

Streszczenie pracy doktorskiej lek. Niny Mól pt.: „*Visfatin and Irisin- new markers of nutritional status and physical development in preterm infants*”

W ostatnich latach ilość porodów przedwczesnych utrzymuje się w Polsce na stałym poziomie, ale dzięki dynamicznemu postępowi w neonatologii oraz wprowadzeniu nowych rozwiązań technologicznych w ostatnich latach, zwiększyła się przeżywalność noworodków z bardzo małą urodzeniową masą ciała (Very Low Birth Weight, VLBW ≤ 1500 g) [53]. Z uwagi na zmniejszenie śmiertelności w tej grupie dzieci, zapewnienie właściwego stanu odżywienia i prawidłowego rozwoju fizycznego stają się jednymi z priorytetów w zakresie długofalowej opieki. Niedobór masy ciała/wzrostu jest istotnym problemem wśród noworodków urodzonych przedwcześnie. W porównaniu z dziećmi urodzonymi o czasie są one bardziej narażone na niedożywienie, opóźnienie rozwoju pozamacicznego we wczesnym okresie życia, częściej doświadczają niedoborów mineralnych kośćca oraz zaburzeń w rozwoju neurofizycznym w późniejszym życiu [54,55]. Z drugiej strony, otyłość dziecięca i związane z nią choroby, takie jak cukrzyca czy nadciśnienie tętnicze, stanowią dodatkowy czynnik utrudniający prowadzenie optymalnego leczenia. Dane z piśmiennictwa potwierdzają zwiększone ryzyko zespołu metabolicznego w późniejszych latach życia u noworodków urodzone przedwcześnie z bardzo małą masą ciała [56-58].

Żywnienie w ciągu pierwszych miesięcy życia wpływa nie tylko na wzrost i skład ciała, ale także odgrywa istotną rolę w długotrwałej kontroli apetytu, w programowaniu mechanizmów regulujących uczucie sytości w ośrodkowym układzie nerwowym i mechanizmów bazujących na czynnikach wydzielanych z tkanek obwodowych [59,60].

Cel badań, problemy badawcze

Głównym celem badania było poszukiwanie nowych wczesnych markerów stanu odżywienia oraz ocena wpływu stosowanego karmienia na skład ciała i wybrane markery stanu odżywienia u noworodków.

Szczegółowej analizie poddane zostały następujące problemy badawcze:

1. ocena użyteczności oznaczania składu ciała u noworodków urodzonych przedwcześnie przy użyciu analizy impedancji elektrycznej,

2. porównanie składu ciała przy użyciu analizy impedancji elektrycznej u noworodków ze szczególnym uwzględnieniem ilości tkanki tłuszczowej w zależności od sposobu

żywienia (pokarm naturalny vs modyfikowana mieszanka mleczna dla wcześniaków) i czasu trwania ciąży,

3. ocena obecności irisiny w mleku kobiecym i mleku modyfikowanym,

4. ocena użyteczności stężeń wisfatyny i irisiny we krwi jako wskaźników stanu odżywienia u noworodków.

Material (dotyczy artykułów nr 1, 2, 3, 4)

Prospektywnym badaniem kohortowym objęto 72 noworodki (53 noworodki urodzone przedwcześnie z bardzo małą masą urodzeniową (VLBW) oraz 19 noworodków urodzonych w fizjologicznym terminie porodu, stanowiących grupę kontrolną), hospitalizowanych w Oddziale Patologii i Intensywnej Terapii Noworodka (OPiITN) Kliniki Chorób Dzieci, Katedry Pediatrii Instytutu Pediatrii Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie w okresie 01.02.2014 r. do 30.11.2016 r. Badanie zostało sfinansowane ze środków grantu Fundacji Nutricia nr RG 7/2013.

Kryteria włączenia do badania obejmowały:

podpisaną świadomą zgodę rodziców/opiekunów na udział dziecka w badaniu,

masę urodzeniową między 1000g a 1500g dla grupy VLBW oraz 2500g – 4000g dla grupy urodzonej w fizjologicznym terminie porodu,

- rozpoczęcie karmienia enteralnego w ciągu pierwszych 48 godzin życia,
- przyjęcie do OPIITN przed 5 dobą życia.

Do kryteriów wyłączenia należały:

- mnogie malformacje wrodzone,
- aberracje chromosomowe,
- krwawienie dokomorowe IV stopnia,
- ciężkie infekcje (sepsa o wczesnym początku, zapalenie opon mózgowo – rdzeniowych),
- martwicze zapalenie jelit,
- zamartwica (skala Apgar < 3 punktów w 5-tej minucie życia).

Metody (dotyczy artykułów nr 1, 2, 3, 4)

Pacjenci byli oceniani w ciągu pierwszego tygodnia życia i 4 tygodnie później, w 5-tym tygodniu życia. Rejestrowano wtedy pomiary masy ciała, długości ciała, obwodu głowy, oraz pobierano próbki krwi oraz próbki mleka od matek, z których wykonywano badania biochemiczne celem:

1. oceny stężenia wisfatyny w próbkach krwi pobranej od noworodków urodzonych przedwcześnie z bardzo małą masą ciała oraz w próbkach krwi pobranej od noworodków urodzonych o czasie,

2. oceny stężenia wisfatyny w próbkach mleka pobranego od matek noworodków urodzonych przedwcześnie z bardzo małą masą ciała oraz w próbkach mleka pobranego od matek noworodków urodzonych o czasie,

3. oceny stężenia irisiny w próbkach krwi pobranej od noworodków urodzonych przedwcześnie z bardzo małą masą ciała oraz w próbkach krwi pobranej od noworodków urodzonych o czasie,

4. oceny stężenia irisiny w próbkach mleka pobranego od matek noworodków urodzonych przedwcześnie z bardzo małą masą ciała oraz w próbkach mleka pobranego od matek noworodków urodzonych o czasie.

Pobrano także próbki 14 różnych modyfikowanych mieszanek mlecznych celem oznaczenia w nich stężeń wisfatyny i irisiny.

Badania biochemiczne przeprowadzono w Zakładzie Biochemii Klinicznej Instytutu Pediatrii Wydziału Lekarskiego, Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum w Krakowie.

Metodyka badań biochemicznych

Wszystkie próbki krwi (1ml) i mleka (5ml) zostały pobrane do probówek z aprotyniną (inhibitorem proteaz) i po pobraniu przeniesione do Zakładu Biochemii Klinicznej gdzie zostały natychmiast odwirowane a następnie zamrożone w temp. -80°C w oczekiwaniu na dalszą diagnostykę. Stężenie irisiny było mierzone przy użyciu komercyjnie dostępnego zestawu ELISA (RAG018R, BioVendor). Stężenie wisfatyny było mierzone przy użyciu komercyjnie dostępnego zestawu ELISA (RAG004R, BioVendor).

Metodyka oceny składu ciała przy użyciu analizy bioimpedancji elektrycznej

Ocena składu ciała przy użyciu analizy bioimpedancji elektrycznej była wykonana dwukrotnie – w pierwszym tygodniu życia oraz w spodziewanym terminie porodu w grupie noworodków urodzonych przedwcześnie z bardzo małą masą ciała oraz w ciągu pierwszego tygodnia życia i w 3 miesiącu życia w grupie noworodków urodzonych o czasie. Metodyka wykonania bioimpedancji elektrycznej została opisana w poszczególnych artykułach. Skład ciała został oceniony przy użyciu wieloczęstotliwościowego analizatora składu ciała (BCM; Fresenius Medical Care, Bad Homburg, Germany), oraz czterech specjalnych jednorazowych elektrod BCM-FMC(<25 kg). Badane noworodki były ułożone w pozycji supinacyjnej z odwiedzionymi

kończynami górnymi i dolnymi. Dwie elektrody były przymocowane do grzbietowej powierzchni rąk, dwie pozostałe do grzbietowej powierzchni stóp. Pomiarów wykonywano 2 minuty po umieszczeniu elektrod na właściwych pozycjach.

Dane dotyczące wywiadu prenatalnego i okołoporodowego, jak również przebiegu hospitalizacji w OPIITN oraz wyników leczenia, były umieszczane w przygotowanej bazie danych programu Microsoft Excel.

Etyka

Protokół badania został zaaprobowany przez Komisję Bioetyczną Uniwersytetu Jagiellońskiego (nr zgody KBET/58/B/2013 z dnia 04.04.2013 r.). Rodzice/opiekunowie dzieci otrzymali szczegółową informację na temat celu i przebiegu badania. Udział w badaniu był dobrowolny. Rodzice/opiekunowie dzieci podpisali świadomą zgodę na udział w badaniu, mieli również możliwość wycofania dziecka z badania na każdym etapie jego trwania. Byli również poinformowani, iż leczenie ich dziecka podczas pobytu w OPIITN nie zmieni się w razie rezygnacji z udziału w badaniu.

Podsumowanie wyników

W poniższym podrozdziale krótko opisano artykuły 1 – 5, wchodzące w skład rozprawy doktorskiej.

Artykuł nr 1 opublikowany w *Developmental Period Medicine*

Artykuł ten przedstawia wyniki badania pilotażowego oceniającego przydatność metody impedancji bioelektrycznej w ocenie składu ciała u noworodków VLBW oraz urodzonych w fizjologicznym terminie porodu. W pracy tej opisano dokładnie sposób przeprowadzenia badania składu ciała przy użyciu metody bioimpedancji elektrycznej u badanych pacjentów oraz twierdzenia naukowe leżące u podstaw tej metody.

Zaobserwowano wyższe wartości oporu mierzone przy różnych częstotliwościach (5, 50, 100Hz) w grupie noworodków VLBW w pierwszym tygodniu życia. Index impedancji bioelektrycznej dodatkowo korelował z całkowitą zawartością wody w organizmie (TBW) w obu badanych grupach. Index bioimpedancji, całkowita zawartość wody w organizmie jak i procentowa zawartość tkanki tłuszczowej w organizmie (% FM) były istotnie niższe w grupie noworodków VLBW w stosunku do noworodków urodzonych w fizjologicznym terminie porodu w wieku 3 miesięcy. Zarówno w grupie noworodków VLBW, jak i urodzonych o czasie stwierdzono zmniejszanie się procentowej ilości całkowitej zawartości wody w organizmie wraz z wiekiem dziecka, w 3 miesiącu życia w obu grupach ilość wody w organizmie była porównywalna.

W artykule wykazano, że bioimpedancja elektryczna jest prostą, nieinwazyjną metodą oceny ilości całkowitej wody ustroju, beztłuszczowej masy ciała oraz tkanki tłuszczowej u noworodków VLBW oraz urodzonych w fizjologicznym terminie porodu. Prezentowane badanie wskazuje na istotne różnice składu ciała między grupą noworodków urodzonych przedwcześnie w stosunku do noworodków urodzonych w fizjologicznym terminie porodu, które to różnice utrzymują się przez 3 pierwsze miesiące życia dzieci.

Artykuł nr 2 opublikowany w *Pediatrics and Neonatology*

W tym artykule przeanalizowano różnice w składzie ciała w zależności od sposobu karmienia pomiędzy noworodkami VLBW badanymi w przewidywanym terminie porodu a noworodkami urodzonymi w fizjologicznym terminie porodu badanymi w 1 tygodniu życia. W tym celu grupę noworodków VLBW podzielono na noworodki karmione mieszanką mleczną (grupa A) lub pokarmem naturalnym (grupa B). Złoty standard składu ciała reprezentowały noworodki urodzone w fizjologicznym terminie porodu, stanowiąc naszą grupę kontrolną (grupa C). Badane grupy A i B nie różniły się od siebie pod względem parametrów antropometrycznych ocenianych przy urodzeniu, punktacją w skalach CRIB i SNAPPE II, rozwojem powikłań wcześniactwa w dalszym okresie hospitalizacji ani statusem socjoekonomicznym matek, który mógłby wpłynąć na stan ogólny pacjentów.

Stwierdziliśmy, że noworodki VLBW karmione mieszanką mleczną miały wyższą masę ciała i większy obwód głowy niż noworodki VLBW karmione pokarmem naturalnym, w spodziewanym terminie porodu. Zaobserwowaliśmy ponadto istotne różnice w składzie ciała

noworodków VLBW w zależności od sposobu karmienia w stosunku do kontrolnej grupy C. Noworodki z grupy A, karmione mieszanką mleczną, prezentowały niższą procentową zawartość beztłuszczowej masy ciała i wyższą procentową jak i bezwzględną ilość tkanki tłuszczowej w przewidywanym terminie porodu w stosunku do grupy noworodków urodzonych w fizjologicznym terminie porodu (grupa C), podczas gdy skład ciała (zawartość beztłuszczowej masy ciała i tkanki tłuszczowej) był porównywalny w grupie karmionej pokarmem naturalnym i noworodkami urodzonymi w fizjologicznym terminie porodu. Noworodki urodzone przedwcześnie wydają się gromadzić większą ilość tkanki tłuszczowej w okresie od urodzenia do momentu przewidywanego terminu porodu w porównaniu do płodów w ostatnim trymestrze ciąży, ale nasze badanie wykazuje, iż noworodki karmione pokarmem naturalnym prezentują porównywalny skład ciała do noworodków urodzonych o czasie. Karmienie wyłącznie mlekiem naturalnym we wczesnym okresie życia ma związek z mniejszym przyrostem masy ciała, a długofalowo zmniejsza ryzyko nadwagi w wieku dziecięcym oraz w okresie dojrzewania w grupie noworodków urodzonych o czasie. Jest to pierwsze badanie pokazujące istotne różnice w zawartości tkanki tłuszczowej w zależności od typu stosowanego pokarmu na tak wczesnym etapie życia noworodków urodzonych przedwcześnie, czyli w terminie przewidywanego porodu.

Artykuł nr 3 opublikowany w *Minerva Pediatrica*

W artykule nr 3 oznaczono obecność w mleku i mieszankach mlecznych irisiny, hormonu o właściwościach przeciwdziałających otyłości. Oznaczanie irisiny było wykonywane zarówno w mleku matek noworodków VLBW jak i matek dzieci urodzonych w fizjologicznym terminie porodu w dwóch punktach czasowych: w ciągu pierwszego tygodnia po porodzie oraz 4 tygodnie później, w 5 tygodniu życia pacjentów. Przebadaliśmy także 14 różnych próbek komercyjnie dostępnych mieszanek mlecznych, zarówno przeznaczonych dla noworodków urodzonych przedwcześnie, dla noworodków urodzonych w fizjologicznym terminie porodu oraz mieszanki o wysokim stopniu hydrolizy białek mleka krowiego. Potwierdziliśmy obecność irisiny zarówno w pokarmie naturalnym jak i w mieszankach mlecznych. Nie stwierdziliśmy różnic w stężeniu irisiny w mleku matek VLBW i matek noworodków urodzonych o czasie zarówno w pierwszym tygodniu po porodzie jak i 4 tygodnie później. Obserwowano wzrost stężenia irisiny w mleku kobiecym wraz z czasem trwania laktacji. Wykazaliśmy istotnie niższe stężenie irisiny w mieszankach mlecznych w porównaniu do mleka kobiecego w obu punktach czasowych, niezależnie od faktu porodu przedwczesnego. Mieszanki mleczne przeznaczone do żywienia noworodków urodzonych przedwcześnie zawierały najwyższe stężenie irisiny, natomiast w hydrolizatach białek mleka krowiego wykryto śladowe ilości badanego hormonu.

Podjezwamy, że irisina dostarczana z mlekiem kobiecym może zwiększać lokalną pulę hormonu w żołądku a przez to wpływać na ilość przyjętego pokarmu, zmniejszać absorpcję tłuszczu z przewodu pokarmowego i promować rozwój prawidłowego składu ciała, bez wzrostu jej stężenia w krwioobieg. Można przypuszczać, że noworodki karmione mieszankami mlecznymi zawierającymi niewielkie ilości irisiny będą miały niższą zawartość brązowej tkanki tłuszczowej, a w konsekwencji nieprawidłowy skład ciała i większe ryzyko otyłości w późniejszym życiu. Przedstawione dane mogą być jednym z dowodów na wpływ sposobu karmienia na obserwowane różnice w składzie ciała noworodków.

Artykuł nr 4 opublikowany w *Plos One*

Ostatnim etapem badania, przedstawionym w artykule nr 4, było porównanie stężeń irisiny i wisfatyny w mleku kobiet karmiących oraz w surowicy u noworodków urodzonych przedwcześnie oraz w fizjologicznym terminie porodu, a także ocenienie powiązań pomiędzy stężeniami irisiny i wisfatyny w surowicy a wybranymi parametrami antropometrycznymi oraz składem ciała. Jest to także pierwsze opublikowane badanie oceniające stężenie irisiny w surowicy noworodków VLBW. Noworodki VLBW w momencie spodziewanego terminu porodu prezentowały większą ilość %FM, podczas gdy %TBW i %FFM były mniejsze w porównaniu do noworodków urodzonych o czasie w pierwszym tygodniu życia.

Noworodki urodzone z VLBW miały istotnie niższe stężenie irisiny w surowicy niż noworodki donoszone zarówno w 1-szym i w 5-tym tygodniu życia. Mimo, iż stężenie irisiny było niższe

w grupie noworodków urodzonych przedwcześnie, jej stężenie w 1-szym tygodniu życia pozytywnie korelowało z urodzeniową masą ciała, urodzeniową długością ciała oraz obwodem głowy przy urodzeniu, masą ciała i obwodem głowy w 5-tym tygodniu życia. Stężenie irisiny surowicy w 1-szym tygodniu życia pozytywnie korelowało z jej stężeniem po 4 tygodniach. Stężenie wisfatyny w 5- tym tygodniu życia negatywnie korelowało z urodzeniową masą ciała, urodzeniową długością ciała oraz obwodem głowy przy urodzeniu, wyrażonymi jako wartości Z-score, co może być związane z nasilonym efektem *catch-up growth* w grupie noworodków VLBW. Co więcej, wykazaliśmy silną negatywną korelację między stężeniami irisiny i wisfatyny w surowicy w 1-szym pomiarze, która to korelacja utrzymywała się także w trakcie drugiego pomiaru, 4 tygodnie później. Oba te hormony mają działanie antagonizujące, irisina wykazuje właściwości zmniejszające otyłość, podczas gdy wisfatyna wzrasta w otyłości. Możliwym jest, że gdy stężenie jednego z tych hormonów wzrasta, stężenie drugiego jest automatycznie obniżane, aczkolwiek dokładny mechanizm molekularny wymaga dalszych badań.

Stężenie wisfatyny w mleku matek VLBW wzrastało między pierwszym a drugim pomiarem, i było istotnie wyższe w 5-tym tygodniu po porodzie, były to takżenajwyższe zmierzone wartości stężenia wisfatyny w obu grupach, biorąc pod uwagę oba punkty czasowe badania. Może mieć to związek z protekcyjnym działaniem wisfatyny, biorąc pod uwagę jej efekt insulinomimetyczny i działanie poprzez receptor dla insuliny, przeciwdziałający nadmiernej utracie masy ciała po urodzeniu, która dla noworodków VLBW może być znacznie groźniejsza niż dla noworodków urodzonych o czasie. Nie zaobserwowaliśmy innych różnic pomiędzy stężeniem wisfatyny w surowicy, w mleku kobiecym i stężeniem irisiny w mleku kobiecym w obu punktach czasowych. Zarówno stężenie irisiny jak i wisfatyny w mleku w 1-szym pomiarze dodatnio korelowało z odpowiadającymi im stężeniami w 2-gim pomiarze. Prawdopodobnie stężenie irisiny w mleku może wpływać na przebieg adaptacji noworodka do warunków życia pozamacicznego, zwłaszcza biorąc pod uwagę termogenezę i metabolizm glukozy.

Artykuł nr 5 opublikowany w *Developmental Period Medicine*

Jest to artykułu przeglądowy opisujący aktualny stan wiedzy na temat przydatności klinicznej wybranych parametrów biochemicznych (albumina, prealbumina, transferyna, białko wiążące retinol) i hormonalnych (somatomedyna C, grelina, wisfatyna) w ocenie stanu odżywienia u noworodków urodzonych przedwcześnie. W artykule dokonano także oceny technik stosowanych w ocenie składu ciała, takich jak absorpcjometria promieniowania X o dwóch energiach (Dual Energy X-ray Absorptiometry; DEXA) i impedancja bioelektryczna (Bioelectrical Impedance Analysis; BIA) oraz opisano założenia leżące u podstaw ich przeprowadzania. Na podstawie przeglądu dostępnego piśmiennictwa stwierdzono, iż aktualnie żadna z wymienionych metod nie jest dobrym pojedynczym markerem oceny stanu odżywienia ani prognostykiem dalszego rozwoju u noworodków urodzonych przedwcześnie, aczkolwiek połączenie kilku metod z różnych grup wydaje się być obiecującą możliwością.

STRESZCZENIE PRACY W JEZYKU ANGIELSKIM

Introduction

In the recent years, the number of the premature births in Poland has been constant, however due to a dynamic development of neonatology and introduction of new technological solutions, a survival rate of the Very Low Birth Weight neonates defined as body weight less or equal 1500g is increased [53]. Since a mortality rate is decreased in this particular pediatric population, their proper nutrition status and normal physical development have become one of the goals of the long-term care. Deficiencies in body mass and/or body height present significant problems in premature neonates. When compared to their term counterparts, they are more susceptible to malnutrition, developmental delays during early period of extra uteral life, also they more often experience mineral deficits of their bones and problems in neuro-physical development later in life [54,55]. On the other hand, childhood obesity and associated diseases, such as diabetes or arterial hypertension, present yet another factor that makes optimal treatment even more difficult.

Published data confirm an increased risk of metabolic syndrome later in life in the premature neonates with very low birth weight [56-58].

Nutrition during first months of life affects not only body height and body composition, but also plays a significant role in the long term control of appetite, programming of the mechanisms regulating satiety center in the central nervous system and mechanisms based on the factors released from the peripheral tissues [59,60].

Objectives

The primary goal of the study was identification of the early markers of nutritional status and evaluation of the effects of the newborn's type of feeding on the body composition and selected markers of nutritional status in newborns.

1. Analysis of usefulness of bioimpedance analysis in determination of the body composition of the premature neonates.
2. Analysis of the body composition determined by bioimpedance analysis in newborns with a special focus on the amount of adipose tissue as a function of type of nutrition (breast milk vs modified infant formula for preterm babies) and length of pregnancy.
3. Presence of irisin in the breast milk vs infant formula.
4. Analysis of usefulness of visfatin and irisin concentration in the blood as markers of nutritional status in newborns.

Materials (applies articles 1, 2, 3, 4)

It was a prospective cohort study that included 72 neonates (53 babies born prematurely with very low birth weight (VLBW), and 19 babies born at their physiological birth time that constituted a control group), hospitalized at Neonatal Intensive Care Unit (NICU), Department of Paediatrics, Institute of Paediatrics, Faculty of Medicine, Jagiellonian University Medical College, Cracow, Poland, during time period between 01.02.2014 and 30.11.2016.

Study inclusion criteria included:

- Written parents'/caregivers' consent for their child to participate in the study,
- Birth weight between 1000g and 1500g in the VLBW group, and 2500g and 4000g full-term control group,
- Initiation of the enteral feeding within first 48 hours of life,
- Admission to NICU prior to the 5th day of life.

Study exclusion criteria included:

- Multiple congenital malformations,
- Chromosomal aberrations,
- Intraventricular haemorrhage grade IV,
- Severe infections (early-onset sepsis, meningitis),
- Necrotizing enterocolitis,
- Birth asphyxia (Apgar Scale < 3 points in the 5th minute of life).

The study was financed by the Nutricia Foundation grant no RG 7/2013.

Methods (applies to articles No 1, 2, 3, 4)

The patients were evaluated in their first week of life, and 4 weeks later, in their 5th week of life. Patient's body weight, body length, and head circumference were recorded and the blood and breast milk samples were collected in order to carry out the following biochemical analyses:

1. Analysis of visfatin concentration in the blood samples obtained from the premature babies with very low birth weight compared to the full-term counterparts.
2. Analysis of visfatin concentration in the milk samples from the mothers of very low birth weight neonates compared to those obtained from the mothers of the full-term babies.
3. Analysis of irisin concentration in the blood samples of the premature babies with very low birth weight compared to the blood samples of the full-term babies.
4. Analysis of irisin concentration in the breast milk from the mothers of premature babies with very low birth weight compared to the milk samples from the mothers of full term babies.

In addition, samples of 14 different infant formulas were analyzed to determine concentrations of visfatin and irisin. Biochemical studies were carried out at the Department of Clinical Biochemistry, Institute of Paediatrics, Faculty of Medicine, Jagiellonian University Medical College, Cracow, Poland.

Methodology of biochemical analyses

The blood (1ml) and milk (5ml) samples were collected into the probes with aprotinin, a protease inhibitor, then transferred to the Clinical Biochemistry Department, where they were immediately centrifuged and stored at -80C temperature until further diagnostics were carried out. Irisin concentration was determined by a commercially available ELISA assay (RAG018R, BioVendor). Visfatin concentration was monitored by a commercially available ELISA assay (RAG004R, BioVendor).

Methodology of electrical bioimpedance analysis of body composition

Analysis of the body composition by electrical bioimpedance analysis was performed twice. In the group of very low birth weight preterm babies, the measurements were done during the first week of life and at the predicted time of delivery, while in the control full term group – during the first week and third month of life. Methodology of electrical bioimpedance analysis was described in each article. Body composition was determined using high frequency analyzer of the body composition (BCM, Fresenius Medical Care, Bad Homburg, Germany) and four dedicated disposable electrodes BCM-FMC (<25kg). The tested babies were laid down in supine position with extended upper and lower extremities. Two electrodes were attached to the dorsal surface of the hands, the other two – to the dorsal surface of the feet. The analysis was performed 2 minutes after placing the electrodes in their assigned positions.

Data regarding prenatal and perinatal history, hospitalization at the NICU, and treatment results were stored in the special database in Excel format.

Ethics

The protocol of the above study was approved by the Jagiellonian University Bioethics Committee, approval No KBET/58/B/2013 dated 04.04.2013. Parents/care givers of the babies included in the study were informed in details about the goals and progress of the study. The participation in the study was voluntarily. The parents/caregivers signed informed consent to participate in the stud;, they were also informed about possibility to withdraw their child from the study at any given time. They were ensured that their child treatment at the NICU would not change if they decided to withdraw from the study.

Summary of the results

The chapter below presents short summaries of the articles 1-5, which constitute the doctoral dissertation.

Article No 1 published in Developmental Medicine

This article presented results of a pilot study, which goal was to determine usefulness of bioelectrical impedance in analysis of body composition in very low birth weight neonates compared to their full-term counterparts. There was a detailed description of the electrical bioimpedance analysis in the patients, with some scientific background of this method.

There were higher impedance values measured at the higher frequencies (5,50, 100Hz) in the VLBW neonates during their first week of life. Index of bioelectrical impedance was positively

correlated with the total body water (TBW) in both analyzed groups. Bioimpedance index, total body water as well as relative (percentile fraction) of body fat tissue (%FM) were statistically lower in the VLBW neonates compared to the full term babies at their 3rd month of life. There was a decrease in fractional amount of total body water in both VLBW and full-term babies as they became older. The total body water was comparable in the two groups at 3 months.

We showed in this article that electric bioimpedance was an easy, non-invasive method to determine amount of total body water, non-fat body mass and fat tissue in the VLBW neonates and full term babies. Our study showed some significant differences in the body composition between preterm neonates compared to the babies born at their physiological time of birth, and the above differences lasted for their first 3 months of life.

Article No 2 published in Pediatrics and Neonatology

This article presented analysis of differences in body composition as function of type of feeding between VLBW neonates examined at their predicted physiological due date compared to the neonates born at term during their 1st week of life. The group of VLBW neonates was divided into neonates fed with milk formula (group A) and breast milk (group B). The golden standard of body composition was represented by neonates born at their physiological due date, who constituted our control group (group C). The analyzed groups A and B did not differ from each other in their anthropometric measurements determined at birth, number of points in CRIB and SNAPEII scales, development of prematurity complications during their hospitalization or socio-economic status of their mothers, which could have affected general status of the patients.

We determined that VLBW neonates fed with milk formula had higher body mass and larger head circumference compared to the VLWB neonates fed with breast milk at their predicted time of birth. We also noticed significant differences in body composition of VLBW neonates as function of type feeding as compared to the control group C. The group A neonates, fed with milk formula, presented lower percentile amount of non-fat body mass, increased fractional and absolute amount of fat tissue at their predicted due date as compared to the full term control group C. However in the preterm group fed with breast milk, their body composition (amount of non-fat body mass and fat tissue) was comparable the full term neonates.

The neonates born prematurely seemed to accumulate increased amount of fat tissue in the time period between their actual birth and predicted delivery date in comparison to the fetuses during their last trimester of pregnancy, however our study demonstrated that preterm babies fed with breast milk presented similar body composition to the babies born at term. Feeding exclusively with breast milk during early period of life was associated with reduced increase in body mass, and in a long term, it would decrease obesity risk during childhood and maturation time in babies born at term. It was the first study to show significant differences in body fat tissue as function of type of feeding in group of neonates born prematurely at such early stage in life, namely at their predicted due date.

Article No 3 published in Minerva Pediatrica

In the article No 3, we evaluated concentration of irisin, a hormone that prevented obesity, in the breast milk and milk formulas. Irisin concentration was determined in the breast milk from mothers of the VLBW preterm babies and the mothers of the control full term babies at two time points, during the first week after birth and then 4 weeks later, during 5th week of life. We also tested samples of 14 different milk formulas commercially available, which included products designated for preterm babies, babies born at physiological due date, and formulas with high degree hydrolyzed cow milk. We confirmed irisin presence both in the breast milk and all the tested milk formulas. We did not find any differences in irisin concentration between breast milk of the mothers of VLBW and full term babies either during first week of life or four weeks later. We observed increase in irisin concentration in breast milk as time of lactation continued. We demonstrated significantly lower irisin concentration in the milk formulas at both time points, regardless of the time of delivery, prematurity. Milk formulas designated for premature babies included the highest irisin concentration, while the hydrolyzed cow milk proteins formulas included only traces of the tested hormone.

We suspected that irisin delivered with the breast milk might increase local supply of this hormone in the stomach, therefore it might affect the amount of ingested food, decrease fat absorption from the intestinal tract and promote development of healthy body composition, without irisin increase in the circulation. We suggested that newborns fed with milk formulas that included minute amounts of irisin might develop smaller amount of brown fat tissue resulting in incorrect body composition and increased risk of obesity later in life. Our results might represent a piece of evidence proving effect of type of feeding on the noticed differences in body composition among newborn population.

Article No 4 published in Plos One

The last stage of the study, presented in the article No 4, was a comparison of irisin and visfatin in the breast milk, in the serum of the babies born either prematurely or full term, along with analysis of potential associations between serum irisin and visfatin concentrations and selected anthropometric measurements, body composition. This was the first published study to evaluate serum irisin in the VLBW neonates. Our VLBW neonates at the time of their predicted delivery presented increased percentile fraction of fat mass (%FM), while %TBW and %FFM were decreased compared to eh newborns born at term during their first week of life.

The VLBW neonates showed statistically lower serum irisin concentration compared to their full term counterparts both during the 1st and 5th week of life. Even though irisin concentration was lower in the preterm neonates' group, its concentration during the 1st week of life was positively associated with the body weight, body length, head circumference at birth, and body weight and head circumference at 5th week of life. Serum irisin concentration during 1st week of life was positively correlated with its concentration at 5th week of life. Visfatin concentration at 5th week of life was negatively associated with body weight, body length and head circumference at birth when presented as z-scores, which might be associated with dynamic catch-up growthphase in the VLBW neonate group. Even more, we identified a strong negative association between irisin and visfatin concentrations during the 1st week, and then four weeks later, at 5th week. The two hormones antagonized each other; irisin was known to decrease obesity, while visfatin was typically increased in obesity. It was possible that the increase in concentration of one of the above hormones resulted in decrease of the other one; however the exact molecular mechanism would require further investigation.

Visfatin concentration in the breast milk of the VLBW mothers increased between the first and second analysis, and it was statistically increased in the 5th week after the delivery. It was also the highest measured visfatin concentration in both groups in regards to both time points of analysis during the study. It might be associated with the protective effect of visfatin, considering its insulin-mimetic effect and interaction with insulin receptor, preventing excessive weight loss after birth, which might be much more dangerous for the VLBW neonates compared to the full term babies. We did not observe any other differences between visfatin concentration in serum, breast milk and irisin in breast milk at both time points. Irisin and visfatin concentrations in breast milk at 1st analysis were positively associated with their corresponding measurements at 2nd time. We hypothesized that irisin concentration in breast milk might affect newborn adaptation process to extra-uterine life conditions, especially in regards to thermogenesis and glucose metabolism.

Article No 5 published in Developmental Period Medicine

This is an article describing current knowledge of clinical usefulness of selected biochemical parameters, such as albumin, prealbumin, transferrin, retinol binding protein, and hormones, such as somatomedin C, ghrelin, visfatin, in analysis of nutrition status of the prematurely born neonates. The paper also summarized two methods for body composition analysis, dual energy x-ray absorptiometry (DEXA) and bioelectrical impedance analysis (BIA) with the technical background for their use. Based on the review of the available at time literature, none of the methods listed above was a good single marker to determine nutritional status or allow to predict future development of the premature babies. However a combination of the above tests from different test groups seemed to be a promising option.