

## RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Lek. Kinga Gradowska

### **„Ultrasonograficzna ocena grubości tkanki tłuszczowej podskórnej i przedotrzewnowej - odległa analiza kohorty dzieci uczestniczących w Eu Childhood Obesity Project-CHOP”**

Choroby cywilizacyjne i społeczne to powszechny problem naszych czasów. Rozwój nowoczesnych technologii, liczne badania prowadzone nad wzrostem bezpieczeństwa ludzi i poprawy ich warunków życia sprawiły, że coraz więcej osób żyje dłużej i w lepszej kondycji, niż ich przodkowie. Wielu dolegliwości można by uniknąć, dzięki modyfikacji naszych codziennych przyzwyczajzeń. Tym, co prowadzi nas do odczuwania skutków chorób cywilizacyjnych, jest przede wszystkim niewłaściwa dieta i brak ruchu. Teoria programowania żywieniowego zakłada, że niekorzystne warunki w życiu płodowym mogą doprowadzić do nieodwracalnych zmian w budowie, metabolizmie i funkcjonowaniu wybranych narządów dziecka, przekładając się w ten sposób na zwiększone ryzyko rozwoju chorób sercowo-naczyniowych, cukrzycy typu 2, osteoporozy, a nawet nowotworów. Do takich niekorzystnych warunków podczas życia płodowego zalicza się zarówno niedobór składników pokarmowych lub hormonów, jak i ich nadmiar. Choć prowadzone badania pozwalają na coraz lepsze zrozumienie zależności między warunkami życia płodowego a prawidłowym rozwojem dziecka, nadal większość mechanizmów programowania żywieniowego wymaga dokładniejszego wyjaśnienia.

Tym większa jest wartość badań podjętych przez lek. med. Kingę Gradowską w ramach międzynarodowego projektu zakończonych pracą doktorską pod tytułem „Ultrasonograficzna ocena grubości tkanki tłuszczowej podskórnej i przedotrzewnowej - odległa analiza kohorty dzieci uczestniczących w Eu Childhood Obesity Project-CHOP”, stanowiącą ważny element w wyjaśnianiu problemów związanych z tym zagadnieniem.

Praca ( 120 stronnicowa) napisana jest w układzie typowym dla rozpraw doktorskich: składa się z obszernego *Wstępu* zawierającego z 4 podrozdziałów oraz *Części badawczej*, w której Autorka przedstawiła *Założenia* i *Cele pracy*, *Materiał i metody*, *Wyniki badań* oraz *Dyskusję* zakończoną czterema *Wnioskami*, 143 pozycjami aktualnego i starannie dobraneo

*Piśmiennictwa* oraz zwięzłym i rzetelnym *Streszczeniem*, dopełnionych właściwymi spisami rycin i tabel.

Następujące po sobie podrozdziały *Części wstępu* wprowadzają czytelnika w aktualny przegląd zagadnień związanych z tematyką pracy takich jak: choroby cywilizacyjne, hipoteza „programowania żywieniowego”. Bardzo interesującą część dotyczącą zagadnień związanych z tkanką tłuszczową - takich jak : adipogeneza, histologiczne rodzaje tkanki tłuszczowej, funkcje tkanki tłuszczowej, udział tkanki tłuszczowej podskórnej i trzewnej w patomechanizmie chorób cywilizacyjnych. Dopełnieniem wstępu był doskonały podrozdział opisujący prawidłowy skład ciała oraz metody jego oceny.

Rozpoczynając *Część badawczą* Autorka przedstawiła zasadnicze założenia i cele swojej pracy jakimi były:

Cel główny:

Ultrasonograficzna ocena grubości brzusznej tkanki tłuszczowej przedotrzewnowej i podskórnej uczestników projektu EU Childhood Obesity Project ( akronim - CHOP ) w wieku 11 lat.

Cele dodatkowe:

Ocena ilości tkanki tłuszczowej za pomocą pomiarów ultrasonograficznych w porównaniu z pomiarami antropometrycznymi, BIA oraz DEXA.

Analiza wpływu innych czynników, oprócz interwencji dietetycznej w wieku niemowlęcym na grubość tkanki tłuszczowej przedotrzewnowej i podskórnej

Ocena dynamiki przyrostu obu warstw tkanki tłuszczowej mierzonej przy pomocy usg wraz z wiekiem (w 5 i 11 roku życia)

Wyznaczone cele Autorka realizowała dzięki przemyślanej i bardzo dobrze opracowanej metodyce badania oraz przeprowadzonej analizie statystycznej przedstawionych w rozdziale *Materiał i metody*.

W badaniu uczestniczyli 11 – latkowie z programu EU CHILDHOOD OBESITY PROJECT-CHOP. Wyjściowo do tego międzynarodowego badania klinicznego z randomizacją zostało zrekrutowanych 1678 niemowląt z 5 krajów europejskich ( Belgia , Hiszpania , Niemcy , Polska , Włochy ) w okresie od 1.10.2002 do 31.07.2004 r.

**Kryteria włączenia do badania :**

- donoszone, eutroficzne, zdrowe niemowlęta do 8 tygodnia życia,
- z niepowikłanej ciąży,

**Kryteria wykluczenia :**

- wcześniactwo ,
- hipotrofia lub hipertrofia,
- patologia ciąży i porodu mogące mieć potencjalny wpływ na rozwój i wzrastanie,

**Kryteria włączenia do grupy porównawczej :**

- donoszone, eutroficzne, zdrowe niemowlęta do 8 tygodnia życia,
- z niepowikłanej ciąży,
- deklarowane i realizowane karmienie pokarmem kobiecym,

Dzieci podzielono na 3 grupy :

**Grupa 1** - dzieci karmione w okresie niemowlęcym mieszanką mleczną o niższej zawartości białka ( LP – low protein ) 540 dzieci,

**Grupa 2** - dzieci karmione w okresie niemowlęcym mieszanką mleczną o wyższej zawartości białka ( HP – high protein ) 550 dzieci,

**Grupa 3** - dzieci karmione pokarmem matki ( BF – breastfed ) 588 dzieci,

Dzieci poddane interwencji dietetycznej były obserwowane podczas regularnych wizyt kontrolnych w ciągu kolejnych miesięcy i lat swojego życia. Oprócz parametrów biochemicznych, antropometrycznych, kwestionariuszy aktywności fizycznej oraz diety, w 5 i 11 roku życia ( wizyta T60 i T132 ; odpowiednio 60 i 132 miesiące życia ), wykonano ultrasonograficzny pomiar grubości tkanki tłuszczowej podskórnej i przedotrzewnowej .Ocenę przeprowadzono u wszystkich 11-latków, które zgłosiły się na wizytę i miały wykonane badanie usg. ( 412 dzieci ).

**U dzieci w wieku 11 lat dokonywano badania:**

- 1) antropometryczne – wykonane zgodnie ze standardem zalecanym przez WHO :
  - fałdy skórno – tłuszczowe : biceps , triceps , mięsień podłopatkowy i nadbiodrowy;
  - obwody : głowy , klatki piersiowej , środkowego ramienia , talii , bioder , uda;
  - długość/wysokość : wzrost , długość piętowo-kolanowa , długość siedzeniowa , szerokość nadgarstka;
  - masa ciała;

- 2) ciśnienia tętniczego krwi mierzone przy pomocy automatycznej metody oscylometrycznej;
- 3) bioimpedancji elektrycznej wykonanej przy pomocy aparatu Tanita Corporation , Tokio, Japonia, BC 418 MA;
- 4) pomiary geometrii dłoni i siły chwytu mierzone przy użyciu dynamometru;
- 5) aktualnej diety badanej przy pomocy wystandaryzowanego kwestionariusza European Food Propensity Questionnaire ( EFPQ);
- 6) przeprowadzono behawioralny kwestionariusz Strengths and Difficulties Questionnaire (SDQ )celem wykrycia innych czynników behawioralnych mogących wpływać na ryzyko otyłości;
- 7) poziom aktywności fizycznej (celem monitorowania aktywności fizycznej i wydatku energetycznego ) sprawdzono przy pomocy :
  - kwestionariusza aktywności fizycznej w modyfikacji Fels ( Fels physical activity questionnaire ; Fels PAQ )oraz kwestionariusza aktywności fizycznej dla starszych dzieci ( Physical Activity Questionnaire for Older Children ;PAQ-C );
  - akcelerometru ( f-my Sensewear Armband) – trzydniowe pomiary;
- 8) krew była pobierana celem wykonania oznaczeń poszczególnych parametrów;
- 9) badanie moczu wykonano w laboratorium centralnym w Warszawie oznaczając : białko, albuminy, mikroalbuminurię, kreatyninę, mocznik, kwas moczowy, osmolarność, sód, potas, wapń;
- 10) badanie densytometryczne przeprowadzono zgodnie z standardem wykonywania badań DEXA , jako złoty standard techniki oceny masy kostnej oraz precyzyjną metodę oceny tkanki tłuszczowej i beztłuszczowej. Efektywna dawka promieniowania otrzymana przez pacjenta podczas badania wynosiła około 0,1 uGy.
- 11) wykonano ultrasonograficzne pomiary :
  - nerek,
  - grubość kompleksu błony środkowej i wewnętrznej tętnicy szyjnej,
  - grubość tkanki tłuszczowej podskórnej i przedotrzewnowej wykonany zgodnie ze ściśle opracowanym protokołem – opisanym poniżej .

Badanie ultrasonograficzne przeprowadzane były przez niezależnego badacza. Obrazy zapisywano w formie cyfrowej i analizowane były w trybie offline.

Ultrasonograficzny pomiar grubości tkanki tłuszczowej podskórnej i przedotrzewnowej wykonano na podstawie metody opracowanej przez Suzuki et al. z modyfikacjami opisanymi przez Holzhauser oraz Mook-Kanamori i współautorów.

Metoda ta została wybrana przez badaczy, jako jedna z prostych, bezpiecznych i powtarzalnych metod pozwalających ocenić rozkład tkanki tłuszczowej ( przedotrzewnowej oraz podskórnej )w organizmie. Z uwagi na główne ograniczenia tej metody, jaką jest zależność wyników od umiejętności badającego, dla potrzeb badania opracowano standard wykonywania tego badania dla wszystkich ośrodków badawczych uczestniczących w badaniu oraz przeprowadzono niezbędne wspólne szkolenia.

Badanie wykonywano przy użyciu ultrasonograficznej sondy liniowej wysokiej rozdzielczości 5-12 MHz. U pacjenta, będącego w pozycji leżącej na plecach z kończynami wzdłuż ciała ustawiano głowicę ultrasonograficzną prostopadle do powierzchni skóry wzdłuż środkowej linii ciała, na wysokości wyrostka mieczykowatego mostka. Był to anatomiczny punkt orientacyjny dla uzyskania optymalnych wyników wykonywanego pomiaru. Badanie wykonywano w miarę możliwości bez ucisku sondą oraz dokładnie w linii środkowej powyżej kresy białej. Niezbędne było ustawienie sondy tak, aby pomiędzy tkanką tłuszczową podskórną, a przedotrzewnową nie znajdowała się tkanka mięśniowa. Zdjęcia wykorzystywane do pomiarów wykonywane były pod koniec fazy swobodnego wdechu. U każdego pacjenta wykonywano 3 pomiary. Obrazy zapisywane były w formacie JPG. Punktem wyznaczającym miejsce wykonywania pomiaru był koniec wyrostka mieczykowatego mostka. Warstwę tkanki tłuszczowej podskórnej mierzono, jako odległość pomiędzy skórą właściwą, a kresą białą. Tkanke tłuszczową przedotrzewnową mierzono zaś, jako odległość między kresą białą, a otrzewną przylegającą do wątroby. Kolejny pomiar grubości warstw tych tkanek, wykonywano, w taki sam sposób, w odległości 1 cm ( w kierunku pępka ) od pierwszych pomiarów, celem wyliczenia pól powierzchni przekroju obu tkanek tłuszczowych. Spośród trzech wykonywanych obrazów ultrasonograficznych u każdego pacjenta , do oceny wybierano jeden najlepiej technicznie. Następnie wykonywano 3 obliczenia grubości tkanki tłuszczowej dla tego obrazka. Jako wynik pomiaru grubości tkanki tłuszczowej przyjmowano

średnią wyliczoną z tych 3 obliczeń. Celem wyliczenia pól powierzchni zmierzonych obszarów posługiwano się stworzonym algorytmem matematyczno - informatycznym.

Uzyskano zgodę koordynatora projektu CHOP na wykorzystanie danych do analizy w ramach pracy doktorskiej.

Wyniki Autorka czytelnie przedstawiła na 3 rycinach, 12 wykresach i w 45 tabelach.

W wieku 11 lat nie wykazano różnicy w grubości żadnego z rodzajów tkanki tłuszczowej pomiędzy grupami z interwencją żywieniową. Stwierdzono natomiast mniejszą grubość tkanki tłuszczowej przedotrzewnowej u dzieci karmionych piersią niż u dzieci karmionych mieszanką ( $p = 0,02$ ), nie stwierdzono różnicy w grubości tkanki tłuszczowej podskórnej. U dziewczynek grubość tkanki tłuszczowej podskórnej i przedotrzewnowej była istotnie większa niż u chłopców. Wraz z postępem dojrzewania stwierdzono istotny przyrost głównie tkanki tłuszczowej podskórnej u dziewcząt, czego nie zaobserwowano u chłopców. Pomędzy 5 a 11 rokiem życia nastąpił większy przyrost tkanki tłuszczowej podskórnej ( $\Delta$  SC fat  $\sim 60,7\%$ ), niż tkanki tłuszczowej przedotrzewnowej ( $\Delta$  PP fat  $\sim 34,2\%$ ), niezależnie od przynależności do grupy interwencyjnej. Grubość obu rodzajów tkanki tłuszczowej była zależna od BMI ojca. Stwierdzono wpływ aktywności fizycznej o intensywności powyżej 6 METs na godzinę na redukcję tkanki tłuszczowej i przedotrzewnowej,  $p < 0,01$ . Dodatkowa godzina wysiłku dziennie na poziomie przynajmniej 6 METs / godzinę redukowała grubość tkanki przedotrzewnowej średnio o 0,34 cm.

Uznanie recenzenta wzbudził rozdział Dyskusja, w którym Doktorantka bez powtórzeń, analizuje wyniki swoich badań. Uzyskane przez siebie wyniki badań dyskutuje, zestawiając je w kontrpropozycjach do osiągnięć najważniejszych badaczy z omawianego tematu. Podkreślić należy swadę i łatwość zestawiania kluczowych problemów, wynikających z oceny uzyskanych w rozprawie wyników z opiniami innych autorów, co świadczy o dużej wiedzy Autorki. Uznanie recenzenta wzbudził również podrozdział dyskusji na części omawiające zalety swojego badania, jego ograniczenia oraz perspektywy dalszych badań.

Po przeprowadzonej dyskusji Doktorantka przedstawiła wnioski, które były odpowiedzią na postawione przez siebie cele pracy.

## Wnioski

1. Rozkład brzusznej tkanki tłuszczowej jest zależny od diety w pierwszym roku życia. Karmienie naturalne wydaje się mieć jednak dominujące znaczenie nad interwencją żywieniową polegającą na podaży różnej ilości spożywanego białka.
2. U dzieci karmionych piersią grubość tkanki tłuszczowej przedotrzewnowej jest mniejsza niż u dzieci karmionych mlekiem modyfikowanym.
3. Tempo przyrostu tkanki tłuszczowej podskórnej i przedotrzewnowej jest zależne od płci i dojrzewania, przy czym u dziewcząt tempo przyrostu tkanki tłuszczowej podskórnej jest większe niż tkanki tłuszczowej przedotrzewnowej.
4. Wysiętek fizyczny o dużej intensywności redukuje tkankę tłuszczową, zwłaszcza przedotrzewnowej.

W ocenianej pracy Recenzent znalazł niewielkie błędy stylistyczne i interpunkcyjne, ujednolicenia wymagałoby forma przedstawienia pozycji piśmiennictwa, które zawiera 143 dobrze dobranych i aktualnych pozycji, głównie obcojęzycznych i pod tym względem nie budzi zastrzeżeń. W części Materiał i Metody nie znalazłem informacji, chociaż zapewne przez przeoczenie o zgodzie Komisji Bioetycznej na badanie.

Jeśli chodzi o metodykę pomiarów ultrasonograficznych informacji wymagałoby czy wykonywała je w danym ośrodku tylko jedna osoba czy też więcej. Jeśli więcej osób - czy istniał jakiś system szkolenia, weryfikacji w ramach programu, że u tego samego pacjenta większa grupa wykonujących badanie usg - ocenia w taki sam sposób wielkość tkanki tłuszczowej, przy takich samych założeniach pomiarowych.



### **Wniosek końcowy**

Mimo przedstawionych wyżej uwag recenzowana rozprawa doktorska Pani Kingi Gradowskiej prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną, jest oryginalnym i rzetelnym wkładem w rozwój wiedzy na ten temat. Doktorantka wykazuje umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.

Podkreślić należy dodatkowo umiejętność pracy w międzynarodowych grupach badawczych. Praca odpowiada w pełni warunkom stawianym pracom na stopień doktora nauk medycznych, dlatego wnioskuję o dopuszczenie Pani lek.med. Kingi Gradowskiej do dalszych etapów obrony pracy doktorskiej oraz jej wyróżnienie według stosownych wymagań i przepisów prawa.

Artur Mazur



