vizsgálati anyagban. MLDT 47. Nagygyűlése Szeged 1997. Abstr. P 120.
7. **Lányi É**, Litter I: Lyme serológiai vizsgálatok és azok interpretációja. MLDT 48. Nagygyűlés Kecskemét 1998. Abstr. P83.
8. **Lányi É**: Bakteriológiában használt identifikációs algoritmusok összevetése: „hagyományos” és számítógépes identifikálás. MLDT 49. Nagygyűlés Siófok 1999. Abstr. M2
9. **Lányi É**, Rostás J, Dóri Á: Klebsiella törzsek beta-laktám rezisztenciájának vizsgálata az NCCLS tükrében. MLDT 50. Nagygyűlés Debrecen 2000. Abstr. P7
10. **Lányi É**: Enterobacter törzsek beta-laktám rezisztenciája: interpretatív eredményközlés. MLDT 51. Nagygyűlés, Gyula 2002 Clinical and Experimental Laboratory Medicine 29(1) 2002 Abst 20/7
11. **Lányi É**, Csernus K, Erhardt É, Molnár D: Keringő aktív ghrelin szint változása orális glukóztétel során elhízott gyermekekben. MET V. Kongresszusa Bp. 2004 Obesitologica Hungarica 2004 Suppl. 4(2) 55
12. **Lányi É**: Pseudomonas aeruginosa törzsek rezisztencia mechanizmusainak rutin laboratóriumi vizsgálata. MLDT 52. Nagygyűlése Sopron 2004 Clinical and Experimental Laboratory Medicine 2004 31 Abst P83
13. **Lányi É.**, Szász M., Adamovich K.: ESBL termelő Klebsiella izolátumok jelentősége MGYT Nagygyűlés Debrecen 2004 P78
14. Rózsai B, **Lányi É**, Berki T, Soltész Gy: Decreased expression of CXCR-1 on neutrophils of type 1 diabetic children. Diabetic Medicine 23 (Suppl .4) 662. 2006 IF:2.73
15. Molnar E, Tiringer I, Szakács I, Soltész Gy, **Lányi É**, Erhardt É, Kozári A, Kállai J: Coping and distress in children with type 1 diabetes: the role of the family and parental attitudes. Diabetic Medicine 23 (Suppl 4 ) p205, 2006 IF: 2.73

16. Molnár E, Rózsai B, **Lányi É**, Kozári A, Soltész Gy, Kállai J: Predictors of quality of life and glycemic control in adolescents with type 1 diabetes: the role of self-directedness and alexithymia. *Ann Behavior Med* 35 (Suppl 1): 153, 2008. IF: 2,87

17. **Lányi É**: Bakteriális meningitis patofiziológiája: elmélet és/vagy gyakorlat? *Klinikai és Kísérletes Laboratóriumi Medicina* 33 (1) 35, 2008

18. Rózsai B, Molnár E, **Lányi É**, Kozári A, Soltész Gy, Kállai J: Psychoneuroendocrine and psychosocial variables related to gender: association between internalizing behavior problems, distress and salivary cortisol levels in girls with type-1 diabetes. *Ann Behavior Med* 35 (Suppl1): 127, 2008. IF: 2,87

Cummulative impact factor: 11.2