

# Katestatin i vitamin D u pretilosti i metaboličkom sindromu djece i adolescenata

---

Šimunović, Marko

Doctoral thesis / Disertacija

2019

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Split, School of Medicine / Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:171:089068>

*Rights / Prava:* [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-03-12**



*Repository / Repozitorij:*

[MEFST Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U SPLITU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**MARKO ŠIMUNOVIĆ, dr. med.**

**KATESTATIN I VITAMIN D U PRETILOSTI I  
METABOLIČKOM SINDROMU DJECE I ADOLESCENATA**

**DOKTORSKA DISERTACIJA**

**SPLIT, 2019.**

Ovaj rad izrađen je na Zavodu za endokrinologiju i neurologiju, Klinike za dječje bolesti, Kliničkog bolničkog centra Split i Zavod za medicinsko laboratorijsku dijagnostiku, Kliničkog bolničkog centra Split.

**Voditelj rada:** Prof. dr. sc. Veselin Škrabić, dr. med.

*Na početku, želio bih se zahvaliti svim kolegama i suradnicima koji su sudjelovali u ovome istraživanju.*

*Zahvaljujem svom mentoru i učitelju prof.dr.sc. Veselinu Škrabiću na neizmjernej pomoći u izradi ove doktorske disertacije.*

*Zahvaljujem se svojoj obitelji, a posebno svojim roditeljima koji su me kroz sve ove godine školovanja neizmjereno podržavali.*

*Na kraju, najveća zahvala ide mojoj supruzi Martini i mome sinu Janu koji su cijelo vrijeme bili uz mene i bez kojih ovo sve ne bih imalo smisla.*



## SADRŽAJ

1. UVOD .....	8
1.1. Pretilost u djece i adolescenata .....	9
1.1.1. Definicije pretilosti u populaciji djece i adolescenata .....	9
1.2. Metabolički sindrom.....	11
1.2.1. Definicija metaboličkog sindroma u populaciji djece i adolescenata .....	11
1.2.2. Prevalencija metaboličkog sindroma u pretile djece i adolescenata .....	12
1.2.3. Patofiziološki mehanizam nastanka metaboličkog sindroma i kardiovaskularnih komplikacija.....	13
1.3. Kromogranin A .....	15
1.3.1. Katestatin .....	16
1.4. Vitamin D.....	22
1.4.1. Sinteza vitamina D.....	23
1.4.2. Procjena statusa vitamina D i definicija hipovitaminoze D u populaciji djece i adolescenata .....	23
1.4.3. Povezanost vitamina D i pretilosti.....	24
1.4.4. Povezanost vitamina D i metaboličkog sindroma .....	25
2. CILJEVI I HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA.....	28
3. ISPITANICI I POSTUPCI .....	31
3.1. Ispitanici.....	32
3.2. Definicije .....	32
3.3. Postupci.....	33
3.3.1. Klinički pregled i antropometrijska mjerenja .....	33
3.3.2. Uzorkovanje krvi i laboratorijske analize .....	34
3.4. Statistički postupci .....	35
4. REZULTATI .....	37
4.1. Serumske koncentracije katestatina u usporedbi s odrednicama MS i ostalim kardiovaskularnim rizičnim čimbenicima .....	48

4.2.	Serumske koncentracije 25(OH)D u usporedbi s odrednicama MS i ostalim kardiovaskularnim rizičnim čimbenicima .....	57
5.	RASPRAVA .....	63
5.1.	MS i kardiovaskularni rizični čimbenici u pretilo djece i adolescenata .....	64
5.2.	Serumske koncentracije katestatina i njegov utjecaj na MS i kardiovaskularne rizične faktore u pretilo djece i adolescenata.....	64
5.3.	Serumske koncentracije 25(OH)D i njegov utjecaj na MS i kardiovaskularne rizične faktore u pretilo djece i adolescenata.....	67
5.4.	Ograničenja i nedostaci studije .....	69
6.	ZAKLJUČCI.....	70
7.	SAŽETAK.....	73
8.	SUMMARY .....	76
9.	POPIS LITERATURA.....	79
10.	ŽIVOTOPIS.....	96

## POPIS OZNAKA I KRATICA

25(OH)D	25-hidroksi vitamin D
ALT	alanin-aminotransferaza
AST	aspartat-aminotransferaza
ATPIII	Američko društvo za kliničku endokrinologiju (engl. <i>American Association of Clinical Endocrinologists/American College of Endocrinology</i> )
CgA	kromogranin A
CRP	C-reaktivni protein
DBP	dijastolički krvni tlak (engl. <i>Diastolic Blood Pressure</i> )
ECLIA	metoda elektrokemiluminiscencije (engl. <i>electrochemiluminescence immunoassay analyzer</i> )
GGT	gama-glutamiltransferaza
HbA1c	glikirani hemoglobin A1c
HDL	lipoprotein visoke gustoće (engl. <i>High Density Lipoprotein</i> )
HOMA-IR	homeostatski model procjene inzulinske rezistencije (engl. <i>homeostatic model assessment of insulin resistance</i> )
IDF	Međunarodna dijabetička federacija (engl. <i>International Diabetes Federation</i> )
IL-6	interleukin 6
ISI	Matsuda indeks inzulinske osjetljivosti (engl. <i>Matsuda insulin sensitivity index</i> )
ITM	indeks tjelesne mase (engl. <i>Body Mass Index, BMI</i> )
IR	inzulinska rezistencija
LDL	lipoprotein niske gustoće (engl. <i>Low Density Lipoprotein</i> )

MS	metabolički sindrom
OB	opseg bokova
OGTT	test oralne tolerancije na glukozu (engl. <i>Oral Glucose Tolerance Test</i> )
OT	opseg trbuha (engl. <i>Waist circumference</i> )
SBP	sistolički krvni tlak (engl. <i>Systolic Blood Pressure</i> )
ŠBT2	šećerna bolest tipa 2
TNF- $\alpha$	čimbenik tumorske nekroze alfa
WHO	Svjetska zdravstvena organizacija (engl. <i>World Health Organization</i> )

## **1. UVOD**

## **1.1. Pretilost u djece i adolescenata**

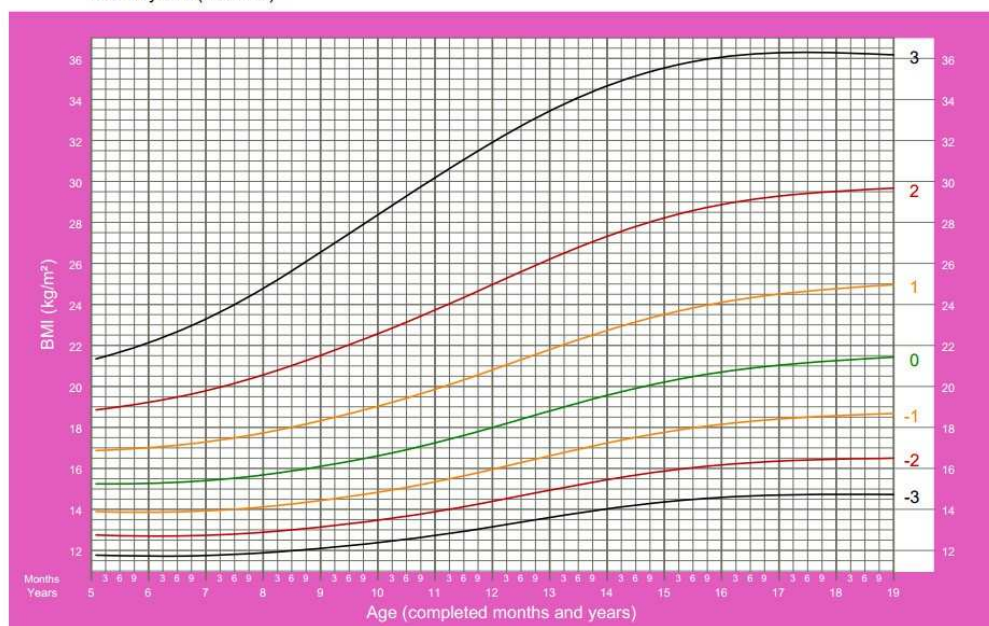
Pretilost u ranoj životnoj dobi je jedan od vodećih javno-zdravstvenih problema u svijetu (1,2). Dobro je poznato da su danas djeca prekomjerno izložena vanjskim čimbenicima ili „obesogenom“ okolišu (unos energije premašuje potrošnju energije) koji utječu na razvoj pretilosti (3,4). No važno je naglasiti da uz okolišne čimbenike ključnu ulogu u nastanku pretilosti imaju nasljedni čimbenici, s udjelom od 40% do 70%, ovisno o istraživanju (4,5). Danas su gotovo svako peto dijete i adolescent u Sjedinjenim Američkim Državama (SAD) pretili, a ovisno o studiji, prevalencija u Europi se kreće od 5% do 31% (6,7). Prema podacima Hrvatskog zdravstvenog-statističkog ljetopisa za 2016. godinu, prevalencija pretilosti u Hrvatskoj kretala se ovisno o dobi od 12% do 18% u školskoj dobi (8). Prilikom usporedbe s ljetopisom iz 2014. godine, prevalencija pretilosti u djece školske populacije je u porastu te se 2014. godine kretala od 10% do 15% ovisno o dobi (9). Također, u populaciji djece dobne starosti 7 godina u Splitsko-dalmatinskoj županiji u razdoblju od 1998. do 2008. godine, zabilježen je porast prevalencije pretilosti s 4,3% na 6,2%, u navedenom desetogodišnjem razdoblju (10). Zbog primjetnog porasta prevalencije pretilosti, iznimno je važno rano prepoznavanje rizičnih skupina u svrhu daljnjeg praćenja i prevencije kardiovaskularnih oboljenja. Naime, pretilost u ranoj životnoj dobi većinom se nastavlja u odraslu dob te je važan čimbenik razvoja kardiovaskularnih komplikacija (11). Rane kardiovaskularne komplikacije u kombinaciji s pretilošću značajno utječu na skraćenje ukupnoga životnog vijeka (12).

### **1.1.1. Definicije pretilosti u populaciji djece i adolescenata**

U odrasloj populaciji pretilost se definira na temelju indeksa tjelesne mase (ITM) te se smatra da je odrasla osoba prekomjerno uhranjena ukoliko ima ITM između 25 i 30 kg/m<sup>2</sup>, a preti ukoliko je ITM iznad 30 kg/m<sup>2</sup> (13). Kod pedijatrijske populacije pretilost se definira prema prilagođenim centilnim krivuljama ITM za dob i spol, a iz kojih se izračunava standardna devijacija te se vrijednost prikazuje u obliku z vrijednosti (engl. *z score*) (Slika 1.) (14,15). Dijete ili adolescent se smatra prekomjerno uhranjen ako je ITM z-vrijednost između 1 i 2, a preti ako je ITM z-vrijednost veća od 2, koristeći centilne krivulje Svjetske zdravstvene organizacije (engl. *World Health Organization*, WHO) (14).

## BMI-for-age GIRLS

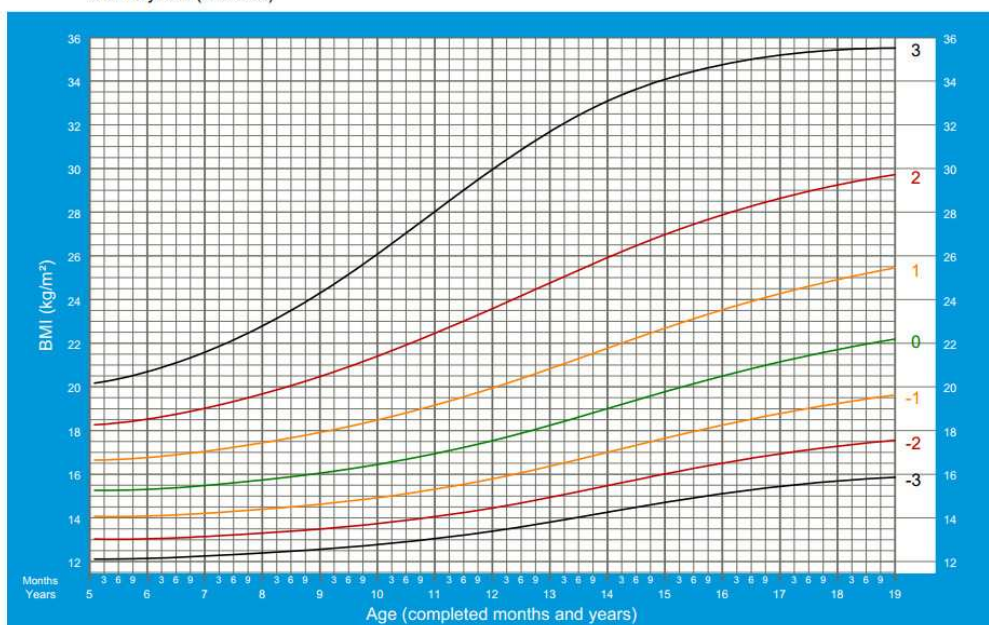
5 to 19 years (z-scores)



2007 WHO Reference

## BMI-for-age BOYS

5 to 19 years (z-scores)



2007 WHO Reference

**Slika 1.** Centilne krivulje prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji (engl. *World Health Organization*, WHO) za ITM s izraženim ITM z-vrijednostima prilagođenim za dob i spol  
Izvor: Svjetska zdravstvena organizacija (engl. *World Health Organization*, WHO)

Postoje i druge mogućnosti u procjeni pretilosti u pedijatrijskoj populaciji kao što su radiološke metode (magnetska rezonanca i apsorpcimetrija dvostrukim rendgenskim zrakama) i antropometrijska mjerenja (13,16). Radiološke metode su u mogućnosti izrazito precizno procijeniti stupanj pretilosti, ali se ne koriste u redovnoj kliničkoj praksi zbog visokih troškova, dostupnosti i/ili ionizirajućeg zračenja (16). Antropometrijska mjerenja koja uključuju opseg trbuha (OT), opseg bokova (OB), mjerenje kožnih nabora i omjer OT/OB, koriste se u redovitoj kliničkoj praksi za procjenu distribucije masnoga tkiva u pretilih osoba, ali treba naglasiti da su navedena mjerenja izrazito subjektivna te vrijednosti često variraju a za populaciju djece i adolescenata nedostaju referentni rasponi. (13,17).

## **1.2. Metabolički sindrom**

Porast prevalencije pretilosti je povezan s rastućim brojem ranih komplikacija u djece i adolescenata pa tako i s metaboličkim sindromom (MS), što dodatno ukazuje na važnost ranog prepoznavanja MS-a u dječjoj i adolescentnoj populaciji (1,2,18,19). MS ili drugim nazivom sindrom „X“, prvi put je opisan 1988. godine kao novi pojam, a definira ga kombinacija kardiovaskularnih rizičnih čimbenika: abdominalna pretilost, hipertenzija, inzulinska rezistencija (IR) i hiperlipidemija (20).

### **1.2.1. Definicija metaboličkog sindroma u populaciji djece i adolescenata**

Najčešće definicije MS-a u odrasloj populaciji su prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji (engl. *World Health Organization*, WHO), Američkom društvu za kliničku endokrinologiju (engl. *American Association of Clinical Endocrinologists/American College of Endocrinology*, ATP III) i Međunarodnoj dijabetičkoj federaciji (engl. *International Diabetes Federation*, IDF) (21–23). Sve navedene definicije sastoje se od skupine kardiovaskularnih rizičnih čimbenika koji uključuju pretilost, poremećaj metabolizma lipida (povišeni trigliceridi i snižen lipoprotein visoke gustoće (engl. *High Density Lipoprotein*, HDL) kolesterol), poremećaj metabolizma glukoze i povišeni krvni tlak, a WHO definicija uz navedene čimbenike uzima u obzir i IR-u i mikroalbuminuriju (21–23). U pedijatrijskoj populaciji situacija je puno kompleksnija te je do danas korišteno



više od 40 različitih definicija, a koje su izvedene iz definicija za odrasle (24,25). IDF je 2007. godine objavio novu definiciju MS-a za djecu i adolescente starije od 10 godina te se od tada definicija prema IDF najčešće i koristi (Tablica 1.) (26). Prema definiciji IDF, da bi dijete i adolescent zadovoljili kriterije za MS, bolesnik mora imati centralni tip pretilosti te 2 ili više ostalih čimbenika (povišene trigliceride, snižen HDL kolesterol, povišeni krvni tlak sistolički krvni tlak (engl. *systolic blood pressure*, SBP) i/ili dijastolički krvni tlak (engl. *diastolic blood pressure*, DBP) te poremećen metabolizam glukoze) (26).

**Tablica 1.** Definicija metaboličkog sindroma prema IDF za djecu i adolescente

	<b>Dob od 10 do 16 godina</b>	<b>Dob stariji od 16 godina</b>
Pretilost	Opseg trbuha $\geq 90$ percentile	Opseg trbuha: Žene $\geq 80$ cm Muškarci $\geq 94$ cm
Trigliceridi	$\geq 1,7$ mmol/L ( $\geq 150$ mg/dL)	$\geq 1.7$ mmol/L ( $\geq 150$ mg/dL)
HDL kolesterol	$< 1,03$ mmol/L (40 mg/dL)	Muškarci: $< 1.03$ mmol/L ( $< 40$ mg/dL) Žene: $< 1.29$ mmol/L ( $< 50$ mg/dL)
Krvni tlak	SBP $\geq 130$ mmHg DBP $\geq 85$ mmHg	SBP $\geq 130$ mmHg DBP $\geq 85$ mmHg
Glukoza	Glukoza na tašte $\geq 5.6$ mmol/L ili dijagnoza šećerne bolesti tipa 2	Glukoza na tašte $\geq 5.6$ mmol/L ili dijagnoza šećerne bolesti tipa 2

Preuzeto iz: Zimmet P, Alberti KG, Kaufman F, i sur. The metabolic syndrome in children and adolescents - an IDF consensus report. *Pediatr Diabetes*. 2007;8:299–306

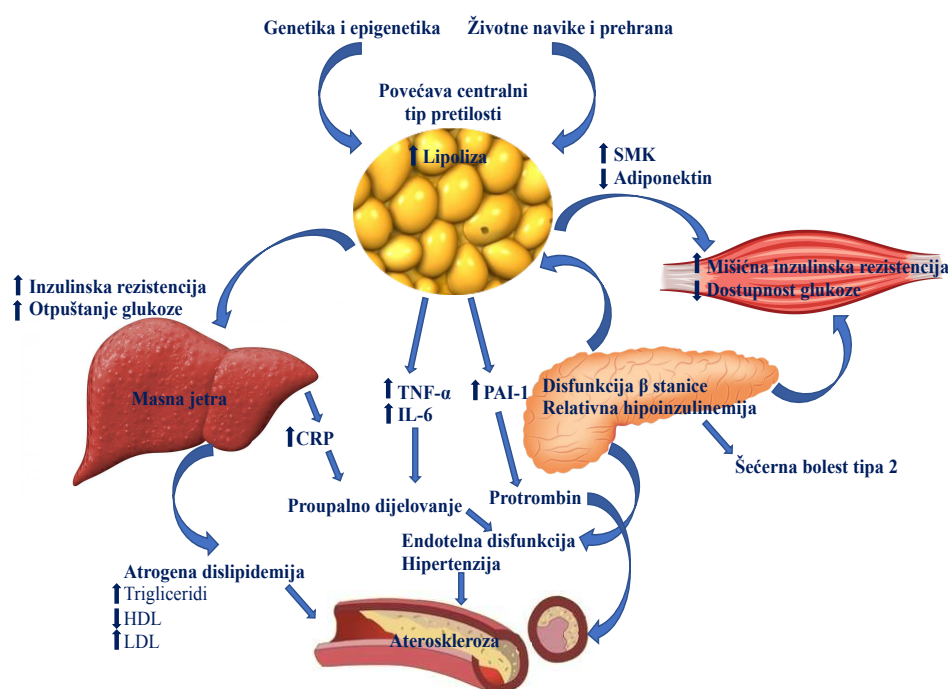
### 1.2.2. Prevalencija metaboličkog sindroma u pretilo djece i adolescenata

Prevalencija MS-a u pedijatrijskoj populaciji, prema različitim istraživanjima ovisi o definiciji MS-a i proučavanoj populaciji pretilo djece i adolescenata te se kreće od 10 do 60% (25). Na području Dalmacije, koristeći modificiranu IDF definiciju, prevalencija MS-a

u pretilo djece i adolescenata iznosi 30,3 % (2). Prevalencija MS-s u Dalmaciji je viša nego u susjednim mediteranskim državama. Tako je u Grčkoj MS prisutan u 7,7% pretilo djece, u Portugalu u 8,9% pretilih adolescenata te u Italiji u 23,3% pretilih adolescenata. Sva navedena istraživanja koristila su istu IDF-ovu definiciju (27–29). Prevalencija MS-a u izrazito pretilih adolescenata u Njemačkoj iznosila je 40,4%, a u populaciji pretilo djece i adolescenata u Srbiji 31,2% (18,27). Na prevalenciju MS-a ne utječe samo odabir definicije već i proučavana populacija sa svojim karakteristikama kao što su: stupanj debljine, dob, spol, životne i prehrabene navike (2).

### 1.2.3. Patofiziološki mehanizam nastanka metaboličkog sindroma i kardiovaskularnih komplikacija

IR i upala niskog stupnja smatraju se glavnim patofiziološkim mehanizmom nastanka ranih kardiovaskularnih komplikacija te šećerne bolesti tipa 2 (ŠBT2) i MS-a (Slika 2.) (30).



**Slika 2.** Patofiziološki mehanizam nastanka kardiovaskularnih komplikacija

Preuzeto iz: Samson SL, Garber AJ. Metabolic syndrome. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2014;43:1-23.

### **1.2.3.1. Inzulinska rezistencija**

Pretilost ima ključnu ulogu u nastanku IR-e, koja je definirana kao smanjena osjetljivost fizioloških mehanizama na djelovanje inzulina (1,30,31). Inzulinski receptori se nalaze na staničnim membranama gotovo svih stanica uključujući stanice jetre, masne stanice, mišiće i krvne žile, ali nije u potpunosti poznato utječe li IR na sva tkiva u jednakoj mjeri (1). Inzulin se nakon lučenja iz beta stanica gušterače prenosi portalnim krvotokom do jetre u kojoj potiče sintezu glikogena, smanjuje glukoneogenezu i potiče lipogenezu (31). U stanju IR-e nastaju promjene u metabolizmu glukoze te se razvija poremećaj homeostaze glukoze, dok izostaje učinak na smanjenje lipogeneze u jetri što rezultira razvojem dislipidemije (1,31,32). Ovaj paradoksalni mehanizam je prvi korak u nastanku kaskade metaboličkog poremećaja te posljedičnog nastanka kardiovaskularnih komplikacija MS-a i ŠBT2. U skeletnim mišićima IR remeti unos glukoze u stanicu, što za posljedicu ima hiperglikemiju (1,33) Također, IR djeluje i na masne stanice, a pogotovo na visceralne masne stanice, koje postaju dodatno otporne na djelovanje inzulina, što posljedično utječe na smanjenje lipogeneze te otpuštanje slobodnih masnih kiselina u krvotok (1,31).

Određivanje IR-e je izrazito zahtjevno u pedijatrijskoj populaciji, a sastoji se od mjerenja potrebe za glukozom za vrijeme infuzije egzogenog inzulina (engl. *euglycemic-hyperinsulinemic clamp*) te u slučaju da bolesnik ima IR-u potrebne su niže količine glukoze za postizanje normoglikemije nego u ispitanika koji imaju održanu inzulinsku osjetljivost (34,35). Navedena procedura je zlatni standard procjene IR-e, ali zbog komplikacija i dugotrajnosti nije standardna u svakodnevnoj kliničkoj praksi (35). Radi svega navedenoga, u rutinskoj kliničkoj praksi koriste se modeli procjene IR-e koji se temelje na mjerenjima bazalnih vrijednosti inzulina i glukoze kao što je homeostatski model procjene inzulinske rezistencije (engl. *homeostatic model assessment of insulin resistance*, HOMA-IR) te modeli koje se temelje na cjelokupnim vrijednostima glukoze i inzulina tijekom cijeloga testa oralne tolerancije na glukozu (engl. *Oral Glucose Tolerance Test*, OGTT) kao što je Matsuda indeks (engl. *Matsuda insulin sensitivity index*, ISI) (35–37). HOMA-IR je najčešći model procjene inzulinske rezistencije korišten u pedijatrijskoj populacije te je u više istraživanja pokazan kao dobar prediktor IR (35). Također, u nekoliko istraživanja korištena je procjena IR-e prema obliku krivulje glukoze kroz čitav OGTT kada je pokazano da monofazični oblik ima značajno nižu inzulinsku osjetljivosti u usporedbi s bifazičnim i višefazičnim krivuljama

glukoze (38,39). Nadalje, crna akantozna (engl. *acanthosis nigricans*) jedna je od najčešćih kožnih promjena u pretilih bolesnika i indirektni je znak IR-e (40).

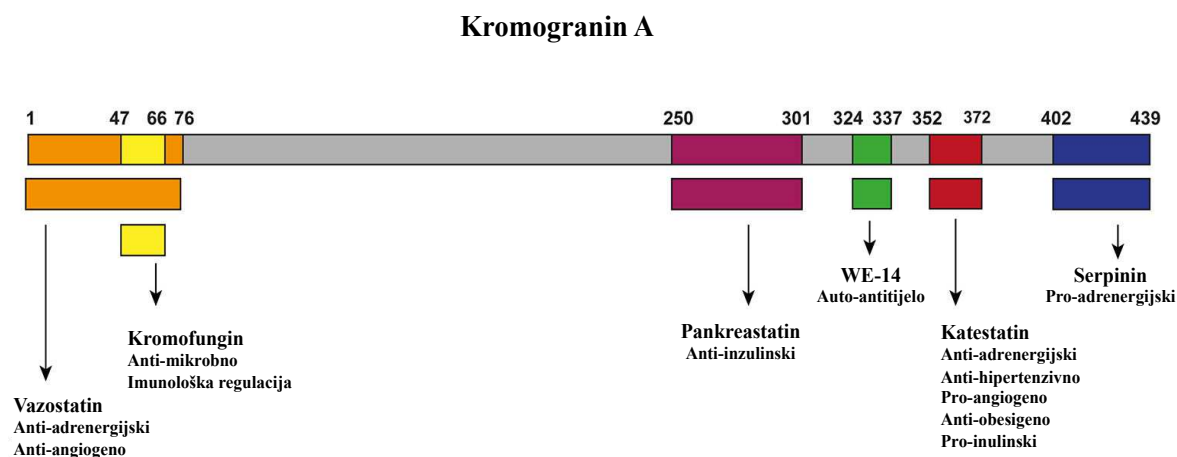
### **1.2.3.2. Upala niskog stupnja**

Sve je više znanstvenih dokaza koji ukazuju da pretilost potiče upalno stanje u organizmu te se povezuje s nizom kardiovaskularnih bolesti kao što su: hipertenzija, dislipidemija, ŠBT2 i opstruktivna apneja tijekom spavanja (1,41,42). Dugo se smatralo da je jedina funkcija masnih stanica pohrana viška energije, ali danas se zna da masne stanice služe kao samostalni endokrinološki organ koji izlučuje različite peptide uključujući čimbenike upale citokine, adipokine i kemokine (33). Pro-upalni citokini kao što su tumorski nekrozni faktor alfa (TNF- $\alpha$ ), inhibitor aktivatora plazminogena 1 (engl. *plasminogen activator inhibitor-1*, PAI-1) i interleukin 6 (IL-6) stvaraju stanje upale niskoga stupnja (31). C-reaktivni protein (CRP) i IL-6 su vodeći biljezi upale niskog stupnja te su značajno povišeni u pretile djece i adolescenata s MS-om u usporedbi s pretilim pojedincima koji nemaju MS (41,43). Također, pokazano je da razine CRP u višim normalnim vrijednostima imaju prediktivnu vrijednost za razvoj kardiovaskularnih bolesti i ŠBT2 u odrasloj dobi (1,44,45).

## **1.3. Kromogranin A**

Postoji stalna potreba za pronalaskom novih molekularnih biljega koji bi dodatno pomogli u praćenju napredovanja metaboličkog poremećaja te u predviđanju prognoze u populaciji pretile djece i adolescenata. Kromogranin A (CgA) je prohormon i granulogeni faktor koji ima pleiotropnu ulogu u regulaciji različitih organskih sustava, a nedavno je prepoznat kao potencijalno važan regulatorni faktor u pretilosti (46,47). Ubikvitarno se nalazi u gotovo čitavom endokrinom, neuroendokrinom i neuralnom tkivu te regulira oslobađanje katekolamina (47). Humani gen za kromogranin A (CHGA) nalazi se na 14. kromosomu, sastavljen je od 8 egzona, a koji se prevode u protein sačinjen od 439 aminokiselina (46,48). Proteolitičkim cijepanjem i doradom nakon prevođenja CgA, nastaju bioaktivni peptidi: vazostatin, kromofungin, pankreastatin, WE-14, katestatin i serpinin (Slika 3.) (46,49). Vazostatin djeluje anti-adrenergički te također regulira kardiovaskularni sustav djelujući kao anti-angiogeni faktor i vazodilatator (50–53). Kromofungin djeluje

antimikrobno i regulira imunosti sustav, a WE-14 pretpostavlja se da djeluje kao protutijelo za CD4+ T stanice, koje su uključene u nastank šećerne bolesti (54–58). Pankreastatin ima suprotan učinak inzulinu te utječe na pojavu IR, a serpinin djeluje na biogenezu autokrinih granula te kao beta agonist (59–62).



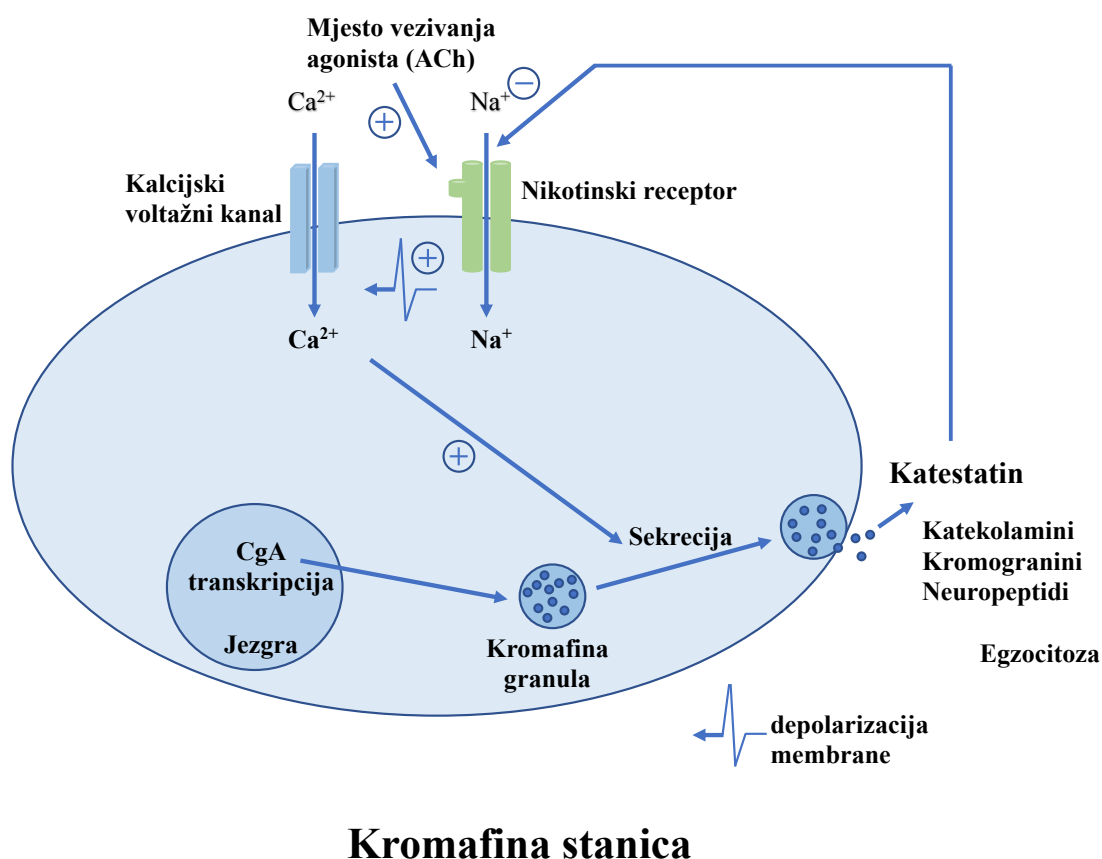
**Slika 3.** Kromogranin A i njegovi bio aktivni peptidi

Preuzeto iz: Muntjewerff EM, Dunkel G, Nicolassen MJT, Mahata SK, van den Bogaart G. Catestatin as a Target for Treatment of Inflammatory Diseases. *Front Immunol.* 2018;9:2199.

### 1.3.1. Katestatin

Od svih navedenih biološki aktivnih peptida koji nastaju proteolitičkim cijepanjem CgA, katestatin ima najširi spektar djelovanja. Jedan od glavnih mehanizama aktivnosti katestatina je inhibicija sekrecije katekolamina putem nekompetitivne blokade nikotinskih receptora, kako je prvi put opisano 1997. godine (Slika 4.) (63). Navedeno antagonističko djelovanje katestatina predstavlja novi autokrini i homeostatski mehanizam, a koji uz pomoć negativne povratne sprege regulira oslobađanje katekolamina iz kromafinih stanica i neurona (63). Nekompetitivna blokada nikotinskog receptora katestatinom primarno se ostvaruje onesposobljavanjem prolaska kationa u stanicu što utječe na signalne puteve u stanicama (63). Početno vezivanje katestatina za kolinergički nikotinski receptor vodi ka onemogućavanju ulaska Na<sup>+</sup> iona u stanični citosol i depolarizacije stanice te posljedične

nemogućnosti ulaska  $\text{Ca}^{2+}$  iona u stanični citosol kroz kalcijски voltažni kanal (63). Navedeni mehanizam djeluje na kromafine granule koje egzocitozom otpuštaju katekolamine, CgA i druge peptide (Slika 4.) (63).



**Slika 4.** Mehanizam djelovanja katestatina

Prema: Mahata SK, O'Connor DT, Mahata M i sur. Novel autocrine feedback control of catecholamine release: A discrete chromogranin A fragment is a noncompetitive nicotinic cholinergic antagonist. *J Clin Invest.* 1997;100:1623–33.

### 1.3.1.1. Povezanost katestatina i pretilosti

Postoji vrlo ograničen broj studija koje su istraživale ulogu katestatina u nastanku i razvoju pretilosti. Međutim, poznato je da je funkcija masnih stanica regulirana s katekolaminima preko četiri vrste adrenergičkih receptora ( $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_3$  i  $\alpha_2$ ) (64). Aktivacijom

$\beta$  adrenergičkih receptora dolazi do stvaranja cikličkog adenozin monofosfata (cAMP) te aktivacije protein kinaze A, a koja aktivira hormon osjetljivu lipazu i proces lipolize (razgradnja triglicerida) (64). Suprotno navedenom mehanizmu,  $\alpha$  adrenergički receptori inhibiraju lipolizu iz čega proizlazi da uloga katekolamina u patofiziološkom mehanizmu pretilosti ovisi o ravnoteži između  $\alpha$  i  $\beta$  adrenergičkih receptora (64,65). U provedenim studijama *in vivo* i *in vitro*, pokazano je da u pretilih ispitanika dolazi do desenzitizacije  $\beta$  adrenergičkih receptora te do blokiranja inhibicije sekrecije leptina i posljedičnog povećanja razine leptina, koji dodatno povećava volumen masnih stanica (64,66–68). Iz svega navedenoga može se zaključiti da katestatin može pozitivno utjecati na desenzitizaciju  $\beta$  adrenergičkih i leptinskih receptora te tako dovesti do ponovne senzitivacije navedenih receptora i normalizacije razina katekolamina i leptina (64). Navedeni mehanizam potvrđen je eksperimentalnim *knock out* CgA (Chga-KO) mišjim modelom u kojega je inducirana pretilost (engl. *diet-induced obesity*) te je dugotrajno primijenjen katestatin, a što je rezultiralo dramatičnim fenotipskim promjenama smanjenjem masnoga tkiva za 25% (64). Također, na eksperimentalnom modelu hiperleptinemičnog pretilog *db/db* miša, pokazano je da je katestatin u kompeticiji s leptinom za mjesto vezivanja na leptinskom receptoru te da djeluje na glukozni transporter 1 ovisan o  $\text{Na}^+$  ionu (engl. *sodium-glucose linked transporter 1*, SGLT1) što za posljedicu ima smanjenje leptinske aktivnosti i posljedične hiperglikemije (69). Nadalje, na eksperimentalnom modelu hibernirajućeg hrčka je pokazano da katestatin djeluje zaštitno protiv nastanka pretilosti svojim djelovanjem na periventrikularne nukleuse u hipotalamusu što se odražava na redukciju unosa hrane i smanjenje tjelesne mase (70).

Nažalost, do sada još nije objavljeno sustavno istraživanje o ulozi katestatina u populaciji pretilih ljudi. Dvije opservacijske studije na populaciji odraslih s hipertenzijom i opstruktivnom apnejom tijekom spavanja koje su većinski uključivale ispitanike s povišenim ITM, pokazale su da katestatin ne korelira s ITM ( $r=0.160$ ,  $P=0.073$  i  $r=0.063$ ,  $P=0.475$ ), a da bi se dodatno razjasnio odnos između katestatina i pretilosti potrebno je dodatno razjasniti utjecaj komorbiditeta (71,72).

Zaključno, različite studije su na eksperimentalnim modelima pokazale da katestatin ima značajnu ulogu u moduliranju pretilosti, ali do sada nije u potpunosti razjašnjena uloga katestatina u pretiloj populaciji.

### **1.3.1.2. Povezanost katestatina i inzulinske rezistencije**

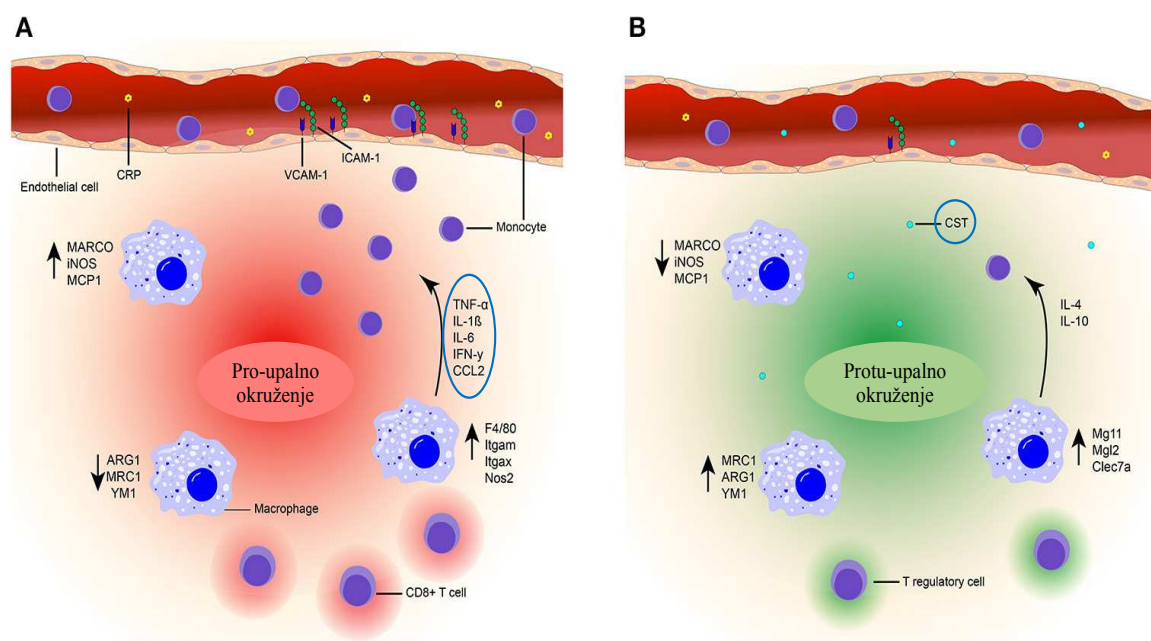
Kako je već naglašeno, IR i upala niskog stupnja su glavni patofiziološki mehanizmi nastanka kardiovaskularnih komplikacija te posljedično MS-a. Uloga katestatina u nastanku i razvoju IR-e nije u potpunosti razjašnjena. U recentnom istraživanju Ying i suradnika iz 2018. godine, na genski modificiranom *knock out* mišjem modelu za katestatin (CST-KO C57BL/6J), kojima je inducirana pretilost te naknadnim tretmanom s katestatinom, pokazano je da katestatin djeluje na metabolizam glukoze i koncentraciju inzulina te time poboljšava toleranciju na glukozu i smanjuje IR-u. Također, ovim istraživanjem je pokazano da katestatin utječe na smanjenje razine pro-upalnih citokina putem regulacije pro- i protu-upalnih gena (73). Ova inovativna studija je po prvi put pokazala da katestatin potencijalno djeluje na regulaciju Kupfferovih stanica i makrofaga, a budući da su učinci njihovih citokina povezani s metabolizmom glukoze i inzulina, možda i ovim putem katestatin moguće ima važnu ulogu u patofiziološkom mehanizmu nastanka i progresije MS-a (49,73).

### **1.3.1.3. Povezanost katestatina i upale niskoga stupnja**

Katestatin utječe na modulaciju upale niskoga stupnja na više razina počevši od lokalnog utjecaja koji, kako je pokazano u *in vitro* studijama, aktivira neutrofile i mastocyte (49,74–78). Također, katestatin sistemski djeluje protuupalno, a što za posljedicu ima moduliranje i zaustavljanje kompleksne kaskade nastanka upalnog stanja (49). Poznato je da pri nastanku upalnoga stanja dolazi do izlučivanja kemokina CCL2 (engl. *CC-chemokine ligand 2*, CCL2) i deregulacije međustaničnih adhezijskih molekula ICAM-1 i VCAM-1 (engl. *intracellular adhesion molecule 1*, ICAM-1 i engl. *vascular CAM-1*, VCAM-1) u endotelnim stanicama kao i aktivacije monocita koji migriraju na mjesto upale (49). Pro-upalno stanje regulirano je i od strane proupalnih čimbenika (F4/80, integrin alfa M, Itgam, integrin alfa X, Itgax, sintetaza dušikovog oksida 2, NOS2, makrofagni receptor kolagene strukture, MARCO, i sintetaza dušikovog oksida, iNOS, monocitni kemotaktični protein -1, MCP-1) i makrofaga te je također povećana produkcija proupalnih citokina (TNF- $\alpha$ , interleukin 1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, interferon gama, IFN- $\gamma$ ) i infiltracija CD8+ T stanica (Slika 5. A) (49). Na različitim eksperimentalnim modelima, uključujući modele za upalnu bolest crijeva i arteriosklerozu, pokazano je da primjena katestatina uzrokuje smanjenje infiltracije monocita i makrofaga, što ukazuje na važnost katestatina u regulaciji upale niskog stupnja (71,75,76). Nadalje, katestatin djeluje pro-angiogeno te smanjuje ekspresiju ICAM-1 i



VCAM-1 u endotelnim stanicama čime možda utječe na proces ekstravazacije limfocita (49,79). Konačno, katestatin dokazano djeluje i na humane monocite, što rezultira porastom protu-upalnog biljega makrofaga MRC-1 (manozni receptor C tipa 1, MRC-1) i smanjenjem pro-upalnog biljega makrofaga MARCO (49,79). Važno je naglasiti da je u više različitih istraživanja demonstriran pozitivan učinak katestatina na smanjenje proupalnih citokina (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  i IL-6) i manju ekspresiju proupalnih gena (F4/80, Itgam, Itgax, NOS2 i kemokinskog liganda 2, CCL2), te povećanju ekspresiju protuupalnih gena (interleukin 10, IL-10, makrofagni galaktozini tip lektina-1, Mgl1, interleukin 4, IL-4, arginaza 1, ARG1 i MRC1) (Slika 5. B) (49,73,75,80). Na temelju svih navedenih mehanizama, katestatin pozitivno utječe na pomicanje diferencijacije makrofaga s pro- na protu-upalni fenotip (49).



**Slika 5.** Uloga katestatina u upali niskoga stupnja

A – Proupalno okruženje, B – protuupalno okruženje nakon primjene katestatina

Preuzeto iz: Muntjewerff EM, Dunkel G, Nicolassen MJT, Mahata SK, van den Bogaart G. Catestatin as a Target for Treatment of Inflammatory Diseases. *Front Immunol.* 2018;9:2199.

#### 1.3.1.4. *Povezanost katestatina i hipertenzije*

Genska ablacija gena za CgA u eksperimentalnom mišjem modelu rezultirala je povišenim krvnim tlakom i srčanom dekompenzacijom, a navedeno je stanje potpuno reverzibilno nakon primjene egzogenog katestatina te postupno vodi do potpune normalizacije krvnog tlaka (81,82). Uloga katestatina u nastanku i razvoju hipertenzije dodatno je potvrđena na gotovo 4000 ispitanika, kada je pokazana snažna povezanost genske varijacija alela *Gly364Ser* u genu za katestatin s povećanim rizikom za arterijsku hipertenziju (prilagođeno za dob s omjerom rizika: 1,483;  $P=0,009$  i omjer rizika: 2.951;  $P=0,005$ ) te kako nosioci t *Gly364Ser* alela imaju viši sistolički krvni tlak (do  $\approx 8$  mm Hg;  $P=0,004$ ) i dijastolički krvni tlak (do  $\approx 6$  mmHg;  $P=0,001$ ) u odnosu na ostatak populacije (83).

Katestatin utječe na regulaciju krvnog tlaka na nekoliko razina, a jedan od glavnih mehanizama je prethodno opisana nekompetitivna blokada nikotinskih receptora (63). Također, katestatin djeluje na otpuštanje histamina iz mastocita što je pokazano na eksperimentalnom modelu štakora, gdje je primjena katestatina dovela do otpuštanja histamina, a što je za posljedicu imalo povišenje razina epinefrina i posljedičnu vazodilataciju (84,85). Dodatno, katestatin smanjuje beta adrenergičnu stimulaciju, a koja je posredovana dušikovim oksidom (NO) i čimbenicima oksidacijskoga stresa (reaktivni kisikov spoj  $H_2O_2$ ) (83,86,87).

Do sada su objavljene tri studije koje su promatrale koncentracije katestatina u bolesnika s hipertenzijom (71,88,89). U prvom istraživanju O'Connor i suradnika, iako statistički neznajno, demonstrirane su niže vrijednosti katestatina u ispitanika s hipertenzijom u usporedbi s normotenzivnim ispitanicima ( $1,26 \pm 0,06$  vs.  $1,36 \pm 0,03$  nmol/l;  $P=0,270$ ) (88). Dodatno, koncentracije katestatina su značajno niže u normotenzivnih ispitanika s pozitivnom obiteljskom anamnezom na povišeni krvni tlak u usporedbi s normotenzivnim ispitanicima s negativnom obiteljskom anamnezom na povišeni krvni tlak ( $1,32 \pm 0,04$  vs.  $1,50 \pm 0,08$  nmol/l;  $P=0,024$ ) (88). Suprotno navedenim rezultatima, druga istraživanja su pokazala značajno više vrijednosti katestatina u ispitanika s povišenim krvnim tlakom (Meng i sur.  $1,53 \pm 0,72$  vs.  $1,19 \pm 0,74$  ng/ml;  $P<0,01$  i Durakoğlugil i sur.  $2,27 \pm 0,83$  vs.  $1,92 \pm 0,49$  ng/ml,  $P=0,004$ ) (71,89). Navedene razlike u koncentracijama katestatina u bolesnika s arterijskom hipertenzijom možda se mogu

objasniti različitim demografskim odrednicama skupina ispitanika te njihovim različitim stadijima hipertenzije (71,88,89). Naime, ispitanici koji su u početnim fazama hipertenzije mogu imati snižene koncentracije katestatina, što za posljedicu moguće ima gubitak vazodilatacije i povišenje krvnog tlaka (71,88,89). Suprotno tome, u ispitanika koji su u kasnijim stadijima hipertenzije, moguće dolazi do kompenzacijskog povećanja koncentracija katestatina zbog prevelike dostupnosti katekolamina (71,90). Dodatno, navedena dvostruka uloga katestatina u regulaciji hipertenzije bi, paradoksalno, u završnim fazama hipertenzije mogla dodatno povisiti krvni tlak (71).

#### ***1.3.1.5. Uloga katestatina u regulaciji metabolizma lipida***

Uloga katestatina u metabolizmu lipida nije u potpunosti razjašnjena, no smatra se da katestatin pozitivno utječe na preusmjeravanje lipida iz masnih stanica prema jetri, gdje beta oksidacijom dolazi do razgradnje lipida (49,73,88,91). Moguća potvrda navedenog mehanizma može se naći u čestom povećanom nakupljanju lipida u bolesnika s različitim upalnim bolestima, a kako je već navedeno, bolesnici s upalnim bolestima imaju poremećen metabolizam katestatina (49,73,88,91). Dodatno, na eksperimentalnom mišjem modelu CgA-KO je pokazano da primjena katestatina značajno snižava koncentraciju triglicerida te reducira masne nakupine za gotovo 25% (75).

### **1.4. Vitamin D**

Vitamin D je jedan od najvažniji sekosteroida u metabolizmu kalcija i fosfora te ima ključnu ulogu u ostvarivanju zdravlja kostiju u djece i adolescenata, ali također ima važnu ulogu u regulaciji različitih ekstraosealnih mehanizama preko receptora za vitamin D (92,93). Ekstraosealni učinak vitamina D odražava se na različite organske sustave, a jedan od glavnih mehanizama je modulacija imunskog sustava te posljedično smanjenje upale niskoga stupnja (92,94).

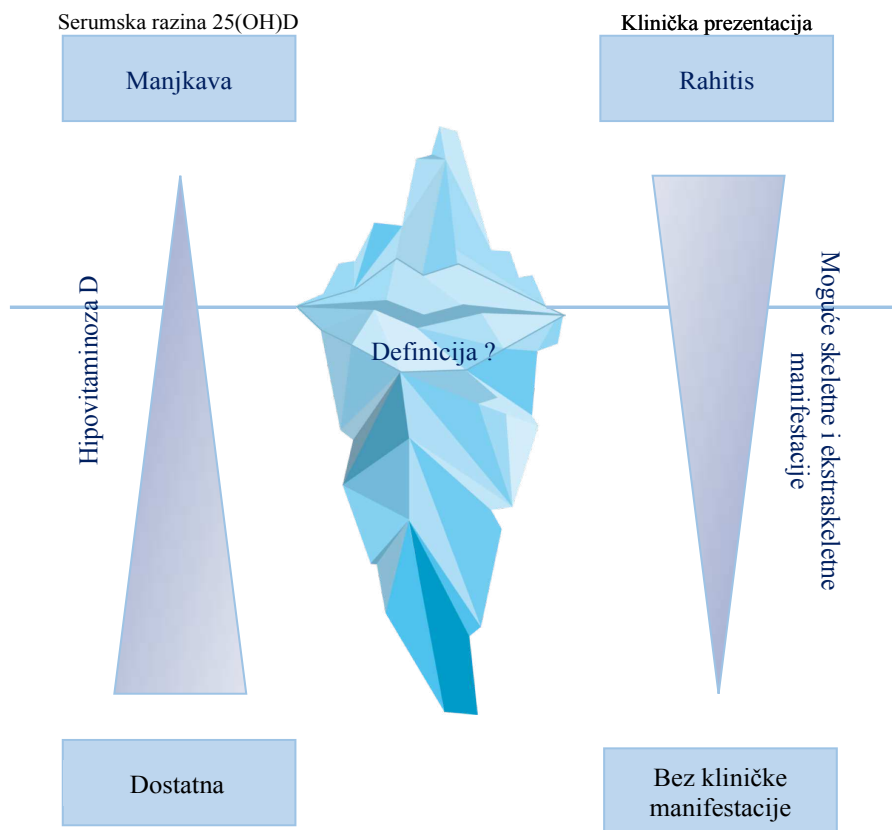
### **1.4.1. Sinteza vitamina D**

Dva oblika vitamina D su od kliničke važnosti, vitamin D<sub>2</sub> (ergokalciferol) i vitamin D<sub>3</sub> (kolekalciferol) (92,95). Ergokalciferol se unosi u organizam putem dodataka prehrane, a također ga se može unijeti preko konzumacije hrane neživotinjskog podrijetla (92,95). Kolekalciferol se nalazi u hrani životinjskog podrijetla i različitim dodacima prehrane, ali se za razliku od ergokalciferola može sintetizirati u koži iz prekursora 7-dehidrokolesterola nakon izlaganja kože ultravioletnim B (UV-B) zrakama sunca (92,95). Ergokalciferol i kolekalciferol su biološki neaktivni oblici vitamina D te je potreban niz reakcija aktivacije (92). U prvoj fazi aktivacije, odvija se hidroksilacija ergokalciferola i kolekalciferola u 25-hidroksi vitamin D 25(OH)D prvenstveno u jetri (95). Nadalje, 25(OH)D može biti pohranjen u jetri ili u masnim stanicama, ili, u sljedećem koraku aktivacije, 25(OH)D se u bubregu dodatnom hidroksilacijom pretvara u biološki aktivan oblik 1,25(OH)D (92,96,97).

### **1.4.2. Procjena statusa vitamina D i definicija hipovitaminoze D u populaciji djece i adolescenata**

25(OH)D je u većini kliničkih studija u pedijatrijskoj populaciji korišten kao siguran biljeg za procjenu koncentracija vitamina D, jer 25(OH)D ima relativno dug poluživot (2–3 tjedna), razmjerno visoke razine u cirkulaciji te je otporan na bioritam paratireoidnog hormona (98,99). Međutim, postoje značajna neslaganja u vezi s izborom granične vrijednosti za dostatne koncentracije 25(OH)D (92,98). Jedna od najčešće korištenih definicija je prema preporukama Globalnog konsenzusa o prevenciji i liječenju rahitisa, a koje definira koncentracije 25(OH)D <30 nmol/L kao manjkave, koncentracije 25(OH)D 30 – 50 nmol/L kao nedostatne te koncentracije 25(OH)D >50 nmol/L kao dostatne (100). Međutim, u današnje vrijeme postoje nesuglasice kako postići i održati optimalne serumske koncentracije 25(OH)D koje pogoduju svim organskim sustavima uz minimalne nuspojave (Slika 6.) (92). Zanimljivo, u recentnoj randomiziranoj kontroliranoj studiji VITAL na gotovo 26000 odraslih ispitanika, kod kojih je kroz 5 godina primjenjivana suplementacija vitaminom D u visokima dozama, nije pokazana niža učestalost kardiovaskularnih bolesti u usporedbi s placebo skupinom, ali treba naglasiti da je prosječna koncentracija 25(OH)D u svih ispitanika iznosila 77 nmol/L, a svega je 12,7% ispitanika imalo koncentracije 25(OH)D

<50 nmol/L (101). Potrebna su dodatna istraživanja koja bih definirala jasne ciljne vrijednosti 25(OH)D u pedijatrijskoj populaciji.



**Slika 6.** Problematika ekstraosealnih komplikacija hipovitaminoze D

Preuzeto iz: Antonucci R, Locci C, Clemente MG, Chicconi E, Antonucci L. Vitamin D deficiency in childhood: Old lessons and current challenges. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2018;31:247–60.

### 1.4.3. Povezanost vitamina D i pretilosti

Nedostatak vitamina D utvrđen je u nizu različitih kroničnih bolesti uključujući i pretilost. Utvrđena je i negativna korelacija između ITM i s koncentracije 25(OH)D u pretiloj pedijatrijskoj populaciji (93,98). Uloga vitamina D u pretilih osoba nije u potpunosti razjašnjena, ali se smatra da vitamin D pohranjen u masnom tkivu, možda regulira upalni

odgovor, ekspresiju gena koji reguliraju adipogenezu i adipocitnu apoptozu te također, utječe na lučenje leptina i adiponektina i regulaciju intenziteta metabolizma (102,103). Također, povećanje broja masnih stanica negativno utječe na pohranjivanje vitamina D u masnom tkivu, a što za posljedicu ima smanjenu biodostupnost vitamina D te nastanak “začaranog kruga” zbog uzajamnog djelovanja vitamina D i pretilosti (98,104).

Navedene tvrdnje potvrđene su u brojnim opservacijskim studijama koje su pokazale da se prevalencija hipovitaminoze D u pretile djece i adolescenata kreće od 6,5% pa sve do 57%, ovisno o promatranoj populaciji i definiciji (97,104–108). Također, važno je naglasiti da neadekvatna prehrana s nedostatnim unosom kravljega mlijeka, sedentaran način života u kojem prevladava višesatno gledanje televizije i smanjena fizička aktivnost, dodatno negativno utječu na koncentracije vitamina D u pretiloj pedijatrijskoj populaciji (105).

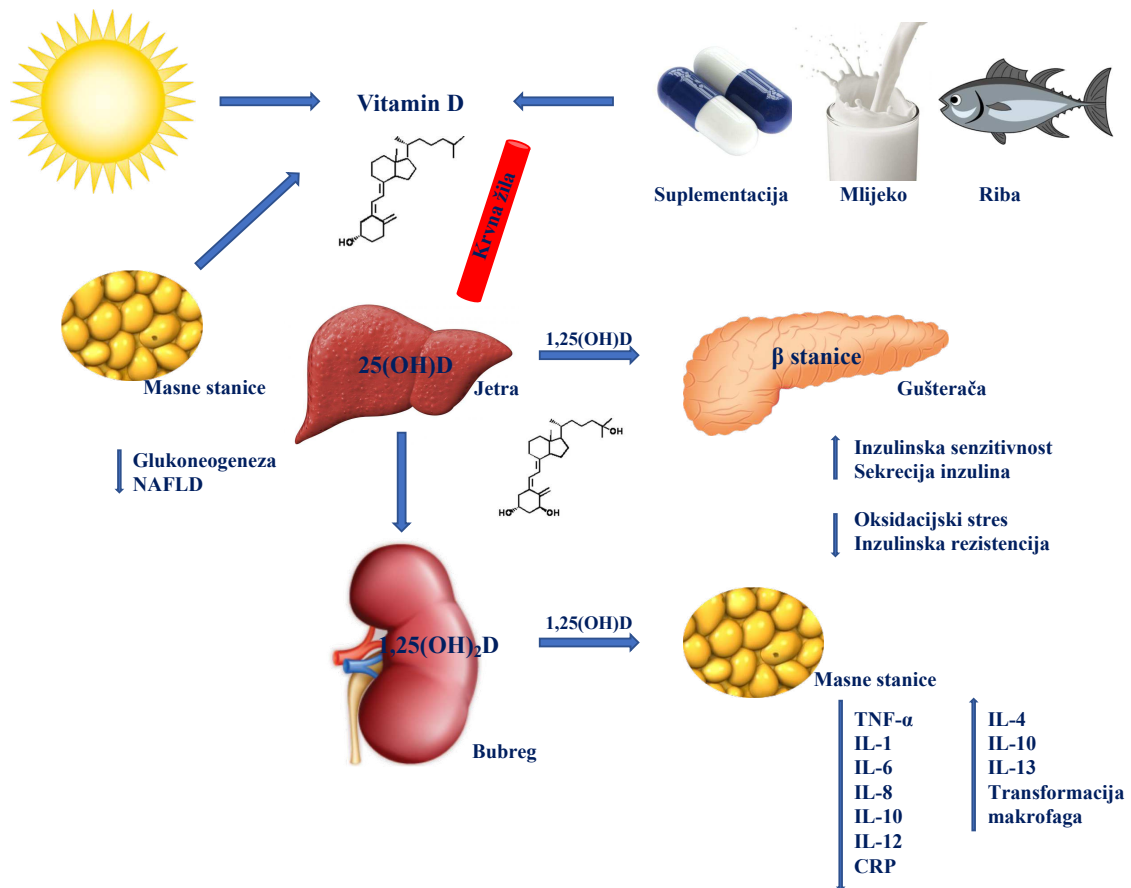
Nadalje, nekoliko studija ukazuje na moguću povezanost manjkavih koncentracija vitamina D s kardiovaskularnim rizičnim čimbenicima uključujući inzulinsku rezistenciju, hipertenziju i dislipidemiju te naknadnu pojavu MS i ŠBT2 (93,109–111).

#### **1.4.4. Povezanost vitamina D i metaboličkog sindroma**

Uloga vitamina D u nastanku i progresiji MS-a nije u potpunosti razjašnjena, ali postojanost poveznice opisana je u velikoj studiji na gotovo 8500 odraslih ispitanika u SAD gdje je pokazano da se prevalencija MS smanjuje s povećanjem koncentracijama 25(OH)D (112). Nadalje, pokazana je poveznica hipovitaminoze D s povećanom prevalencijom kardiovaskularnih bolesti u kasnijem životu (110,113).

Vitamin D utječe na upalu niskoga stupnja i IR-u, a kao što je već navedeno, oni su vodeći patofiziološki mehanizmi nastanka MS-a (114). Vitamin D djeluje na osjetljivost na inzulin djelujući direktno i parakrino na samu gušteraču, a putem receptora za vitamin D, modulira ionske kanale za  $Ca^{2+}$  te povećava i ukupno otpuštanje inzulina iz beta stanica (114–116). Također, smatra se da vitamin D pozitivno utječe na izražaj receptora za inzulin koji omogućava povećan unos glukoze u stanice perifernog tkiva (114,117). Vitamin D utječe na upalu niskoga stupnja smanjenjem upalne aktivnosti adipocita, inhibicijom

djelovanja pro-upalnih citokina IL-1 $\beta$ , IL-6, interleukin 8 (IL-8) i interleukin 12 (IL-12), smanjenjem upale u visceralnim adipocitima te smanjenjem kronične upale (Slika 7.) (114).



**Slika 7.** Metabolizam vitamina D i njegov utjecaj pretilost

Preuzeto iz: Zakharova I, Klimov L, Kuryaninova V i sur. Vitamin D Insufficiency in Overweight and Obese Children and Adolescents. Front Endocrinol. 2019;10:103.

Nadalje, u seriji opservacijskih istraživanja pokazana je povezanost pojedinačnih odrednica MS-a i vitamina D u populaciji pretilih djece i adolescenata (110). Većina studija pokazala je povezanost vitamina D s poremećajem lipidograma i povišenim krvnim tlakom, a što je djelomično potvrđeno u meta analizi na gotovo 26000 ispitanika iz 2014. godine koja opisuje značajnu negativnu povezanost između koncentracija 25(OH)D i triglicerida ( $r = -0.135$ , CI;  $-0,243$ ,  $-0,025$ ) te pozitivnu povezanost između koncentracija 25(OH)D i HDL

kolesterola ( $r=0,156$ , CI;  $-0,021, 0,324$ ) (110,118). Zaključno, više serumske koncentracije 25(OH)D su povezane s povoljnijim lipidnim profilom u pedijatrijskoj populaciji, otvarajući mogućnost eventualnog preventivnog djelovanja vitamina D na nastanak i progresiju MS-a (110,118).

U skladu sa navedenim tvrdnjama, u samo nekoliko randomiziranih kontroliranih studija u pedijatrijskoj pretiloj populaciji je pokazan pozitivan utjecaj suplementacije 25(OH)D (110). U randomiziranoj kontroliranoj studiji na 50 pretilih ispitanika u dobi od 10 do 16 godina koje su bile ujednačene prema svim odrednicama MS-a, pokazano je da ispitanici iz skupine koja je kroz 12 tjedana primala suplementaciju vitamina D, imaju značajno niže koncentracije triglicerida, bazalnog inzulina, razinu HOMA-IR i udjela MS-a u usporedbi s placebo skupinom (119). Potrebna su daljnja istraživanja koja će na većem broju ispitanika pokazati stvaran utjecaj vitamina D na pretilost i MS.



## **2. CILJEVI I HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA**

U skladu s problematikom istraživanja glavni ciljevi istraživanja su:

1. Utvrditi razliku u koncentracijama katestatina u pretilih ispitanika u odnosu na kontrolnu skupinu ispitanika te između pretilih ispitanika s MS-om u usporedbi s pretilim ispitanicima bez MS-a i kontrolne skupine ispitanika.
2. Ispitati povezanost katestatina s kardiovaskularnim rizičnim čimbenicima i odrednicama MS-a.
3. Ispitati povezanost katestatina s procjenom inzulinske rezistencije HOMA-IR (engl. *homeostatic model assessment of insulin resistance*) i biljegom upale niskoga stupnja visoko osjetljivog C-reaktivnog proteina (engl. *high-sensitivity C-reactive protein*, hsCRP).

Sporedni ciljevi istraživanja su:

1. Utvrditi razliku u koncentracijama 25(OH)D u pretilih ispitanika u odnosu na kontrolnu skupinu ispitanika te između pretilih ispitanika s MS-om u usporedbi s pretilim ispitanicima bez MS-a i kontrolnim skupinama ispitanika.
2. Ispitati povezanost vitamina D s kardiovaskularni rizičnim čimbenicima i odrednicama MS-a.

Hipoteze ovog istraživanja su sljedeće:

1. Serumska koncentracija katestatina će biti značajno niža u pretilih ispitanika u odnosu na kontrolnu skupinu ispitanika.
2. Serumska koncentracija katestatina će biti značajno niža u pretilih ispitanika s MS-om u odnosu na pretila ispitanike bez MS-a i kontrolnu skupinu ispitanika.
3. Serumska koncentracija katestatina će negativno korelirati s HOMA-IR i koncentracijom hsCRP.
4. Serumska koncentracija 25(OH)D će biti značajno niža u pretilih ispitanika s MS-om u odnosu na pretila ispitanike bez MS-a i kontrolnu skupinu ispitanika.

### **3. ISPITANICI I POSTUPCI**

Istraživanje je osmišljeno i provedeno u Klinici za dječje bolesti, Zavodu za endokrinologiju i neurologiju, Kliničkog bolničkog centra Split i Zavodu za medicinsko laboratorijsku dijagnostiku, Kliničkog bolničkog centra Split te je odobreno od strane Etičkog povjerenstva Kliničkog bolničkog centra Split (Klasa: 500-3/17-01/10, Ur. Br.: 2181-147-01/06/ M.S.-17-2, U Splitu 20.4.2017.) i provedeno je u skladu s Helsinškom deklaracijom i kasnijim revizijama iste. Svi ispitanici su dali usmeno odobrenje te su roditelji potpisali informirani pristanak prije početka ispitivanja.

### **3.1. Ispitanici**

U istraživanje je uključeno 92 pretila dijeta i adolescenta s ITM z vrijednosti  $>2$ , koji su upućeni po prvi put na Kliniku za dječje bolesti, Zavod za endokrinologiju i neurologiju zbog obrade debljine u razdoblju od travnja 2017. do lipnja 2018. godine. U istom razdoblju uključeno je i 39 zdravih ispitanika s ITM z vrijednosti  $<1$ , a koji su s promatranom skupinom usklađeni prema spolu, dobi i pubertetskom statusu. Kriteriji isključenja bili su svi oblici sekundarne pretilosti, sindromi, i druge bolesti i/ili lijekovi koji utječu na povišeni krvni tlak, metabolizam glukoze i lipida.

Ukupan broj ispitanika uključenih u završnu statističku obradu iznosio je  $N=131$ . Nakon podjele pretilih ispitanika u dvije skupine ovisno o prisustvu MS, podskupina bez MS-om sastojala se od 61 ispitanika, a skupinu s MS-om sačinjavao je 31 ispitanik.

### **3.2. Definicije**

Pretilost je definirana kao ITM z vrijednost  $>2$  prilagođena za dob i spol, a izračunata je za sve ispitanike prema centilnim krivuljama Svjetske zdravstvene organizacije pomoću softvera AnthroPlus (WHO, Ženeva, Švicarska) (14,41,120).

MS je definiran prema IDF iz 2007. godine na sljedeći način: OT koji prelazi 90. centilu za djecu i adolescente u dobi od 10 do  $<16$  godina i za adolescente u dobi od  $\geq 16$  godina (žene  $\geq 80$  cm i muškarci  $\geq 94$  cm) s dva ili više od sljedećih parametara: HDL kolesterol (od 10 do  $<16$  god  $<1,03$  mmol/L i od  $\geq 16$  godina žene  $<1,29$  mmol/L i muškarci

<1,03 mmol/L), trigliceridi  $\geq 1,7$  mmol/L, sistolički krvni tlak  $\geq 130$  mmHg ili dijastolički krvni tlak  $\geq 85$  mmHg.

Za procjenu arterijskog krvnog tlaka korištene su prilagođene centilne krivulje prema preporuci Europskog društva za hipertenziju (121,122). Hipertenzija je definirana kao SBP i/ili DBP  $\geq 95$ . centile prilagođeno za dob, spol i tjelesnu visinu (121,122).

Status vitamina D definiran je prema preporukama Globalnog konsenzusa o prevenciji i liječenju rahitisa na temelju serumskih koncentracija 25(OH)D (25). Koncentracije 25-hidroksi vitamina D  $< 30$  nmol/L definiraju se kao manjkave, koncentracije 25-hidroksi vitamina D  $30 - 50$  nmol/L definiraju se kao nedostatne, dok se koncentracije 25-hidroksi vitamina D  $> 50$  nmol/L definiraju kao dostatne.

Procjena IR-e određena je pomoću indeksa HOMA-IR koji se računa kao umnožak koncentracije inzulina natašte (mU/L) i koncentracije glukoze natašte (mmol/L), podijeljen s 22,5, a HOMA-IR  $\geq 3,16$  je definiran kao IR (35,36). Također, korišten je indeks ISI kao procjena IR-e tijekom cijelog testa oralne tolerancije na glukozu (engl. *Oral Glucose Tolerance Test*, OGTT) te je izračunat kao  $10000 / \text{kvadratni korijen [glukoza na tašte} \times \text{inzulin na tašte]} \times [\text{prosječna glukoza} \times \text{prosječni inzulin tijekom OGTT}]$  (37). Nadalje, oblik krivulje glukoze tijekom OGTT korišten je kao indirektni znak IR-e te je monofazični oblik krivulje definiran kao porast koncentracije glukoze u prvom dijelu OGTT dok se ne postigne maksimalna vrijednost između 30 i 90 min, nakon čega slijedi smanjenje do 120 min, a koje je  $\geq 0,25$  mmol/L (4.5 mg/dL) (123–125). Bifazični oblik krivulje definiran je kao dodatni porast koncentracije glukoze  $\geq 0,25$  mmol/L (4.5 mg/dL) nakon pada u prvom dijelu, a svi ostali oblici krivulje glukoze koji imaju rast krivulje u 120 minuti OGTT smatraju se nedefinirani (123–125).

### **3.3. Postupci**

#### **3.3.1. Klinički pregled i antropometrijska mjerenja**

Od svakog roditelja i ispitanika uzeta je anamneza na pojavu povišenog krvnog tlaka te je proveden detaljan klinički pregled. Svakom ispitaniku je procijenjen stadij spolnog razvoja te su ispitanici s pubertetskim statusom po Tanner 1 definirani kao oni u

prepubertetu, a svi u rasponu od Tanner 2 do Tanner 5 definirani su kao oni u pubertetu (126,127).

Također su svim ispitanicima uključenim u istraživanje izvršena antropometrijska mjerenja. Tjelesna masa i visina izmjereni su na kalibriranoj vagi i visinomjeru (Seca, Hamburg, Njemačka). Indeks tjelesne mase izračunat je kao tjelesna masa (kg) podijeljena s kvadratom tjelesne visine ( $m^2$ ). OT mjereno je na srednjoj udaljenosti između donjeg ruba posljednjeg rebra te gornjeg ruba grebena ilijačne kosti u izdisaju, a OB mjereno je na najširem promjeru oko glutealne regije, a sva su mjerenja provedena u stojećem uspravnom položaju. Omjer struka i bokova (engl. *waist to hip ratio*, SB) definiran je kao OT podijeljen s OB. Arterijski krvni tlak mjereno je u sjedećem položaju, na desnoj ruci, u tri navrata te je prosjek posljednja dva mjerenja analiziran (121,128).

### **3.3.2. Uzorkovanje krvi i laboratorijske analize**

Svim je ispitanicama nakon 12-satnog posta u 8 sati ujutro uzorkovana venska krv korištenjem polietilenskog katetera iz podlaktične vene. Svi uzorci su analizirani u istom laboratoriju te su poštovane standardne laboratorijske procedure. Dio uzorka je svakodnevno analiziran, dok je drugi dio centrifugiran, alikvotiran i pohranjen na  $-80^{\circ} C$  te je korišten za analizu katestatina. Tijekom provođenja laboratorijskih analiza istraživači nisu bili upoznati kojoj skupini ispitanika pojedini ispitanik pripada.

Serumska koncentracija inzulina i 25(OH)D određena je imunokemijskom metodom elektrokemiluminiscencijom (ECLIA) (COBAS e601, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Njemačka). Čimbenik rasta sličan inzulinu 1 (engl. *Insulin-like growth factor 1*, IGF-1) određen je imunokemijskom kemiluminiscencijom (CLIA) (IDS-iSYS, IDS, Tyne i Wear, Ujedinjeno Kraljevstvo), a hemoglobin A1c (HbA1c) određen je tekućom kromatografijom visoke razlučivosti (HPLC) (HumaNex A1c, HUMAN, Wiesbaden, Njemačka). Koncentracija glukoze u krvi je određena fotometrijskom metodom s heksokinazom (ARCHITECT ci16200, Abbott Laboratories, Illinois, Chicago, SAD), a hsCRP je određen lateks turbidimetrijskom metodom (ARCHITECT ci16200, Abbott Laboratories, Illinois, Chicago, SAD). Ostale laboratorijske analize određene su

standardnim biokemijskim tehnikama (ARCHITECT ci16200, Abbott, Illinois, Chicago, SAD).

Svi su pretili ispitanici nakon bazalnog uzorkovanja krvi podvrgnuti OGTT testu te su određene vrijednosti glukoze i inzulina u 0., 30., 60., 90. i 120. minuti izvođenja testa.

### **3.3.2.1. Određivanje katestatina**

Koncentracije katestatina (Cat. # EK-053-27, EIA kit, Phoenix Pharmaceuticals Inc., Burlingame, California, SAD) u serumu bolesnika je određena dvostrukim enzim-immunoadsorpcijskim testom (ELISA). Prema protokolu proizvođača, osjetljivost testa je bila 0,05 ng/mL, s linearnim rasponom od 0,05 do 0,92 ng/mL i mjernim rasponom od 0 do 100 ng/mL. Koeficijent varijacije unutar testa bio je manji od 10%, mjerena varijabilnost unutar testa je bila manja od 15% te je 100% prijavljena reakcija s humanim katestatinom.

## **3.4. Statistički postupci**

Procjena veličine uzorka izračunata je uz pomoć statističkog programa G\*power verzija 3.1.9.3 (Institute for Experimental Physiology, Dusseldorf, Njemačka, dostupan: <http://www.gpower.hhu.de/en.html>) koristeći test usporedbe tri srednje vrijednosti za nezavisne uzorke (jednosmjerna ANOVA) te je utvrđeno da će se uz snagu od 90% odbaciti nulta hipoteza koja kaže da nema razlike u koncentraciji katestatina u serumu bolesnika iz tri skupine ispitanika ukoliko ukupan broj ispitanika iznosi 36 ispitanika, odnosno 12 ispitanika u svakoj skupini. Za izračun veličine uzorka korištene su srednje vrijednosti podataka dobivenih u pilot studiji koja je obuhvaćala po 8 ispitanika u svakoj testnoj skupini. Srednja vrijednost ispitanika u skupini pretilih s MS iznosila je 4,95 ng/mL, u skupini pretilih bez MS 7,87 ng/mL, a u skupini kontrola 18,70 ng/mL. Izračunata veličina učinka (engl. *effect size*) iznosila je 0,68, a standardna devijacija skupina 8,65. Na isti način je provedeno određivanje veličine uzorka za ispitivanje koncentracije 25(OH)D u serumu bolesnika te je utvrđeno da će se uz 90% vjerojatnost potvrditi razlika u koncentraciji 25(OH)D u serumu bolesnika iz tri skupine ispitanika ukoliko ukupan broj ispitanika iznosi 87 ispitanika, odnosno 29 ispitanika u svakoj skupini. Srednja vrijednost serumske vrijednosti 25(OH)D u ispitanika u skupini pretilih s MS iznosila je 44,11 nmol/L, u skupini pretilih bez MS 53,87



nmol/mL, a u skupini kontrola 75,53 nmol/L. Izračunata veličina učinka iznosila je 0,39, a standardna devijacija skupina 33,39.

Također, zbog navedenog nesrazmjera promatranih skupina 1:2:1 izračunata je *post hoc* snaga istraživanja. Kada su unesene dobivene vrijednosti katestatina (prosječna vrijednost po skupini i prosječna standardna devijacija) izračunata je veličina učinka koja je iznosila 0,29 (kao test od izbora sam odabrao ANOVA analizu varijance). Kada je navedena veličina učinka ( $f=0,29$ ) unesena uz definiranje  $\alpha$  vrijednosti od 0,05, ukupnog uzorka od 131 i broja skupina 3 (raspodjelu 1:2:1) – dobio se slijedeći izračun *post-hoc* snage testa:  $(1 - \beta) = 0,85$  tj. 85%. Zaključno, *post-hoc* izračun snage istraživanja je pokazao da snaga istraživanja za utvrđivanje razlike u koncentracijama katestatina iznosi 85%, što se općenito smatra prihvatljivom snagom u biomedicinskim istraživanjima (snaga  $>80\%$ ). U slučaju vitamina D prema istim postavkama istraživanja izračunata je veličina učinka koja je iznosila 0,36. Uz  $f=0,36$ ,  $\alpha$  od 0,05, te snagu od 95% i broj skupina 3 (raspodjelu 1:2:1), izračunat je a-priori potreban broj ispitanika od 123.

Statistička obrada podataka provedena je korištenjem statističkih programa Prism 7 za Mac OS X (verzija 7.0 d, GraphPad, La Jolla, CA, SAD) i MedCalc za Windows (v. 11.5.1.0, MedCalc Software, Ostend, Belgija). Za procjenu normalne distribucije podataka korišten je Kolmogorov-Smirnov test. Kontinuirani podatci prikazani su kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija (SD), dok su kategorijski podatci prikazani kao cijeli brojevi i postotci (%). Za analizu kontinuiranih podataka korišten je Studentov t-test (2 skupine) ili jednosmjerna analiza varijance - ANOVA ( $>2$  skupine) s *post-hoc* Tukey HSD testom, a za analizu kategorijskih podataka korišten je hi-kvadrat ( $\chi^2$ ) test. Nadalje, za korelaciju između različitih kardiovaskularnih rizičnih čimbenika korišten je Pearsonov koeficijent korelacije. Dodatno je korištena logistička regresija da bih se utvrdili neovisni značajni prediktori serumske koncentracije katestatina u ispitanjoj skupini. Statistička značajnost definirana je kao  $P < 0,05$ .

## **4. REZULTATI**

U ovo istraživanje uključeno je 92 pretila ispitanika i 39 kontrolnih ispitanika, bez statistički značajne razlika u dobi i spolu među skupinama. Nadalje, nije bilo statistički značajne razlike u pubertetskom statusu između pretilih ispitanika i kontrolne skupine (Tablica 2.).

**Tablica 2.** Demografske karakteristike ispitanika uključenih u istraživanje

Varijabla	Pretili ispitanici (N=92)	Kontrolna skupina (N=39)	P*
Spol – N (%)			
Muško	52 (56,5)	18 (46,2)	0,339
Žensko	40 (43,5)	21 (53,8)	
Dob (godine)	13,95 ± 2,32	14,36 ± 2,17	0,344
Pubertetski status – N (%)			
Tanner 1	12 (13,1)	5 (12,8)	0,997
Tanner 2	13 (14,1)	6 (15,4)	
Tanner 3	11 (11,9)	5 (12,8)	
Tanner 4	27 (29,4)	12 (30,8)	
Tanner 5	29 (31,5)	11 (28,2)	

Podaci su prikazani kao srednja vrijednost ± SD (standardna devijacija) ako nije drugačije navedeno

\* Usporedba između grupa provedena je s t-testom ili hi-kvadrat testom

Statistički značajna razlika utvrđena je u svim antropometrijskim karakteristikama između pretilih ispitanika i kontrolne skupine, osim u tjelesnoj visini (Tablica 3.). Također, 60,9% pretilih ispitanika je imalo crnu akantozu, a niti jedan kontrolni ispitanik nije imao crnu akantozu.

**Tablica 3.** Antropometrijske i kliničke karakteristike ispitanika uključenih u istraživanje

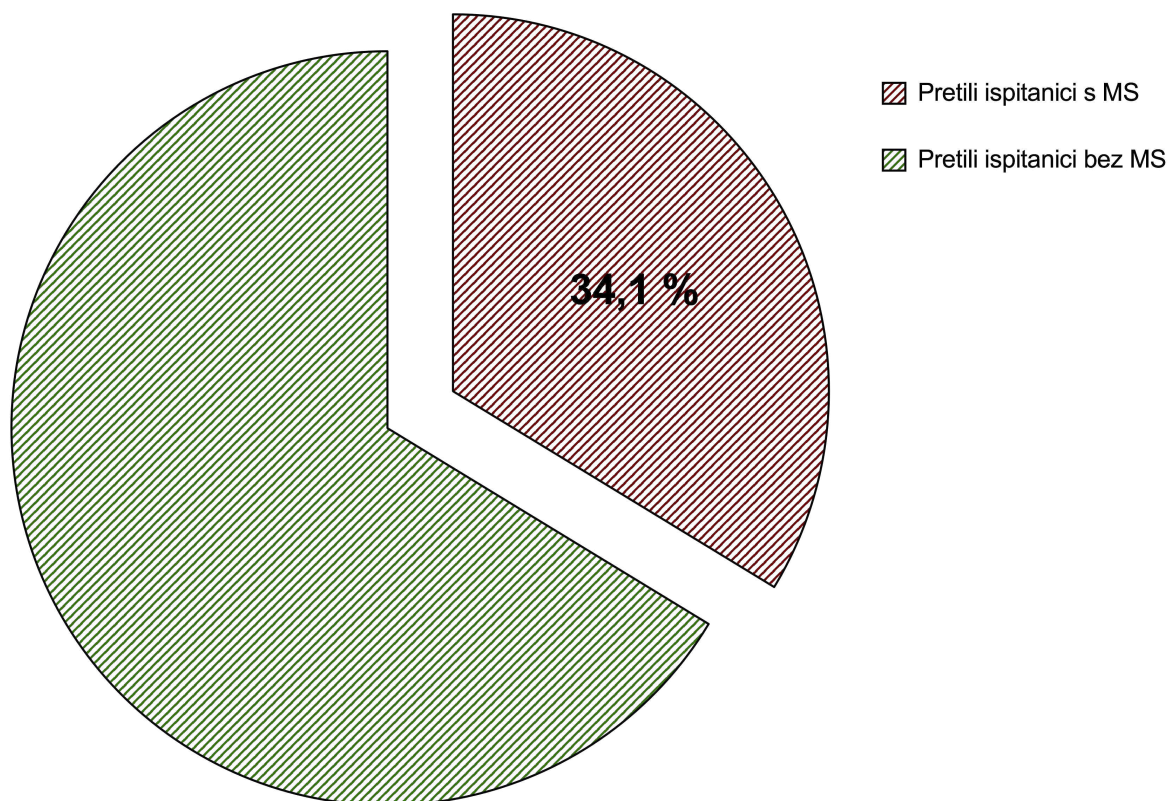
Varijabla	Pretili ispitanici (N=92)	Kontrolna skupina (N=39)	P*
Tjelesna visina (cm)	166,2 ± 16,16	165,9 ± 10,59	0,906
Tjelesna masa (kg)	87,58 ± 19,05	56,13 ± 11,46	<0,001
ITM (kg/m <sup>2</sup> )	30,66 ± 3,59	20,19 ± 2,54	<0,001
ITM z vrijednost	2,74 ± 0,46	0,18 ± 0,76	<0,001
Opseg trbuha (cm)	101,9 ± 9,97	72,65 ± 6,84	<0,001
Opseg bokova (cm)	109,3 ± 13,39	86,94 ± 7,04	<0,001
Omjer struka i bokova	0,94 ± 0,07	0,84 ± 0,05	<0,001
Akantoza – N (%)	56 (60,9)	0 (0)	<0,001

Podaci su prikazani kao srednja vrijednost ± SD (standardna devijacija) ako nije drugačije navedeno

ITM – indeks tjelesne mase

\* Usporedba između grupa provedena je s t-testom ili hi-kvadrat testom

Nakon podjele pretilih ispitanika prema prisutnosti MS-a, 31 (34,1%) ispitanik zadovoljio je kriterije MS-a (Slika 8.).



**Slika 8.** Prevalencija MS-a u pretilih ispitanika

Nadalje, pronađena je statistička značajna razlika između podskupina s i bez MS-a u tjelesnoj masi ( $93,28 \pm 16,62$  vs.  $84,78 \pm 19,71$  kg,  $P=0,043$ ) i ITM ( $31,87 \pm 3,47$  vs.  $30,04 \pm 3,52$  kg/m<sup>2</sup>,  $P = 0,019$ ) (Tablica 4.).

**Tablica 4.** Demografske i antropometrijske karakteristike pretilih ispitanika ovisno o prisutnosti MS

Varijabla	Pretili s MS (N=31)	Pretili bez MS (N=61)	P*
Spol – N (%)			
Muško	16 (51,6)	36 (59)	0,514
Žensko	15 (48,4)	25 (41)	
Dob (godine)	$14,28 \pm 2,37$	$13,78 \pm 2,29$	0,327
Tjelesna visina (cm)	$170,7 \pm 11,76$	$163,9 \pm 17,64$	0,057
Tjelesna masa (kg)	$93,28 \pm 16,62$	$84,78 \pm 19,71$	0,043
ITM (kg/m <sup>2</sup> )	$31,87 \pm 3,47$	$30,04 \pm 3,52$	0,019
ITM z vrijednost	$2,85 \pm 0,57$	$2,69 \pm 0,4$	0,117

MS – metabolički sindrom, ITM – indeks tjelesne mase

Podaci su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  SD (standardna devijacija) ako nije drugačije navedeno

\* Usporedba između grupa provedena je s t-testom ili hi-kvadrat testom

Rezultati analize odrednica MS-a između pretilih ispitanika s MS-om i bez MS-a, a koji su uspoređeni s kontrolnom skupinom prikazani su u Tablici 5. Statistički značajna razlika pronađena je kod svih odrednica MS-a.

**Tablica 5.** Odrednice MS-a kod pretilih djece i adolescenata s ili bez MS-a u usporedbi s kontrolnom skupinom

Varijabla	Pretili s MS (N=31)	Pretili bez MS MS (N=61)	Kontrolna skupina (N=39)	P*
Opseg trbuha (cm)	104,8 ± 8,76	100,5 ± 10,3	72,65 ± 6,84	<0,001 <sup>bc</sup>
Trigliceridi (mmol/L)	1,55 ± 0,81	1,07 ± 0,41	0,69 ± 0,32	<0,001 <sup>abc</sup>
HDL kolesterol (mmol/L)	0,95 ± 0,13	1,17 ± 0,23	1,46 ± 0,26	<0,001 <sup>abc</sup>
SBP (mmHg)	134,8 ± 15,23	119,1 ± 9,98	108,4 ± 8,32	<0,001 <sup>abc</sup>
DBP (mmHg)	79,42 ± 7,92	73,23 ± 8,04	65,9 ± 6,97	<0,001 <sup>abc</sup>
Glukoza natašte (mmol/L)	5,18 ± 0,86	4,94 ± 0,38	4,77 ± 0,34	0,006 <sup>b</sup>

Podaci su prikazani kao srednja vrijednost ± SD (standardna devijacija)

MS –metabolički sindrom, HDL – lipoprotein visoke gustoće, SBP – sistolički krvni tlak, DBP – dijastolički krvni tlak

\* Usporedba između grupa provedena je s jednosmjernom analizom varijance (ANOVA) s post-hoc Tukey HSD testom

<sup>a</sup> Podskupina pretilih ispitanika s MS uspoređeni s podskupinom pretilih ispitanika bez MS

<sup>b</sup> Podskupina pretilih ispitanika s MS uspoređeni s kontrolnom skupinom

<sup>c</sup> Podskupina pretilih ispitanika bez MS uspoređeni s kontrolnom skupinom

Rezultati usporedba ostalih biokemijskih i kliničkih karakteristika između pretilih ispitanika s MS-om i bez MS-a, a koji su uspoređeni s kontrolnom skupinom prikazani su u Tablici 6. Statistički značajna više vrijednosti LDL kolesterola, AST, ALT, GGT, inzulina natašte, HbA1c i hsCRP imali su pretili ispitanici s MS-om, a u usporedbi s pretilim ispitanicima bez MS-a i kontrolnom skupinom.

**Tablica 6.** Ostale biokemijske i kliničke karakteristike pretile djece i adolescenata s ili bez MS u usporedbi s kontrolnom skupinom

Varijabla	Pretili s MS (N=31)	Pretili bez MS MS (N=61)	Kontrolna skupina (N=39)	P*
Ukupni kolesterol (mmol/L)	4,43 ± 1,1	4,14 ± 0,75	4,1 ± 0,78	0,209
LDL kolesterol (mmol/L)	2,86 ± 0,8	2,49 ± 0,69	2,32 ± 0,72	0,009 <sup>a</sup>
AST (U/L)	21,61 ± 6,86	21,13 ± 7,42	18,51 ± 5,52	0,099
ALT (U/L)	30,9 ± 19,83	24,67 ± 17,58	14,44 ± 5,06	<0,001 <sup>ab</sup>
GGT (U/L)	23,81 ± 13,9	18,98 ± 10,34	12,87 ± 2,35	<0,001 <sup>ab</sup>
Urea (mmol/L)	4,22 ± 1,04	4,07 ± 0,91	4,35 ± 0,98	0,359
Kreatinin (μmol/L)	60,45 ± 10,79	57,49 ± 8,56	58,46 ± 6,78	0,306
Inzulin natašte (mIU/L)	32,02 ± 20,12	25,15 ± 16,66	1,5 ± 4,79	<0,001 <sup>ab</sup>
IGF-1 (nmol/L)	41,36 ± 17,56	36,86 ± 13,29	40,61 ± 12,74	0,261
Hemoglobin A1c (%)	5,47 ± 0,35	5,44 ± 0,29	5,23 ± 0,31	0,001 <sup>ab</sup>
hsCRP (mg/L)	2,92 ± 2,25	2,55 ± 2,05	0,75 ± 1,63	<0,001 <sup>ab</sup>

Podaci su prikazani kao srednja vrijednost ± SD (standardna devijacija)

MS – metabolički sindrom, LDL – lipoprotein niske gustoće, ALT – alanin-aminotransferaza, AST – aspartat-aminotransferaza, GGT – gama-glutamiltransferaza, IGF-1 – čimbenik rasta sličan inzulinu 1, hsCRP – C reaktivni protein visoke osjetljivosti

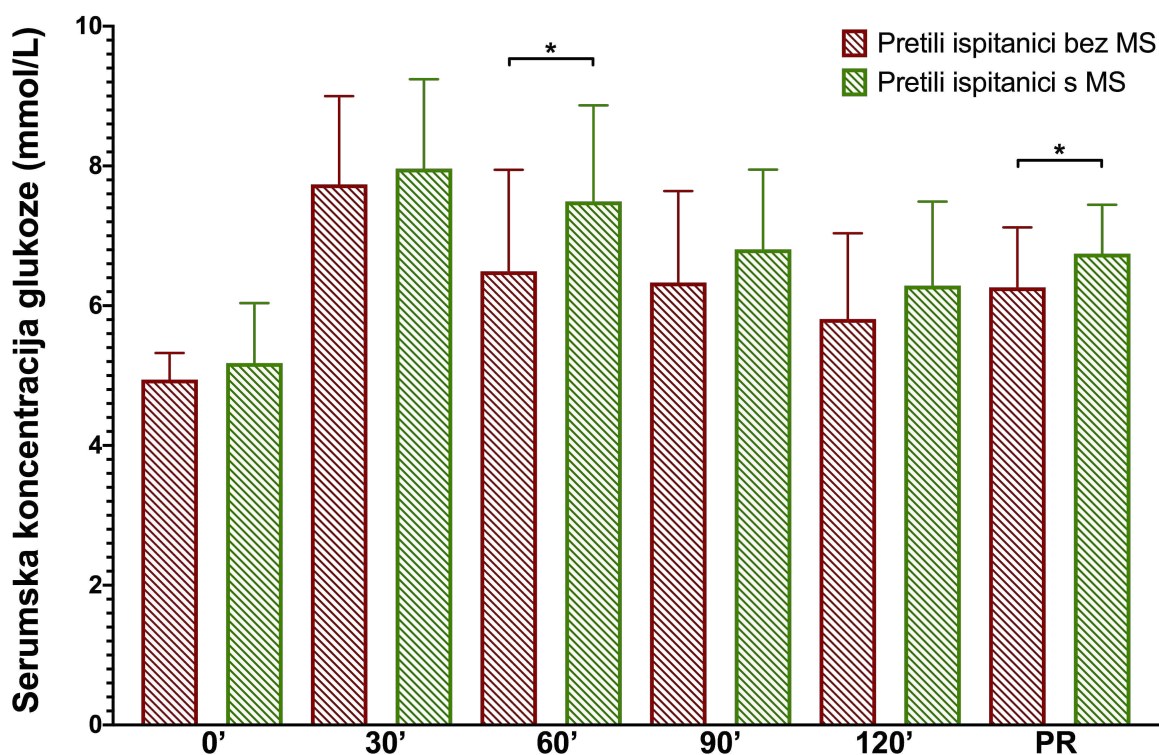
\* Usporedba između grupa provedena je s jednosmjernom analizom varijance (ANOVA) s post-hoc Tukey HSD testom

<sup>a</sup> Podskupina pretelih ispitanika s MS uspoređeni s kontrolnom skupinom

<sup>b</sup> Podskupina pretelih ispitanika bez MS uspoređeni s kontrolnom skupinom



Statistički značajna razlika između pretilih ispitanika s MS i bez MS-a pronađena je u koncentracijama glukoze u 60. minuti OGTT testa ( $7,49 \pm 1,38$  vs.  $6,49 \pm 1,45$  mmol/L,  $P=0,002$ ) i prosječnoj glukozi tijekom cijelog OGTT testa ( $6,75 \pm 0,7$  vs.  $6,26 \pm 0,86$  mmol/L,  $P=0,008$ ) (Slika 9.).



**Slika 9.** Prosječne vrijednosti glukoze kroz cijeli OGTT test u pretilih ispitanika s MS i bez MS

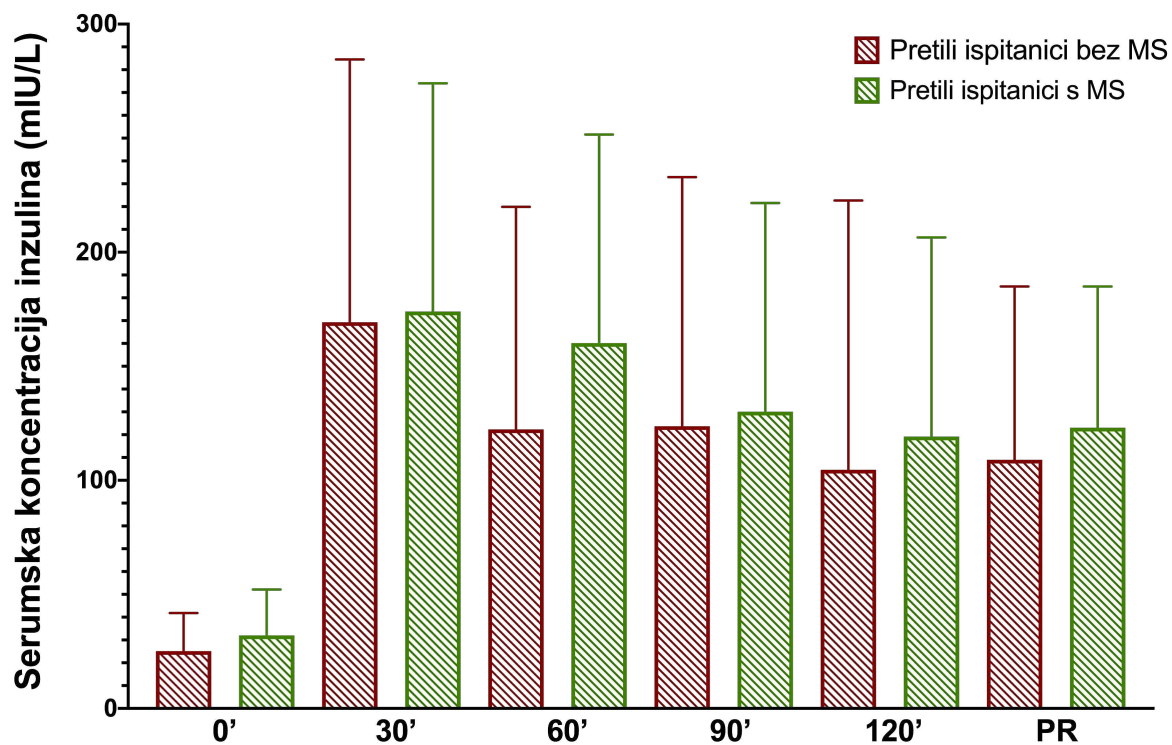
Podaci su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  SD (standardna devijacija)

PR – prosječna koncentracija glukoze

Usporedba između skupina provedena je s t-testom

\*  $P < 0,05$

Također, nije pronađena statistički značajna razlika između pretelih ispitanika s MS i bez MS-a u koncentracijama inzulina tijekom cijelog OGTT testa.



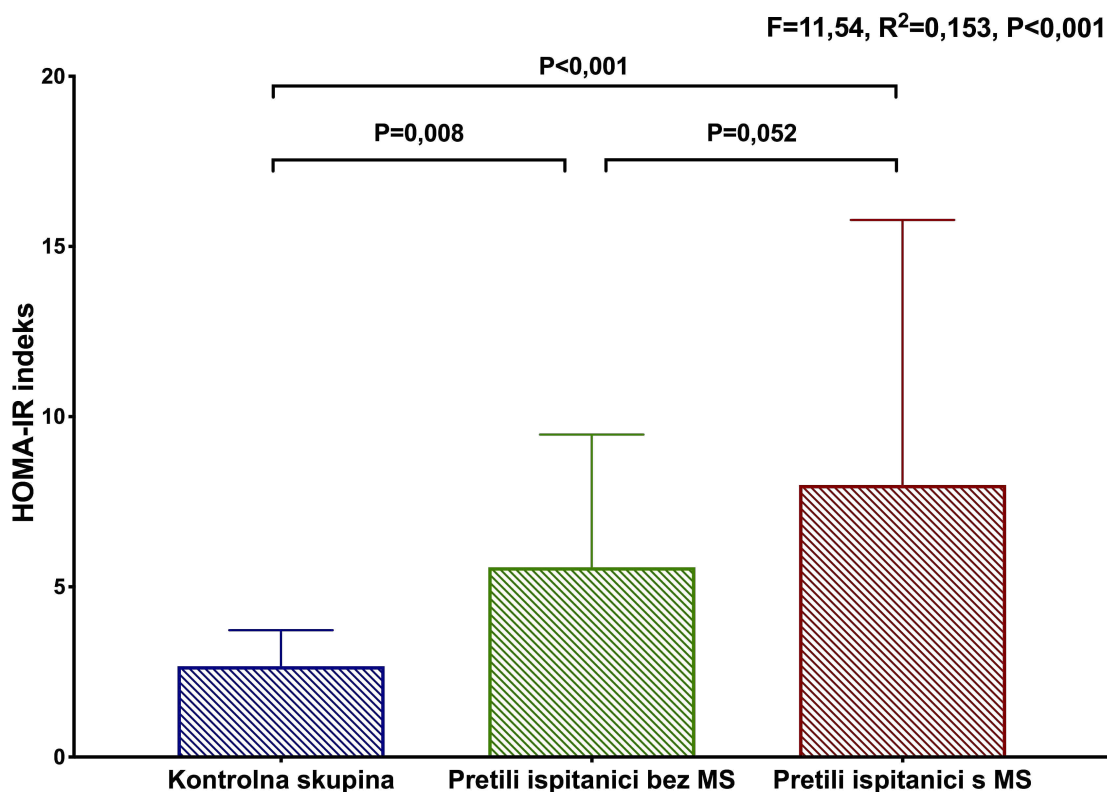
**Slika 10.** Prosječne vrijednosti inzulina kroz cijeli OGTT test kod pretelih ispitanika s MS i bez MS

Podaci su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  SD (standardna devijacija)

PR – prosječna koncentracija inzulina

Usporedba između grupa provedena je s t-testom

Statistički značajno više vrijednosti HOMA-IR ( $7,99 \pm 7,78$  vs.  $5,58 \pm 3,89$  vs.  $2,67 \pm 1,05$ ,  $P < 0,001$ ) imali su pretili ispitanici s MS-om, a u usporedbi s pretilim ispitanicima bez MS-a i kontrolnom skupinom (Slika 11.).



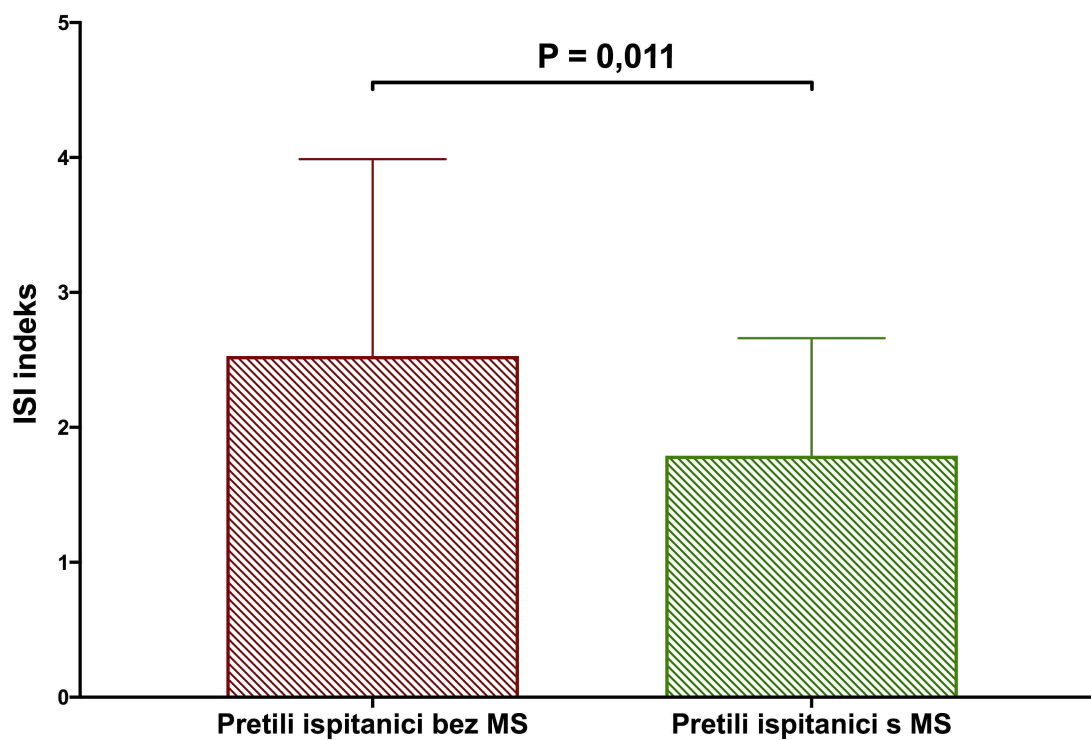
**Slika 11.** Razine HOMA-IR indeksa u pretiloj djece i adolescenata s ili bez MS u usporedbi s kontrolnom skupinom

Podaci su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  SD (standardna devijacija)

HOMA-IR – homeostatski model procjene inzulinske rezistencije, MS – metabolički sindrom

Usporedba između skupina provedena je s jednosmjernom analizom varijance (ANOVA) s post-hoc Tukey HSD testom

Nadalje, statistički značajna razlika pronađena je u indeksu ISI između pretelih ispitanika s MS-om i bez MS-a ( $1,79 \pm 0,87$  vs.  $2,53 \pm 1,46$ ,  $P=0,011$ ) (Slika 12.).



**Slika 12.** Razine ISI indeksa u pretile djece i adolescenata s ili bez MS

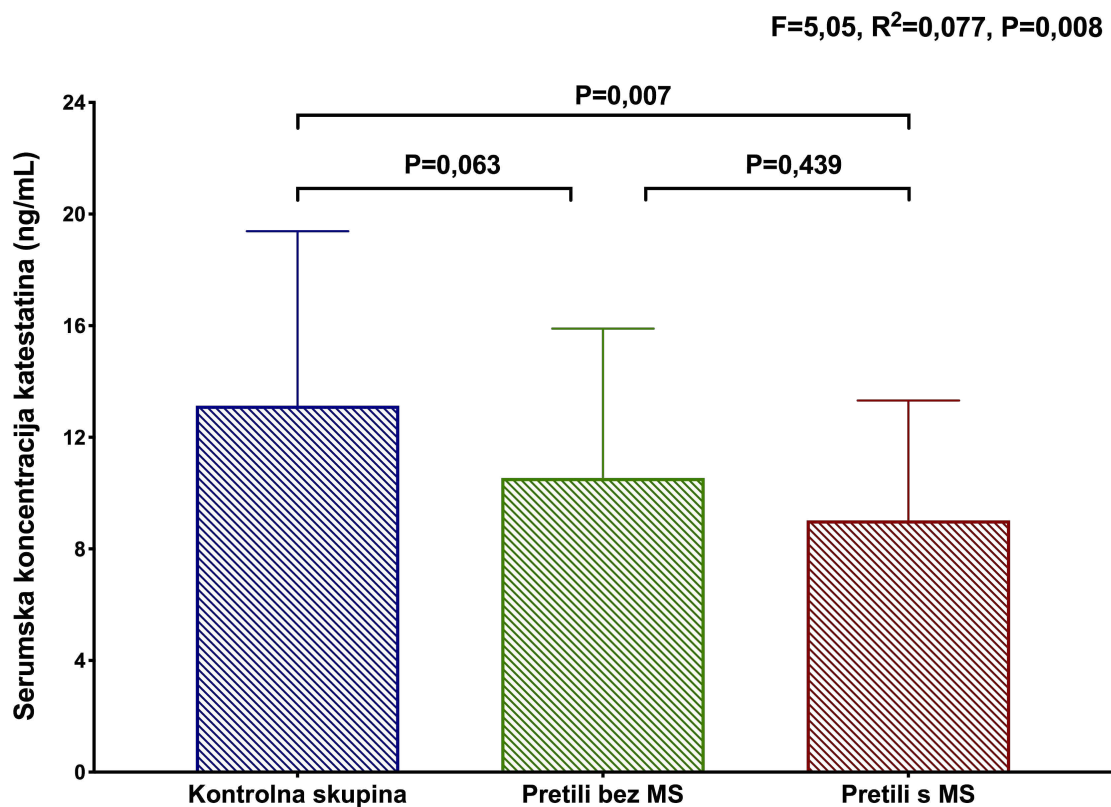
Podaci su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  SD (standardna devijacija)

ISI – Matsuda indeks, MS – metabolički sindrom

Usporedba između skupina provedena je s t-testom

#### 4.1. Serumske koncentracije katestatina u usporedbi s odrednicama MS i ostalim kardiovaskularnim rizičnim čimbenicima

Statistički značajno niže koncentracije katestatina u serumu su zabilježene u skupini pretilih ispitanika u usporedbi s kontrolnom skupinom ( $10,03 \pm 5,05$  vs.  $13,13 \pm 6,25$  ng/ml,  $P=0,004$ ). Nadalje, nakon stratifikacije pretilih ispitanika u dvije podskupine prema prisutnosti MS-a i usporedbe s kontrolnom skupinom pronađeno je da pretili ispitanici s MS-om imaju statistički najnižu koncentraciju katestatina u odnosu na pretili ispitanike bez MS-a i kontrolnu skupinu ispitanika ( $9,02 \pm 4,3$  vs.  $10,54 \pm 5,36$  vs.  $13,13 \pm 6,25$ ,  $P=0,008$ ), kao što je prikazano na Slici 13.



**Slika 13.** Serumske koncentracije katestatina u pretili djece i adolescenata sa ili bez MS u usporedbi s kontrolnom skupinom

Podaci su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  SD (standardna devijacija)

MS – metabolički sindrom

Usporedba između skupina provedena je s jednosmjernom analizom varijance (ANOVA) s post-hoc Tukey HSD testom

Nadalje, nisu zabilježene značajne razlike u koncentracijama katestatina u serumu u svih ispitanika nakon stratifikacije prema spolu (muško  $11,03 \pm 5,86$  vs. žensko  $10,92 \pm 5,36$  ng/mL,  $P=0,918$ ) i pubertalnom status (prepubertetski  $12,33 \pm 6,95$  vs. pubertetski  $10,76 \pm 5,37$  ng/mL,  $P=0,287$ ). Dodatno, značajne razlike u koncentracijama katestatina u serumu nisu uočene u svih ispitanika nakon stratifikacije prema pubertetskom statusu definiranom prema Tanneru (Tanner 1  $12,33 \pm 6,95$  vs. Tanner 2  $11,91 \pm 6,78$  vs. Tanner 3  $10,71 \pm 3,97$  vs. Tanner 4  $11,76 \pm 5,3$  vs. Tanner 5  $9,32 \pm 5,12$  ng/mL,  $P=0,237$ ).

Koncentracija katestatina u serumu je značajno i negativno korelirala s DBP ( $r=-0,253$ ,  $P=0,014$ ), HOMA-IR ( $r=-0,215$ ,  $P=0,037$ ), i s koncentracijom hsCRP ( $r=-0,208$ ,  $P=0,044$ ) u pretilih i kontrolnih ispitanika, a nije pronađena statistički značajna korelacija s ostalim mjerenim parametrima (Table 7.).

**Tablica 7.** Korelacija između koncentracije katestatina u serumu ispitanika i kardiovaskularnih rizičnih faktora

Varijabla	Svi ispitanici (N=131)	
	r*	P
ITM z vrijednost	- 0,183	0,078
Ukupni kolesterol (mmol/L)	- 0,176	0,089
Trigliceridi (mmol/L)	- 0,065	0,536
HDL kolesterol (mmol/L)	0,116	0,267
LDL kolesterol (mmol/L)	- 0,087	0,406
SBP (mmHg)	- 0,026	0,807
DBP (mmHg)	- 0,253	0,014
HOMA-IR	- 0,215	0,037
hsCRP (mg/L)	- 0,208	0,044

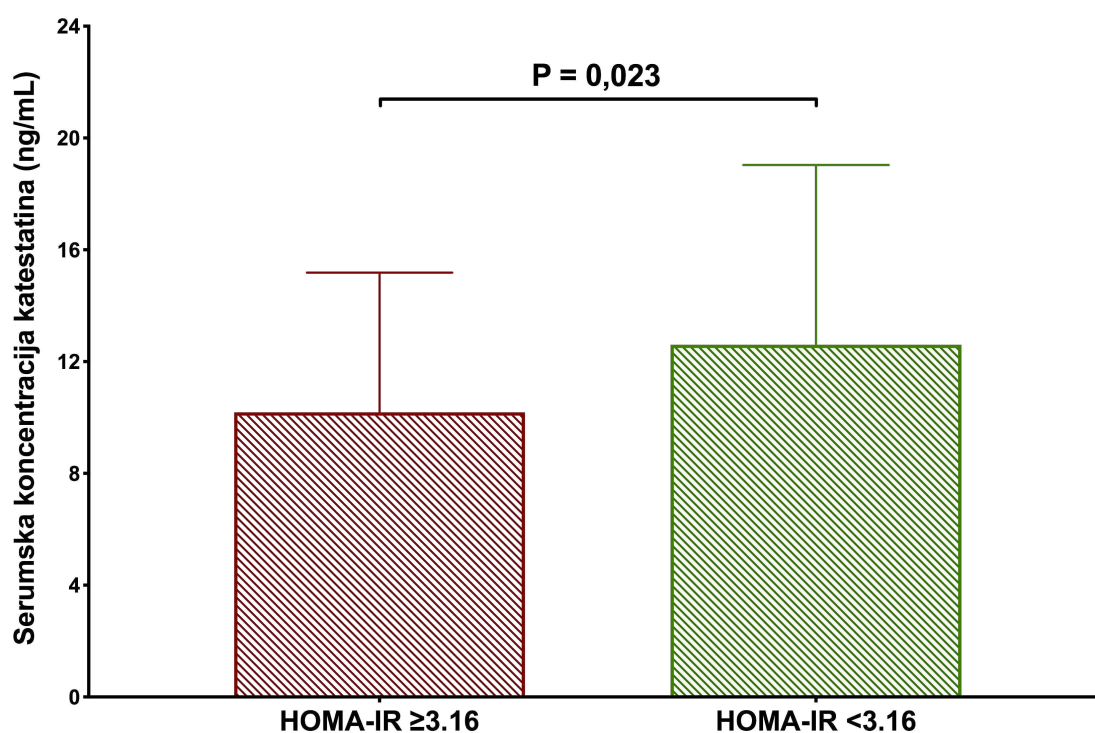


ITM – indeks tjelesne mase, HDL – lipoprotein visoke gustoće, LDL – lipoprotein niske gustoće, SBP – sistolički krvni tlak, DBP – dijastolički krvni tlak, HOMA-IR – homeostatski model procjene inzulinske rezistencije, hsCRP – visoke osjetljivosti C-reaktivni protein

\* Pearsonov koeficijent korelacije

Multivarijatna logistička regresijska analiza prilagođena za dob, spol i ITM z vrijednost u regresijskom modelu nije pokazala da katestatin (OR 0,95, 95% CI 0,86-1,04; P=0,246) djeluje kao neovisni prediktor za prisustvo MS.

Podjelom svih ispitanika ovisno o razinama HOMA-IR, 87 ispitanika imalo je HOMA-IR  $\geq 3.16$ , a dok je 44 ispitanika imalo HOMA-IR  $< 3.16$ . Statistički značajno niže koncentracije katestatina u serumu je pronađeno u ispitanika s HOMA-IR  $\geq 3.16$  u usporedbi s ispitanicima koji su imali HOMA-IR  $< 3.16$  ( $10,18 \pm 5,00$  vs.  $12,6 \pm 6,43$ , P=0,023) (Slika 14.).



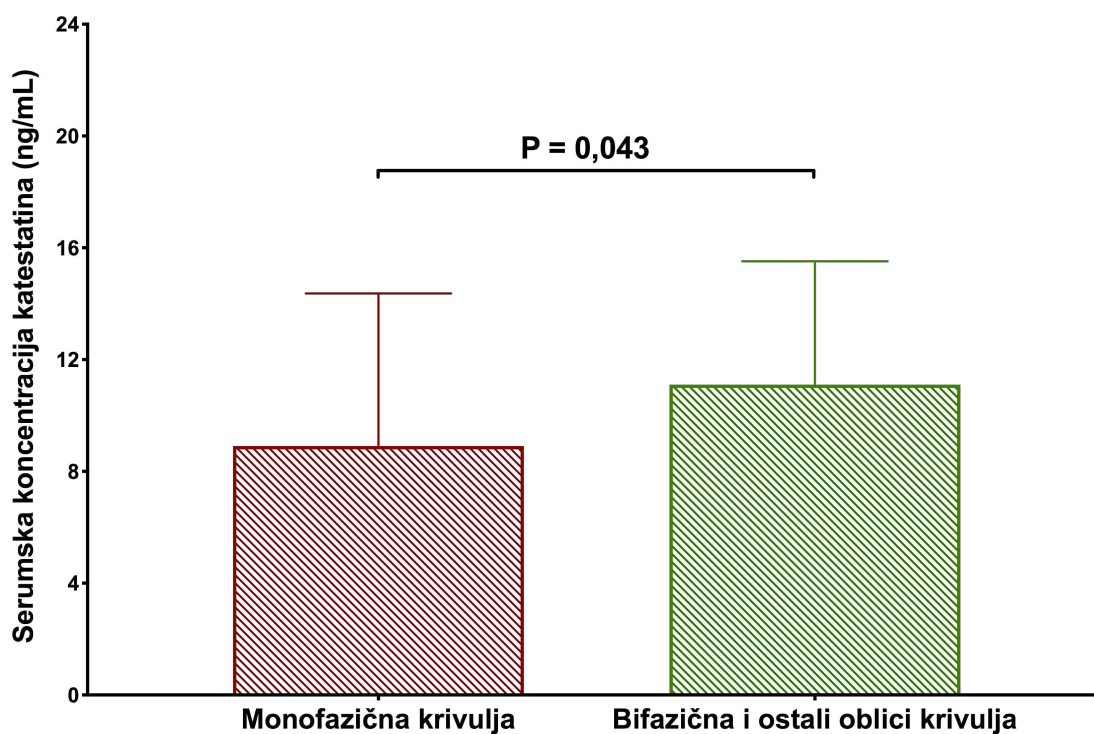
**Slika 14.** Odnos između serumskih koncentracija katestatina i HOMA-IR

Podaci su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  SD (standardna devijacija)

HOMA-IR – homeostatski model procjene inzulinske rezistencije

Usporedba između skupina provedena je s t-testom

Nadalje, podjelom svih pretilih ispitanika ovisno o obliku krivulje glukoze tijekom OGTT testa, monofazični oblik krivulje je imalo 44 (47,8%) ispitanika, dok je 48 (52,2%) imalo bifazični ili jedan od ostalih oblika krivulje glukoze. Statistički značajno niža koncentracija katestatina u serumu je pronađena u ispitanika koji su imali monofazični oblik u usporedbi s ispitanicima koji su imali bifazični ili jedan od ostalih oblika krivulje glukoze za vrijeme OGTT ( $8,91 \pm 5,46$  vs.  $11,1 \pm 4,42$ ,  $P=0,043$ ) (Slika 15.). Također, u istoj skupini bolesnika nije pronađena statistički značajna korelacija između serumskih koncentracija katestatina i indeksa ISI ( $r=0,007$ ,  $P=0,458$ ).

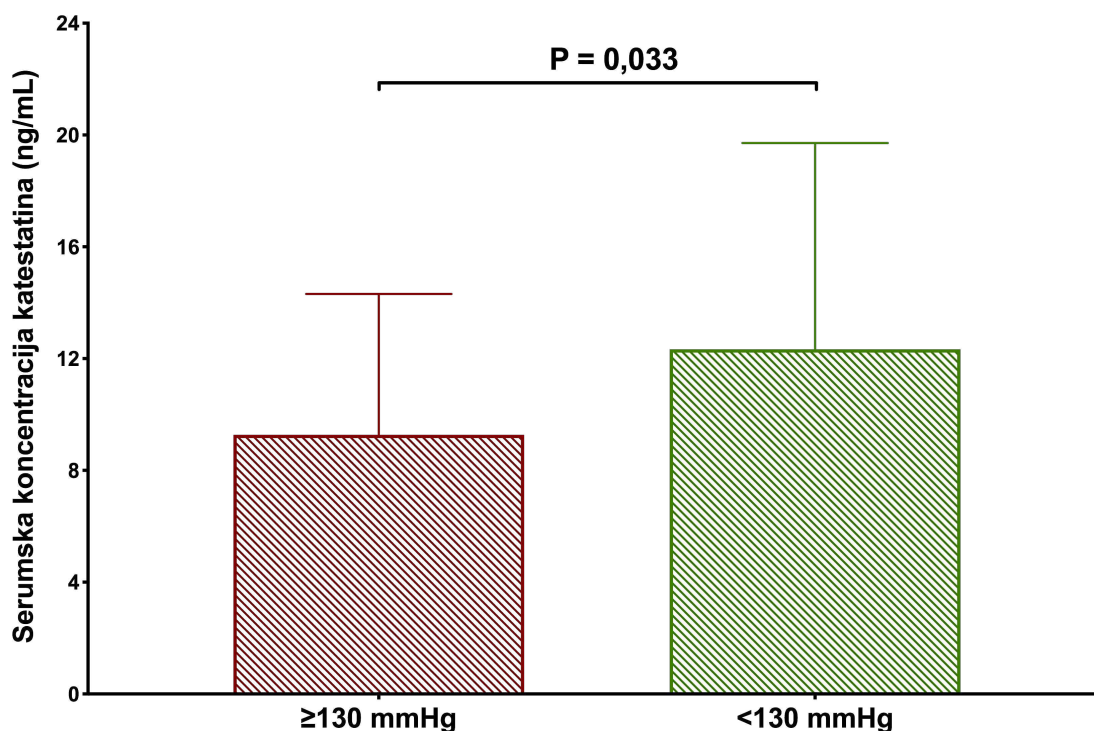


**Slika 15.** Odnos između serumskih koncentracija katestatina i oblika krivulje glukoze tijekom OGTT testa u pretilih ispitanika

Podaci su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  SD (standardna devijacija)  
Usporedba između skupina provedena je s t-testom



Nadalje, nakon podjele svih ispitanika na podskupine ovisno o prisustvu povišenog krvnog tlaka i pozitivne obiteljske anamneze na povišeni krvni tlak, podskupina s povišenim SBP, a koja uključuje 33 ispitanika, pokazala je statistički značajno niže koncentracije katestatina u usporedbi s podskupinom bez povišenog SBP ( $9,27 \pm 5,04$  vs.  $12,33 \pm 7,38$  ng/mL,  $P=0,033$ ) (Slika 16.).

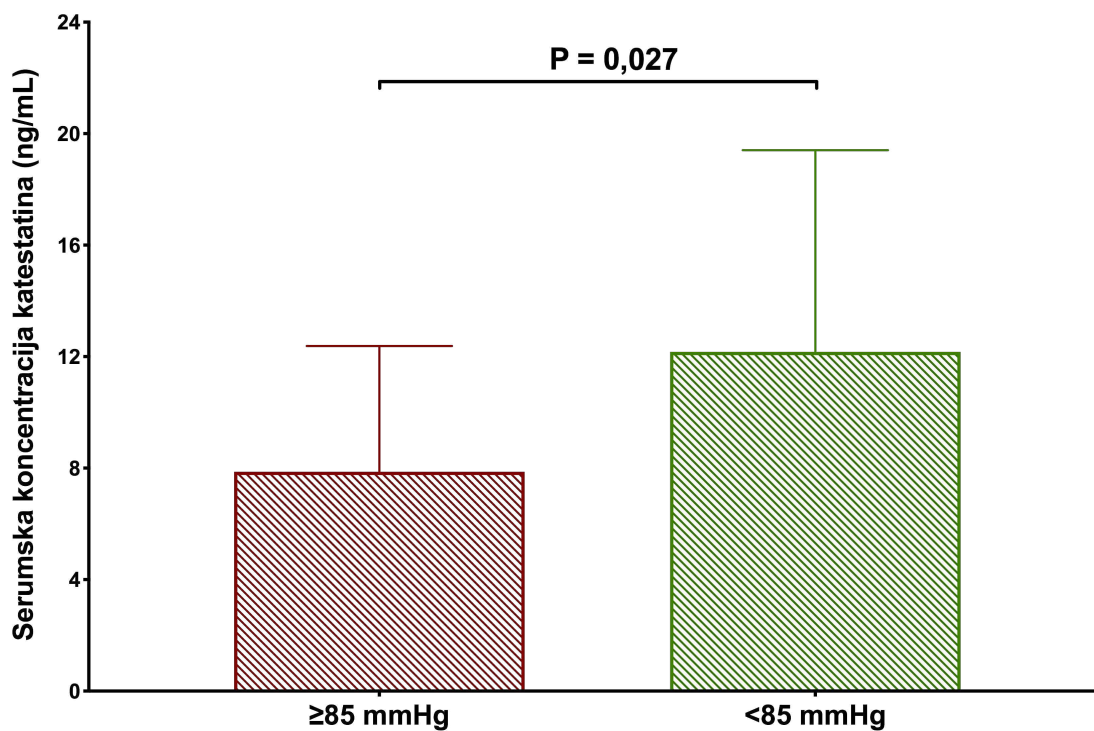


**Slika 16.** Odnos između serumskih koncentracija katestatina i SBP

Podaci su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  SD (standardna devijacija)  
 $\geq 130$  mmHg – sistolički krvni tlak  $\geq 130$  mmHg,  $< 130$  mmHg – sistolički krvni tlak  $< 130$  mmHg

Usporedba između skupina provedena je s t-testom

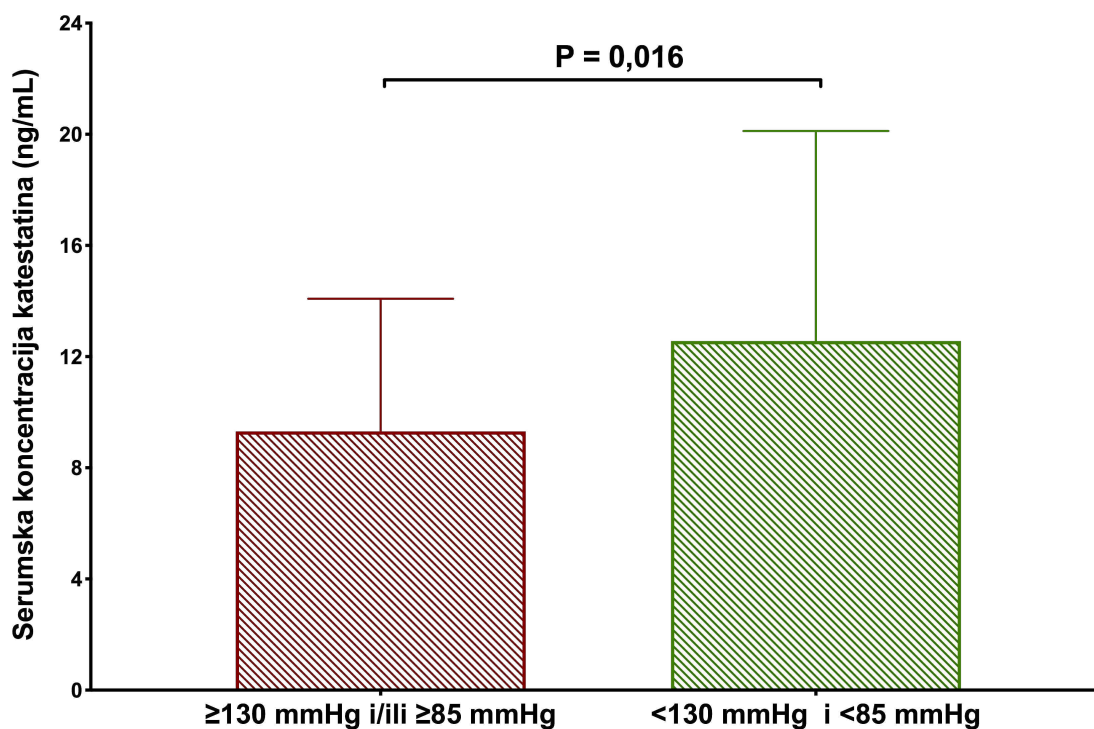
Podskupina ispitanika s povišenim DBP, sačinjena od 15 ispitanika, uspoređena s ispitanicima koji nisu imali povišeni DBP, imala je statistički značajno niže koncentracije katestatina ( $7,87 \pm 4,51$  vs.  $12,17 \pm 7,23$  ng/mL,  $P=0,027$ ) (Slika 17.).



**Slika 17.** Odnos između koncentracija katestatina u serumu ispitanika i DBP

Podaci su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  SD (standardna devijacija)  
 $\geq 85$  mmHg – dijastolički krvni tlak  $\geq 85$  mmHg,  $< 85$  mmHg – dijastolički krvni tlak  $< 85$  mmHg  
Usporedba između skupina provedena je s t-testom

Nakon dodatnog spajanja podskupina s povišenim SBP i DBP u podskupinu s povišenim SBP i/ili povišenim DBP, a koja uključuje 40 ispitanika, podskupina s povišenim SBP i/ili povišenim DBP u usporedbi s normotenzivnim ispitanicima je imala statistički značajno niže vrijednosti katestatina u serumu ( $9,31 \pm 4,78$  vs.  $12,56 \pm 7,56$  ng/mL,  $P=0,016$ ) (Slika 18.).



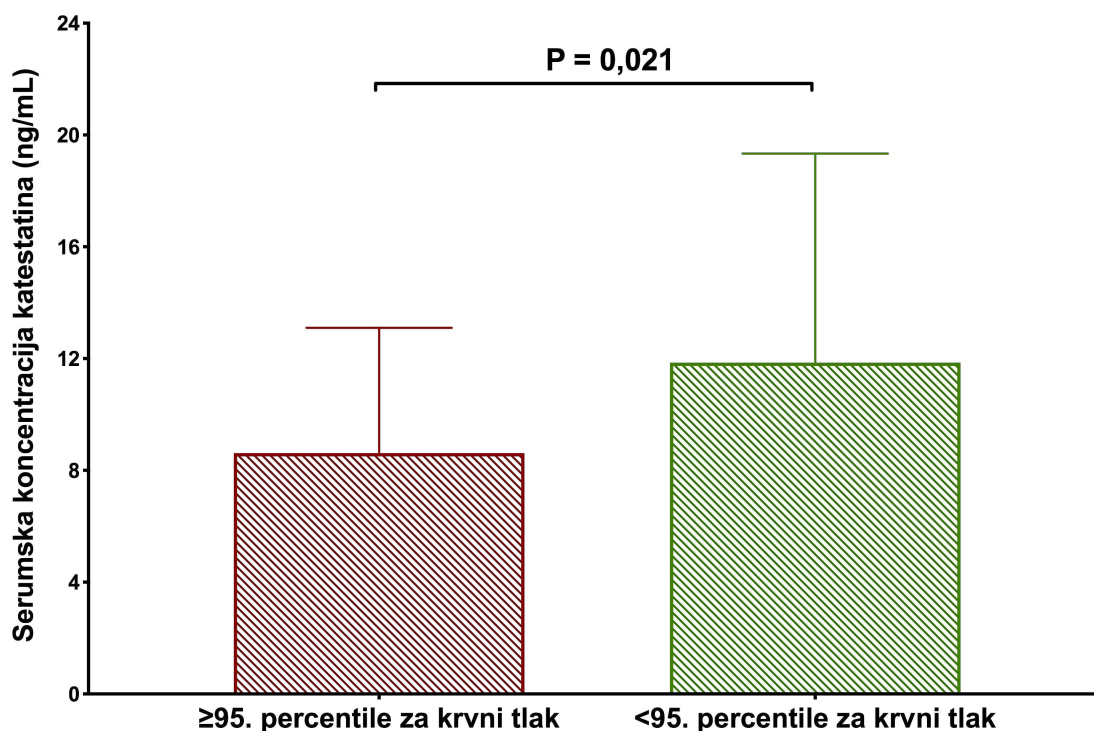
**Slika 18.** Odnos između serumskih koncentracija katestatina i povišenog krvnog tlaka

Podaci su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  SD (standardna devijacija)

$\geq 130$  mmHg i/ili  $\geq 85$  mmHg – sistolički krvni tlak  $\geq 130$  mmHg i/ili dijastolički krvni tlak  $\geq 85$  mmHg,  $< 130$  i  $< 85$  mmHg – sistolički krvni tlak  $< 130$  mmHg i dijastolički krvni tlak  $< 85$  mmHg

Usporedba između skupina provedena je s t-testom

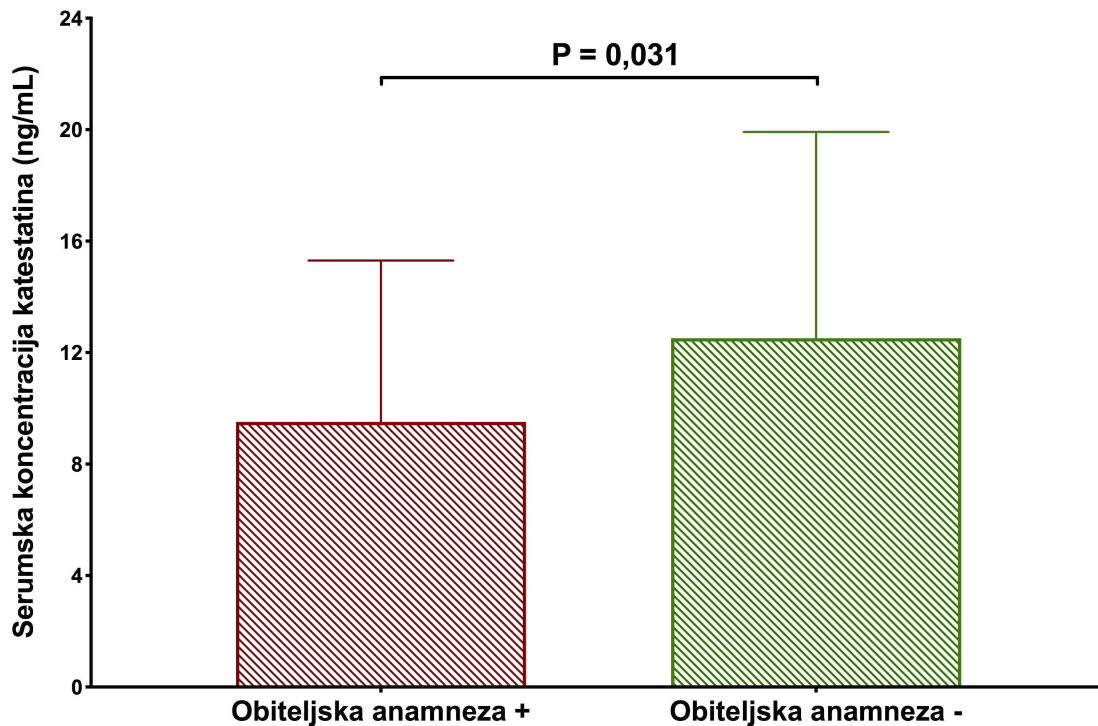
Također, nakon podjele ispitanika u podskupine s povišenim SBP i/ili povišenim DBP prema percentilima krivuljama, a koja uključuje 42 ispitanika, statistički značajno niže vrijednosti katestatina imala je podskupina sa SBP  $\geq 95$ . percentila i/ili DBP  $\geq 95$ . percentila u usporedbi s ispitanicima iz podskupine SBP  $< 95$ . percentila i DBP  $< 95$ . percentila ( $8,62 \pm 4,48$  vs.  $11,85 \pm 7,49$ ,  $P=0,021$ ) (Slika 19.).



**Slika 19.** Odnos između serumskih koncentracija katestatina i povišenog krvnog tlaka definiranog prema percentilnim krivuljama

Podaci su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  SD (standardna devijacija)  
Usporedba između skupina provedena je s t-testom

Dodatno, analizirali smo ispitanike na temelju pozitivne obiteljske anamneze povišenog krvnog tlaka i utvrdili da podskupina obuhvaća 33 ispitanika s pozitivnom obiteljskom anamnezom, a koji imaju statistički značajno niže koncentracije katestatina nego ispitanici s negativnom obiteljskom anamnezom na povišeni krvni tlak ( $9,51 \pm 5,79$  vs.  $12,52 \pm 7,4$  ng/mL,  $P=0,031$ ) (Slika 20.).

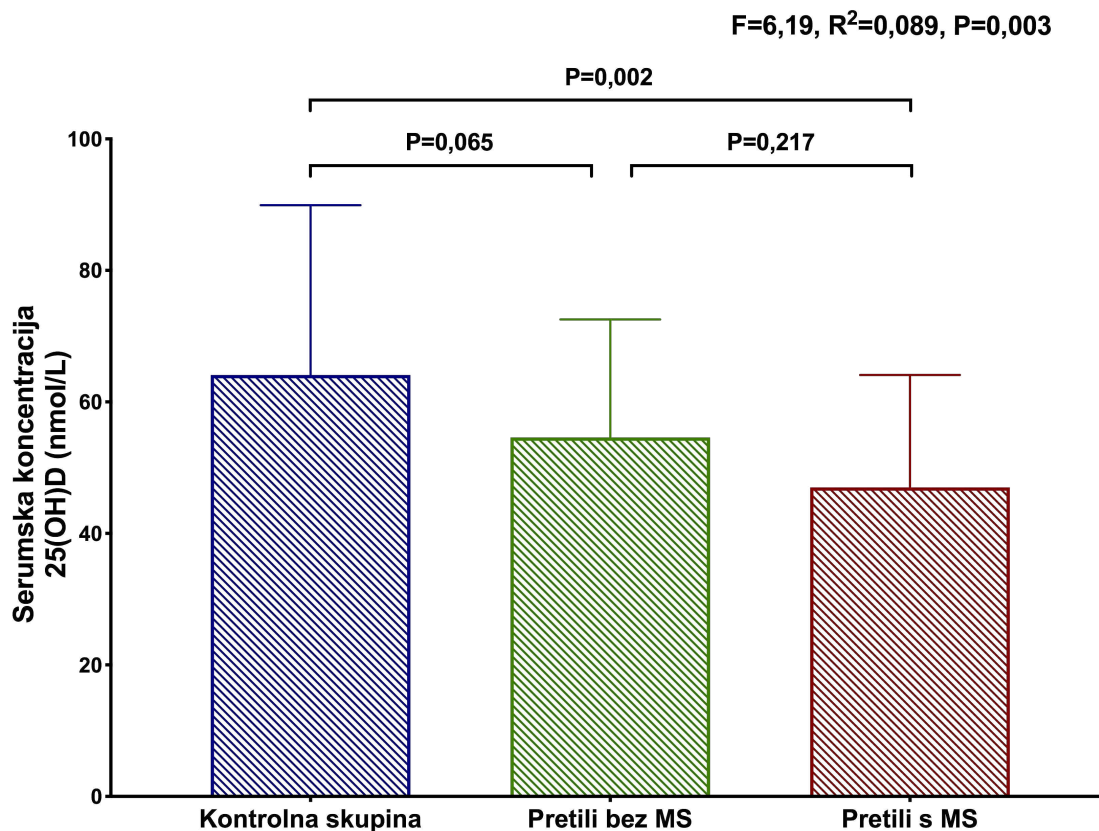


**Slika 20.** Odnos između serumskih koncentracija katestatina i pozitivne obiteljske anamneze na povišen krvni tlak

Podaci su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  SD (standardna devijacija)  
Usporedba između skupina provedena je s t-testom

## 4.2. Serumske koncentracije 25(OH)D u usporedbi s odrednicama MS i ostalim kardiovaskularnim rizičnim čimbenicima

Serumske koncentracije 25(OH)D su statistički značajno niže u pretilih ispitanika u usporedbi s kontrolnom skupinom ( $52,0 \pm 17,93$  vs.  $64,09 \pm 25,82$  nmol/L,  $P=0,003$ ). Nakon dodatne stratifikacije pretile djece i adolescenata s obzirom na prisutnost MS-a i naknadnu usporedbu s kontrolnom skupinom, analiza je pokazala da je skupina pretelih bolesnika s MS-om imala statistički značajno nižu koncentraciju 25(OH)D u odnosu s pretilim ispitanicima bez MS-a i kontrolne skupine ispitanika ( $46,99 \pm 17,11$  vs.  $54,58 \pm 17,93$  vs.  $64,09 \pm 25,82$  nmol/L,  $P=0,003$ ) (Slika 21.).



**Slika 21.** Serumske koncentracije 25(OH)D u pretile djece i adolescenata s ili bez MS u usporedbi s kontrolnom skupinom

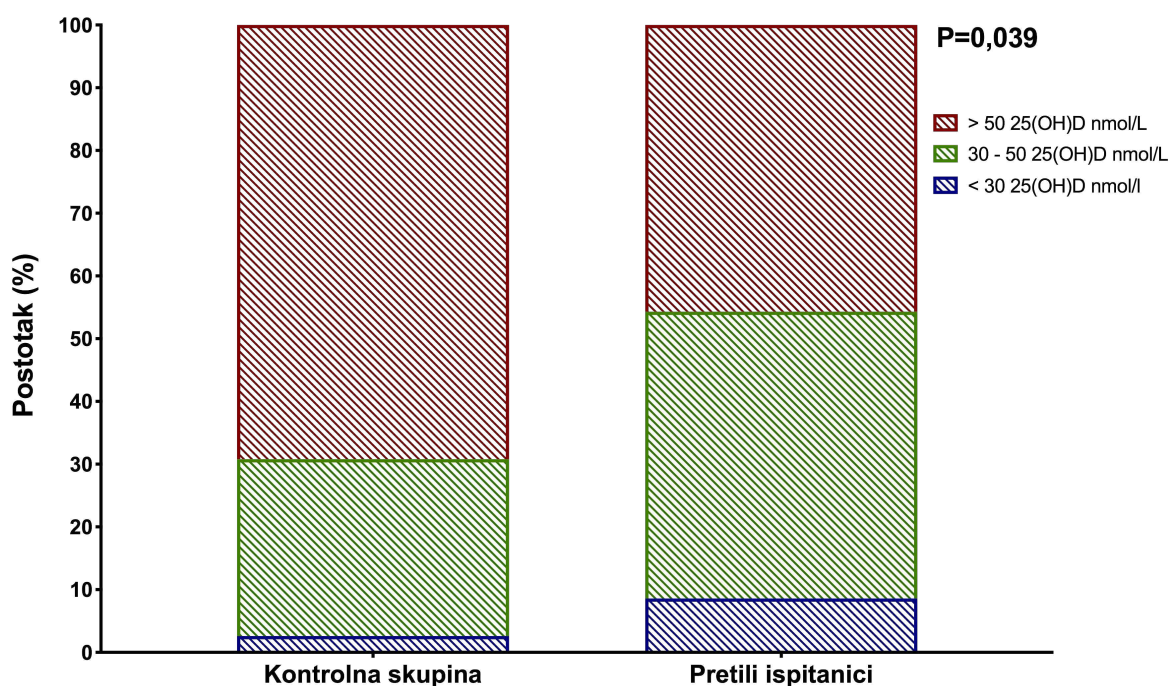
Podaci su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  SD (standardna devijacija)

25(OH)D – 25-hidroksi vitamin D, MS –metabolički sindrom

Usporedba između grupa provedena je s jednosmjernom analizom varijance (ANOVA) s post-hoc Tukey HSD testom



Nadalje, od 92 pretilih ispitanika, 8 (8,6%) je imalo manjkavu koncentraciju 25(OH)D, 42 (45,7%) je imalo nedostatnu koncentraciju 25(OH)D, a 42 (45,7%) je imala dostatnu koncentraciju 25(OH)D, dok od 39 kontrolnih ispitanika, 1 (2,6%) je imao manjkavu koncentraciju 25(OH)D, 11 (28,2%) je imalo nedostatnu koncentraciju 25(OH)D, a 27 (69,2%) imalo je dostatnu koncentraciju 25(OH)D ( $P=0,039$ ) kako je prikazano na Slici 22.



**Slika 22.** Status 25(OH)D u pretilih ispitanika i kontrolnoj skupini

25(OH)D – 25-hidroksi vitamin D  
Usporedba između skupina hi-kvadrat testom

Nakon stratifikacije pretilih ispitanika prema statusu 25(OH)D na tercile, nije pokazana statistička razlika u dobi, tjelesnoj visini, tjelesnoj masi, ITM ispitanika i ITM z vrijednosti.

**Tablica 8.** Demografske i antropometrijske karakteristike pretilih ispitanika nakon podjele u tercile prema koncentracijama 25(OH)D u serumu

Varijable	Prva tercila 25(OH)D <43,17 nmol/L	Druga tercila 25(OH)D od 43,17 do 58,6 nmol/L	Treća tercila 25(OH)D >58,6 nmol/L	P*
Dob (godine)	14,46 ± 2,32	13,51 ± 2,4	13,79 ± 2,18	0,260
Tjelesna visina (cm)	168,2 ± 11,98	166,3 ± 11,33	164,3 ± 23,08	0,660
Tjelesna masa (kg)	89,94 ± 18,98	84,71 ± 17,33	88,57 ± 21,27	0,547
ITM (kg/m <sup>2</sup> )	31,4 ± 3,45	30,37 ± 4,05	30,13 ± 3,21	0,356
ITM z vrijednost	2,73 ± 0,36	2,79 ± 0,57	2,68 ± 0,42	0,669

Podaci su prikazani kao srednja vrijednost ± SD (standardna devijacija)  
25(OH)D – 25-hidroksi vitamin D, HDL – lipoprotein visoke gustoće, SBP – sistolički krvni tlak, DBP – dijastolički krvni tlak

\* Usporedba između grupa provedena je s jednosmjernom analizom varijance (ANOVA) s post-hoc Tukey HSD testom



U istim promatranim podskupinama statistički značajno više vrijednosti triglicerida imali su ispitanici s najnižim vrijednostima 25(OH)D, a dok s obzirom na ostale odrednicama MS-a nije pronađena statistički značajna razlika (Tablica 9.).

**Tablica 9.** Odrednice MS kod svih pretilih ispitanika nakon podjele u tercile prema koncentracijama 25(OH)D u serumu

Varijable	Prva tercila 25(OH)D <43,17 nmol/L	Druga tercila 25(OH)D od 43,17 do 58,6 nmol/L	Treća tercila 25(OH)D >58,6 nmol/L	P*
Opseg trbuha (cm)	105,0 ± 10,82	99,85 ± 10,05	100,9 ± 8,58	0,109
Trigliceridi (mmol/l)	1,47 ± 0,79	1,14 ± 0,48	1,08 ± 0,49	0,032 <sup>b</sup>
HDL kolesterol (mmol/l)	1,09 ± 0,21	1,09 ± 0,23	1,09 ± 0,25	0,986
SBP (mmHg)	125,3 ± 14,61	122,2 ± 13,64	125,7 ± 14,32	0,569
DBP (mmHg)	77,47 ± 9,48	74,39 ± 7,05	73,97 ± 8,74	0,221
Glukoza natašte (mmol/l)	4,89 ± 0,46	5,17 ± 0,76	4,99 ± 0,5	0,171
25(OH)D (nmol/L)	33,81 ± 7,13	49,5 ± 4,55	72,76 ± 11,43	<0,001 <sup>abc</sup>

Podaci su prikazani kao srednja vrijednost ± SD (standardna devijacija)

25(OH)D – 25-hidroksi vitamin D, HDL – lipoprotein visoke gustoće, SBP – sistolički krvni tlak, DBP – dijastolički krvni tlak

\* Usporedba između grupa provedena je s jednosmjernom analizom varijance (ANOVA) s post-hoc Tukey HSD testom

<sup>a</sup> Prva tercila 25(OH)D uspoređeni s drugom tercilom 25(OH)D

<sup>b</sup> Prva tercila 25(OH)D uspoređeni s trećom tercilom 25(OH)D

<sup>c</sup> Druga tercila 25(OH)D uspoređeni s trećom tercilom 25(OH)

Daljnjom analiza istih podskupina i njihov odnos s ostalim kardiovaskularnim rizičnim faktorima prikazan je u Tablici 10. Statistički značajna niže vrijednosti ukupnog kolesterola i LDL kolesterola imali su pretili s najnižim vrijednostima 25(OH)D.

**Tablica 10.** Biokemijske i kliničke karakteristike u svih pretilih ispitanika nakon podjele u tercile prema koncentracijama 25(OH)D u serumu

Varijable	Prva tercila 25(OH)D <43.17 nmol/L	Druga tercila 25(OH)D od 43.17 do 58.6 nmol/L	Treća tercila 25(OH)D >58.6 nmol/L	P*
Ukupni kolesterol (mmol/L)	4,6 ± 0,91	3,97 ± 0,63	4,18 ± 1,01	0,017 <sup>a</sup>
LDL kolesterol (mmol/L)	2,85 ± 0,73	2,4 ± 0,61	2,54 ± 0,7	0,035 <sup>a</sup>
AST (U/L)	22,1 ± 8,01	20,94 ± 7,66	20,87 ± 6,08	0,763
ALT (U/L)	29,8 ± 19,29	27,0 ± 21,67	23,17 ± 13,75	0,385
GGT (U/L)	24,03 ± 14,39	20,58 ± 13,08	17,27 ± 5,45	0,086
Urea (mmol/L)	4,08 ± 1,1	4,17 ± 0,77	4,11 ± 1,0	0,932
Kreatinin (μmol/L)	58,43 ± 11,36	58,42 ± 9,19	58,9 ± 7,7	0,976
Inzulin natašte (mIU/L)	26,58 ± 12,36	29,67 ± 22,21	23,49 ± 11,58	0,335
IGF-1 (nmol/L)	37,5 ± 11,82	36,68 ± 15,76	41,54 ± 16,71	0,402
HOMA-IR	5,86 ± 2,98	7,36 ± 8,04	5,32 ± 2,89	0,298
Hemoglobin A1c (%)	35,38 ± 2,51	37,26 ± 4,9	36,51 ± 4,3	0,194
hsCRP (mg/L)	2,49 ± 1,73	2,87 ± 1,95	3,42 ± 3,74	0,406

Podaci su prikazani kao srednja vrijednost ± SD (standardna devijacija)

25(OH)D – 25-hidroksi vitamin D, LDL – lipoprotein niske gustoće, ALT – alanin-aminotransferaza, AST – aspartat-aminotransferaza, GGT – gama-glutamilttransferaza, IGF-1 – čimbenik rasta sličan inzulinu 1, HOMA-IR – homeostatski model procjene inzulinske rezistencije, hsCRP – visoke osjetljivosti C-reaktivni protein

\* Usporedba između grupa provedena je s jednosmjernom analizom varijance (ANOVA) s post-hoc Tukey HSD testom

<sup>a</sup> Prva tercila 25(OH)D uspoređeni s drugom tercilom 25(OH)D

Također, koncentracije 25(OH)D u serumu bolesnika su pokazale značajnu i negativnu korelaciju s ITM z vrijednosti ( $r=-0,208$ ,  $P=0,017$ ), koncentracija triglicerida ( $r=-0,259$ ,  $P=0,003$ ), DBP ( $r=-0,204$ ,  $P=0,020$ ) i HOMA-IR ( $r=-0,196$ ,  $P=0,026$ ) u pretilih i kontrolnih ispitanika, dok nije pronađena statistički značajna korelacija s drugim mjerenim parametrima (Tablici 11.).

**Tablica 11.** Korelacija između serumske koncentracije 25(OH)D i kardiovaskularnih rizičnih faktora

Varijabla	Svi ispitanici (N=131)	
	r*	P
ITM z vrijednost	-0,208	0,017
Ukupni kolesterol (mmol/L)	-0,124	0,160
Trigliceridi (mmol/L)	-0,259	0,003
HDL kolesterol (mmol/L)	0,122	0,168
LDL kolesterol (mmol/L)	-0,095	0,285
SBP (mmHg)	-0,110	0,213
DBP (mmHg)	-0,204	0,020
HOMA-IR	-0,196	0,026
hsCRP (mg/L)	0,022	0,805

ITM – indeks tjelesne mase, HDL – lipoprotein visoke gustoće, LDL – lipoprotein niske gustoće, SBP – sistolički krvni tlak, DBP – dijastolički krvni tlak, HOMA-IR – homeostatski model procjene inzulinske rezistencije, hsCRP – visoke osjetljivosti C-reaktivni protein

\* Pearsonov koeficijent korelacije

## **5. RASPRAVA**

## **5.1. MS i kardiovaskularni rizični čimbenici u pretile djece i adolescenata**

Prevalencija MS-a u našoj proučavanoj populaciji iznosi 34,1% što ukazuje na blagi porast prevalencije MS-a u usporedbi s prethodnim razdobljem (2). Navedeni rezultati mogu se povezati s porastom pretilosti u školskoj dobi te je važno naglasiti potrebu za daljnjim praćenjem prevalencije MS-a u našoj populaciji (8). Također, može se diskutirati o tome da su na porast prevalencije pretilosti i posljedično MS-a, utjecale tranzicijske promjene tijekom posljednjih tridesetak godina koje su drastično utjecale na rani rast i razvoj, prehrambene navike, tjelesnu aktivnost i socio-ekonomsko okruženje (2,129,130). Navedene tvrdnje su djelomično potkrijepljene presječnim istraživanjem na odrasloj populaciji u Dalmaciji kod koje je demonstrirana izrazito slaba adherencija mediteranskom načinu prehrane (131). Sve navedeno ukazuje na multifaktorijalan i kompleksan patofiziološki mehanizam nastanka MS-a te na važnost ranog prepoznavanja i liječenja pretilosti u ranoj životnoj dobi.

U našem istraživanju demonstrirali smo značajno niže vrijednosti hsCRP u pretilih ispitanika s MS-om, a navedeni rezultati su u skladu s dosad objavljenim studijama (42,132,133). Nadalje, pretili ispitanici s MS-om imali su statistički značajno više vrijednosti indeksa HOMA-IR u usporedbi s pretilim ispitanicima bez MS-a i kontrolnom skupinom, ali i da pretili ispitanici s MS-om imaju značajno niže vrijednosti indeksa ISI u usporedbi s pretilim ispitanicima bez MS-a, a što je, također, u skladu s dosad objavljenim istraživanjima (2,132,133).

## **5.2. Serumske koncentracije katestatina i njegov utjecaj na MS i kardiovaskularne rizične faktore u pretile djece i adolescenata**

Rezultati prvoga dijela istraživanja pokazali su niže serumske koncentracije katestatina u pretile djece i adolescenata nego u kontrolnoj skupini. Osim toga, kada je skupina pretilih ispitanika bila podijeljena u dvije podskupine prema prisutnosti MS-a, djeca i adolescenti s MS imali su niže serumske koncentracije katestatina od ispitanika bez MS-a. Takvi rezultati potvrdili su našu hipotezu te je prema našim saznanjima, ova studija prva koja je izvijestila o serumskim koncentracijama katestatina u pretile djece i adolescenata te

mogućoj poveznici katestatina s MS-om i kardiovaskularnim čimbenicima rizika u pedijatrijskoj populaciji.

IR i upala niskoga stupnja su glavni patofiziološki mehanizmi nastanka kardiovaskularnih komplikacija i MS-a u pretilo djece i adolescenata (31,134). Kako je poznato indeks HOMA-IR je najčešće korišten model procjene IR-e u pretilo djece i adolescenata, ali njegova procjena se temelji na bazalnim vrijednostima, a druge metode kao što je indeks ISI ili oblik krivulje glukoze, temelje svoju procjenu na cjelokupnim vrijednostima tijekom OGTT testa (34,35,123–125). U ovome istraživanju uočili smo značajnu i negativnu korelaciju između indeksa HOMA-IR i serumskih koncentracija katestatina, ali nije uočena značajna korelacija između indeksa ISI i serumskih koncentracija katestatina u pretilih ispitanika. Također, utvrdili smo da pretili ispitanici s monofaznom krivuljom glukoze tijekom OGTT testa imaju niže koncentracije katestatina u usporedbi s ispitanicima s bifaznim i/ili ostalim oblicima krivulje glukoze tijekom OGTT, a što ukazuje na mogući složeni utjecaj katestatina na metabolizam glukoze i inzulina. Također, uočili smo značajnu i negativnu korelaciju između koncentracije hsCRP i serumske koncentracije katestatina. Ova nova, poveznica između katestatina i IR-e te upale niskoga stupnja prethodno je opisana u recentnim istraživanjima na mišjem modelu s ablacijom gena za katestatin (CST-KO) kada je miševima inducirana pretilost i upalna bolest crijeva (73,75). U navedenom istraživanju, nakon indukcije pretilosti, miševi su tretirani katestatinom što je uzrokovalo smanjenje razine proupalnih citokina uslijed modulacije izražaja gena za pro- i protuupalne čimbenike, ali je također, dovelo do poboljšanja lipidnog profila, tolerancije na glukozu i inzulin te je sveukupno utjecalo na smanjenje pretilosti u miševa (73). Negativna korelacija katestatina i biljega upale hsCRP u našoj pedijatrijskoj populaciji je u skladu s rezultatima na mišjem modelu te naglašava moguću novu ulogu katestatina u patofiziološkim mehanizmima pretilosti, imuno-metabolizmu i MS-a.

U studiji Kim i suradnika, u populaciji djece mlađe od 10 godina s opstruktivskom apnejom tijekom spavanja, koncentracije katestatina u serumu nisu značajno korelirale sa SBP, međutim, pokazana je slaba, ali značajna i negativna korelacija sa srednjim arterijskim tlakom ( $r=-0.184$ ,  $P=0.049$ ) (135). Naši su rezultati pokazali značajnu i negativnu korelaciju između katestatina i DBP, a što ukazuje na moguću ulogu katestatina u postupnom pogoršanju kardiovaskularnih rizičnih čimbenika u pretiloj pedijatrijskoj populaciji.

Dodatno, u našem istraživanju zabilježene su značajno niže vrijednosti katestatina u ispitanika s povišenim krvnim tlakom u usporedbi s normotenzivnim ispitanicima, a što je u skladu s prethodnim istraživanjem u odraslih bolesnika s povišenim krvnim tlakom, ali se razlikuje od dvije studije koje su također provedene u odrasloj hipertenzivnoj populaciji (71,88,89). Ova dinamika razine katestatina ukazuje na moguće početno snižavanje koncentracija katestatina u serumu u početnim fazama hipertenzije, kao u naših ispitanika te kasniji postupni rast koncentracijama katestatina za vrijeme produljenog trajanja hipertenzije (71,88,89). Ovakav složen utjecaj katestatina na patofiziološki mehanizam nastanka i progresije hipertenzije dodatno je potkrijepljen našim rezultatima koji demonstriraju da ispitanici s pozitivnom obiteljskom anamnezom na povišen krvni tlak imaju značajno niže vrijednosti katestatina, a što je ranije pokazano u odrasloj populaciji (88). Također, pokazano je da polimorfizmi na specifičnim genskim lokusima doprinose razlikama u količinama oslobođenog CgA i osiguravaju nasljednu autonomnu osobinu katestatina u regulaciji hipertenzije te tako doprinose funkciji simpatičkog sustava (91,136). Naši rezultati moguće ukazuju na bitan nasljedni utjecaj na metabolizam katestatina, a što je u skladu sa navedenim istraživanjima (83,137,138). Međutim, potrebna su dugoročna istraživanja koja će promatrati koncentracije katestatina u općoj populaciji, a sve kako bi se bolje razumjela uloga katestatina u nastanku i razvoju hipertenzije.

U istraživanju na odrasloj populaciji hipertenzivnih bolesnika koji su uglavnom bili pretili s MS-om, pokazana je pozitivna i značajna korelacija između serumskih koncentracija katestatina i HDL kolesterola ( $r=0.426$ ,  $P<0,001$ ), međutim, u studiji s odraslim ispitanicima s opstruktivskom apnejom tijekom spavanja demonstrirani su potpuno suprotni rezultati ( $r=-0,320$ ,  $P<0,001$ ) (71,72). Osim toga, Durakođlugil i suradnici su u svom istraživanju pokazali da koncentracije triglicerida negativno i značajno koreliraju sa serumskim koncentracijama katestatina ( $r=-0,317$ ,  $P=0,002$ ) (71). Suprotno navedenim rezultatima studija u odrasloj populaciji, u našoj ispitanoj populaciji nije zabilježena značajna povezanost između koncentracije katestatina u serumu i parametara lipidnog profila, a mogući razlog navedenih razlika može se pronaći u razlici u dobi promatranih ispitanika. Prosječna dob ispitanika u navedenim studijama bila je veća od 40 godina, s različitim komorbiditetima te različitim udjelom oba spola koji dodatno moduliraju moguće ekstenzivne učinke kroničnih metaboličkih poremećaja na serumske koncentracije katestatina.

U našem istraživanju, uočili smo nešto više serumske koncentracije katestatina u svih ispitanika u usporedbi s jedinim drugim istraživanjem provedenim na dječjoj populaciji s ispitanicima s opstrukcijskom apnejom tijekom spavanja (135). Međutim, promatrana skupina u navedenom istraživanju je bila mlađe dobi, dok je većina naših ispitanika na početku ili za vrijeme puberteta, a što ukazuje na mogući utjecaj puberteta odnosno dobi na koncentracije katestatina. Buduća istraživanja koja bi uključivala veći broj zdrave djece i adolescenata moći će u potpunosti razjasniti mogući utjecaj pubertetskog statusa na metabolizam katestatina.

### **5.3. Serumske koncentracije 25(OH)D i njegov utjecaj na MS i kardiovaskularne rizične faktore u pretilo djece i adolescenata**

U drugom dijelu istraživanja utvrdili smo prevalenciju manjkave koncentracije 25(OH)D koja je u pretilih ispitanika iznosila 8,6%, a što je niže u usporedbi s drugim novijim istraživanjima u Europi i Sjedinjenim Državama (93,104,109). Međutim, kada smo naše rezultate usporedili s rezultatima istraživanja iz mediteranske regije, demonstrirali smo sličnu prevalenciju manjkavosti 25(OH)D kao u grčkoj pretiloj pedijatrijskoj populaciji koja je iznosila 6,5% (108). Dodatno, s obzirom na drugačiji kriterij, prema kojemu je manjkava koncentracija 25(OH)D definirana kao <50 nmol/L, prevalencija u pretiloj talijanskoj pedijatrijskoj populaciji iznosi 55,6%, a što je, također, usporedivo s našim rezultatima kada se skupini s manjkom pridoda skupina s nedostatnom razinom 25(OH)D, a koja bi iznosila 54,3% (139). Značajno niža prevalencija prema prethodno navedenim kriterijima zabilježena je u pretilo španjolske djece i adolescenata (18,2%), a dok je u izrazito pretilih ispitanika iznosila 37,7% (140). Navedena odstupanja u prevalenciji manjkavosti 25(OH)D vjerojatno su uzrokovane vanjskim čimbenicima kao što su tjelesna aktivnost, prehrana, izlaganje suncu, ali i mogućim drugim nepoznatim čimbenicima.

Nadalje, u našem istraživanju pokazali smo značajno više koncentracije ukupnog kolesterola, triglicerida i LDL kolesterola u pretilih ispitanika s nižim koncentracijama 25(OH)D, dok nisu zabilježene značajne razlike u koncentracijama HDL kolesterola. Navedeni rezultati su u skladu s rezultatima recentnih studija objavljenih u SAD-u i Švedskoj, dok su u potpunoj suprotnosti s istraživanjem Pacifica i suradnika na pretiloj



talijanskoj pedijatrijskoj populaciji (93,109,141). Moguće objašnjenje navedenog nerazmjera u razinama odrednica lipidograma možda se može pronaći u razlikama u ITM z vrijednosti u promatranim skupinama. U posljednjem istraživanju ITM z vrijednosti značajno su bile niže u usporedbi s našom i ostalim navedenim promatranim studijama što ukazuje na moguće kompleksni učinak vitamina D na progresiju pretilosti i posljedično nastanak kardiovaskularnih komplikacija (93,109,141). Nadalje, u *in vitro* istraživanju pokazano je da vitamin D pozitivno utječe na inhibiciju sekrecije leptina iz masnih stanica (142). Nažalost, točan mehanizam djelovanja vitamina D na izlučivanje leptina nije u potpunosti razjašnjen, ali treba naglasiti da masne stanice mogu pohraniti 25(OH)D, što za posljedicu može imati poremećaj homeostaze leptina i posljedične progresije pretilosti (142,143).

U preglednom članku iz 2015. godine, 22 studije od ukupnih 37 opservacijskih istraživanja uključenih u pregledni članak, demonstrirale su korelaciju između jednog od modela procjene IR i koncentracija 25(OH)D, što je u skladu s našim rezultatima (110). Navedena poveznica dodatno ukazuje na važnu ulogu prevencije hipovitaminoze D u pretiloj djece i adolescenata koja može ubrzati nastanak MS-a i kardiovaskularnih komplikacija dodatno pogoršavajući već postojeću IR-u (110,144). Osim navedenoga mehanizma hipovitaminoza D moguće djeluje negativno na pogoršanje upale niskoga stupnja što dodatno utječe na pogoršanje IR-e (106). Zanimljivo, u našem istraživanju nismo pronašli poveznicu s biljegom upale niskoga stupnja hsCRP, a što je u suprotnosti s istraživanjem Adikaram i suradnika koji su pokazali slabu, ali značajnu korelaciju između koncentracija hsCRP i 25(OH)D ( $r=-0,142$ ,  $P=0,048$ ) (145). U navedenom istraživanju ispitanici su imali značajno niže koncentracije 25(OH)D uspoređujući s našim istraživanjem (145). Dodatno moguće je da vitamin D djeluje i na druge mehanizme upale niskoga stupnja koje nismo promatrali u našem istraživanju. Složenost mehanizma djelovanja vitamina D na upalu niskog stupnja dodatno je pokazano u istraživanju Reyman i suradnika u kojem je promatrano 32 različita upalna medijatora u pretiloj djece i adolescenata te je opisana poveznica vitamina D s više različitih upalnih medijatora, a nakon hijerarhijske klaster analize pokazana je poveznica između manjkavosti 25(OH)D i porasta razina katepsina S, topljive vaskularne stanične adhezijske molekule (engl. *soluble vascular cell adhesion molecule*, sVCAM) i kemerina (106). Navedeni medijatori upale niskoga stupnja u različitim istraživanjima pokazali su povezanost s IR-om što dodatno ukazuje na sinergističko

djelovanje IR-e, upale niskoga stupnja i vitamina D na nastanak i progresiju MS-a i kardiovaskularnih rizičnih faktora (106).

Osim toga, u već navedenom preglednom istraživanju demonstrirana je jasna poveznica između koncentracija 25(OH)D i krvnoga tlaka, a što je u skladu s našim rezultatima gdje smo pokazali statistički značajnu i negativnu poveznicu koncentracija 25(OH)D i DBP (110).

#### **5.4. Ograničenja i nedostaci studije**

Glavni nedostatak ove studije je izostanak dugotrajnog praćenja naših ispitanika, a tijekom kojeg bih se mogla pratiti dinamika katestatina, ali i ostalih kardiovaskularnih rizičnih čimbenika tijekom napredovanja pretilosti. Nadalje, utjecaj mogućeg trećeg čimbenika na pretilost, ali na razine katestatina i kardiovaskularnih rizičnih čimbenika također bi trebalo dodatno razjasniti u eksperimentalnim istraživanjima. Također, nešto manja veličina kontrolne skupine u usporedbi s promatranom skupnom i provođenje istraživanja u jednome centru su mogli utjecati na reproducibilnost naših rezultata. Dodatno, uski raspon godina ispitanika koji su uključeni u istraživanje, a radi nepostojanja jasne definicije MS-a u djece mlađe od 10 godina, isto tako je mogao utjecati na naše rezultate.

## **6. ZAKLJUČCI**

1. Serumske koncentracije katestatina bile su statistički značajno niže u skupini pretilih ispitanika u odnosu na kontrolnu skupinu ispitanika.
2. Serumske koncentracije katestatina bile su statistički značajno niže u pretilih ispitanika s MS-om u odnosu na pretile ispitanike bez MS-a i kontrolnu skupinu ispitanika.
3. Utvrđena je statistički značajna negativna korelacija između serumskih koncentracija katestatina i procjene inzulinske rezistencije HOMA-IR.
4. Utvrđena je statistički značajna negativna korelacija između serumskih koncentracija katestatina i biljega upale niskoga stupnja hsCRP.
5. Serumske koncentracije katestatina bile su statistički značajno niže u ispitanika s povišenim SBP, DBP i pozitivnom obiteljskom anamnezom na povišeni krvni tlak.
6. Utvrđena je statistički značajna negativna korelacija između serumskih koncentracija katestatina i DBP.
7. Serumske koncentracije 25(OH)D bile su statistički značajno niže u pretilih ispitanika s MS-om u odnosu na pretile ispitanike bez MS-a i kontrolnu skupinu ispitanika.
8. Prevalencija manjkave koncentracije 25(OH)D u pretilih ispitanika iznosila je 8,6%.
9. Utvrđena je statistički značajna negativna korelacija između serumskih koncentracija 25(OH)D i procjene inzulinske rezistencije HOMA-IR.
10. Nije pronađena statistički značajna korelacija između serumskih koncentracija 25(OH)D i biljega upale niskoga stupnja hsCRP.
11. Utvrđena je statistički značajna negativna korelacija između serumskih koncentracija 25(OH)D i triglicerida.

Pretilost u ranoj životnoj dobi utječe na pojavnost ranih kardiovaskularnih komplikacija MS-a i ŠBT2. Danas je poznato da IR i upala niskog stupnja imaju jednu od glavnih uloga u nastanku ranih kardiovaskularnih komplikacija, ali i dalje postoji potreba za novim molekularnim biljezima koji bi pomogli u ranom prepoznavanju napredovanja metaboličkog poremećaja, kao i u prognozi nastanka kardiovaskularnih komplikacija. Stoga je od iznimne važnosti dodatno istraživati i razjasniti metaboličke i kardiovaskularne komplikacije te razvoj MS-a u pretile djece i adolescenata.

Znanstveni doprinos ovoga istraživanja temelji se na novoj spoznaji o povezanosti razine katestatina i čimbenika kardiovaskularnih komplikacija. Ovaj novootkriveni peptid je

posljednjih godina prepoznat kao mogući važan čimbenik u nastanku i progresiji pretilosti i MS-a, a do sada nije istražen u pretiloj pedijatrijskoj populaciji. Na temelju naših spoznaja, katestatin je nova poveznica u složenom patofiziološkom mehanizmu MS-a u pretilo djece i adolescenata te predstavlja prediktor IR-e i upale niskog stupnja. Potvrda snižene koncentracije 25(OH)D u pretilosti i MS-u podupire dosadašnja saznanja o mogućoj ulozi 25(OH)D u razvoju kardiovaskularnih komplikacija u toj kroničnoj bolesti. Dodatno, ovo istraživanje nudi integrativni pristup pretiloj djeci i adolescentima te bi trebalo upotpuniti saznanja o ranim kardiovaskularnim komplikacijama u toj populaciji.

Zaključno, potrebna su dodatna istraživanja kako bi se u potpunosti razjasnili učinci katestatina na nastanak i progresiju MS-a u populaciji pretilo djece i adolescenata te kako bi se utvrdio točan klinički značaj katestatina u ranom otkrivanju ranih kardiovaskularnih rizičnih čimbenika i njihovog dugoročnog praćenja.

## **7. SAŽETAK**

Pretilost u ranoj životnoj dobi je jedan od vodećih javno zdravstvenih problema u svijetu. Poznato je da pretilost u ranoj životnoj dobi većinom perzistira u odrasloj dobi, a što je važan čimbenik razvoja kardiovaskularnih komplikacija i metaboličkog sindroma (MS). Zbog svega navedenoga postoji stalna potreba za pronalaskom novih molekularnih biljega koji bi dodatno pomogli u praćenju napredovanja metaboličkog poremećaja. Katestatin je peptid koji proteolitičkim cijepanjem nastaje iz kromogranina A te ima široki spektar biološke aktivnosti, poput inhibicije otpuštanja katekolamina, smanjenja krvnog tlaka, poticanja oslobađanja histamina, smanjenja beta-adrenergičke stimulacije i regulacije oksidativnog stresa. Do sada je objavljeno nekoliko studija na odrasloj populaciji, a koje su pokazale da je katestatin značajan rizični faktor za hipertenziju, a koliko nam je poznato, ovo je prvo izvješće o serumskim koncentracijama katestatina u pretile djece i adolescenata. Također, manjkavost vitamina D povezana je s nizom različitih kronični bolesti uključujući pretilost. Uloga vitamina D u pretilosti nije u potpunosti razjašnjena, a potencijalni učinci uključuju regulaciju upalnog odgovora, ekspresiju gena koji reguliraju adipogenezu i adipocitnu apoptozu te utjecaj na lučenje leptina i adiponektina i regulaciju intenziteta metabolizma.

Cilj ovoga istraživanja je bio usporediti serumske koncentracije katestatina i 25-hidroksi vitamin D (25(OH)D) s odrednicama MS-a i ostalim kardiovaskularnim rizičnim čimbenicima između pretelih ispitanika i odgovarajuće kontrolne skupine ispitanika.

U studiju je uključeno 91 pretilo dijete i adolescent s ITM z vrijednosti  $>2$  i kao kontrolna skupina 39 zdrave djece (ITM z vrijednosti  $<1$ ) koji su usklađeni prema dobi i spolu ispitanika. Svim ispitanicima napravljena su antropometrijska mjerenja, klinički pregled i laboratorijske analiza (katestatin, 25(OH)D i druge laboratorijske vrijednosti) te su pretili ispitanici podvrgnuti oralnom testu opterećenja glukozom (OGTT).

Statistički značajno niže koncentracije katestatina u serumu zabilježene su u skupini pretelih ispitanika u usporedbi s kontrolnom skupinom ( $10,03 \pm 5,05$  vs.  $13,13 \pm 6,25$  ng/mL,  $P=0,004$ ). Daljnjim analizama utvrđena je statistički značajno niža koncentracije katestatina u podskupini pretelih ispitanika s MS-om ( $9,02 \pm 4,3$  vs.  $10,54 \pm 5,36$  vs.  $13,13 \pm 6,25$ ,  $P = 0,008$ ). Serumske koncentracije katestatina su značajno negativno korelirale s dijastoličkim krvnim tlakom ( $r = -0,255$ ,  $P = 0,014$ ), homeostatskim modelom procjene inzulinske rezistencije (HOMA-IR) ( $r = -0,215$ ,  $P = 0,037$ ) i visoko osjetljivim C reaktivnim proteinom

(hsCRP) ( $r=-0,208$ ),  $P=0,044$ ). Dodatno, skupina pretilih ispitanika s MS-om imala je značajno niže serumske koncentracije 25(OH)D u usporedbi sa skupinom pretilih ispitanika bez MS-a i kontrolnom skupinom ( $46,99 \pm 17,11$  vs.  $54,58 \pm 17,93$  vs.  $64,09 \pm 25,82$  nmol/L,  $P=0,003$ ). HOMA-IR je značajno i negativno korelirala sa serumskim koncentracijama 25(OH)D ( $r=-0,196$ ,  $P=0,026$ ).

Zaključno, naša studija je demonstrirala da su serumske koncentracije katestatina i 25(OH)D bile značajno niže u pretilih ispitanika s MS-om, u usporedbi s pretilim ispitanicima bez MS-a i kontrolnom skupinom. Serumske koncentracije katestatina su pokazale značajnu korelaciju s HOMA-IR i hsCRP, a dok su serumske koncentracije 25(OH)D pokazale značajnu korelaciju s HOMA-IR.



## **8. SUMMARY**

Childhood obesity is one of the leading public health problems in the world and it is well known that early childhood obesity persists most into adulthood, an important factor in the development of cardiovascular complications and metabolic syndrome (MS). There is a constant need for new molecular biomarkers that will help clinicians decipher the progression of the metabolic disorder. Catestatin is a peptide by proteolytic cleavage derived from chromogranin A and has a wide range of biological activities, such as inhibition of catecholamine release, reduction of blood pressure, stimulation of histamine release, reduction of beta-adrenergic stimulation and regulation of oxidative stress. So far, several studies have been published in the adult population that have shown that catestatin is a significant risk factor for hypertension, and to our knowledge, this is the first report of serum catestatin levels in obese children and adolescents. Also, vitamin D deficiency is associated with a number of different chronic diseases including obesity. The role of vitamin D in obese individuals has not been fully elucidated, but it is considered possible to regulate the inflammatory response, the expression of genes that regulate adipogenesis and adipocyte apoptosis and also affect leptin and adiponectin secretion and regulate energy metabolism.

The aim of this study was to compare serum levels of catestatin and 25-hydroxy vitamin D (25 (OH) D) with components of MS and other cardiovascular risk factors among obese subjects, with control group.

The study included 91 obese children and adolescents with BMI z score >2 and control group of 39 healthy children and adolescents (BMI z score <1), matched by age and gender of the subjects. Anthropometric measurements, clinical examination and laboratory analysis (catestatin, 25(OH)D and other laboratory parameters) were made and all obese subjects were subjected to an oral glucose tolerance test (OGTT).

Significantly lower serum catestatin concentrations were recorded in the group of obese subjects compared with a control group ( $10.03 \pm 5.05$  vs.  $13.13 \pm 6.25$  ng/mL,  $P = 0.004$ ). Further analyses revealed significantly lower catestatin concentrations in the subgroup of obese patients with MS ( $9.02 \pm 4.3$  vs.  $10.54 \pm 5.36$  vs.  $13.13 \pm 6.25$ ,  $P = 0.008$ ). Serum catestatin concentrations were significantly negatively correlated with homeostatic model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) ( $r = -0.215$ ,  $P = 0.037$ ) and high sensitivity C-reactive protein (hsCRP) ( $r = -0.208$ ,  $P = 0.044$ ). Additionally, group of obese patients with MS had significantly lower levels of serum 25(OH)D when compared to the group of obese

patients without MS and the control group ( $46.99 \pm 17.11$  vs.  $54.58 \pm 17.93$  vs.  $64.09 \pm 25.82$  nmol/L,  $P=0.003$ ). HOMA-IR was in negative correlation with serum concentrations of 25(OH)D ( $r=-0,196$ ,  $P=0,026$ ).

In conclusion, our study demonstrated that serum concentrations of catestatin and 25(OH)D were significantly lower in obese subjects with MS, compared with obese subjects without MS and health controls. Serum concentrations of catestatin showed a significant correlation with HOMA-IR and hsCRP, while serum concentrations of 25(OH)D showed a significant correlation with HOMA-IR.

## **9. POPIS LITERATURA**

1. Weiss R, Bremer AA, Lustig RH. What is metabolic syndrome, and why are children getting it? *Ann N Y Acad Sci.* 2013;1281:123–40.
2. Šimunović M, Božić J, Milić L, Unić I, Škrabić V. The Prevalence of Metabolic Syndrome and Cardiovascular Risk Factors in Obese Children and Adolescents in Dalmatia: A Hospital Based Study. *Int J Endocrinol.* 2016;2016:1823561.
3. Aggarwal B, Jain V. Obesity in Children: Definition, Etiology and Approach. *Indian J Pediatr.* 2018;85:463–71.
4. Mărginean CO, Mărginean C, Meliț LE. New Insights Regarding Genetic Aspects of Childhood Obesity: A Minireview. *Front Pediatr.* 2018;6:271.
5. Herrera BM, Keildson S, Lindgren CM. Genetics and epigenetics of obesity. *Maturitas.* 2011;69:41–9.
6. Wijnhoven TM, van Raaij JM, Spinelli A, Starc G, Hassapidou M, Spiroski I, i sur. WHO European Childhood Obesity Surveillance Initiative: body mass index and level of overweight among 6-9-year-old children from school year 2007/2008 to school year 2009/2010. *BMC Public Health.* 2014;14:806.
7. Ogden CL, Fryar CD, Hales CM, Carroll MD, Aoki Y, Freedman DS. Differences in Obesity Prevalence by Demographics and Urbanization in US Children and Adolescents, 2013-2016. *JAMA.* 2018;319:2410–8.
8. HZJZ. Hrvatski zdravstveno-statistički ljetopis za 2016. Zagreb: Hrvatski zavod za javno zdrastvo; 2016.
9. HZJZ. Hrvatski zdravstveno-statistički ljetopis za 2014. Zagreb: Hrvatski zavod za javno zdrastvo; 2014.
10. Bralić I, Tahirović H, Matanić D. Growth and obesity in 7-year-old Croatian children: Secular changes from 1991 to 2008. *Eur J Pediatr.* 2011;170:1521–7.
11. Mellerio H, Alberti C, Druet C, Capelier F, Mercat I, Josserand E, i sur. Novel Modeling of Reference Values of Cardiovascular Risk Factors in Children Aged 7 to 20 Years. *Pediatrics.* 2012;129:e1020–9.

12. Franks PW, Hanson RL, Knowler WC, Sievers ML, Bennett PH, Looker HC. Childhood obesity, other cardiovascular risk factors, and premature death. *N Engl J Med*. 2010;362:485–93.
13. Freedman DS, Sherry B. The validity of BMI as an indicator of body fatness and risk among children. *Pediatrics*. 2009;124:S23-34.
14. de Onis M, Onyango AW, Borghi E, Siyam A, Nishida C, Siekmann J. Development of a WHO growth reference for school-aged children and adolescents. *Bull World Heal Organ*. 2007;85:660–7.
15. Lydakis C, Stefanaki E, Stefanaki S, Thalassinos E, Kavousanaki M, Lydaki D. Correlation of blood pressure, obesity, and adherence to the Mediterranean diet with indices of arterial stiffness in children. *Eur J Pediatr*. 2012;171:1373–82.
16. Eloi JC, Epifanio M, de Gonçalves MM, Pellicoli A, Vieira PF, Dias HB, i sur. Quantification of Abdominal Fat in Obese and Healthy Adolescents Using 3 Tesla Magnetic Resonance Imaging and Free Software for Image Analysis. *PLoS One*. 2017;12:e0167625.
17. Kumar S, Kelly AS. Review of Childhood Obesity: From Epidemiology, Etiology, and Comorbidities to Clinical Assessment and Treatment. *Mayo Clin Proc*. 2017;92:251–65.
18. Vukovic R, Zdravkovic D, Mitrovic K, Milenkovic T, Todorovic S, Vukovic A, i sur. Metabolic syndrome in obese children and adolescents in Serbia: prevalence and risk factors. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2015;28:903–9.
19. Zhang H, Zhang T, Li S, Li Y, Hussain A, Fernandez C, i sur. Long-Term Impact of Childhood Adiposity on Adult Metabolic Syndrome Is Modified by Insulin Resistance: The Bogalusa Heart Study. *Sci Rep*. 2015;5:17885.
20. Reaven GM. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes*. 1988;37:1595–607.
21. Alberti KG, Zimmet P. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus

- provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med.* 1998;15:539–53.
22. Expert Panel on Detection Evaluation and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA.* 2001;285:2486–97.
  23. Alberti KG, Zimmet P, Shaw J. Metabolic syndrome--a new world-wide definition. A Consensus Statement from the International Diabetes Federation. *Diabet Med.* 2006;23:469–80.
  24. Ford ES, Li C. Defining the metabolic syndrome in children and adolescents: will the real definition please stand up? *J Pediatr.* 2008;152:160–4.
  25. Friend A, Craig L, Turner S. The prevalence of metabolic syndrome in children: a systematic review of the literature. *Metab Syndr Relat Disord.* 2013;11:71–80.
  26. Zimmet P, Alberti KG, Kaufman F, Tajima N, Silink M, Arslanian S, et al. The metabolic syndrome in children and adolescents - an IDF consensus report. *Pediatr Diabetes.* 2007;8:299–306.
  27. Lafortuna CL, Adorni F, Agosti F, De Col A, Sievert K, Siegfried W, et al. Prevalence of the metabolic syndrome among extremely obese adolescents in Italy and Germany. *Diabetes Res Clin Pract.* 2010;88:14–21.
  28. Braga-Tavares H, Fonseca H. Prevalence of metabolic syndrome in a Portuguese obese adolescent population according to three different definitions. *Eur J Pediatr.* 2010;169:935–40.
  29. Papoutsakis C, Yannakoulia M, Ntalla I, Dedoussis GV. Metabolic syndrome in a Mediterranean pediatric cohort: Prevalence using International Diabetes Federation-derived criteria and associations with adiponectin and leptin. *Metabolism.* 2012;61:140–5.
  30. Samson SL, Garber AJ. Metabolic Syndrome. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2014;43:1–23.

31. Magge SN, Goodman E, Armstrong SC, COMMITTEE ON NUTRITION; SECTION ON ENDOCRINOLOGY; SECTION ON OBESITY. The Metabolic Syndrome in Children and Adolescents: Shifting the Focus to Cardiometabolic Risk Factor Clustering. *Pediatrics*. 2017;140:e20171603.
32. Brown MS, Goldstein JL. Selective versus total insulin resistance: a pathogenic paradox. *Cell Metab*. 2008;7:95–6.
33. Heilbronn LK, Campbell LV. Adipose tissue macrophages, low grade inflammation and insulin resistance in human obesity. *Curr Pharm Des*. 2008;14:1225–30.
34. Schwartz B, Jacobs DR, Morgan A, Sreinberger J, Hong CP, Sinaiko AR. Measurement of insulin sensitivity in children: comparison between the euglycemic-hyperinsulinemic clamp and surrogate measures. *Diabetes Care*. 2008;31:783–8.
35. van der Aa MP, Knibbe CA, Boer A, van der Vorst MM. Definition of insulin resistance affects prevalence rate in pediatric patients: a systematic review and call for consensus. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2017;30:123–31.
36. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*. 1985;28:412–9.
37. Matsuda M, DeFronzo RA. Insulin sensitivity indices obtained from oral glucose tolerance testing: comparison with the euglycemic insulin clamp. *Diabetes Care*. 1999;22:1462–70.
38. Bervoets L, Mewis A, Massa G. The shape of the plasma glucose curve during an oral glucose tolerance test as an indicator of beta cell function and insulin sensitivity in end-pubertal obese girls. *Horm Metab Res*. 2015;47:445–51.
39. Nolfi G, Spreghini MR, Sforza RW, Morino G, Manco M. Beyond the morphology of the glucose curve following an oral glucose tolerance test in obese youth. *Eur J Endocrinol*. 2012;166:107–14.
40. Yosipovitch G, DeVore A, Dawn A. Obesity and the skin: skin physiology and skin manifestations of obesity. *J Am Acad Dermatol*. 2007;56:901–16.



41. Weiss R, Dziura J, Burgert TS, Tamborlane W V, Taksali SE, Yeckel CW, i sur. Obesity and the metabolic syndrome in children and adolescents. *N Engl J Med*. 2004;350:2362–74.
42. Gøbel RJ, Jensen SM, Frøkiaer H, Mølgaard C, Michaelsen KF. Obesity, inflammation and metabolic syndrome in Danish adolescents. *Acta Paediatr*. 2012;101:192–200.
43. Kowalska I, Strackowski M, Nikolajuk A, Adamska A, Karczewska-Kupczewska M, Otziomek E, i sur. Insulin resistance, serum adiponectin, and proinflammatory markers in young subjects with the metabolic syndrome. *Metabolism*. 2008;57:1539–44.
44. Ridker PM, Hennekens CH, Buring JE, Rifai N. C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women. *N Engl J Med*. 2000;342:836–43.
45. Pradhan AD, Manson JE, Rifai N, Buring JE, Ridker PM. C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus. *JAMA*. 2001;286:327–34.
46. Bandyopadhyay GK, Mahata SK. Chromogranin A regulation of obesity and peripheral insulin sensitivity. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2017;8:20.
47. Mahata SK, Kiranmayi M, Mahapatra NR. Catestatin A Master Regulator of Cardiovascular Functions. *Curr Med Chem*. 2018;25:1352–74.
48. Mouland AJ, Bevan S, White JH, Hendy GN. Human chromogranin A gene. Molecular cloning, structural analysis, and neuroendocrine cell-specific expression. *J Biol Chem*. 1994;269:6918–26.
49. Muntjewerff EM, Dunkel G, Nicolassen MJT, Mahata SK, van den Bogaart G. Catestatin as a Target for Treatment of Inflammatory Diseases. *Front Immunol*. 2018;9:2199.
50. Pike SE, Yao L, Jones KD, Cherney B, Appella E, Sakaguchi K, i sur. Vasostatin, a Calreticulin Fragment, Inhibits Angiogenesis and Suppresses Tumor Growth. *J Exp*

Med. 1998;188:2349–56.

51. Tota B, Mazza R, Angelone T, Nullans G, Metz-Boutigue MH, Aunis D, i sur. Peptides from the N-terminal domain of chromogranin A (vasostatins) exert negative inotropic effects in the isolated frog heart. *Regul Pept.* 2003;114:123–30.
52. Aardal S, Helle KB, Elsayed S, Reed RK, Serck-Hanssen G. Vasostatins, comprising the N-terminal domain of chromogranin A, suppress tension in isolated human blood vessel segments. *J Neuroendocr.* 1993;5:405–12.
53. Corti A, Mannarino C, Mazza R, Angelone T, Longhi R, Tota B. Chromogranin A N-terminal fragments vasostatin-1 and the synthetic CGA 7-57 peptide act as cardiostatins on the isolated working frog heart. *Gen Comp Endocrinol.* 2004;136:217–24.
54. Eissa N, Hussein H, Kermarrec L, Elgazzar O, Metz-Boutigue MH, Bernstein CN, i sur. Chromofungin (CHR: CHGA 47-66 ) is downregulated in persons with active ulcerative colitis and suppresses pro-inflammatory macrophage function through the inhibition of NF- $\kappa$ B signaling. *Biochem Pharmacol.* 2017;145:102–13.
55. Eissa N, Hussein H, Kermarrec L, Grover J, Metz-Boutigue MH, Bernstein CN, i sur. Chromofungin ameliorates the progression of colitis by regulating alternatively activated macrophages. *Front Immunol.* 2017;8:1131.
56. Gottlieb PA, DeLong T, Baker RL, Fitzgerald-Miller L, Wagner R, Cook G, i sur. Chromogranin A is a T cell antigen in human type 1 diabetes. *J Autoimmun.* 2014;50:38–41.
57. Stadinski BD, DeLong T, Reisdorph N, Reisdorph R, Powell RL, Armstrong M, i sur. Chromogranin A is an autoantigen in type 1 diabetes. *Nat Immunol.* 2010;11:225–31.
58. DeLong T, Baker RL, He J, Barbour G, Bradley B, Haskins K. Diabetogenic T-cell clones recognize an altered peptide of chromogranin A. *Diabetes.* 2012;61:3239–46.
59. Tatemoto K, Efendić S, Mutt V, Makk G, Feistner GJ, Barchas JD. Pancreastatin, a novel pancreatic peptide that inhibits insulin secretion. *Nature.* 1986;324:476–8.
60. Bandyopadhyay GK, Lu M, Avolio E, Siddiqui JA, Gayen JR, Wollam J, i sur.

- Pancreastatin-dependent inflammatory signaling mediates obesity-induced insulin resistance. *Diabetes*. 2015;64:104–16.
61. Corti A, Marcucci F, Bachetti T. Circulating chromogranin A and its fragments as diagnostic and prognostic disease markers. *Pflugers Arch*. 2018;470:199–210.
  62. Tota B, Gentile S, Pasqua T, Bassino E, Koshimizu H, Cawley NX, i sur. The novel chromogranin A-derived serpinin and pyroglutaminated serpinin peptides are positive cardiac  $\beta$ -adrenergic-like inotropes. *FASEB J*. 2012;26:2888–98.
  63. Mahata SK, O'Connor DT, Mahata M, Yoo SH, Taupenot L, Wu H, i sur. Novel autocrine feedback control of catecholamine release: A discrete chromogranin A fragment is a noncompetitive nicotinic cholinergic antagonist. *J Clin Invest*. 1997;100:1623–33.
  64. Bandyopadhyay GK, Vu CU, Gentile S, Lee H, Biswas N, Chi NW, i sur. Catestatin (Chromogranin A352-372) and novel effects on mobilization of fat from adipose tissue through regulation of adrenergic and leptin signaling. *J Biol Chem*. 2012;287:23141–51.
  65. Arner P. Human fat cell lipolysis: biochemistry, regulation and clinical role. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2005;19:471–82.
  66. Bougnères P, Stunff CL, Pecqueur C, Pinglier E, Adnot P, Ricquier D. In vivo resistance of lipolysis to epinephrine. A new feature of childhood onset obesity. *J Clin Invest*. 1997;99:2568–73.
  67. Stallknecht B, Bülow J, Frandsen E, Galbo H. Desensitization of human adipose tissue to adrenaline stimulation studied by microdialysis. *J Physiol*. 1997;500:271–82.
  68. Jensen MD. Lipolysis: contribution from regional fat. *Annu Rev Nutr*. 1997;17:127–39.
  69. Dominguez Rieg JA, Chirasani VR, Koepsell H, Senapati S, Mahata SK, Rieg T. Regulation of intestinal SGLT1 by catestatin in hyperleptinemic type 2 diabetic mice. *Lab Invest*. 2016;96:98–111.

70. Mele M, Avolio E, Alò R, Fazzari G, Mahatac SK, Canonaco M. Catestatin and orexin-A neuronal signals alter feeding habits in relation to hibernating states. *Neuroscience*. 2014;269:331–42.
71. Durakoğlugil ME, Ayaz T, Kocaman SA, Kırbaş A, Durakoğlugil T, Erdoğan T, i sur. The relationship of plasma catestatin concentrations with metabolic and vascular parameters in untreated hypertensive patients: Influence on high-density lipoprotein cholesterol. *Anatol J Cardiol*. 2015;15:577–85.
72. Borovac JA, Dogas Z, Supe-Domic D, Galic T, Bozic J. Catestatin serum levels are increased in male patients with obstructive sleep apnea. *Sleep Breath*. 2018;23:473–81.
73. Ying W, Mahata S, Bandyopadhyay GK, Zhou Z, Wollam J, Vu J, i sur. Catestatin Inhibits Obesity-Induced Macrophage Infiltration and Inflammation in the Liver and Suppresses Hepatic Glucose Production, Leading to Improved Insulin Sensitivity. *Diabetes*. 2018;67:841–8.
74. Aung G, Niyonsaba F, Ushio H, Kajiwara N, Saito H, Ikeda S, i sur. Catestatin, a neuroendocrine antimicrobial peptide, induces human mast cell migration, degranulation and production of cytokines and chemokines. *Immunology*. 2011;132:527–39.
75. Rabbi MF, Labis B, Metz-Boutigue MH, Bernstein CN, Ghia JE. Catestatin decreases macrophage function in two mouse models of experimental colitis. *Biochem Pharmacol*. 2014;89:386–98.
76. Zhang D, Shooshtarizadeh P, Laventie BJ, Colin DA, Chich JF, Vidic J, i sur. Two chromogranin a-derived peptides induce calcium entry in human neutrophils by calmodulin-regulated calcium independent phospholipase A2. *PLoS One*. 2009;4:e4501.
77. Briolat J, Wu SD, Mahata SK, Gonthier B, Bagnard D, Chasserot-Golaz S, i sur. New antimicrobial activity for the catecholamine release-inhibitory peptide from chromogranin A. *Cell Mol Life Sci*. 2005;62:377–85.
78. Deng Z, Xu C. Role of the neuroendocrine antimicrobial peptide catestatin in innate

- immunity and pain. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2017;49:967–72.
79. Kojima M, Ozawa N, Mori Y, Takahashi Y, Watanabe-Kominato K, Shirai R, i sur. Catestatin Prevents Macrophage-Driven Atherosclerosis but Not Arterial Injury-Induced Neointimal Hyperplasia. *Thromb Haemost*. 2018;118:182–94.
  80. Rabbi MF, Eissa N, Munyaka PM, Kermarrec L, Elgazzar O, Khafipour E, i sur. Reactivation of intestinal inflammation is suppressed by catestatin in a murine model of colitis via M1 macrophages and not the gut microbiota. *Front Immunol*. 2017;8:985.
  81. Mahapatra NR, O'Connor DT, Vaingankar SM, Hikim AP, Mahata M, Ray S, i sur. Hypertension from targeted ablation of chromogranin A can be rescued by the human ortholog. *J Clin Invest*. 2005;115:1942–52.
  82. Gayen JR, Gu Y, O'Connor DT, Mahata SK. Global disturbances in autonomic function yield cardiovascular instability and hypertension in the chromogranin A null mouse. *Endocrinology*. 2009;150:5027–35.
  83. Kiranmayi M, Chirasani VR, Allu PK, Subramanian L, Martelli EE, Sahu BS, i sur. Catestatin Gly364Ser Variant Alters Systemic Blood Pressure and the Risk for Hypertension in Human Populations via Endothelial Nitric Oxide Pathway. *Hypertension*. 2016;68:334–47.
  84. Kennedy BP, Mahata SK, O'Connor DT, Ziegler MG. Mechanism of cardiovascular actions of the chromogranin A fragment catestatin in vivo. *Peptides*. 1998;19:1241–8.
  85. Mahata SK, Mahata M, Fung M, O'Connor DT. Catestatin: A multifunctional peptide from chromogranin A. *Regul Pept*. 2010;162:33–43.
  86. Angelone T, Quintieri AM, Pasqua T, Filice E, Cantafio P, Scavello F, i sur. The NO stimulator, Catestatin, improves the Frank-Starling response in normotensive and hypertensive rat hearts. *Nitric Oxide*. 2015;50:10–9.
  87. Angelone T, Quintieri AM, Pasqua T, Gentile S, Tota B, Mahata SK, i sur. Phosphodiesterase type-2 and NO-dependent S-nitrosylation mediate the

- cardioinhibition of the antihypertensive catestatin. *Am J Physiol Circ Physiol*. 2012;302:H431–42.
88. O'Connor DT, Kailasam MT, Kennedy BP, Ziegler MG, Yanaihara N, Parmer RJ. Early decline in the catecholamine release-inhibitory peptide catestatin in humans at genetic risk of hypertension. *J Hypertens*. 2002;20:1335–45.
  89. Meng L, Ye XJ, Ding WH, Yang Y, Di BB, Liu L, et al. Plasma catecholamine release-inhibitory peptide catestatin in patients with essential hypertension. *J Cardiovasc Med*. 2011;12:643–7.
  90. Schillaci G, De Vuono S, Pucci G. An endogenous brake on the sympathetic nervous system: The emerging role of catestatin in hypertension. *J Cardiovasc Med*. 2011;12:609–12.
  91. O'Connor DT, Zhu G, Rao F, Taupenot L, Fung MM, Das M, et al. Heritability and genome-wide linkage in US and Australian twins identify novel genomic regions controlling chromogranin A: implications for secretion and blood pressure. *Circulation*. 2008;118:247–57.
  92. Antonucci R, Locci C, Clemente MG, Chicconi E, Antonucci L. Vitamin D deficiency in childhood: Old lessons and current challenges. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2018;31:247–60.
  93. Censani M, Hammad HT, Christos PJ, Schumaker T. Vitamin D Deficiency Associated With Markers of Cardiovascular Disease in Children With Obesity. *Glob Pediatr Heal*. 2018;5:2333794X17751773.
  94. Zittermann A, Gummert JF. Nonclassical vitamin D action. *Nutrients*. 2010;2:408–25.
  95. Marquina C, Mousa A, Scragg R, de Courten B. Vitamin D and cardiometabolic disorders: a review of current evidence, genetic determinants and pathomechanisms. *Obes Rev*. 2019;20:262–77.
  96. Norman AW. From vitamin D to hormone D: Fundamentals of vitamin D endocrine system essential for good health. *Am J Clin Nutr*. 2008;88:491S-499S.

97. Codoñer-Franch P, Tavárez-Alonso S, Simó-Jordá R, Laporta-Martín P, Carratalá-Calvo A, Alonso-Iglesias E. Vitamin D status is linked to biomarkers of oxidative stress, inflammation, and endothelial activation in obese children. *J Pediatr.* 2012;161:848–54.
98. Miraglia del Giudice E, Grandone A, Cirillo G, Capristo C, Marzuillo P, Di Sessa A, i sur. Bioavailable Vitamin D in Obese Children: The Role of Insulin Resistance. *J Clin Endocrinol Metab.* 2015;100:3949–55.
99. Fraser DR. Vitamin D. *Lancet.* 1995;345:104–7.
100. Munns CF, Shaw N, Kiely M, Specker BL, Thacher TD, Ozono K, i sur. Global Consensus Recommendations on Prevention and Management of Nutritional Rickets. *J Clin Endocrinol Metab.* 2016;101:394–415.
101. Manson JE, Cook NR, Lee IM, Christen W, Bassuk SS, Mora S, i sur. Vitamin D Supplements and Prevention of Cancer and Cardiovascular Disease. *N Engl J Med.* 2019;380:33–44.
102. Frelut ML, Girardet JP, Bocquet A, Briend A, Chouraqui JP, Darmaun D, i sur. Impact of obesity on biomarkers of iron and vitamin D status in children and adolescents: The risk of misinterpretation. *Arch Pediatr.* 2018;25:3–5.
103. Vidailhet M, Mallet E, Bocquet A, Bresson JL, Briend A, Chouraqui JP, i sur. Vitamin D: still a topical matter in children and adolescents. A position paper by the Committee on Nutrition of the French Society of Paediatrics. *Arch Pédiatrie.* 2012;19:316–28.
104. Plesner JL, Dahl M, Fonvig CE, Nielsen TRH, Kloppenborg JT, Pedersen O, i sur. Obesity is associated with vitamin D deficiency in Danish children and adolescents. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2018;31:53–61.
105. Turer CB, Lin H, Flores G. Prevalence of Vitamin D Deficiency Among Overweight and Obese US Children. *Pediatrics.* 2013;131:e152–61.
106. Reyman M, Verrijn Stuart AA, van Summeren M, Rakhshandehroo M, Nuboer R, de Boer FK, i sur. Vitamin D deficiency in childhood obesity is associated with high

- levels of circulating inflammatory mediators, and low insulin sensitivity. *Int J Obes.* 2014;38:46–52.
107. Rajakumar K, Fernstrom JD, Holick MF, Janosky JE, Greenspan SL. Vitamin D status and response to Vitamin D(3) in obese vs. non-obese African American children. *Obesity.* 2008;16:90–5.
  108. Moschonis G, Androustos O, Hulshof T, Dracopoulou M, Chrousos GP, Manios Y. Vitamin D insufficiency is associated with insulin resistance independently of obesity in primary schoolchildren. The healthy growth study. *Pediatr Diabetes.* 2018;19:866–73.
  109. Ekblom K, Marcus C. Vitamin D deficiency is associated with prediabetes in obese Swedish children. *Acta Paediatr.* 2016;105:1192–7.
  110. Challa AS, Makariou SE, Siomou EC. The relation of vitamin D status with metabolic syndrome in childhood and adolescence: an update. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2015;28:1235–45.
  111. Grunwald T, Fadia S, Bernstein B, Naliborski M, Wu S, Luca F. Vitamin D supplementation, the metabolic syndrome and oxidative stress in obese children. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2017;30:383–8.
  112. Ford E, Ajani U, McGuire L, Liu S. Concentrations of serum vitamin D and the metabolic syndrome among U.S. adults. *Diabetes Care.* 2005;28:1228–30.
  113. Zittermann A, Schleithoff SS, Koerfer R. Putting cardiovascular disease and vitamin D insufficiency into perspective. *Br J Nutr.* 2005;94:483–92.
  114. Zakharova I, Klimov L, Kuryaninova V, Nikitina I, Malyavskaya S, Dolbnya S, i sur. Vitamin D Insufficiency in Overweight and Obese Children and Adolescents. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2019;10:103.
  115. Maestro B, Dávila N, Carranza MC, Calle C. Identification of a Vitamin D response element in the human insulin receptor gene promoter. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2003;84:223–30.
  116. Zeitz U, Weber K, Soegiarto DW, Wolf E, Balling R, Erben RG. Impaired insulin



- secretory capacity in mice lacking a functional vitamin D receptor. *FASEB J*. 2003;17:509–11.
117. Wright DC, Hucker KA, Holloszy JO, Han DH. Ca<sup>2+</sup> and AMPK both mediate stimulation of glucose transport by muscle contractions. *Diabetes*. 2004;53:330–5.
  118. Kelishadi R, Farajzadegan Z, Bahreynian M. Association between vitamin D status and lipid profile in children and adolescents: A systematic review and meta-analysis. *Int J Food Sci Nutr*. 2014;65:404–10.
  119. Kelishadi R, Salek S, Salek M, Hashemipour M, Movahedian M. Effects of vitamin D supplementation on insulin resistance and cardiometabolic risk factors in children with metabolic syndrome: A triple-masked controlled trial. *J Pediatr (Rio J)*. 2014;90:28–34.
  120. WHO. *AnthroPlus for Personal Computers Manual: Software for Assessing Growth of the World's Children and Adolescents*. Geneva. 2009.
  121. National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Children and Adolescents. The fourth report on the diagnosis, evaluation, and treatment of high blood pressure in children and adolescents. *Pediatrics*. 2004;114:555–76.
  122. Lurbe E, Agabiti-Rosei E, Cruickshank JK, Dominiczak A, Erdine S, Hirth A, et al. 2016 European Society of Hypertension guidelines for the management of high blood pressure in children and adolescents. *J Hypertens*. 2016;34:1887–920.
  123. Tschritter O, Fritsche A, Shirkavand F, Machicao F, Häring H, Stumvoll M. Assessing the shape of the glucose curve during an oral glucose tolerance test. *Diabetes Care*. 2003;26:1026–33.
  124. Kim JY, Mandarino LJ, Coletta DK, Shaibi GQ. Glucose response curve and type 2 diabetes risk in latino adolescents. *Diabetes Care*. 2012;35:1925–30.
  125. Kim JY, Michaliszyn SF, Nasr A, Lee S, Tfayli H, Hannon T, et al. The shape of the glucose response curve during an oral glucose tolerance test heralds biomarkers of type 2 diabetes risk in obese youth. *Diabetes Care*. 2016;39:1431–9.

126. Marshall WA, Tanner JM. Variations in pattern of pubertal changes in girls. *Arch Dis Child.* 1969;44:291–303.
127. Marshall WA, Tanner JM. Variations in the pattern of pubertal changes in boys. *Arch Dis Child.* 1970;45:13–23.
128. National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Children and Adolescents. Update on the 1987 Task Force Report on High Blood Pressure in Children and Adolescents: A Working Group Report from the National High Blood Pressure Education Program. *Pediatrics.* 1996;98:649–58.
129. Gupta N, Goel K, Shah P, Misra A. Childhood obesity in developing countries: Epidemiology, determinants, and prevention. *Endocr Rev.* 2012;33:48–70.
130. Janssen I, Katzmarzyk P, Boyce W, Vereecken C, Mulvihill C, Roberts C, i sur. Comparison of overweight and obesity prevalence in school-aged youth from 34 countries and their relationships with physical activity and dietary patterns. *Obes Rev.* 2005;6:123–32.
131. Kolčić I, Relja A, Gelemanović A, Miljković A, Boban K, Hayward C, i sur. Mediterranean diet in the southern Croatia – does it still exist? *Croat Med J.* 2016;57:415–24.
132. Kamal NN, Ragy MM. The effects of exercise on C-reactive protein, insulin, leptin and some cardiometabolic risk factors in Egyptian children with or without metabolic syndrome. *Diabetol Metab Syndr.* 2012;4:27.
133. Rank M, Siegrist M, Wilks DC, Langhof H, Wolfarth B, Haller B, i sur. The cardio-metabolic risk of moderate and severe obesity in children and adolescents. *J Pediatr.* 2013;163:137–42.
134. Chiarelli F, Marcovecchio ML. Insulin resistance and obesity in childhood. *Eur J Endocrinol.* 2008;159:S67–74.
135. Kim J, Lee S, Bhattacharjee R, Khalyfa A, Kheirandish-Gozal L, Gozal D. Leukocyte telomere length and plasma catestatin and myeloid-related protein 8/14 concentrations in children with obstructive sleep apnea. *Chest.* 2010;138:91–9.

136. Wen G, Mahata SK, Cadman P, Mahata M, Ghosh S, Mahapatra NR, i sur. Both rare and common polymorphisms contribute functional variation at CHGA, a regulator of catecholamine physiology. *Am J Hum Genet.* 2004;74:197–207.
137. Sahu BS, Obbineni JM, Sahu G, Allu PK, Subramanian L, Sonawane PJ, i sur. Functional genetic variants of the catecholamine-release-inhibitory peptide catestatin in an Indian population: Allele-specific effects on metabolic traits. *J Biol Chem.* 2012;287:43840–52.
138. Benyamin B, Maihofer AX, Schork AJ, Hamilton BA, Rao F, Schmid-Schönbein GW, i sur. Identification of novel loci affecting circulating chromogranins and related peptides. *Hum Mol Genet.* 2017;26:233–42.
139. Bellone S, Esposito S, Giglione E, Genoni G, Fiorito C, Petri A, i sur. Vitamin D levels in a paediatric population of normal weight and obese subjects. *J Endocrinol Invest.* 2014;37:805–9.
140. Durá-Travé T, Gallinas-Victoriano F, Chueca-Guindulain MJ, Berrade-Zubiri S, Moreno-González P, Malumbres-Chacón M. Prevalence of hypovitaminosis D and associated factors in Spanish population of school children and adolescents. *Aten Primaria.* 2018;50:422–9.
141. Pacifico L, Anania C, Osborn JF, Ferraro F, Bonci E, Olivero E, i sur. Low 25(OH)D3 levels are associated with total adiposity, metabolic syndrome, and hypertension in Caucasian children and adolescents. *Eur J Endocrinol.* 2011;165:603–11.
142. Menendez C, Lage M, Peino R, Baldelli R, Concheiro P, Diéguez C, i sur. Retinoic acid and vitamin D(3) powerfully inhibit in vitro leptin secretion by human adipose tissue. *J Endocrinol.* 2001;170:425–31.
143. Haimi M, Kremer R. Vitamin D deficiency/insufficiency from childhood to adulthood: Insights from a sunny country. *World J Clin Pediatr.* 2017;6:1–9.
144. Wang L, Wang H, Wen H, Tao H, Zhao X. Relationship between HOMA-IR and serum Vitamin D in Chinese children and adolescents. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2016;29:777–81.

145. Adikaram SGS, Samaranayake DBDL, Atapattu N, Kendaragama KMDLD, Senevirathne JTN, Wickramasinghe VP. Prevalence of vitamin D deficiency and its association with metabolic derangements among children with obesity. *BMC Pediatr.* 2019;19:186.

## **10. ŽIVOTOPIS**

## **OPĆI PODACI:**

**Ime i prezime:** Marko Šimunović

**Datum rođenja:** 06.03.1989.

**Adresa stanovanja:** Šoltanska 26, 21000 Split

**Mobitel:** +385 99 336 4444

**E-mail:** markosimunovic@hotmail.com

## **OBRAZOVANJE:**

1996. – 2004. - Osnovna škola Pojišan u Splitu

2004. – 2007. - III. gimnazija u Splitu

2007. – 2013. - integrirani preddiplomski i diplomski sveučilišni studij Medicina, Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu

2014. - sveučilišni poslijediplomski doktorski studij Klinička medicina utemeljena na dokazima, Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu

2016. – 2017. - sveučilišni poslijediplomski specijalistički studiji iz Pedijatrije, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

## **ZAPOSLENJA I AKTIVNOSTI:**

2014. - liječnik opće medicine u ordinaciji obiteljske medicine, Vrgorac, Dom zdravlja Splitsko-dalmatinske županije

2014. - liječnik opće medicine u Ispostavama: Hvar, Jelsa i Komiža Zavoda za hitnu medicinu Splitsko-dalmatinske županije

2015. - liječnik na specijalizaciji iz pedijatrije za potrebe Klinike za dječje bolesti, Kliničkog bolničkog centra Split

### **NASTAVNA AKTIVNOST:**

2016. – 2018. - vanjski suradnik na Katedri za kliničke vještine, Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu

2018. - naslovni asistent na Katedri za kliničke vještine, Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu

### **ČLANSTVO U ORGANIZACIJAMA:**

2015. - član Hrvatskog pedijatrijskog društva

2018. - član Hrvatskog društvo za pedijatrijsku endokrinologiju i dijabetologiju

2018. - član Hrvatskog društva za endokrinologiju i dijabetologiju

2018. - član Europskog društva za pedijatrijsku endokrinologiju

2019. - član Europskog društva za endokrinologiju

### **POPIS PUBLIKACIJA:**

1. Šimunović M, Božić J, Milić L, Unić I, Škrabić V. The Prevalence of Metabolic Syndrome and Cardiovascular Risk Factors in Obese Children and Adolescents in Dalmatia: A Hospital Based Study. *Int J Endocrinol.* 2016;2016:1823561.
2. Čulić V, Miyake N, Janković S, Petrović D, Šimunović M, Đapić T, i sur. Distal arthrogyriposis with variable clinical expression caused by TNNI2 mutation. *Hum Genome Var* 2016;3:2–5.
3. Simunović M, Paradžik M, Skrabić R, Unić I, Bućan K, Skrabić V. Cataract as early ocular complication in children and adolescents with type 1 diabetes mellitus. *Int J Endocrinol* 2018;2018.
4. Nimri R, Dassau E, Segall T, Muller I, Bratina N, Kordonouri O, Bello R, Biester T, Dovc K, Tenenbaum A, Brener A, Šimunović M, i sur. Adjusting insulin doses in patients with type 1 diabetes who use insulin pump and continuous glucose monitoring: Variations among countries and physicians. *Diabetes, Obes Metab* 2018;20.

5. Simunovic M, Supe-Domic D, Karin Z, Degoricija M, Paradzik M, Bozic J, i sur. Serum catestatin concentrations are decreased in obese children and adolescents. *Pediatr Diabetes* 2019;20:549–55.