

SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET

Doria Gabrić

**UČESTALOST MANJKA VITAMINA D I POVEZANOST S HORMONSKIM
PARAMETRIMA U PACIJENTICA LIJEČENIH METODAMA
POTPOMOGNUTE OPLODNJE**

Diplomski rad

Akademska godina:

2017/2018

Mentor:

Doc. dr. sc. Jelena Marušić, dr. med.

Split, srpanj 2018.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET

Doria Gabrić

**UČESTALOST MANJKA VITAMINA D I POVEZANOST S HORMONSKIM
PARAMETRIMA U PACIJENTICA LIJEČENIH METODAMA
POTPOMOGNUTE OPLODNJE**

Diplomski rad

Akadska godina:

2017/2018

Mentor:

Doc. dr. sc. Jelena Marušić, dr. med.

Split, srpanj 2018.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Vitamin D	2
1.1.1. Fiziologija djelovanja vitamina D	2
1.1.2. Mjerenje koncentracije vitamina D u tijelu	5
1.1.3. Uloga vitamina D u pojedinim sustavima	5
1.1.4. Reproductivni sustav i utjecaj vitamina D	10
1.1.4.1. Fiziologija ženskog spolnog sustava	10
1.1.4.2. Utjecaj vitamina D u ženskom spolnom sustavu	13
1.1.4.2.1. Utjecaj vitamina D u sindrom policističnih jajnika	15
1.1.4.2.2. Utjecaj vitamina D u endometriozu	17
1.1.4.2.3. Utjecaj vitamina D kod mioma	18
1.1.4.2.4. Utjecaj vitamina D u prijevremenoj menopauzi	18
1.1.4.2.5. Utjecaj vitamina D u trudnoći	18
1.1.4.3. Utjecaj vitamina D u muškoj plodnosti	19
1.1.5. Epidemiologija hipovitaminoze D	20
1.1.6. Uzroci hipovitaminoze D	20
1.1.7. Vitamin D danas	22
1.2. Neplodnost	23
1.2.1. Definicija i klasifikacija	23
1.2.2. Epidemiologija	24
1.2.3. Uzroci	24
1.2.3.1. Zajednički uzroci neplodnosti	24
1.2.3.1.1. Dob i odgađanje rađanja	24
1.2.3.1.2. Poremećaji tjelesne težine	25
1.2.3.1.3. Pušenje duhana	26
1.2.3.1.4. Konzumacija alkohola	26
1.2.3.1.5. Onkološke bolesti	26

1.2.3.2.	Ženski uzroci neplodnosti.....	27
1.2.3.2.1.	Sindrom policističnih jajnika.....	27
1.2.3.2.2.	Endometrioza.....	29
1.2.3.2.3.	Adenomioza.....	32
1.2.3.2.4.	Tubarna neplodnost	32
1.2.3.2.5.	Prijevremeno ovarijsko zatajenje.....	34
1.2.3.3.	Muški uzroci neplodnosti	35
1.2.3.3.1.	Predtestikularna neplodnost.....	35
1.2.3.3.2.	Testikularna neplodnost.....	35
1.2.3.3.2.1.	Kriptorhizam.....	36
1.2.3.3.2.2.	Genetski poremećaji	36
1.2.3.3.2.3.	Varikokela	37
1.2.3.3.3.	Posttestikularna neplodnost.....	37
1.2.3.4.	Idiopatska neplodnost.....	38
3.	ISPITANICI I METODE	41
3.1.	Ispitanici	42
3.2.	Mjesto istraživanja	42
1.2.	Organizacija istraživanja	42
1.3.	Opis istraživanja	42
1.4.	Metode određivanja laboratorijskih parametara	43
1.5.	Statistička obrada podataka	43
4.	REZULTATI	44
5.	RASPRAVA	51
6.	ZAKLJUČCI	64
7.	POPIS CITIRANE LITERATURE	66
8.	SAŽETAK	80
9.	SUMMARY	82
10.	ŽIVOTOPIS	85

„The whole purpose of education is to turn mirror into windows.“

Sydney J. Harris

Hvala!

Od srca se zahvaljujem svojoj mentorici doc.dr.sc. Jeleni Marušić na susretljivosti, posvećenosti, brojnim akademskim i životnim savjetima te strpljivom i stručnom vođenju u izradi ovog diplomskog rada, kao i na poticanju moje radoznalosti i prihvaćanja izazova znanosti.

Zahvaljujem dr. med. Anti Mršiću, dr. sc. Danijeli Šupe Domić i doc. dr. sc. Martini Šunj za sve savjete i pomoć u prikupljanju podataka.

Hvala mami Vanji i sestri Steli za svu podršku i razumijevanje, sve sate brige i strepnje, sve osmjehе i utjehe. Za ljubav. Onu pravu, istinsku, bezuvjetnu, roditeljsku i sestrinsku ljubav.

Hvala ujki Nikici čija kritika je bila najveća motivacija, a ponosni osmjeh najveća nagrada.

Hvala svim prijateljima, posebno Ani Kelavi, Luciji Stojčić i Ivanu Kraljeviću na svim provedenim satima učenja, međusobnom razumijevanju i apsolutnoj potpori, kao i za sve naše dogodovštine koje ostaju kao neizbrisiv trag i vječna karika prijateljstva.

Hvala čovjeku koji danas nije s nama, a bio bi najponosniji da je tu. Čovjeku od malo riječi, ali puno ljubavi i djela. Čovjeku koji mi je bio kao otac i čije riječi uvijek ostaju sa mnom.

Čovjeku kojem posvećujem ovaj rad!

Mom didu Ivi.

1. UVOD

1.1. Vitamin D

Iako nosi naziv vitamina, vitamin D u svojoj osnovi to nije budući da ga naše tijelo može sintetizirati. To je vitamin topljiv u mastima, a njegovi najznačajniji učinci se ostvaruju u regulaciji kalcija i fosfata te održavanju homeostaze skeletnog sustava. 80-90% vitamina D dobivamo iz kolesterola u koži pod utjecajem sunčevih ultraljubičastih B (UVB) zraka, a preostalih 10-20% dobivamo iz hrane (1). Iz skupine vitamina D najvažnije su nam dvije njegove forme: D_2 (ergokalciferol) i D_3 (kolekalciferol). Vitamin D_2 se sintetizira u biljkama i gljivama iz ergosterola, dok se vitamin D_3 nalazi u hrani životinjskog porijekla (2-4). Brojna istraživanja posljednjih godina upozoravaju na epidemiju hipovitaminoze D u svijetu danas, a glavni rizični faktori takvog negativnog trenda se povezuju s načinom života: nedostatno izlaganje suncu, nošenje zaštitne odjeće, korištenje krema za sunčanje. Također i neki konstitucijski i okolišni čimbenici predstavljaju rizične faktore kao što su starija životna dob, ženski spol, pretilost, tamnija koža, zimsko doba te život na nižim geografskim širinama (3,4).

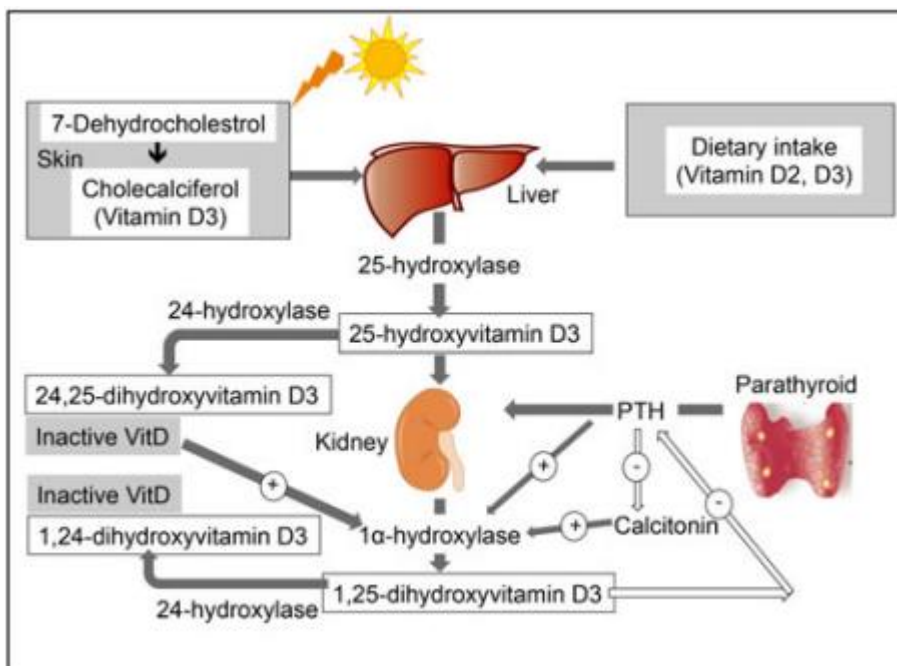
1.1.1. Fiziologija djelovanja vitamina D

Sinteza vitamina D započinje iz kolesterola u epidermisu kože. Nakon oksidacije kolesterola u 7-dehidrokolesterol (7-DHC), pod djelovanjem UVB zraka valne duljine 290 do 315 nm, dolazi do neenzimske, foto-posredovane reakcije i stvaranja previtamina D_3 i potom vitamina D_3 u stabilnom obliku (5,6). Preveliko izlaganje suncu dovodi do razgradnje previtamina D_3 i vitamina D_3 u inaktivne fotoprodukte (4). Da bi postao biološki aktivan, vitamin D koji je nastao u koži ili je unesen hranom, mora proći enzimske reakcije hidroksilacije u jetri i bubregu. Prva hidroksilacija se odvija na endoplazmatskom retikulumu u stanicama jetre i posredovana je enzimom 25-hidroksilaza (CYP2R1), a njen produkt je 25-hidroksivitamin D_3 ($25(OH)D_3$) (7-9). $25(OH)D_3$ se zatim otpušta u krvotok, dolazi u bubreg gdje se odvija druga hidroksilacija. Ona se odvija u mitohondrijima proksimalnog tubula i posredovana je enzimom 1α -hidroksilaza (CYP27B1). Produkt ove reakcije je aktivni oblik vitamina D $1,25$ -dihidroksivitamin D_3 ($1,25(OH)_2D_3$) (7-9). U tom obliku vitamin D može vršiti svoju hormonsku ulogu. Djelovanje 1α -hidroksilaze, kao posljednjeg enzima u kaskadi aktivacije vitamina D, kontrolirano je s tri hormona: paratiroidnim hormonom (PTH), faktorom stimulacije fibroblasta 23 (FGF23) i samim vitaminom D. Povišena koncentracija kalcija i fosfata u krvi indirektno djeluje na 1α -hidroksilazu inhibirajući njeno djelovanje putem PTH i FGF23 iako ovi ioni mogu imati i direktno djelovanje. PTH djeluje pozitivno na sintezu 1α -hidroksilaze. U stanjima hipokalcemije dolazi do povećanog lučenja PTH koji

zatim potiče transkripciju 1α -hidroksilaze (10). Dolazi do stvaranja $1,25(OH)_2D_3$ koji onda negativnom povratnom spregom koči stvaranje dodatnog PTH na razini transkripcije (11). $1,25(OH)_2D_3$ i FGF23 djeluju negativno na stvaranje 1α -hidroksilaze, kalcitriol putem negativne povratne sprege, a FGF23 putem poticanja izlučivanja fosfata i smanjenja njihove reapsorpcije u proksimalnom tubulu (12,13).

Kada u tijelu postoji dovoljna koncentracija vitamina D tada se u bubregu aktivira 24-hidroksilaza (CYP24A1) koji je odgovorna za inaktivaciju $1,25(OH)_2D_3$ i $25(OH)D_3$. Produkti te reakcije su $24,25(OH)_2D_3$ i $1,24,25(OH)_2D_3$ koji se dalje kataboliziraju i izlučuju (4,9). I djelovanje CYP24A1 također reguliraju isti hormoni kao i 1α -hidroksilazu. $1,25(OH)_2D_3$ i FGF23 je potiču, a PTH je inhibira (13).

Slika 1. Sinteza vitamina D



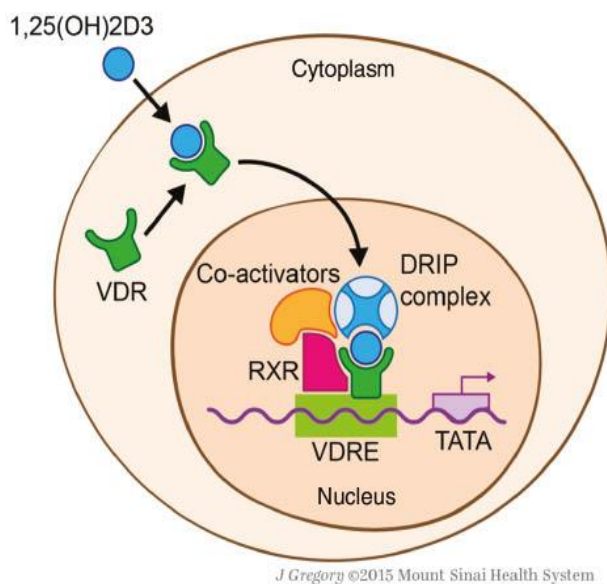
Preuzeto iz: Dastani Z, Li R, Richards B. Genetic regulation of vitamin D levels. *Calcif Tissue Int.* 2013 Feb;92(2):106-17.

Iako je i glavni izvor 1α -hidroksilaze bubreg, danas je poznato da ga stanice u drugim ciljnim tkivima kao što su epitelne stanice kože, pluća, dojke, crijeva, mnogih endokrinih žlijezda kao što su paratiroidna žlijezda, otočići gušterače, štitna žlijezda, testisi, jajnici, placenta, T i B limfociti, makrofagi, osteoblasti, hondrociti i razni tumori koji potiču iz ovih stanica mogu sami lokano sintetizirati vitamin D i uz takvo ekstrarenalno, autokrino i parakrino djelovanje utjecati na lokalnu ekspresiju gena (2).

Takvu mogućnost sinteze posjeduje i degradacijski enzim, CYP24A1. Njegova produkcija na staničnoj razini je usko regulirana koncentracijom $1,25(OH)_2D_3$ putem negativne povratne sprege i tako sprječava toksični učinak vitamina D (15).

Vitamin D je hidrofobna molekula pa se u krvotoku se nalazi vezan za vitamin D vezujući protein (vitamin D binding protein, VDBP). VDBP pripada skupini α globulina i služi kao nosač molekule vitamina D kroz vodeni mediji i olakšava njegov ulazak u stanicu (6). Oko 85-88% metabolita vitamina D se nalazi vezano za VDBP, a 12-15% je vezano za albumine (14). Vezan za VDBP, vitamin D dopijeva do stanica gdje se kompleks otpušta i vitamin D se veže za receptor vitamina D (VDR) koji se nalazi u citoplazmi i pripada steroidno-tireoidnoj obitelji nuklearnih receptora (1). Kompleks VDR/vitamin D ulazi u jezgru gdje se događaju konformacijske promjene i stvaranje heterodimera s retinoid X receptorom (RXR). Zatim se spaja s drugim ko-aktivatorima kao što DRIP kompleks te se stvara transkripcijska regulatorna jedinica koja se veže za *Vitamin D response element* (VDRE) u promotorskoj regiji gena. Ovo vezanje rezultira regulacijom genske ekspresije (16). Prema brojnim studijama koje su provedene, danas se smatra da VDR ligand može modulirati od 200 pa čak i do 1000 gena (5,17). Osim genskih učinaka, VDR može modulirati i brze, negenomske efekte. Oni uključuju brzi porast intracelularnih kalcijevih kanala, aktivaciju fosfolipaze C i otvaranje kalcijevih kanala (16).

Slika 2. Djelovanje vitamina D u stanici



Preuzeto iz: Nandi A, Sinha N, Ong E, Sonmez H, Poretsky L. Is there a role for vitamin D in human reproduction. *Horm Mol Biol Clin Investig.* 2016 Jan;25(1):15-28.

Naše tijelo stvara zalihe vitamina D. Najveće se nalaze u jetri i masnom tkivu. U ljudi one mogu biti dostatne mjesecima, ili čak godinama kao izvor vitamina D bez dodatne nadoknade (18). Istraživanja su pokazala da su zalihe vitamina D u masnom tkivu veće u osoba koje imaju više masnog tkiva te da su potrebne veće količine vitamina D da bi se zadovoljili kapaciteti pohrane. Zbog toga su pretile osobe u većem riziku za razvoj hipovitaminoze (19).

1.1.2. Mjerenje koncentracije vitamina D u tijelu

Serumska koncentracija $25(\text{OH})\text{D}_3$ je najbolji pokazatelj statusa vitamina D u serumu jer mjeri količinu sintetiziranog vitamina D iz kože i onog unesenog hranom, a dobar je pokazatelj i jer ima i dugo poluvrijeme raspada od 15 dana (20).

Za razliku od $25(\text{OH})\text{D}_3$, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ima poluvrijeme raspada od 15 sati, i serumske razine su usko regulirane razinom PTH, kalcija i fosfata, pa se ne može iskoristiti za mjerenje (5).

Smjernice koje su utemeljene na istraživanjima metabolizma vitamina D na kosti preporučuju minimalnu koncentraciju vitamina D od 50 nmol/L, dok smjernice izrađene prema studijama usmjerenim na pleiotropne učinke vitamina D preporučuju minimalnu koncentraciju vitamina D u serumu od 75 nmol/L (21). Neke studije su pokazale i da za utjecaj na skeletni sustav koncentracija vitamina D mora biti minimalno 75 nmol/L jer ispod te razine koncentracija PTH počinje rasti (5).

1.1.3. Uloga vitamina D u pojedinim sustavima

Koštano-mišićni sustav

Najvažnija uloga vitamina D u fiziologiji skeletnog sustava je održavanje kalcija i fosfata u fiziološkim razinama da bi se održala normalna pregradnja i mineralizacija kostiju. Djelujući preko vitamin D receptora (VDR), vitamin D regulira njihovu homeostazu tako da djeluje na reapsorpciju u bubregu i crijevima (22). Kada u tijelu ne postoji dovoljna koncentracija kalcija i fosfata, tada se počinje lučiti PTH. PTH djeluje na bubrege tako da povećava tubularnu reapsorpciju kalcija i također stimulira 1α -hidroksilazu i stvaranje $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. On aktivira i osteoblaste koji putem RANKL liganda potiču sazrijevanje preosteoklasta u zrele osteoklaste. Njihova zadaća je da razgrade kost i time otpuste kalciji i fosfate da bi se regulirala njihova serumska razina. Postoji li i direktna uloga vitamina D na kosti istraživano je u brojnim studijama na modelima vitamin D rezistentnog rahitisa, te

mišjim *knockout* modelima u kojima nisu postojali funkcionalni VDR i/ili CYP27B1. Takvi miševi su razvili hipokalcemiju, hipofosfatemiju, sekundarni hipoparatiroidizam te posljedično rahitis (22,23). Iako nisu postojali uvjeti za produkciju i djelovanje vitamina D, uz 'spasilačku' dijetu bogatu kalcijem, fosfatima i laktozom, koncentracije serumskog ioniziranog kalcija i PTH su se normalizirane, i rahitis je preveniran (23). To naglašava važnost vitamina D u metabolizmu kalcija i fosfata u crijevima, ali i potencijalno isključuje direktno djelovanje vitamina D na kosti. Međutim, daljnje studije su pokazale da iako je 'spasilačka' dijeta prevenirala hipokalcemiju i rahitis, zaostala je osteopenija i defektna funkcija osteoblasta (2,24).

Djelovanje vitamina D na skeletnu muskulaturu posredovano je genomskim i negenomskim učincima. Pokazano je da status vitamina D ima pozitivnu korelaciju s fizičkom spremom i inverzno je povezan s rizikom od pada. Nadoknada vitaminom D je pokazala poboljšanja u mišićnoj snazi, smanjenu rizika od pada, i moguć utjecaj na kompoziciju i morfologiju mišićnih vlakana kod starijih osoba sa sniženom razinom vitamina D (25).

Gastrointestinalni sustav

VDR se eksprimira u cijelom probavnom sustavu, iako uloga „signalinga“ putem VDR-a još uvijek ostaje nepoznata (26). Među brojnim istraživanjima, danas se puno pažnje poklanja utjecaju vitamina D kod upalnih bolesti crijeva (UPC), Crohnovoj bolesti i ulceroznom kolitisu. Poznato je već da vitamin D posjeduje imunomodulatorna svojstva. Djelujući na takav način on održava integritet mukozne barijere crijeva inhibirajući upalom posredovanu apoptozu epitelnih stanica crijeva. Kalcitriol potiče Th2 aktivnost što znači da suprimira upalnu aktivnost dendritičkih stanica, inducira antibakterijsku aktivnost i regulira produkciju citokina u korist protuupalnih citokina. Kada oboljeli od UPC-a dođe do optimalnih vrijednosti vitamina D, tada ima smanjen rizik ponovnog javljanja bolesti, smanjen rizik za komplikacije koje zahtijevaju kirurško liječenje te poboljšanu kvalitetu života.

Također jedna od važnih meta istraživanja je i povezanost vitamina D s karcinogenezom tumora probavnog sustava. Mnoge studije o karcinomima usne šupljne, želuca, crijeva, jetre i gušterače pokazuju visoku pojavnost hipovitaminoze kod oboljelih od zloćudnih bolesti, te smanjenu smrtnost i bolju prognozu onih koji su u su imali normalne vrijednosti vitamina D ili dobivali njegove pripravke kao potpurnu terapiju standardnoj terapiji (27-31). U meta analizama za karcinom jednjaka nisu uočene povezanosti između vitamina D i pojave tumora (32).

Krvožilni sustav

Utjecaj vitamina D na kardiovaskularni sustav je mnogostruk i u pozitivnoj korelaciji s djelovanjem na bolesti krvožilnog sustava. Jedan od dobro poznatih učinaka je negativna regulacija renin-angiotenzin-aldosteron sustava (RAAS). U stanjima nedostatka vitamina D, RAAS sustav postaje aktivniji. To dovodi do porasta tlaka, a ako takvo stanje potraje razvija se hipertenzija. Tada se kao posljedica može razviti hipertrofija lijeve klijetke. Također se zbog djelovanja aldosterona povećava reapsorpcija vode i natrija iz bubrega što dovodi do povećanja priljeva srcu i njegovog dodatnog opterećenja. Sve to vodi većem riziku kardiovaskularnih događaja. Jedna provedena pregledna studija je pokazala da koncentracije kalcitriola niže od 25 nmol/L imaju 1,2 – 2,5 puta veći rizik kardiovaskularnih događaja nego kada su koncentracije kalcitriola bile više od 75 nmol/L. Endotelne stanice su također jedan od meta djelovanja vitamina D. U njima se povećava sinteza i aktivnost dušikova oksida (NO), potentnog endogenog vazodilatatora. Također, vitamin D povećava i angiogenetski potencijal endotelnih stanica putem djelovanja na VEGF te smanjuje sposobnost endotela da inducira agregaciju trombocita (33).

Respiratorni sustav

Djelovanje vitamina D u respiratornom sustavu ima više meta djelovanja. Danas poznati utjecaji vitamina D se prokazuju u razvoju i strukturi pluća, snazi respiratornih mišića, upali i imunom odgovoru na respiratorne patogene. Proučavanja povezanosti između vitamina D i bolesti dišnog sustava su jasno pokazala povezanost niskih vrijednosti vitamina D s astmom, bronhitisom i drugim respiratornim oboljenjima, neovisno o pušenju. Također se pokazala i statistički značajna razlika u višem funkcionalnom vitalnom kapacitetu (FVC) u osoba s višim koncentracijama vitamina D, te dobiti u bolesnika oboljelih od kronične opstruktivne plućne bolesti (KOPB), intersticijskih bolesti pluća i cistične fibroze (34).

Urinarni sustav

Bubrezi predstavljaju glavnu točku djelovanja u aktivaciji vitamina D, pa nam je njihovo zdravlje od velike važnosti. Kronično bubrežno zatajenje (KBZ) je progresivna bolest kod koje se funkcija bubrega smanjuje. Posljedično smanjenju bubrežne funkcije, sposobnost aktivacije vitamina D u bubregu se smanjuje, ali ostaje uredna funkcija autokrinog stvaranja vitamina D u drugim ciljnim tkivima (35). Obzirom da je VDBP globulin i pripada obitelji albumina, on se također gubi iz tijela kao posljedica proteinurije i taj mehanizam predstavlja jedno od mogućih dodatnih mehanizama nastanka hipovitaminoze. Obzirom na povezanost renalnog i kardiovaskularnog sustava, nije za zanemariti činjenicu da i KBZ osim svojim već

poznatim patofiziološkim mehanizmima, također pridonosi i riziku kardiovaskularnih incidenata smanjenom sintezom vitamina D.

Također se manjak vitamina D u mnogočemu povezuje i s drugim bolestima urinarnog sustava. U djece je dokazana veća incidencija urinarnih infekcija u djece koja su imala snižen status vitamina D, nego u djece kod kojih je status vitamina D bio uredan (36). Jedan od često spominjanih radova je rad o utjecaju vitamina D na karcinom prostate koji je pokazao da stanice prostate odgovaraju na stimulaciju vitaminom D povećanjem njihove diferencijacije i apoptozom, te se smanjuje proliferacija, invazivnost i mogućnost metastaziranja tumorskih stanica (37).

Imunološki sustav i hematopoeza

Vitamin D je potentan imunomodulator i njegovo djelovanje u imunološkom sustavu je značajno u obrani tijela od infekcija kao i u autoimunim bolestima. On inhibira proliferaciju B limfocita te blokira njihovu diferencijaciju i stvaranje imunoglobulina. Također suprimira i proliferaciju T limfocita i uzrokuje skretanje s Th1 na Th2 fenotip te olakšava indukciju T regulatornih stanica. Utječe i na dendritičke stanice inhibirajući njihovu diferencijaciju i sazrijevanje. Svi ovi mehanizmi rezultiraju smanjenjem proupalnih citokina kao što je IL-17, te skreću sintezu citokina u smjeru protuupalnih citokina kao što je IL-10 (38).

Također vitamin D se uključuje i u obranu nekih specifičnih patogena kao što je *Mycobacterium tuberculosis* potičući transkripciju gena za sintezu katelicidina, peptida koji je sposoban uništiti ovu acidorezistentnu, aerobnu bakteriju kao i druge patogene (5).

Sve je više dokaza o povezanosti deficita vitamina D s autoimunim bolestima uključujući multiplu sklerozu (MS), reumatoidni artritis (RA), diabetes mellitus (DM), upalne bolesti crijeva (UPC) i sistemski eritematozni lupus (SLE). Također je pokazana poveznica da manjak vitamina D olakšava progresiju ovih bolesti, odnosno da je nadoknada vitaminom D usporava ili zaustavlja (38).

Radovi koji su proučavali povezanosti vitamina D i eritropoeze pokazuju da osobe koje imaju manjak vitamin D imaju veći rizik razvoja anemije, niži prosječni hemoglobin i veće iskorištavanje faktora stimulacije eritrocita (39).

Integumentarni sustav

Kalcitriol sintetiziran u keratinocitima regulira njihov rast, diferencijaciju, apoptozu i druge biološke procese intrakrinim, autokrinim i parakrinim putevima na epidermalne stanice. U *in vitro* uvjetima niska razina vitamina D dovodi do proliferacije keratinocita, odnosno do inhibicije u višim koncentracijama. Također je važna imunomodulatorna uloga vitamina D u

koži koju ostvaruje djelovanjem na T i B limfocite, Langerhansove stanice te dendritičke stanice.

Vitamin D se koristi i u liječenju nekih kožnih bolesti. Jedna od takvih bolesti je psorijaza za koju je pokazano pozitivno djelovanje vitamina D na remisiju bolesti. Zbog svoje imunomodulatore uloge, novija istraživanja pokazuju i pozitivnu povezanost i s atopijskim dermatitisom iako su potrebna daljnja istraživanja da bi se ta uloga potvrdila. Vitiligo, kao autoimuna bolest, također pokazuje pozitivan odgovor na terapiju vitaminom D (40).

O utjecaju vitamina D na kosu i nokte nema još dovoljno istraženih podataka, ali neke studije na miševima pokazuju da miševi s nedostatnim koncentracijama vitamina D razvijaju manjak dlakavosti (41).

Živčani sustav

Neuroprotektivno djelovanje vitamina D je povezano s njegovim utjecajem na stvaranje i otpuštanje neurotrofina, hormona odgovornog za neuronsku diferencijaciju, sintezu neuromedijatora, homeostazu unutarstaničnog kalcija te prevenciju oštećenja živčanog tkiva nastalih oksidativnim stresom. Klinička istraživanja navode da manjak vitamina D može rezultirati povećanim rizikom razvoja bolesti središnjeg živčanog sustava, posebice razvoja shizofrenije i multiple skleroze. Istraživan je i utjecaj kod osoba oboljelih od depresije, gdje se pokazalo da koncentracija vitamina D korelira s težinom depresije. Također je pokazana i bolja kontrola epileptičnih napadaja kod farmakorezistentog oblika epilepsije (42).

Endokrini sustav

U endokrinom sustavu glavnu okosnicu, i najveći potencijal djelovanja izražava paratiroidna žlijezda. U fiziološkim uvjetima, niske koncentracije vitamina D dovode do hipokalcemije te posljedično dolazi do povećanog lučenja PTH. PTH zatim stimulira bubrege na veću reapsorpciju kalcija i sintezu vitamina D. U stanjima kada postoji autonomno lučenje PTH, kao što je adenom paratiroidne žlijezde, dolazi do takvog stalnog poticaja. Ako u tim stanjima osoba već ima nedostatak vitamina D nastaje tzv. normokalcemični (asimptomatski) hiperparatiroidizam, te je klinička slika maskirana, za razliku od osoba koje imaju optimalnu koncentraciju i razvijaju simptome. Povezanost manjka vitamina D i primarnog hiperparatiroidizma prokazuje se na dva različita načina. Prvo, sama bolest je teža u onih koji imaju konkomitantni manjak vitamina D. Drugo, pokazuje se veća prevalencija adenoma u takvih osoba, pretpostavlja se što zbog utjecaja na proliferaciju i diferencijaciju stanica, što zbog činjenice da deficit vitamina D i hipokalcemija izazivaju hiperplaziju paratiroideja (43).

U referentnom preglednom članku istraživan je utjecaj vitamina D na pojedine endokrine organe te utjecaj na bolesti istih (44).

U perspektivi istraživanja dijabetesa, pokazano je da osobe koje su rano u djetinjstvu imale manjak vitamina D, kasnije su češće oboljevale od dijabetesa tipa I. Jedan od predloženih modela djelovanja je djelovanje na autoimunu prirodu bolesti. Kod dijabetesa tipa II nije pokazana značajnost ranog deficita u prevenciji bolesti, dok se nadoknada vitamina D smatra korisnom u osoba koji imaju veći rizik razvoja dijabetesa tipa II. U oba tipa dokazi idu u prilog povećane inzulinske sekrecije i osjetljivosti ciljnih tkiva na djelovanje inzulina, te utjecaj na autoimunost kod dijabetesa tipa I (44). Jedno istraživanje je pokazalo da je liječenje manjka vitamina D u pretilih adolescenata povezano sa značajnim poboljšanjem inzulinske rezistencije (45).

Studije pokazuju da snižene razine vitamina D u autoimunim bolestima štitnjače, Hashimotovoj i Gravesovoj bolesti, podiže rizik razvoja ovih bolesti. U liječenju Gravesove bolesti pokazano je da pacijenti koji su ušli u remisiju bolesti su imali više vrijednosti $25(\text{OH})\text{D}_3$, za razliku od onih koji nisu ušli u remisiju.

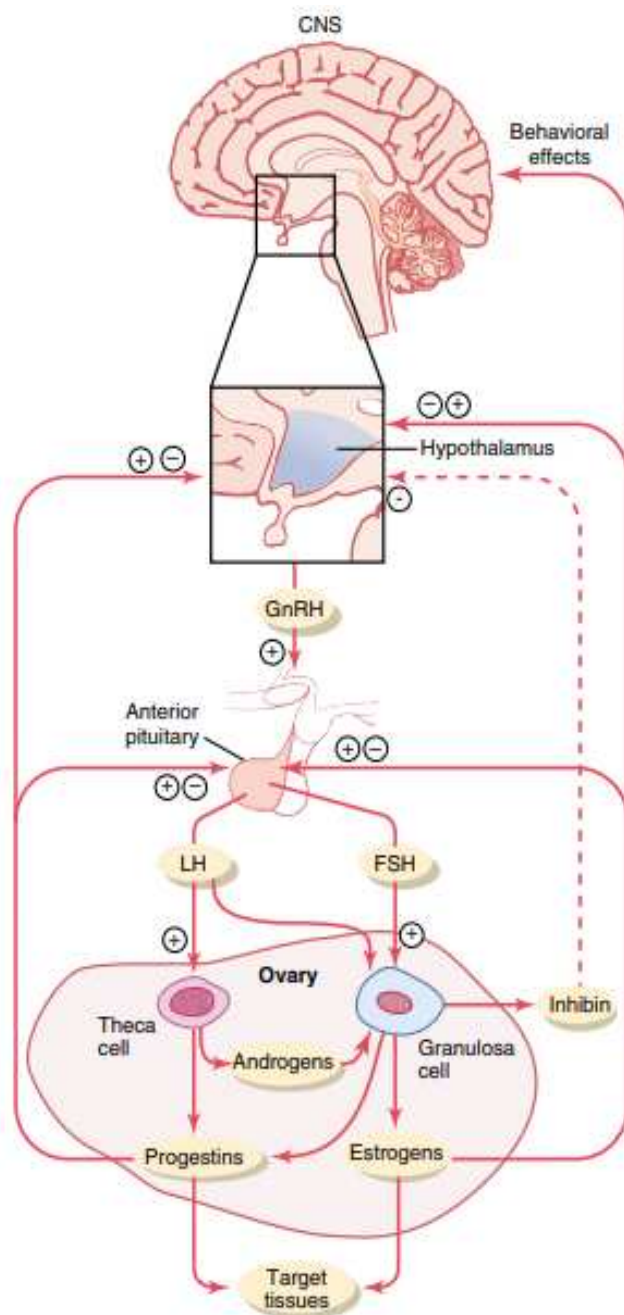
Preliminarni podatci u istraživanjima povezanosti s Addisonovom bolešću pokazuju da vitamin D može biti važan u modifikaciji genske osjetljivosti za razvoj bolesti te da pozitivnom utjecaju može doprinositi i njegova imunomodulatorna uloga (44).

1.1.4. Reproductivni sustav i utjecaj vitamina D

1.1.4.1. Fiziologija ženskog spolnog sustava

Sustav spolnih hormona u žena kontroliran je na tri hijerarhijske razine, hipotalamus, hipofiza i jajnici (Slika 4). Hipotalamus pulsatilno otpušta gonadotropin-oslobađajući hormon (GnRH) koji potom stimulira prednji režanj hipofize na otpuštanje gonadotropina: folikulostimulirajućeg hormona (FSH) i luteinizirajućeg hormona (LH). Na početku svakog menstrualnog ciklusa FSH potiče rast nekoliko primordijalnih folikula koji sadrže jajnu stanicu. Između njih će dominirati jedan folikul koji će proći sve razvojne faze do Grafova folikula i izaći u procesu ovulacije, dok će ostali podleći procesu atrezije. Rastom folikula, oko njega se stvara sve više slojeva granulosa i teka stanica koje međusobno, i u dijalogu s hormonima hipofize potiču stvaranje estradiola, progesterona, aktivina, inhibina, *insulin like growth factor* (IGF), inhibitora zrenja oocite (OMI) i anti-Müllerovog hormona (AMH) te aktivnost aromataze i stvaranje androgena. U predovulacijskoj fazi estrogen doseže kritičnu razinu kada dolazi do prelaska mehanizma negativne povratne sprege u mehanizam pozitivne povratne sprege putem GnRH. To uzrokuje nagli skok FSH i LH i nastupa ovulacija. Time se završava folikularna faza menstrualnog ciklusa. Faza koja slijedi je luteinska faza koja je

obilježena stvaranjem žutog tijela i dominantnim lučenjem progesterona. Nakon što folikul pukne i jajna stanica se oslobodi, na mjestu folikula ostaje sloj granuloza i teka stanica koje će oformiti žuto tijelo. Uloga žutog tijela je značajna u produkciji progesterona, i u manjoj mjeri estrogena, te pripremi uterusa na implantaciju. Ukoliko ne dođe do oplodnje, žuto tijelo se smanjuje i propada, opada koncentracija progesterona i estrogena te dolazi do prestanka negativne povratne sprege. Time nastupa menstruacija i početak nove folikularne faze. Ako dođe do oplodnje, tada se funkcija žutog tijela nastavlja i podržana je placentalnim lučenjem humanog korionskog gonadotropina (HCG) (Slika 5) (46,47)



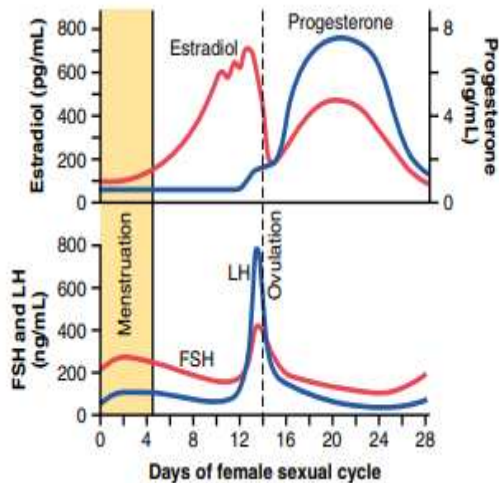
Slika 4. Mehanizmi povratne sprege u osi hipotalamus-hipofiza-jajnik (51). Stimulacijsko djelovanje je označeno znakom +; inhibicijsko djelovanje je označeno znakom -.

U procesu regrutacije folikula, rana folikulogeneza počinje autonomno, bez ovisnosti o FSH. Folikuli bilježe početni rast, ali gotovo svi završe atrezijom. Oni koji nastavljaju rast i razvoj, prvo postaju preantralni folikuli. U toj fazi granuloza stanice ostvare 3-6 slojeva stanica i ekspimiraju receptore za FSH, a teka stanice se mobiliziraju iz strome jajnika, grupiraju se s vanjske strane bazalne membrane te stvaraju receptore za LH i inzulin. Porastom razine FSH i estradiola povisuje se gustoća FSH receptora na membrani granuloza stanica. Estrogeni mikrouvijeti pogoduju daljnjoj diferencijaciji folikula, a androgeni vode folikul u arest ili atreziju. Sljedeća faza folikulogeneze je razvoj antralnog folikula koji je karakteriziran stvaranjem antruma, šupljine ispunjene folikulinskom tekućinom. Osim stvaranja antruma, dolazi i do daljnje proliferacije granuloza stanica i posljedično aktivnije sinteze hormona. U izboru dominantnog folikula glavnu riječ imaju FSH i AMH, odnosno ekspresija njihovih receptora na granuloza stanicama (47).

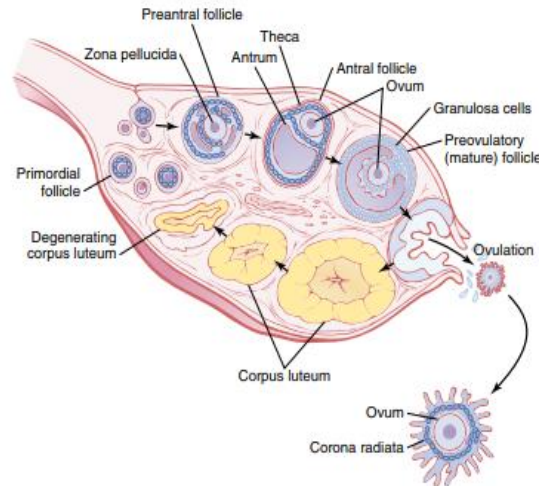
AMH je glikoprotein kojeg proizvode granuloza stanice primarnih, preantralnih i malih antralnih folikula, a pripada obitelji transformirajućeg faktora rasta (TGF) (48). Njegova glavna uloga je inhibicija regrutacije primordijalnih folikula čime prevenira prerano iscrpljivanje ovarijske rezerve. AMH blokira osjetljivost folikula na FSH, što znači da onaj folikul koji ekspimirira najviše receptora za FSH, malo receptora za AMH, te ima najveću mogućnost sinteze aromataze i estradiola će postati dominantnim folikulom (47,48).

Sljedeća faza je predovulacijski folikul. Dva dana prije ovulacije granuloza stanice ekspimiraju receptore za LH, što steroidogenezu usmjeruje prema progesteronu. Njegov porast je povezan sa sintezom proteolitičkih enzima i prostaglandina, što ubrzo započinje degradaciju stijenke folikula i izbacivanje zrele oocite (47).

Nakon ovulacije, antrum folikula se puni krvlju i stvara se crveno tijelo (*corpus haemorrhagicum*). Zaostale granuloza stanice potom nakupljaju žuti pigment, lutein, pa se crveno tijelo pretvara u žuto tijelo (*corpus luteum*). Ono stvara progesteron koji svoj maksimum lučenja doseže 7. ili 8 dan luteinske faze, odnosno 21. dan ciklusa. Degeneracija žutog tijela počinje naglo, 9-11 dana nakon ovulacije. Posrednici luteolize su endotelin-I, estradiol, dušični oksid i prostaglandin F2 α . Luteolizu finalno inducira tumor nekrotizirajući faktor- α (*tumor necrosis factor- α (TNF- α)*) i matriks metaloproteinaze (MMP) (47).



Slika 5. Dinamika izlučivanja spolnih i tropnih hormona



Slika 6. Folikulogeneza

1.1.4.2. Utjecaj vitamina D u ženskom spolnom sustavu

Potencijalna mjesta djelovanja vitamina D u ženskom spolnom sustavu istraživana su ispitivanjem lokalizacije VDR-a (49-52). Istraživanje na ženama štakora provedeno imunohistokemijskim metodama je pokazalo postojanje VDR-a na folikulima jajnika, posebice na granulosa stanicama. Slabija izražajnost receptora u odnosu za granulosa stanice, pokazana je u teka stanicama, stromi jajnika te germinativnom epitelu, dok stanice žutog tijela intenzivno eksprimiraju VDR. Prisutnost je pokazana i u epitelu jajovoda i maternice (49).

Prisutnost VDR-a pokazana je i na stanicama decidue i trofoblasta posteljice (50,51) kao i u stanicama hipofize (52). Ovi rezultati upućuju na mogućnost direktnog učinka vitamina D u ispitivanim tkivima.

Osim što postoje dokazi o postojanju VDR-a, danas se zna da stanice u organima ženskog reproduktivnog sustava posjeduju 1α -hidroksilazu i mogu same stvarati aktivnu formu vitamina D, $1,25(OH)_2D_3$, te na taj način utjecati na autokrine i parakrine genomske i negenomske mehanizme (2,52).

Istraživanje koje je provedeno na ženama miševa u kojih je učinjena ciljna ablacija 1α -hidroksilaze, pokazala je da su ovariji tih miševa anatomske bili znatno manji nego u

miševa divljeg tipa, folikuli su bili nezreliji, intersticiji reduciran i nije bilo žutog tijela. Također ti miševi su bili aciklični i nisu ovoluirali (53).

U istraživanju VDR *knock-out* miševa, pokazano je da ispitivani miševi nisu napredovali u razvoju uz pojavu alopecije, hipokalcemije i neplodnosti. Također su imali vrlo defektan razvoj kostiju kao tipičnu sliku vitamin D rezistentnog rahitisa tipa II (54). Kao i kod ciljane ablacije 1 α -hidroksilaze, i u modelima VDR *knock-out* miševa pokazana je hipoplazija uterusa i gonadalna disfunkcija. Kada je tim miševima nadoknađivan estradiol nađene histološke abnormalnosti su ispravljene (55).

Kasnija istraživanja su pokazala da kada su oba tipa *knock out* miševa hranjena dijetom bogatom kalcijem, represivni učinci na ženski reproduktivni nisu pokazani (9). Taj pronalazak nalaže da vitamina D nema značajan direktni učinak, ali ima važnu indirektnu ulogu u razvoju ovih organa.

Glavna uloga AMH je očuvanje rezerve jajnika putem inhibicije regrutacije folikula za rast te smanjenje osjetljivosti primordijalnih folikula na FSH, a svoje djelovanje na molekularnoj razini ostvaruje putem AMH tip II receptora (AMHR-II) i Smad 1/5/8 proteina (48). U istraživanju Malloy i suradnika pokazana je prisutnost VDRE-a u promotorskoj regiji gena za AMH u kulturi stanica karcinoma prostate indicirajući potencijalni direktni utjecaj vitamina D na stvaranje AMH (56). U istraživanju provedenom na ženama koje su podvrgnute aspiraciji folikula tijekom postupka *in vitro* oplodnje (IVF), mjerene su koncentracije vitamina D u folikularnoj tekućini. Zaključni rezultati pokazuju negativnu povezanost koncentracije vitamina D u folikularnoj tekućini s AMHR-II mRNA ekspresijom. Pronađeno je dvostruko povećanje ekspresije AMHR-II u granulosa stanicama žena s manjkom vitamina D za razliku od žena koje su imale uredne vrijednosti. Također je pokazano i značajno smanjenje ekspresije receptora za FSH kao i fosforilacije Smad 1/5/8 proteina (57). Za razliku od ovih studija, Chang i suradnici nisu pokazali povezanosti AMH i vitamina D (58).

O utjecaju na AMH značajno govori i istraživanje koje je pokazalo konkomitantne sezonske varijacije vitamina D i AMH. Da bi ustvrdili tu povezanost, Dennis i suradnici su ispitanicama uveli terapiju vitaminom D i kasnijom analizom podataka ustvrdili da je ta nadoknada bila dovoljna da blokira sezonske varijacije AMH (60).

O utjecaju vitamina D na stvaranje spolnih hormona, Merhi i suradnici izlažu povećanje stvaranja progesterona u prisutnosti prekursora pregnenolona i vitamina D, a Parikh i suradnici pokazuju da je inkubacija humanih jajnih stanica s vitaminom D potaknula veće stvaranje progesterona, estrogena, estrona i inzulinu-sličnom faktoru rasta (*insulin-like growth factor 1 (IGF-1)*) (57,60). Suprotne rezultate donosi Knight i suradnici čiji rezultati kažu da za povećanje 25(OH) D_3 za 10 nmol/L se progesteron smanjuje za faktor od 10%, a estradiol za faktor od 3% (61).

O utjecaju na testosteron istražuju Chang i suradnici koji iznose pozitivnu korelaciju ukupnog testosterona i vitamina D (58).

Niske koncentracije vitamina D u premenopauzalnih žena povezane su s višim vrijednostima FSH. Takav zaključak nalaže smanjenje u broju primordijalnih folikula i mogućem ubrzanijem razvoju menopauze (62).

Aromataza je enzim prisutan u granulosa stanicama koji stvara estrogene biokonverzijom iz androgena stvorenih u teka stanicama (63). U modelima VDR *knock out* miševa osim anatomskih malformacija, pokazana je i smanjena aktivnost aromataze. Te promjene su pratile i povećanje FSH i LH otkrivajući hipergonadotropni hipogonadizam. Davanje kalcija tim miševima je povećalo aktivnost aromataze, a kada se koncentracija kalcija održavala u normalnom rasponu, aktivnost aromataze je dosegla 60% vrijednosti kontrolne skupine miševa. Usprkos tomu, FSH i LH su ostali povišeni (55).

1.1.4.2.1. Utjecaj vitamina D u sindrom policističnih jajnika

Nedostatak vitamina D je čest nalaz kod sindroma policističnih jajnika (PCOS). Čak 67-85% oboljelih žena ima serumske koncentracije ispod 20 ng/ml (50 nmol/L). Nedostatak vitamina D može uzrokovati egzacerbaciju simptoma PCOS-a, a pregledna istraživanja pokazuju povezanost s inzulinskom rezistencijom, ovulatornim i menstrualnim nepravilnostima, nižim uspjehom trudnoće, hirsutizmom, hipeandrogenizmom, pretilosti i povećanjem faktora rizika kardiovaskularnih bolesti (64).

Manjak vitamina D se pokazao kao predskazatelj težine bolesti i većih metaboličkih poremećaja (65). Irani suradnici u svom istraživanju zaključuju da u žena oboljelih od PCOS-a vitamin D modulira stvaranje AMH u granulosa stanicama kao i njihovu osjetljivost na FSH igrajući time ulogu u razvoju folikula (66).

Wher i suradnici su pokazali da 50% žena s PCOS-om i nepravilnostima ciklusa nakon 24 tjedne terapije imale poboljšanja u pravilnosti ciklusa (67).

Obzirom da molekularni mehanizmi kao što su oksidativni stres, proupalni citokini te inzulinska rezistencija, igraju veliku ulogu u patogenezi PCOS-a, o povezanosti s nedostatkom vitamina D se podrobnije istraživalo. Akbari i suradnici u svojoj meta-analizi zaključuju da je nadoknada vitamina D rezultirala povećanjem ukupnog antioksidativnog kapaciteta (TAC), te značajnim smanjenjem markera oksidativnog stresa, malondialdehida (MDA) i *high-sensitive* CRP (hs-CRP), dok utjecaj na ukupni glutation nije pokazao statistički značajnu razliku (68). Time je pokazana značajna uloga vitamina D u moduliranju oksidativnog stresa u patogenezi PCOS-a.

Jedni od glavnih pokretača pro-upalnog odgovora u PCOS-u su *advanced glycation end-products* (AGE) koji igraju ulogu u abnormalnom razvoju folikula vežući se za receptore na njihovoj površini (RAGE) (1). Nadoknada vitamina D je pokazala veće stvaranje solubilnog RAGE-a (sRAGE) čija je uloga vezivanje AGE-a i time onemogućavanje njegovo vezanje za stanični receptor (RAGE) (66). Posljedica ovih mehanizama je smanjenje utjecaja upalnog odgovora i razvoja abnormalnih folikula.

Hiperandrogenizam, kao jedna od glavnih karakteristika PCOS-a također je široko proučavan. Yildizhan i suradnici su pokazali da je vitamin D negativno korelirao s ukupnim testosteronom i dehidroepiandrosteron (DHEAS) u pretilih žena oboljelih od PCOS-a (65). Jednake rezultate su prikazali i Karadag i suradnici (69). Za razliku od njih, Chang i suradnici su pokazali pozitivnu korelaciju (58).

Glavna konkomitantna stanja koja se često nalaze uz PCOS-a su inzulinska rezistencija, pretilost, metabolički sindrom i dijabetes tipa II. Terapija vitaminom D je pokazala povećanje sinteze i lučenja inzulina, kao i ekspresije inzulinskih receptora te osjetljivosti na inzulini. Također je smanjila stvaranje proupalnih citokina koji su uključeni u patogenezu inzulinske rezistencije (70).

Osim toga, pokazano je da su serumske vrijednosti vitamina D obrnuto proporcionalne krvnom tlaku, lipidnom profilu i metaboličkom sindromu u žena s PCOS-om (71).

U randomiziranom kontroliranom pokusu koji je istraživao 50 žena oboljelih od PCOS-a, pokazane su statistički značajne razlike u ukupnom kolesterolu, trigliceridima i

lipoproteinima vrlo male gustoće (VLDL), bez utjecaja na lipoproteine male gustoće (LDL), lipoproteine velike gustoće (HDL) i visoko osjetljivi CRP (hs-CRP). (72).

1.1.4.2.2. Utjecaj vitamina D u endometriozu

Endometriozu je zbog svojih proliferativnih, angiogenetskih i upalnih svojstava zanimljiva meta istraživanja povezanosti s vitaminom D.

Ekspresija VDR-a i 1α -hidroksilaze je dokazana u ortotopičnom i ektopičnom tkivu endometrija (73), a zanimljive rezultate pokazuju Agić i suradnici da žene oboljele od endometriozu pokazuju jaču ekspresiju VDR-a i 1α -hidroksilaze za razliku od kontrolne skupine (74).

Postavljena hipoteza o mogućem utjecaju polimorfizma gena za VDR u riziku i razvoju endometriozu kao i neplodnosti nije dokazana (75).

U velikoj prospektivnoj studiji pokazana je inverzna povezanost između očekivane vrijednosti vitamina D i rizika za endometriozu (76).

U modelima miševa kojima je injicirano ili transplantirano tkivo endometrija na peritoneum, miševima su davani kolekalciferol, kalcitriol i analog vitamina D elokalcitol. Rezultati su pokazali preventivnu ulogu u implantaciji tkiva kao i regresiju endometrijskih lezija. Primjena kolekalciferola uzrokovala je značajno smanjenje endometrijskih lezija i induciranu fibrozu i apoptozu u stomi cisti (77). U modelu kada je primjenjivan kalcitriol zabilježeni su istovjetni rezultati. U ovom istraživanju je također pokazano i znatno smanjenje vaskularnog čimbenika rasta (VEGF) i matriks metaloproteinaze 9 (MMP 9) ukazujući na mogući pozitivni utjecaj na inhibiciju neovaskularizacije i remodeliranje ekstracelularnog matriksa (78). U miševa kojima je davan analog vitamina D, elokalcitol zabilježena je redukcija endometrijskih lezija koja je pokazala i ovisnost o dozi (79).

Statistički značajno niže vrijednosti vitamina D u žena s teškom endometriozom za razliku od žena s blagim oblikom te kontrolnom skupinom pokazali su u svom istraživanju Miyashita i suradnici (80)

Somigliana i suradnici su pokazali da su žene oboljele od endometriozu imale više prosječne vrijednosti vitamina D u serumu za razliku od kontrolne skupine te da koncentracije kalcidiola u krvi koreliraju s težinom bolesti (81).

Između ovih studija, Hartwell je pokazao da su koncentracije kalcidiola bile slične u žena s endometriozom i kontrolne skupine, dok su serumske koncentracije kalcitriola pokazale tendenciju prema višim vrijednostima u oboljelih žena, ali razlika nije bila statistički značajna (82)

U istraživanju žena koje su imale samo ovarijske endometriome, njih 85,7% je imalo nedostatak vitamina D, te je u skupini žena s nedostatkom pokazano da su imale statistički značajno veće endometriome za razliku od žena koje su imale optimalne vrijednosti vitamina D (83).

Bez obzira kroz koju prizmu gledamo na ovaj međusobni utjecaj, endometrioza je ipak bolest uzrokovana metaboličkom i hormonalnom neravnotežom, stoga je određivanje statusa vitamina D u ovih pacijentica od velike važnosti (71).

1.1.4.2.3. Utjecaj vitamina D kod mioma

Od prije je poznato da su niže serumske koncentracije vitamina D tipične za žene koje imaju fibroide kao i veći rizik za razvoj mioma uterusa. U prilog tome ide i činjenica da su žene afroameričkog porijekla 2-3 puta sklonije nastanku mioma i njihove prosječne vrijednosti vitamina D su niže za razliku od bijelkinja. Do sada provedene studije pružaju samo vjerojatne moguće terapijske učinke analogima vitamina D, dok još uvijek nema studija provedenih na ljudima (71).

1.1.4.2.4. Utjecaj vitamina D u prijevremenoj menopauzi

U istraživanju žena s prijevremenom menopauzom pokazana je inverzna korelacija s vitaminom D (84).

Nasuprot ovom istraživanju, Esroy i suradnici pokazuju da vitamin D ne igra ulogu u patogenezi ove bolesti (85).

1.1.4.2.5. Utjecaj vitamina D u trudnoći

Tijekom trudnoće nedostatak vitamina D je povezan s povećanim rizikom gestacijskog dijabetesa, ponavljanih spontanih pobačaja, preeklampsije i intrauterinog zastoja rasta (1,16). Osim utjecaja na tijek trudnoće, pokazan je pozitivan utjecaj viših vrijednosti vitamina D na ostvarivanje trudnoće. Farzadi i suradnici su pokazali da su žene sa serumskim koncentracijama vitamina D višim od 30ng/mL (75 nmol/L) imale najveću šansu trudnoće.

Također su te žene imale i značajno veću šansu dobitka embrija visoke kvalitete i transfera u stadiju blastociste, potkrjepljujući time pogodan utjecaj vitamina D i na jajnike i na endometriji (86).

1.1.4.3. Utjecaj vitamina D u muškoj plodnosti

Važnu ulogu vitamina D u muškoj plodnosti podupiru dokazi o postojanju VDR-a i vitamin D metabolizirajućih enzima u muškom reproduktivnom sustavu u životinjskim i ljudskim modelima (87). Poblize, u ljudi je dokazano postojanje VDR-a, 25-hidroksilaze, 1 α -hidroksilaze i 24-hidroksilaze u prostati, seminalnim vezikulama, epididimisu i Leydigovim stanicama, dok Sertolijeve stanice, spermatogonije, spermatociti, spermatide i spermatozoe pojedinačno eksprimiraju, djelomično eksprimiraju ili ne eksprimiraju navedene molekule.

O *in vitro* utjecaju vitamina D na mušku plodnost, zanimljive su rezultate prikazali Jensen i sur. Njihov rad pokazuje da serumske koncentracije vitamina D pozitivno koreliraju s mobilnosti spermija, te da muškarci koju su imali nedostatak vitamina D su imali nižu proporciju mobilnih i morfološki urednih spermija u usporedbi s muškarcima koji su imali uredan status vitamina D. Također su pokazali da je vitamin D doveo do povećanja unutarstanične koncentracije kalcija u spermatozoama i utjecao na mehanizme uključene u mobilnost spermija, kapacitaciju i akrosomsku reakciju (88).

U radu Hammoud i sur. pokazano je da vrijednosti vitamina D niže od 50 nmol/L i više od 125 nmol/L jednako negativno djeluju na mobilnost spermija (89).

U modelu ženskih miševa koji su oplođeni sjemenom miševa koji su imali niske vrijednosti vitamina D, pokazano je 73% manje trudnoća u usporedbi sa ženkama koje su oplođene sjemenom miševa s urednim vrijednostima vitamina D. Također, broj uspješnih parenja kod miševa s nedostatkom vitamina D je bio 45% niži u usporedbi s brojem parenja miševa s urednim vrijednostima vitamina D (90).

Iz zbira radova proizlazi zaključak pozitivne korelacije vitamina D i stvaranja testosterona, iako neki među njima pokazuju da je taj utjecaj dobno ovisan, dok mali broj radova ne pronalazi povezanosti. Također, neke studije pokazuju negativnu korelaciju s estradiolom, iako je zaključni stav da ne postoji uvjerljiva povezanost estradiola i vitamina D kod ljudi (9).

1.1.5. Epidemiologija hipovitaminoze D

Veliki je broj istraživanja napravljen da bi se iskazala pojavnost hipovitaminoze D te dobiveni rezultati variraju u svojim vrijednostima od 30-90% (91). Mnogo je razloga zašto postoji tako velika razlika između rezultata, a neki uključuju razlike u dizajnu studija, različite *cut-off* vrijednosti za definiranje manjka vitamina D, razlike u geografskim širinama provedenih studija te dobi, spolu, etnicitetu, rasi i kulturi življenja ispitanika (2,91). Veliki pregledni članak koji je obuhvatio 14 europskih populacijskih studija i 55844 ispitanika pokazuje da 13% euroljana ima serumsku koncentraciju vitamina D manju od 30 nmol/L. Oni koji imaju vrijednosti ispod 50 nmol/L je 40,4% osoba, a ako se *cut-off* vrijednost postavi na 75 nmol/L tada se postotak penje na 79,24%. Istraživanje također pokazuje da su osobe tamne puti imale mnogo veću pojavnost hipovitaminoze nego osobe svijetle puti (92). Američko istraživanje provedeno na zdravim pojedincima starijim od 20 godina je pokazalo da 30,9% osoba bijele puti imalo nedostatne razine vitamina D (*cut-off* vrijednost 50 nmol/L)(2).

Objavljena je svjetska studija koja je ispitivala pojavnost nedostatka vitamina D. Njome je obuhvaćeno 195 istraživanja i preko 168000 ispitanika, a zaključak je da 88,1% ljudi u svijetu ima vrijednosti ispod 75 nmol/L, 37,3% ispod 50 nmol/L i 6,7% onih kojima su vrijednosti vitamina D niže od 25 nmol/L (93).

1.1.6. Uzroci hipovitaminoze D

Mnogo je stanja koja uzrokuju manjak vitamina D počevši od smanjenje sinteze u koži i nemogućnosti apsorpcije do urođenih i stečenih stanja. U tablici 1. navedeni mogući uzroci hipovitaminoze D (5).

Tablica 1. Uzroci nedostatka vitamina D

Uzrok	Način	Mehanizam
Smanjena sinteza u koži	Korištenje krema za sunčanje	Apsorpcija UVB zraka
	Kožni pigment Starenje	Apsorpcija UVB zraka Smanjenje količine 7-dehidroksikolestrola u koži
	Godišnja doba, geografska širina i doba dana	Količina solarnih UVB fotona koji dolaze do Zemlje ovisno o kutu upada
	Kožni graftovi	Značajno smanjena sinteza 7-dehidroksikolesterola
Smanjena bioraspoloživost	Malapsorpcija	Smanjena apsorpcija masti, cistična fibroza, celijakija, Whippleova bolest, Crohnova bolesti, lijekovi koji smanjuju apsorpciju masti i drugi uzroci
	Pretilost	Sekvestracija vitamina D u masnom tkivu
Povećani katabolizam	Antikonvulzivi, glukokortikoidi, HAART protokol (liječenje AIDS-a), imunosupresivni lijekovi	Vežanje za steroidni i ksenobiotični receptor ili pregnan X receptor
Dojenje	Mali udio vitamina D u majčinu mlijeku	
Smanjena sinteza kalcidiola	Zatajenje jetre blaga do umjerena disfunkcija	Malapsorpcija vitamina D, ali je njegova sinteza moguća
	Zatajenje jetre 90% disfunkcija	Nedostatna sinteza $25(OH)D_3$
Povećan gubitak urinom	Nefrotski sindrom	Gubitak vitamina D vezanog za VDBP
Smanjena sinteza $1,25(OH)_2D_3$	Kronično bubrežno zatajenje (KBZ)	U stadijima 2 i 3 KBZ-a hiperfosfatemija povećava FGF23 i time se blokira djelovanje 1α -hidroksilaze U stadijima 4-5 KBZ-a je sinteza $1,25(OH)_2D_3$ nedostatna
Nasljedni poremećaji	Vitamin D ovisan rahitis tip I	Mutacija 1α -hidroksilaze
	Vitamin D ovisan rahitis	Mutacija receptora za vitamin D

	tip II	(VDR)
	Vitamin D ovisan rahitis	Prevelika sinteza <i>hormone-responsive-element binding protein</i>
	tip III	
	AD hipofosfatemični rahitis	Mutacija za FGF23
	X-vezani hypofosfatemični rahitis	Mutacija PHEX gena koja uzrokuje povišene FGF23 i druge fosfatone
Stečena stanja	Tumorska osteomalacija	Tumor sintetizira FGF23 i druge fosfatone
	Primarni hiperparatireoidizam	Povišeni PTH uzrokuje povećanu sintezu $1,25(OH)_2D_3$
	Grunulomatoze: sarkoidoza, tuberkuloza; limfomi	Konverzija $25(OH)D_3$ u $1,25(OH)_2D_3$ u makrofazima
	Hipertireoza	Povećani metabolizam $25(OH)D_3$

Preuzeto iz: Holick MF, Chen TC. Vitamin D deficiency. Am J Clin Nutr. 2008 Apr;87(4):1080S-6S.

1.1.7. Vitamin D danas

Naslov The Washington Post-a iz 2015. godine u prijevodu glasi 'Pripravci vitamina D: Panacea, placebo, ili nešto između' i zapravo stvarno ilustrira dosadašnja znanja i brojne polemike o ekstraskeltnim učincima vitamina D (94). Posljednjih desetak godina pojavljuje se novi val istraživanja o vitaminu D i njegovoj ulozi u patofiziologiji niza autoimunih, kardiovaskularnih i različitih zloćudnih bolesti. Iako rezultati studija nisu jednoznačni, dosadašnja istraživanja govore u prilog preventivnoj i suportivnoj ulozi vitamina D u etiopatogenezi i terapiji brojnih bolesti. Znamo da vitamin D nije trojanski konj, ali za proglasiti ga zlatnim runom potrebna su daljnja istraživanja (71).

Još uvijek postoje neslaganja oko određivanja koncentracije koja definira optimalan i snižen status vitamina D u krvi. Cilj nadoknade vitamina D je postizanje i održavanje najpogodnije koncentracije $25(OH)D_3$ bez štetnih učinaka. U tablici 2. su prikazane preporučene minimalne serumske vrijednosti vitamina D prema *US Institute of Medicine* (IOM), *Endocrine Society* (ES), *European Vitamin D Association* (EVIDAS) i GULF kao i njihove preporuke za nadoknadu (21).

Tablica 2. Prikaz preporučenih serumskih vrijednosti vitamina D i smjernice za njegovu nadoknadu

Preporučene vrijednosti nmol/L	Stanja	Preporučene dnevne doze vitamina D		
		Dob (godine)	IU/L	
IOM	>50	Zdravlje kostiju	<1	400
			1-70	600
			>70	800
ES	>75	Rizik nedostatka vitamina D	0-1	400
			1-18	600-1000
			>19	1500-2000
EVIDAS	>75	Opće zdravlje	0-6 mj	400
			6-12 mj	400-600
			1-18	600-1000
			15-45	1500-2000
GULF	>75	Opće zdravlje	0-6 mj	400
			6-12 mj	400-600
			1-18	600-1000
			19-65	800-2000
			>65	1000-2000
		Prevenција fetalnih anomalija	16-45	1500-2000

Preuzeto iz: Pludowski P1, Holick MF2, Grant WB3, Konstanyowicz J4, Mascarenhas MR5, Haq A6, i sur. Vitamin D supplementation guidelines. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2018 Jan;175:125-35.

1.2. Neplodnost

1.2.1. Definicija i klasifikacija

Neplodnost (*infertilitet*) je definirana kao bolest koju karakterizira nemogućnost ostvarivanja kliničke trudnoće nakon 12 mjeseci redovitih, nezaštićenih spolnih odnosa ili (95).

Umanjena plodnost (*subfertilitet*) označava stanje u reproduktivskom nastojanju para pri kojem trudnoća može nastupiti, ali u pravilu nastupa nakon dužeg razdoblja nego što je to slučaj u normalno plodnog para (96).

Neplodnost se klasificira kao primarna i sekundarna. Primarno je neplodna ona žena kojoj nikad nije dijagnosticirana klinička trudnoća i odgovara obilježjima neplodnosti. Pojam

sekundarne neplodnosti se odnosi na žene koje ne mogu zanijeti nakon što im je ranije bila potvrđena klinička trudnoća (96).

S obzirom na porijeklo uzroka, neplodnost se dijeli na: žensku, mušku, kombiniranu i idiopatsku neplodnost (97)

1.2.2. Epidemiologija

Prema nacionalnim statistikama i podacima Svjetske zdravstvene organizacije (SZO) procjenjuje se da je oko 20% parova neplodno, od čega 10% se smatra umanjeno plodno (98).

Procjene su da je u zapadnjačkim zemljama jedna na svakih sedam žena u reproduktivnoj dobi neplodna, dok je u zemljama u razvoju taj odnos veći, jedna na svake četiri žene (99).

Neplodnost žena uzrok je izostanka trudnoće u 35 do 50% slučajeva te je u 20% udružen sa muškim faktorom. Muški faktor je uzrokom neplodnosti u 40 do 50% parova, a 10% otpada na nepoznate uzroke neplodnosti. (96,100)

U našoj zemlji godišnje se liječi 10 do 12 tisuća parova, a pomoć liječnika traži se prosječno nakon 2,3 godine neplodnosti. (97)

1.2.3. Uzroci

Zdravom mlađem paru prosječno je potrebno 8,5 mjeseci da postignu kliničku trudnoću. Fekunditet, kapacitet parova da ostvari trudnoću i djecu, ovisi o dobi žene, ali i partnera. SZO ističe da je fekunditet najviši između 20 i 27 godine života žene i iznosi 20 do 30%, a kod muškarca se potentan fekunditet održava i do 40 godine (97).

1.2.3.1. Zajednički uzroci neplodnosti

1.2.3.1.1. Dob i odgađanje rađanja

Plodnost se smanjuje starenjem žene i muškarca (97).

Žene se rađaju s konačnim brojem jajnih stanica, negdje oko 2 milijuna. U dobi od 12 godina taj broj pada na oko 300000, da bi u četrdesetim godinama pao na 10000. (97). S dobi žene oocite su sve češće suboptimalne i nekompetentne zbog aneuploidija. Između 35. i 39. godine života učestalost aneuploidnih oocita je viša od 50%, a nakon 40. godine je 90% oocita

aneuploidno. To je glavni razlog porasta neplodnosti s porastom dobi, kao i uzrok visokog rizika od spontanih pobačaja i slabijim uspjehom liječenja neplodnosti.

Današnja istraživanja pouzdano upućuju na to da je plodnost žene u opadanju već nakon 32. godine, a nagli pad plodnosti se bilježi nakon 38. godine.

Povezanost smanjenja muške plodnosti sa starenjem dokazana je tendencijom opadanja volumena sjemeni, kao i koncentracije, mobilnosti i morfologije spermija. Patofiziološka pozadina dobne ovisnosti vjerojatno je vezana i uz stanja koja prate starenje kao što su vaskularne bolesti, pretilost, infekcije spolnog sustava, ali i epigenetske štetne učinke kao što su nakupljanje toksičnih spojeva, zračenje, alkohol, pušenje i genitalna vrućina (97,101).

Danas se bilježi sve veći trend rađanja u starijoj reproduktivnoj dobi što je potaknuto liberalnijim socijalnim stajalištima, drugačijim ekonomskim mogućnostima i emancipiranim svjetonazorima.

1.2.3.1.2. Poremećaji tjelesne težine

U svijetu bilježimo porast debljine u žena i muškaraca od 2 do 5% godišnje, a u zadnjih 20 godina se učestalost debljine utrostručila (97).

Pretilost može poremetiti reproduktivne funkcije utjecajem i na jajnike, i na endometriji. Pokazano je smanjenje plodnosti, veći broj pobačaja i češće komplikacije trudnoće kao i slabija šansa rađanja zdrave djece u pretilih žena koje su začele u prirodnim ili potpomognutim ciklusima (102).

Van der Steeg i suradnici su pokazali da je vjerojatnost trudnoće smanjena za 4% po jedinici indeksa tjelesne mase (BMI) iznad 29 kg/m² (103).

Masno tkivo zapravo predstavlja veliki endokrini organ koji proizvodi mnoge hormone kao što su leptin, adiponektin, estrogen, testosteron, citokine kao što je TNF α i interleukin 6 te brojne enzime lipogeneze (97). Putem ovih hormona debljina mijenja hipotalamo-hipofizno-gonadalnu os, posebice djelujući preko povećane razine slobodnih estrogena jer masno tkivo povećava konverziju androgena u estrogene. Estrogeni potom negativnom povratnom spregom djeluju na lučenje gonadotropin-oslobađajućeg hormona (GnRH) te dolazi do nepravilnog lučenja FSH i LH što u konačnici uzrokuje nepravilne ili anovulatorne cikluse (104).

Debljina u muškaraca i neravnoteža biosignala adipocita, negativno utječu na kontrolu i funkciju testisa. Posljedica toga je subfertilno sjeme, hipogonadizam, niski androgeni i spolna disfunkcija (97).

Nenormalna mršavost, odnosno BMI <20 kg/m² udružena je s reprodukcijским poremećajima. Kada je udio masnog tkiva manji od 20% dolazi do nenormalne neurosekrecije, anovulacija i često amenoreje. Takvo stanje je također povezano i sa smanjenim fekunditetom, složenim i skupim liječenjem, a uspjeh IVF-a je prepolovljen (97).

1.2.3.1.3. Pušenje duhana

Duhan je jedan od najsnažnijih pokretača epigenetskih učinaka na gamete. Mjesečni fekunditet para koji puši tek je 8%, odnosno tri puta niži nego kod parova koji ne puše (97).

U žena pušenje uzrokuje oštećenje oocita, inhibiciju aromataze, oksidativni stres folikula, disfunkciju *zona pellucidae*, antiestrogenski učinak, pad pričuve jajnika, nereceptivni endometriji te nedostatnu funkciju žutog tijela (97).

U muškaraca uzrokuje manji volumen sjemena, nižu koncentraciju, oštećenje DNA te abnormalnosti spermija (97).

Van Voorhis i suradnici su pokazali da je pušenje uzrokovalo produžene i o dozi ovisne dekrementne učinke na funkciju jajnika te da su žene koje su pušile tijekom ciklusa potpomognute oplodnje imale 50% niži uspjeh implantacije za razliku od žena koje nisu pušile (105).

1.2.3.1.4. Konzumacija alkohola

Prekomjerna konzumacija alkohola u objema gametama povisuje učestalost aneuploidija, te smanjuje plodnost za 20-30%. U muškaraca alkohol oštećuje spermatogenezu i izaziva arest zrenja spermija te reducira njihovu pokretljivost i morfologiju. U žena je konzumacija više od 8 alkoholnih pića na tjedan povezana s anovulacijama i endometriozom (97).

1.2.3.1.5. Onkološke bolesti

Posebna i rastuća jest skupina mladih žena i muškaraca koji uspješno izliječe od zloćudnih bolesti, ali još uvijek nisu završili svoju reprodukciju ili je nisu niti započeli. Njih je važno uputiti te im pružiti multidisciplinarni onkofertilitetni tretman koji uključuje pohranu gameta ili zametaka prije liječenja, pohranu tkiva jajnika, poštredne kirurške zahvate, poštredno zračenje te odabir posebnih protokola kemoterapije (106).

1.2.3.2. Ženski uzroci neplodnosti

1.2.3.2.1. Sindrom policističnih jajnika

Sindrom policističnih jajnika (PCOS) jedan je od najčešćih uzroka endokrinoloških poremećaja koji zahvaća 15-20% žena reproduktivne dobi. (107,108)

Osnovne karakteristike bolesti su kronične anovulacije, klinički ili biokemijski hiperandrogenizam i policistična morfologija jajnika, a povezana je i s razvojem pretilosti, inzulinskom rezistencijom i metaboličkim sindromom (70). Pretilost u žena s PCOS-om pojačava inzulinsku rezistenciju, hiperandrogenizam i dislipidemiju (107).

S obzirom na to da se radi o funkcionalnom poremećaju nejasne etiologije za koji ne postoji jedinstveni dijagnostički test, važno je isključiti druga stanja koja se mogu slično očitovati. To su neklasična kongenitalna adrenalna hiperplazija, tumori jajnika i nadbubrežne žlijezde koji luče androgene, poremećaj rada kore nadbubrežne žlijezde te uporaba androgenih ili anaboličkih lijekova. Također se ne smije zaboraviti da hiperprolaktinemija, hipotireoza i hipertireoza također mogu rezultirati anovulacijom. (107).

Klinički, pacijentice se najčešće žale na neuredna krvarenja, neplodnost, pretilost, pojačanu dlakavost, opadanje kose i akne (109)

Da li se olakšalo postavljanje dijagnoze PCOS-a danas postoje 3 slične skupine dijagnostičkih kriterija, a to su NIH (*US National Institute of Health*) kriteriji, Rotterdamski kriteriji, te AES (*Androgen Excess Society and PCOS*) kriteriji (Tablica 3) (107).

Tablica 3. Kriteriji za postavljanje dijagnoze PCOS-a

Kriteriji	Obilježja
NIH	<ul style="list-style-type: none">• Klinički hiperandrogenizam i/ili biokemijska hiperandrogenemija• Kronična anovulacija• Isključenje bolesti koje se slično manifestiraju
Rotterdam	Postojanje dva od tri kriterija, a nakon što se isključe bolesti koje se slično manifestiraju <ul style="list-style-type: none">• Oligo/anovulacija• Hiperandrogenizam i/ili hiperandrogenemija• UZV dokaz policističnih jajnika
AES	<ul style="list-style-type: none">• Hiperandrogenizam (hirzutizam i/ili hiperandrogenemija)• Ovarijska disfunkcija (oligo/anovulacija i/ili UZV dokaz policističnih jajnika)• Isključenje bolesti koje se slično manifestiraju

Preuzeto iz: Pavičić Baldani. Kronične anovulacije – Sindrom policističnih jajnika. U: Šimunić V. i sur. Reprodukcijska endokrinologija i neplodnost. Zagreb: Školska knjiga; 2012. str. 275-96.

Ovisno o kriterijima, pojavnost PCOS-a je od 6,5 – 8% prema NIH-a kriterijima, dok se prema Rotterdamskim kriterijima taj postotak kreće od 15 do 20%.

Posljedica oligo/anovulacije su oligo- i amenoreja. Oligomenoreja se definira kao manje od 8 menstrualnih ciklusa godišnje. Amenoreja se definira kao odsutnost menstruacije dulje od 3 mjeseca uz odsustvo trudnoće. Iako su ova dva stanja najčešći nalaz u kliničkoj slici žena s PCOS-om, određeni broj žena je u eumenoreji. Eumenoreja ipak nije jamstvo postojanja ovulacije, te se 20-30% žena s PCOS-om i eumenorejom pronađe subklinička oligo/anovulacija pokazana niskim vrijednostima progesterona određenim između 22-24 dana ciklusa (107).

Hiperandrogenizam je najizraženija dijagnostička sastavnica PCOS-a. Klinički se očituje u obliku hirsutizma, odnosno povećanim rastom terminalnih dlaka prema muškom načinu raspodjele. Težinu hirsutizma procjenjujemo modificiranom Ferriman-Gallweyevom skalom (FG zbroj) koji boduje težinu dlakavosti od 1 do 4 na devet različitih mjesta. Ako je zbroj veći od 8, tada govorimo o hirsutizmu. Iako često prisutne u kliničkoj slici, danas se akne i alopecija smatraju nedovoljno pouzdanim znakom hiperandrogenizma.

Biokemijski gledano, hiperandrogenemija se obično dijagnosticira mjerenjem ukupnog testosterona u serumu, proteina koji veže spolne hormone (SHGB), odnosno izračunatom frakcijom slobodnog testosterona (FAI), ali i drugi androgeni u serumu kao što su androstendion i dehidroepiandrosteron sulfat također mogu biti povećani (107).

Ultrazvučne karakteristike dijagnostike nalažu prisutnost 12 ili više folikula koji mjere 2-9 mm u promjeru mjereno transvaginalnim ultrazvukom ili volumen jajnika veći od 10 mL da bi se potvrdila dijagnoza policističnih jajnika. U procjeni policističnih jajnika transabdominalnim ultrazvukom kao vrijednosna metoda se koristi samo mjerenje volumena jajnika jer je mjerenje folikula manje pouzdano, pogotovo kod pretilih žena (110)

Posljedice PCOS-a se osjećaju tijekom cijelog života. U vrijeme prenatalnog razvoja moguć je abnormalan razvoj ploda, a u djetinjstvu se mogu javiti prerana adrenarha i rana menarha. Tijekom adolescentnog razdoblja i u reproduktivnim godinama ovo stanje je praćeno nepravilnostima ciklusa, hirsutizmom, aknama, neplodnošću kao i metaboličkim poremećajima koji uključuju pretilost, inzulinsku rezistenciju, dislipidemiju i dijabetes tipa II koji se nastavljaju i u postmenopauzalnom razdoblju uz povećan kardiovaskularni rizik (110).

Postavljeno je pet glavnih mjera liječenja PCOS-a: 1. smanjenje tjelesne težine, 2. poticanje fizičke aktivnosti, 3. prestanak pušenja i uzimanja alkohola, 4. farmakološki pristup, 5. kirurški pristup.

U farmakološkom liječenju, prva terapija izbora su hormonski kontraceptivi, kao što je antiandrogen ciproteron acetat koji utječe na poremećaje menstrualnog ciklusa kao i na akne i hirzutizam. Klomifen je trenutno prva terapija izbora u liječenju neplodnosti, dok se metformin pokazao dobrotvoran u modificiranju metaboličkih/glikemijskih abnormalnosti kao i na poboljšanje redovitosti ciklusa.

U kirurškom liječenju najčešće se primjenjuje laparoskopska elektrokoagulacija strome policističnih jajnika tzv. *drilling*. Takva mehanička trauma mijenja endokrinološka zbivanja te se LH normalizira i vrijednosti androgena padaju za 50% (107,109,111).

1.2.3.2.2. Endometrioza

Endometrioza se očituje nazočnošću ektopičnog endometrija koji ima histološke značajke normalnog endometrija uz dokaz stanične aktivnosti i razvoja lezija što se iskazuje stvaranjem priraslica i ometanjem normalnih fizioloških procesa (112).

Od endometrioze boluje 10-15% žena reproduktivne dobi. U općoj populaciji je taj postotak 6-10%, dok se endometrioza pronalazi u 20-40% žena koje se liječe od neplodnosti i u jednakom postotku kod žena koje imaju kliničku sliku zdjelične boli (113).

Rizični čimbenici za endometriozu jesu rana menarha, kratki ciklusi, menoragija, niska plodnost, prekomjerna uporaba alkohola i kofeina te okolinski polutanti. Također je pokazana nedvojbeno obiteljska sklonost, a kćeri i sestre oboljele imaju 6-9 puta viši rizik. Hormonska kontracepcija, pušenje i tjelovježba su se pokazali kao zaštitni čimbenici. (113).

Danas je najprihvaćenija teorija o nastanku endometrioze refluks menstrualne krvi zbog retrogradne kontraktilnosti maternice. Takvo stanje se nalazi u oko 70% svih žena, ali malokad dolazi do implantacije endometralnih stanica i razvoja endometrioze. U žena oboljelih od ove bolesti to je omogućeno greškom imunskog sustava, promijenjenom funkcijom stanica, angiogenezom te promijenjenom odgovoru na estrogene, progesteron i prostaglandine (113).

Simptomatologija endometrioze ovisi o smještaju lezije. Iskazuje se različitim simptomima od kojih su najčešći bol i smetnje reprodukcije. Vodeći simptom endometrioze je zdjelična bol. Iskazuje se kao sekundarna dismenoreja te dispareunija. Ona ne mora biti vezana uz ciklička zbivanja, a može biti i difuzna, neodređena karaktera. Među kliničkim znakovima najtipičniji je nalaz palpabilnih čvorića u Douglasovom prostoru, u području

uterosakralnih ligamenata te rektovaginalnog septuma, kao i bol pri pomicanju maternice, bolna povećana adneksa te fiksacija adneksa i maternice u retroverziji. Ovisno o rjeđim lokalizacijama (rodnica, mokraćni sustav, probavni sustav, pluća, mišić, kosti, središnji živčani sustav) javljaju se i drugi, najrazličitiji simptomi (112).

Endometrioza je bolest koja napreduje, što pojačava simptome. Ipak postoji znatno kašnjenje od 8 do 9 godina od pojave prvih simptoma do dijagnoze i početka liječenja.

Dijagnoza endometrioze se postavlja na temelju iscrpne anamneze, fizikalnog pregleda, laboratorijskih pretraga te vizualnih pretraga kao što je ultrazvuk, magnetna rezonancija ili laparoskopija. „Zlatni standard“ za postavljanje konačne dijagnoze jest laparoskopija s biopsijom barem jedne lezije i histološkom analizom.

Američko društvo za reproduktivnu medicinu (ASRM) je predložilo četiri stupnja izraženosti endometrioze, a prikazani su u tablici 4. Klasifikacija prema ASRM-a je sustav bodovanja koji se temelji na lokalizaciji i veličini implantata te stupnju prijanjanja. S obzirom na to broj bodova definira četiri razreda: minimalna, blaga, umjerena i teška endometrioza.

Tablica 4. Klasifikacija endometrioze prema ASRM

Stadiji (bodovi)	Obilježja (izražavaju se u bodovima)
I. stadiji (0-5) – minimal	Minimalna bolest – nekoliko površinskih
II. stadiji (6-15) – mild	Blaga bolest - veći broj lezija, neke i dublje
III. stadiji (16-40) – moderate	Srednje izražena – brojne lezije, lezije na
IV. stadiji (≥ 41) – severe	Izražena bolest – brojne lezije,

Preuzeto iz: Šimunić V. Endometrioza. U: Šimunić V. i sur. Reprodukcijska endokrinologija i neplodnost. Zagreb: Školska knjiga; 2012. str. 205-24.

Mogući uzroci neplodnosti kod endometrioze prikazani su u tablici 5.

Tablica 5. Prikaz mogućih uzroka neplodnosti kod endometrioze

Blaga i srednje teška endometriozna	Teška endometriozna
<p>Poremećaji folikulogeneze i ciklusa</p> <ul style="list-style-type: none"> • Nenormalna folikulogeneza • Anovulacije • Hiperprolaktinemija • Disfunkcija žutog tijela <p>Štetni učinci iz peritonejske tekućine</p> <ul style="list-style-type: none"> • Neravnoteža upalnih i imunoloških biljega • Motilitet jajovoda • Nenormalno zrenje i transport gameta <p>Nenormalnosti miometrija i endometrija</p> <ul style="list-style-type: none"> • Poremećene kontrakcija • Nekvalitetni endometriji • Nereceptivni endometriji • Nesklad hormona - P_4, E_2 • Antiendometrijska protutijela 	<ul style="list-style-type: none"> • Priraslice i abnormalnosti u zdjelici koja onemogućuju ovulaciju i prihvata oocite u tubu • Oštećenje fimbrija ili okluzija tube • Hidrosalpings • Oštećenje endosalpingsa i opstrukcija • Okluzija proksimalnog dijela tube • Disfunkcija organa u zdjelici – duboka endometriozna
<p>Subklinički i rani spontani pobačaji?</p>	

Preuzeto iz: Šimunić V. Endometriozna. U: Šimunić V. i sur. Reprodukcijska endokrinologija i neplodnost. Zagreb: Školska knjiga; 2012. str. 205-24.

U liječenju endometrioze ne postoji jedinstveno i najbolje liječenje. Najčešće su opcije kirurško i medikamentozno liječenje, te njihova kombinacija.

Kirurško liječenje može biti pošteno i radikalno, a postoji nekoliko mogućnosti: ekscizija lezija (endometrioma) tzv. *stripping*, ablacija i destrukcija lezija, rješavanje priraslica, ventrosuspenzija uterusa, ablacija živaca (LUNA), presakralna neuroektomija. Najčešća metoda izbora izvođenja operacije i laparoskopija.

U medikamentoznom liječenju se u prvoj liniji koriste nesteroidni protuupalni lijekovi (NSAID) i hormoni. Od NSAID-a se primjenjuju indometacin, ibuprofen, ketoprofen i naproksen kao i koksibi. U hormonskom liječenju koristi se kombinirana oralna kontracepcija, gestageni, agonisti GnRH i intrauterini sustav s levonorgestrelom (113).

1.2.3.2.3. Adenomioza

Adenomioza je vrlo česta vrsta endometrioze kod koje se ektopični endometriji nalazi unutar mišićnog sloja maternice. Nalazi se u 3-5% žena reproduktivne dobi, a kod neplodnih žena, učestalost je oko 10%. Kao i kod endometrioze drugih područja, endometriotske lezije u miometriju reagiraju na hormone te doživljavaju sekundarne promjene, ali i izazivaju hiperplaziju okolnih glatkih mišića (114).

U nastanku i razvoju adenomioze sudjeluju lokalne tkivne promjene: povišena aktivnost estradiola zbog porasta aktivnosti aromataze, pada 17βhidroksisteroid dehidrogenaze i porasta prostaglandina E₂, razvoj progesteronske rezistencije, disfunkcija imunskog sustava, disfunkcija staničnih citokina, kemokina i faktora rasta te smanjena apoptoza. Takve, nepotpuno razjašnjene promjene promoviraju implantaciju ektopičnog endometrija i rast adenomioze.

Od simptoma i znakova adenomioze prevladavaju zdjelčna bol, dismenoreja i dispareunija. Najčešći prateći simptomi su menoragija, disfunkcijska krvarenja i neplodnost koji se javljaju s učestalošću od 40 do 50%.

Dijagnoza adenomioze se postavlja na temelju anamneze u kojoj žene najčešće opisuju gore navedene simptome. U dijagnostici nam daljnje detaljnije podatke daje ginekološki pregled koji otkriva asimetrično povećanje uterusa. Najpouzdanija metoda dijagnostike adenomioze je transvaginalni ultrazvuk kojim se obično prikazuje asimetrično povećan uterus koji je 2-3 puta veći. Također se vide i ehogeni tračci koji iz endometrija radijarno strše u miometriji te male miometrijske ciste.

U liječenju se primjenjuju medikamentozno i kirurško liječenje. Najdjelotvornije konzervativno i medikamentozno liječenje je uterini sustav koji lokalno oslobađa levonorgestrel, ali se i kao kod endometrioze primjenjuje oralna hormonska kontracepcija, gestageni i NSAID.

Kirurško liječenje se rjeđe primjenjuje jer adenomiotska žarišta ne posjeduju čahuru i teže ih je ekstirpirati, a rezervirano je za žene koje se liječe od neplodnosti i one u perimenopauzi. (114).

1.2.3.2.4. Tubarna neplodnost

Tubarni uzrok neplodnosti zbog okluzije i patoloških stanja peritoneuma koja uzrokuju stvaranje adhezija je najčešći uzrok ženske neplodnosti s učestalošću oko 30-35% u neplodnih žena. Najčešći uzrok tubarne neplodnosti je upalna bolest zdjelice (PID) (115). PID označava

na upalu gornjeg dijela spolnog sustava i može se odnositi na upalu endometrija (*endometritis*), jajovoda (*salpingitis*), jajnika (*oophritis*), miometrija (*myometritis*), seroze uterusa i parametrija (*parametritis*) i zdjeličnog peritoneuma. (116) *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* i anaerobni mikroorganizmi su najčešći uzročnici PID-a. Rizik i težina neplodnosti se povećava s brojem i težinom PID-a. Učestalost neplodnosti nakon jedne epizode PID-a iznosi 10-12%, 23-25% nakon dvije epizode, dok učestalost raste na čak 54-75% nakon tri epizode PID-a. Rizik ektopičnih trudnoća se povećava za šest do sedam puta nakon jedne epizode PID-a (115).

Drugi česti uzroci tubarne neplodnosti su priraslice koje stvaraju nakon operacija, te miomi koji se nalaze u rogu maternice (115).

Najčešći simptomi PID-a su bol u donjem dijelu trbuha, mukopurulentni vaginalni iscjedak, nepravilna krvarenja i povišena temperatura, dok se od kliničkih znakova mogu naći palpacijska bolnost adneksa te izražena bol pri pomicanju vrata maternice (116).

Posljedice upale su dugotrajne i uključuju aglutinaciju fimbrija, opstrukciju tuba, hidrosalpings i nodozna zadebljanja mišićnog sloja istmusa (115). Od akutnih komplikacija koje se mogu razviti su ooforitis, koji nastaje širenjem infekcije *per continuitatem* s jajovoda ili hematogeno kao posljedica bakterijemije i sepse. Druga akutna posljedica, i posljednji stadij PID-a je razvoj tuboovarijskog apscesa.

Dijagnostika PID-a je olakšana primjenom kliničkih kriterija koji uključuju minimalne i dodatne kriterije. Kombinacijom svih glavnih i jednog sporednog kriterija, dijagnostička točnost je otprilike 78%, a uz dva sporedna kriterija je oko 90%. (116). U tablici 6 su prikazani kriteriji.

Tablica 6. Prikaz dijagnostičkih kriterija upalne zdjelične bolesti

Minimalni kriteriji

- Bolna osjetljivost donjeg abdomena
- Bolnost na pomicanje vrata maternice
- Bolna osjetljivost adneksa

Dodatni kriteriji

- Temperatura >38°C
 - Povišen C-reaktivni protein
 - Povišena sedimentacija
 - Pozitivan mikrobiološki nalaz cervikalnog obriska
 - Zdjelični apsces ili kompleks palpatorno ili ultrazvuk
-

Preuzeto iz: Ciglar S. Upale gornjeg dijela spolnog sustava žene. U: Šimunić V i sur. Ginekologija. Zagreb: Ljevak; 2001. str. 259-69.

Najsigurnijaa dijagnostička metoda je laparoskopija.

Liječenje PID-a može biti medikamentozno, intervencijsko i preventivno. Medikamentozno liječenje se provodi antibiotskom terapijom prema nalazu uzročnika i antibiogramu. Intervencijsko liječenje se sastoji od punkcije i evakuacije gnojnog sadržaja laparoskopski ili laparotomijom. U preventivnom liječenju je najveći naglasak na edukaciji pacijentica, kao i na postavljanje rane dijagnoze i liječenje upale donjih ženskih spolnih organa kako bi se spriječio prodor uzročnika (116).

1.2.3.2.5. Prijevremeno ovarijsko zatajenje

Prijevremeno ovarijsko zatajenje ili prijevremena menopauza je ona koja se javlja prije 40. godine života. Nastupa u oko 1% žena mlađih od 40 godina, te u 0,1% mlađih od 30 godina (117).

Iako se ne zna točan uzrok nastanka prijevremena menopauze, kao mogući etiološki čimbenici se navode kromosomski, genski, autoimuni, metabolički, infektivni i jatrogeni uzroci. Mogući mehanizmi nastanka bolesti uključuju inicijalni manjak primordijalnih folikula, ubranu folikularnu atreziju i promjene u sazrijevanju primordijalnih folikula. Danas se za sigurno zna da je prijevremena menopauza posljedica citotoksičnog i radijacijskog liječenja (117).

Dijagnoza prijevremene menopauze se postavlja na temelju kliničkih, laboratorijskih i ultrazvučnih parametara. Višekratno određivanje FSH, LH i estradiola nužno je za postavljanje dijagnoze, a nalaz FSH >40 i.j./L govori u prilog bolesti. Većina kliničara postavlja dijagnozu na temelju amenoreje u trajanju od 3-6 mjeseci, povišene serumske razine FSH najviše do 40i.j./L u višekratnom mjerenju i niskim razinama estradiola uz isključenje drugih stanja i bolesti koje prate dugotrajnu amenoreju. (117).

Pacijentice se obično žale na nemogućnost zanošenja. Često imaju tipičnu anamnezu urednog nastupa menarhe i redovitih menstrualnih ciklusa, nakon čega nastupa oligomenoreja ili abruptna amenoreja.

Ovo stanje je povezano s dugoročnim zdravstvenim rizicima. Zbog nedostatka estrogena te žene imaju veći rizik za nastanak osteoporoze, neuroloških i kardiovaskularnih bolesti, psihoseksualne disfunkcije i promjene raspoloženja. Stoga je prva mjera liječenja hormonska nadomjesna terapija do vremena prosječne dobi za prirodnu menopauzu. S obzirom na to da se određeni dio žena liječi od neplodnosti, a stimulacijski ciklusi

potpomognute oplodnje pokazuju nezadovoljavajuće rezultate, danas većina autora predlaže donaciju oocita. Tada je uspjeh embriotransfera do 30%. (117).

1.2.3.3. Muški uzroci neplodnosti

Neplodnost muškarca najčešće je uzrokovana urođenim ili stečenim anomalijama i infekcijama urogenitalnog sustava, povišenom temperaturom unutar skrotalnih vreća, poremećajima endokrinog i imunskog sustava te genetskim anomalijama (118). Muški faktor je uzrokom neplodnosti para u 40-50% slučajeva (96), a u 30-40% muškaraca nije moguće utvrditi uzrok neplodnosti pa kod njih govorimo o idiopatskoj neplodnosti (118).

Uzroci muške neplodnosti dijele se na predtestikularne, testikularne i posttestikularne.

1.2.3.3.1. Predtestikularna neplodnost

U predtestikularnom uzroku neplodnosti glavnu okosnicu predstavlja poremećaj osi hipotalamus-hipofiza-testis. Najčešći poremećaji koji remete funkciju osovine su: tumori hipofize (kraniofaringeomi, meningeomi, funkcijski adenomi), trauma glave, štetno djelovanje lijekova, upotreba steroida i drugo.

Razlikujemo dvije vrste poremećaja: hipogonadotropni hipogonadizam i hipergonadotropni hipogonadizam. Kod hipogonadotropnog hipogonadizma izostaje normalna sekrecija gonadotropin-oslobađajućeg hormona (GnRH) ili nedostatan odgovor hipofiznih sekretornih stanica, što u konačnici dovodi do sniženih vrijednosti FSH i LH.

Nasuprot navedenom poremećaju, postoji i hipergonadotropni hipogonadizam koji je karakteriziran previsokom koncentracijom FSH, LH i prolaktina. Kod takvog stanja valja prvo pomisliti na funkcijski adenom hipofize kao mogući uzrok (119).

1.2.3.3.2. Testikularna neplodnost

Uzroci testikularne neplodnosti su: nedostatak testisa, testikularna disgeneza (kriptorhizam), genetske abnormalnosti (Klinefelterov sindrom, Y-mikrodelecije i dr.), trauma, torzija testisa, postupalne promjene, vanjski čimbenici (lijekovi, pušenje, zračenje, vrućina, kemoterapijsko liječenje), sistemske bolesti, varikokela, operacije koje mogu dovesti do vaskularne ozljede testisa i idiopatski uzroci (119).

1.2.3.3.2.1. Kriptorhizam

U 3-4% novorođenčadi i čak 30% nedonoščadi testisi se na rođenju ne nalaze u skrotumu. Pojavnost na kraju prve godine iznosi 0,5% i gotovo da se ne mijenja do odrasle dobi, što znači da će nakon prve godine rijetko doći do spontanog spuštanja testisa u skrotum (120).

Ako se testis ne spusti tijekom ranog djetinjstva u skrotum, već zaostane u preponskom kanalu ili trbušnoj šupljini, govorimo o kriptorhizmu. To je najčešći kongenitalni poremećaj koji često kod dječaka dovodi do neplodnosti u odrasloj dobi (119). Kriptorhidni testis je izložen djelovanju više temperature koja nepogodno djeluje na spermatogenezu.

1.2.3.3.2.2. Genetski poremećaji

Najčešći genetski poremećaji koji uzrokuju neplodnost su Klinefelterov sindrom, Kallmanov sindrom, mikrodelecije Y kromosoma te cistična fibroza (119).

U bolesnika s koncentracijom spermija $< 10^6/\text{mL}$ preporučuje se učiniti genetsko savjetovanje.

Klinefelterov sindrom je jedan od najčešćih genetskih poremećaja spolnog kromosoma. Kromosomski, može se raditi o punom fenotipu (47, XXY) ili mozaicizmu (46, YY/47, XXY). Ovisno o genetskoj izraženosti različite su fenotipske osobine i stupanj neplodnosti. U takvih bolesnika postoji mogućnost začeća djeteta, ali je potrebno genetsko savjetovanje roditelja i prenatalna obrada ploda zbog učestaliji kromosomopatija (119).

Kallmanov sindrom predstavlja hipogonadotropni hipogonadizam udružen sa anosmijom. Radi se o nasljednom hipotalamičkom poremećaju koji je karakteriziran nedostatkom gonadotropin-oslobađajućeg hormona i ne razvijenim olfaktornim bulbusima. (120). Spermatogeneza se kod ovih bolesnika može izazvati nadomjesnom terapijom gonadotropinima.

Velika istraživanja i klinička važnost posvećeni su Y kromosomu. Danas se zna da postoje razne mikrodelecije, a one imaju veliku važnost u kliničkoj praksi pri obradi neplodnog muškarca. Pokazano je da u bolesnika s normalnim brojem spermija nema mikrodelecije Y kromosoma. Nadalje, što su delecije izraženije, češća je teška oligozoospermija ili azoospermija. Testiranje mikrodelecija Y kromosoma preporučljivo je u svih bolesnika koji imaju < 5 milijuna spermija/mL.

Cistična fibroza je autosomno recesivna bolest čiji se genetski poremećaj očituje na 7. kromosomu. Poremećaj se očituje u transmembranskom proteinu koji je odgovoran za

prijenos iona te također dolazi do poremećaja razvoja sjemenih mjehurića, funikulusa, ejakulacijskog kanala te donjih 2/3 epididimisa.

U 2% bolesnika s cističnom fibrozom nalazimo obostrani prirođeni nedostatak funikulusa. Tada se govori o opstruktivnoj azoospermiji. U svih bolesnika s volumenom ejakulata < 1,5 mL i sniženim vrijednostima pH treba se posumnjati na mogući nedostatak *vas deferensa* i testirati ih na cističnu fibrozu (120).

1.2.3.3.2.3. Varikokela

Varikokela je proširenje i produženje vena pampiniformnog pleksusa. Najčešće se pojavljuje na lijevoj strani zbog anatomskog odnosa ulijevanja testikularne vene u lijevu bubrežnu venu pod pravim kutom što otežava protok krvi. Drugi razlozi razvoja varikokele su nedostatna razvijenost i funkcija zalistaka te smještaj lijeve testikularne vene ispod sigme pa dolazi do njene kompresije (121).

Varikokela iz više razloga može biti uzrokom neplodnosti. Zastoj venske krvi dovodi do povišenja temperature u testisu. Također, zbog zastoja krvi smanjena je doprema kisika i uklanjanje ugljikova dioksida što dovodi do zakiseljenja tkiva. Svi ovi mehanizmi imaju dekrementno djelovanje na spermatogenezu (121)

Dijagnoza varikokele se postavlja kliničkim pregledom, koji obuhvaća pregled testisa u ležećem i stojećem položaju uz izvođenje Valsalvina manevra. Smatra se kako samo klinički palpabilna varikokela ima utjecaj na mušku neplodnost, zato dodatne pretrage nisu klinički potrebne. Indikacije za operaciju varikokele su klinički palpabilan nalaz, poremećen spermogram i bolna varikokela (119).

1.2.3.3.3. Posttestikularna neplodnost

Uzrok posttestikularne neplodnosti je opstrukcija, prilog njoj govori nedostatak spermija ili spermatogenih stanica u ejakulatu ili postejakulacijskom urinu (119).

Učestalost opstruktivne azoospermije iznosi 15-20%, a posljedica je obostrane opstrukcije ejakulatornih kanala. Od prirođenih uzroka najčešća je idiopatska opstrukcija epididimisa ili prirođeni nedostatak *vas deferens*, a od stečenih upala, trauma ili raniji operativni zahvat. U anamnezi pacijenta važno je saznati njegove prethodne bolesti genitourinarnog trakta i eventualne operative zahvate.

Pri kliničkom pregledu testisi su normalne veličine, epididimisi su zadebljani ili čvorasti, a *vas deferens* može potpuno nedostajati. Hormonski status je normalan. Volumen

ejakulata je <1,5 mL, pH je nizak, a razina fruktoze sjemene tekućine je niska. Osim spermiograma, važna je analiza urina kako bi se isključila retrogradna ejakulacija (119).

1.2.3.4. Idiopatska neplodnost

Nemogućnost trudnoće u para u kojeg se niti jedan uzrok neplodnosti ne može definirati nakon temeljite obrade naziva se neobjašnjena ili idiopatska neplodnost, a učestalost ovog tipa neplodnosti je 10% (97,112)

Ovaj pojam obuhvaća heterogenu skupinu parova u kojih su dokazani ovulacija, prohodnost jajovoda, fertilnost ejakulata, penetracija spermija kroz cervikalnu sluz i uredan endometriji. Mogući su uzroci takvu stanju okultni poremećaji funkcije spermija, varikokela, endometrioza, defekti receptivnost endometrija, slabo izraženi poremećaji folikulogeneze i endokrinog sustava te cervikalna disfunkcija i nejasne imunološke reakcije (97).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog istraživanja je pokazati učestalost manjka vitamina D među ženama koje se liječe od neplodnosti i vidjeti postoji li povezanost vitamina D s hormonskim parametrima plodnosti.

Podciljevi istraživanja su pokazati korelaciju nedostatka vitamina D s antropometrijskim mjerama te utvrditi postoje li razlike u statusu vitamina D između skupina žena oboljelih od endometrioze, sindroma policističnih jajnika i hipotireoze te ih usporediti sa skupinom žena koje nemaju ženski uzrok neplodnosti, ali i utvrditi postoji li razlika u statusu vitamina D između žena koje su ostale trudne i onih koje nisu.

Hipoteze:

- učestalost nedostatka vitamina D među neplodnim ženama je jednaka učestalosti među svjetskom populacijom
- vitamin D pokazuje modulirajući učinak na hormonske parametre plodnosti
- žene koje su teže, kao i one koje puše imaju niži status vitamina D
- žene oboljele od endometrioze, PCOS-a imaju niži status vitamina D od kontrolne skupine.
- žene oboljele od hipotireoze ne pokazuju niže vrijednosti vitamina D
- žene koje su ostale trudne, imaju viši status vitamina D od onih koje su ostale trudne

3. ISPITANICI I METODE

3.1. Ispitanici

Ispitanici su sve žene liječene metodama medicinski potpomognute oplodnje (MPO) u Laboratoriju za medicinski potpomognutu oplodnju KBC-a Split (Centar).

Kriteriji uključenja:

1. Pacijentice liječene metodama MPO u KBC-u Split
2. Uzorci krvi obrađeni u Centralnom laboratoriju Zavoda za medicinsko laboratorijsku dijagnostiku KBC-a Split (Centralni laboratoriji)
3. Razlika nalaza hormona i vitamina D manja od 6 mjeseci

Kriteriji isključenja:

1. Uzorci krvi obrađivani u drugim vanjskim laboratorijima
2. Razlika nalaza hormona i vitamina D viša od 6 mjeseci
3. Pacijentice na prethodnoj terapiji vitaminom D

3.2. Mjesto istraživanja

Istraživanje je provedeno na Zavodu za ginekološku endokrinologiju i humanu reprodukciju Klinike za ženske bolesti i porode KBC-a Split.

1.2. Organizacija istraživanja

Provedeno istraživanje po organizaciji je retrospektivno presječno istraživanje.

1.3. Opis istraživanja

Prema podacima iz upisnih knjiga Centra za MPO izvučene su pacijentice liječene u razdoblju od siječnja 2017. do svibnja 2018. godine. Iz pismohrane Centra prikupljeni su protokoli pacijentica odakle su izvučeni potrebni podatci koji su kasnije provjeravani u Centralnom laboratoriju. Oni nalazi koji nisu odgovarali nalazima iz Centralnog laboratorija izbačeni su iz analize, kao i oni kojima je razlika između napravljenih nalaza bila viša od 6 mjeseci.

Podatci o tjelesnoj težini, visini i pušenju prikupljeni su kontaktiranjem pacijentica.

Promatrani parametri su :

- dob
- tip neplodnosti

- uzrok neplodnosti (muški, ženski, kombinirani, nepoznat)
- antropometrijski parametri (tjelesna težina i visina, indeks tjelesna mase)
- pušenje
- nalazi hormona mjereni 2-5. dana menstrualnog ciklusa FSH, LH, AMH, estradiol, ukupni testosteron, progesteron, TSH, prolaktin
- nalaz vitamina D
- datum izrađivanja vitamina D

Prema uzrocima neplodnosti pacijentice su podijeljene u četiri skupine: pacijentice bez ženskog uzroka neplodnosti, pacijentice oboljele od sindroma policističnih jajnika, pacijentice oboljele od endometrioze i pacijentice oboljele od hipotireoze. One pacijentice koje su imale kombinaciju bolesti uz izbačene iz skupina i ostavljene samo u ukupnoj obradi podataka. Pacijenti su također podijeljene u skupinu onih koje su ostale trudne i onih koje nisu.

1.4. Metode određivanja laboratorijskih parametara

Koncentracije vitamina D i reproduktivnih hormona analizirane su imunokemijskom elektrokemoluminiscentnom metodom proizvođača Roche na analizatoru Cobas e601.

1.5. Statistička obrada podataka

Prikupljeni podaci obrađivani su u programskim paketima Microsoft Office za obradu teksta te Microsoft Excel za izradu tabličnoga prikaza. Za statističku analizu korišteni su računalni programi Microsoft Excel for Windows version 11.0 (Microsoft Corporation) i SPSS 19.0 (IBM Corp, Armonk, NY).

Kvantitativne varijable su prikazane srednjom vrijednosti i standardnom devijacijom, dok su kategorijske varijable izražene u frekvencijama i postotcima. Razlike srednjih vrijednosti kvantitativnih podataka između skupina testirane su t-testom za nezavisne uzorke i jednosmjernom analizom varijance (ANOVA), ovisno o razdiobi podataka. Usporedba kategorijskih varijabli testirana je hi-kvadrat testom. Kod kvantitativnih podataka za ispitivanje povezanosti je korišten Pearsonov koeficijent korelacije. Razina statističke značajnosti za dvostrane testove postavljena je na $p < 0.05$.

4. REZULTATI

U istraživanje je uključeno ukupno 66 ispitanica liječenih metodama potpomognute oplodnje u KBC-u Split. Prosječna dob iznosila je 34,2 ($\pm 4,4$) godine. Najmlađa pacijentica imala je 22 godine, a najstarija 47 godina. Podijeljene u dvije dobne skupine, 62,1% žena je bilo je mlađe od 35 godina, a 37,9% starije od 35 godina.

Prosječna tjelesna težina pacijentica iznosila je 65,1 kg (raspon 50-84 kg), a prosječni indeks tjelesne mase (ITM) je iznosio 22,69 kg/m² (raspon 17,5-28). Pacijentice su podijeljene prema BMI u 3 kategorije: ITM <25 kg/m², 25-30 kg/m² i >30 kg/m². 51 pacijentica (79,7%) je pripadala skupini ITM <25, 13 pacijentica (20,3%) je bilo u skupini ITM 25-30, dok niti jedna pacijentica nije imala ITM iznad 30 kg/m².

U ispitivanom uzorku, 25 žena (37,9%) su pušačice, dok ih 38 (57,6%) ne puši.

Prema tipu neplodnosti, 57 pacijentica (86,4%) se liječi pod dijagnozom primarne neplodnosti, a njih 9 (13,6%) pod dijagnozom sekundarne neplodnosti (tablica 7).

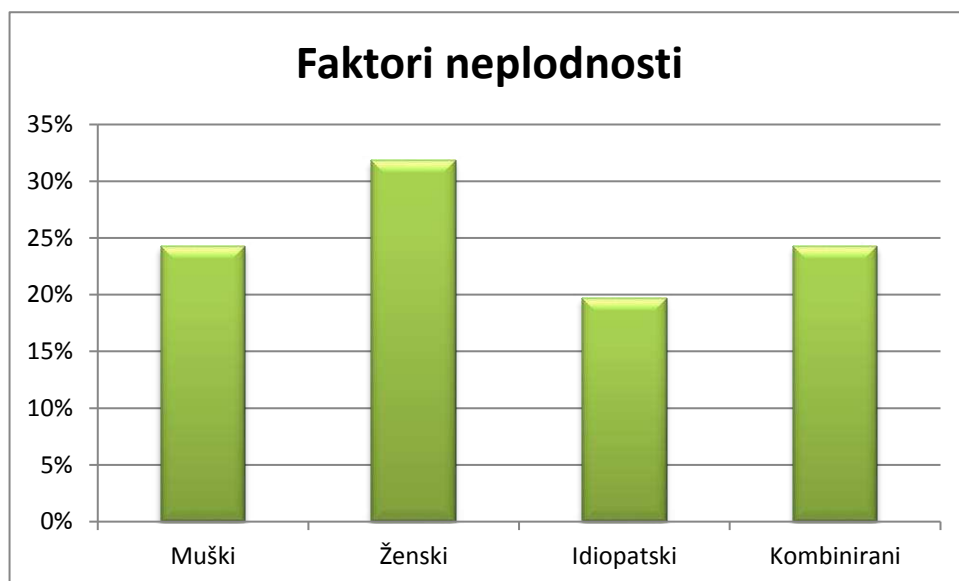
Tablica 7. Prikaz antropometrijskih i demografskih parametara

Parametar	Mean \pmSD / Broj (%)	Raspon
Dob (godine)	34,2 \pm 4,4	22-47
Visina (cm)	169,4 \pm 4,45	155-180
Težina (kg)	65,1 \pm 7,3	50-84
ITM kg/m²	22,69 \pm 2,34	17,5-28
Pušenje		
DA	25 (37,9%)	
NE	38 (57,6%)	
Tip neplodnosti		
Primarna	57(86,4%)	
Sekundarna	9 (13,6%)	

ITM – indeks tjelesne mase

Prema učestalosti, muški faktor bio je uzrokom neplodnosti u 24% parova, ženski u 32%, kombinirani u 24%, a 20% parova bilo je idiopatski neplodno (slika 7).

Slika 7. Prikaz udjela pojedinog faktora neplodnosti



Prosječne vrijednosti hormona ispitanica ukupnom uzorku prikazane su u tablici 8 i ukazuju na uredne prosječne vrijednosti, osim za vitamin D čiji ukupni postotak ukazuje na nedostatak.

Prosječna vrijednost vitamina D iznosila je 57,7 nmol/L, sa standardnom devijacijom SD $\pm 22,2$. Najniža izmjerena vrijednost je iznosila 12 nmol/L, a najviša 111,2 nmol/L.

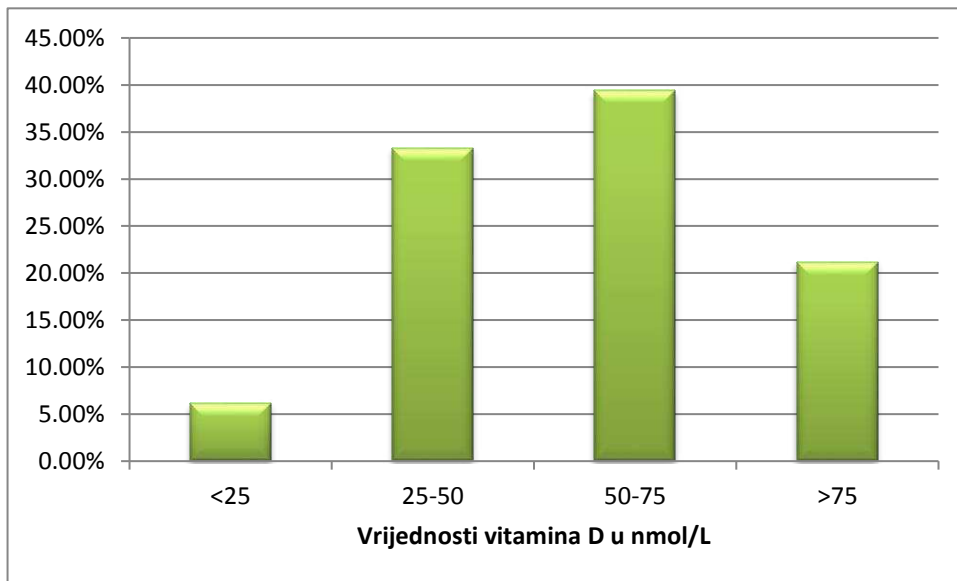
Tablica 8. Prikaz vrijednosti mjerenih hormona

	N	Mean	SD	Min	Max
Vit D (nmol/L)	66	57,7	$\pm 22,2$	12,2	111,2
FSH (IU/L)	49	7,1	$\pm 2,2$	2,6	13,8
LH (IU/L)	51	6,3	$\pm 2,8$	1,8	12,7
AMH (pmol/L)	61	19,5	$\pm 14,1$	1,4	66,4
E₂ (pmol/L)	47	202,7	$\pm 115,4$	37,7	619
T (nmol/L)	42	0,9	$\pm 0,4$	0,1	1,9
P₄ (nmol/L)	13	0,8	$\pm 0,5$	0,2	1,7
TSH (mIU/L)	38	2,0	$\pm 0,9$	0,1	4,9
PRL (mIU/L)	44	439,9	$\pm 282,6$	115	1586

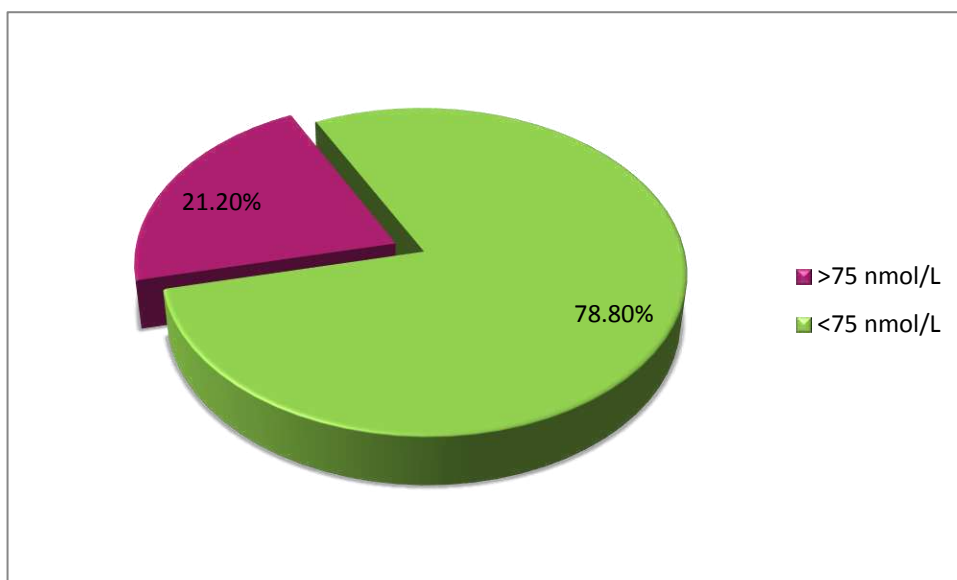
Vit D – vitamin D; FSH – folikulostimulirajući hormon; LH – luteinizirajući hormon; AMH – Anti-Müllerov hormon, E₂ – estradiol, P₄ – progesteron; TSH – tireostimulirajući hormon; PRL - prolaktin

Vrijednosti vitamina D su podijeljene u 4 kategorije: <25 nmol/L, 25-50 nmol/L, 50-75 nmol/L i >75 nmol/L. 6,1% pacijentica je imalo vrijednosti ispod 25 nmol/L. 33,3% pripada skupini 25-50 nmol/L, 39,4% u skupini 50-75, a samo 21,2% pacijentica je imalo vrijednosti vitamina D više od 75 nmol/L. Kumulativni postotak nedostatka vitamina D iznosi 78,8%, dok je uredne vrijednosti imalo samo 21,2% pacijentica (slike 8 i 9).

Slika 8. Prikaz postotka vitamina D po kategorijama



Slika 9. Prikaz raspodjele optimalnih i sniženih vrijednosti vitamina



Uspoređujući razlike vitamina D između skupine žena mlađih od 35 godina i stariji od 35 godina, nije pokazana statistički značajna razlika ($t=0,29$, $p=0,773$).

Također nije pokazana statistički značajna razlika vitamina D s indeksom tjelesne mase između skupina žena s ITM <25 kg/m² i skupine ITM 25-30 kg/m² (t=0,501, p=0,618).

Povezanost vitamina D i pušenja, iako nije dosegla statističku značajnost, pokazuje trend prema inverznoj ovisnosti (t=1,837, p=0,066).

Prema datumu određivanja vitamina D, rezultati nalaza su podijeljeni u dvije skupine: ljetnu, od 1. travnja do 31. rujna, i zimsku, od 1. listopada do 31. ožujka. Izračunata prosječna vrijednost za ljetnu skupinu iznosi 66,24 nmol/L, a za zimsku 51,52 nmol/L. T-testom pokazana je statistički značajna razlika između ovih dviju skupina (t=2,796, p=0,007).

Analizirajući postoji li sezonska cikličnost AMH koja bi pratila cikličnost vitamina D, nije pokazana statistički značajna razlika među ispitanicima ukupno (t=0,172, p=0,864). Ispitujući samo prvu skupinu žena, postoji trend ostvarivanja cikličnosti, ali nije dosegnuo statističku značajnost (t=1,996, p=0,058)

Pearsonovim koeficijentom korelacije nije pokazana statistički značajna razlika između vitamina D i spolnih hormona, a rezultat je potvrđen t-testom (tablica 9).

Tablica 9. Prikaz povezanosti vitamina D sa spolnim hormonima

		FSH	LH	AMH	E₂	T	P₄	TSH	PRL
Vit D	Pearson	0,72	0,055	0,029	0,090	0,007	0,351	0,1480	0,157
	correlation								
	p	0,209	0,700	0,827	0,548	0,965	0,239	0,374	0,310

Vit D – vitamin D; FSH – folikulostimulirajući hormon; LH – luteinizirajući hormon; AMH – Anti-Müllerov hormon; E₂ – estradiol; P₄ – progesteron; TSH – tireostimulirajući hormon; PRL – prolaktin

Pacijentice su podijeljene u 4 skupine ovisno o uzroku neplodnosti: pacijentice bez ženskog uzroka neplodnosti (grupa 1), pacijentice oboljele od endometrioze i adenomioze (grupa 2), pacijentice oboljele od hipotireoze (grupa 3) i pacijentice oboljele od sindroma policističnih jajnika (grupa 4). Između njih je napravljena jednosmjerna analiza varijance (ANOVA) koja je pokazala statistički značajne razlike za FSH (F=3,24, p=0,035), AMH (F=42,26, p= 0,000), estradiol (F=3,85, p=0,018) i testosteron (F=3,15, p=0,04), dok ostali

promatrani hormoni i ITM nisu pokazali statističku značajnost između grupa. Usporedba za vitamin D pokazala je naizgled velike razlike srednjih vrijednosti vitamina D između skupina, posebno između skupina žena sa endometriozom i PCOS-om ($70,6 \pm 26,7$ naprema $50,6 \pm 23,5$). Usprkos razlici od 20 nmol/L između ove dvije skupine, nije pokazana statistički značajna razlika, kao ni između drugih ispitivanih skupina. Post-hoc usporedba Scheffeovim testom potvrdila je statističku značajnost za AMH između skupine 4 sa svim ostalim skupinama ($p=0,000$), te za estradiol između skupina 2 i 4 ($p=0,039$). Nije potvrđena statistički značajna razlika za ranije pokazane FSH i testosteron.

U usporednoj korelaciji ITM između grupa 1 i 4, ispitivanje povezanosti t-testom je pokazalo statističku značajnost ($t=-3,11$, $p=0,004$), ali ispitivanje Scheffeovim testom u međusobnom povezivanju između grupa nije pokazalo tu značajnost ($p=0,086$).

U ispitivanju povezanosti spolnih hormona s pušenjem pokazano je da žene koje puše imaju statistički značajno viši AMH ($t=2,26$, $p=0,027$) i niži prolaktin ($t=-2,104$, $p=0,042$), dok utjecaj na druge hormone nije pokazan (tablica 11).

Tablica 11. Povezanost pušenja i spolnih hormona.

Pušenje	ITM	FSH	LH	AMH	E2	T	P4	TSH	PRL
t	1,368	0,162	0,239	2,266	1,239	1,178	0,182	0,246	-2,104
p	0,176	0,872	0,812	0,027*	0,222	0,246	0,859	0,807	0,042*

*t-test za nezavisne uzroke, * $p > 0,05$; FSH – folikulostimulirajući hormon; LH – luteinizirajući hormon; AMH – Anti-Müllerov hormon; E₂ – estradiol; P₄ – progesteron; TSH – tireostimulirajući hormon; PRL – prolaktin*

Vodeći se hipotezom da bi žene u skupini PCOS-a mogle više pušiti, pomoću χ^2 - testa testirali smo razliku skupine PCOS i ostalih skupina zajedno. χ^2 -test nije pokazao statistički značajnu razliku u pušenju 4 skupine sa svim ostalima ($p=0,181$). Također ispitujući puše li više mlađe žene, također nismo pronašli statistički značajne razlike ($p=0,994$).

Od ukupnog uzorka žena izvukli smo skupinu žena koje su ostale trudne, te smo njihove nalaze vitamina D usporedili sa skupinom žena koje nisu ostale trudne. 25 pacijentica (37,9%) su ostale trudne, dok njih 41 (62,1%) nisu ostale trudne, a prosječne mjerene

vrijednosti nisu dosegule statistički značajnu razliku ($59,9 \pm 24,5$ nmol/L naprema $56,4 \pm 20,8$ nmol/L; $p=0,530$).

Tablica 12. Prikaz povezanosti mjerenih parametara s vitaminom D

Vitamin D	N	Mean (nmolL)	±SD	p
Dob				
<35 godina	41	58,4	±22,7	0,773
>35 godina	25	56,7	±21,8	
ITM				
>25 kg/m ²	51	57,1	±21,8	0,616
25-30 kg/m ²	13	60,5	±25,4	
Pušenje				
Da	25	51,5	±21,5	0,066
Ne	38	62,2	±22,5	
Trudnoća				
Trudne	25	60	±24,6	0,530
Nisu trudne	41	56,4	±20,9	
Žene bez ženskog uzroka neplodnosti	25	61,8	±22,6	
Endometrioza	5	70,6	±26,8	0,896*
Hipotireoza	10	61,5	±22,6	1,0*
PCOS	12	50,6	±23,6	0,599*

**p-vrijednosti u usporedbi pojedine skupine sa skupinom žena bez ženskog uzroka; PCOS – sindrom policističnih jajnika*

5. RASPRAVA

Među svim trendovima 21. stoljeća, rađanje u starijoj reproduktivnoj dobi postaje nova moda koja, unatoč zrelijim stavovima budućih roditelja, ipak prkosi prirodno podobnim uvjetima za trudnoću ali i demografskoj slici cijeloga svijeta.

Još jedan od novih trendova 21. stoljeća, u domeni znanosti postaje i istraživanje uloga vitamina i minerala koji, do sada zanemareni, danas izlaze na svjetlo dana i pronalaze svoj smisao u znanstvenim istraživanjima i kliničkoj praksi. Jedan od njih je i vitamin D koji se počima istraživati još 20-ih godina prošlog stoljeća, a u posljednjih desetak godina možda postaje kamenom mudraca (123).

Današnje statistike kažu kako je svaki četvrti par neplodan, a prema definiciji Svjetske zdravstvene organizacije neplodnim se smatra onaj par koji nakon godinu dana redovitih, nezaštićenih spolnih odnosa ne ostvaruje kliničku trudnoću (95,98). Uzroci neplodnosti su razni, ali starija dob kao sve češći uzrok neplodnosti ima veliko zaleđe u liberalnijim socijalnim stajalištima, drugačijim ekonomskim mogućnostima i emancipiranim svjetonazorima. Kao posljedica istih psihosocijalnih modela, pušenje, konzumacija alkohola i debljina danas predstavljaju rastući problem čije su epigenetske i genetske posljedice dekremtne kako za zdravlje općenito, tako i za neplodnost. Također, sve veća pojavnost spolno prenosivih bolesti postaje čestim uzrokom neplodnosti kod obaju spolova, a njihove posljedice su dalekosežne. Oboljenja kao što su sindrom policističnih jajnika, endometrioza, te svi uzroci koji smanjuju prohodnost jajovoda i receptivnost endometrija značajni su uzroci neplodnosti kod žena. Kod muškaraca, neplodnost se može početi razvijati još u dječjoj dobi kao posljedica kriptorhizma, varikokele i brojnih genskih anomalnosti, a u odrasloj dobi, najčešće je posljedica utjecaja nekih okolinskih polutanata, infekcija, karcinoma testisa kao i korištenja nekih lijekova i aktivnih supstanci.

Vitamin D se u svom djelovanju ponaša kao hormon, a njegova aktivnost posredovana je vitamin D receptorom (VDR). Iako svoju glavnu ulogu ostvaruje u metabolizmu kalcija, fosfata i kostiju, danas se sve više istražuje njegova ekstraskelena uloga. Važne okosnice njegova novootkrivenog djelovanja su imunomodulatorne, antiproliferativne, antiangiogenetske i protuupalne te se kroz prizmu njih kristaliziraju pojedinačne uloge u svakom organskom sustavu. Svjetska istraživanja pokazuju da oko 88% populacije ima nedostatak vitamina D, što je zabrinjavajući podatak obzirom na mnoge njegove dobrobiti (93). Uzroci tako poražavajućih podataka su brojni, a neki od njih uključuju smanjeno izlaganje suncu, korištenje krema za sunčanje, ženski spol, pretilost, stariju životnu dob i

tamniju put (3,4). Posljedice, su jednako tako brojne. Danas je već u više istraživanja pokazano da vrijednosti vitamina D niže od 50 nmol/L povećavaju rizik nastanka karcinoma debelog crijeva, prostate i dojke za 30-50% te su povezane sa slabijim preživljenjem od ovih bolesti, ali postoje i poveznice s mnogim drugim autoimunim i kardiovaskularnim oboljenjima (5).

Cilj ovog istraživanja bio je pokazati mogu li se te dobrobiti ostvariti u pogledu hormonskih parametara plodnosti i trudnoće kod žena liječenih postupcima MPO te postoje li razlike u tim parametrima između skupina žena oboljelih od endometrioze, PCOS-a i hipotireoze kao čestih uzroka neplodnosti.

Era istraživanja utjecaja vitamina D u reproduktivnom sustavu žene i muškarca započela je otkrivanjem postojanja vitamin D receptora (VDR) na centralnim i perifernim organima spolnog sustava. Slijedila su ih ispitivanja u modelima *knock-out* miševa kojima su učinjene ciljane ablacije VDR-a te pojedinih enzima uključenih u aktivaciju vitamina D. Ta istraživanja su pokazala brojne anomalnosti anatomskog razvoja i kasnije disfunkciju organa reproduktivnog sustava kao i drugih organskih sustava (49-54). Kasnija istraživanja su postavila hipotezu da bi stroga dijeta s visokim udjelom kalcija kao i nadomjestak estradiola tim miševima mogli ispraviti ove anomalnosti, što se u konačnici pokazalo istinitim. Time se pokazao značaj metabolizma kalcija u razvitku organa reproduktivnog sustava, ali i značajna uloga vitamina D u posredovanju njegova metabolizma (9,53-55).

Zatim su se postavljala pitanja i hipoteze o utjecaju vitamina D na spolne hormone koje su istraživali mnogi autori, ali rezultati studija ne pokazuju jednoznačne rezultate.

Jedan od glavnih pronalazaka koji je dao obrise buduće slike istraživanja utjecaja vitamina D na markere plodnosti bila je spoznaja da AMH prati cikličnost vitamina D između godišnjih doba koju su pokazali Dennis i suradnici (59), kao i otkriće postojanja *vitamin D response element* (VDRE) u promotorskoj regiji gena za AMH (56). Rezultati našeg istraživanja pokazuju sezonsku razliku vitamina D, dok slijedeći primjer Dennisovog istraživanja, nismo uspjeli pokazati statistički značajnu razliku u sezonskoj promjeni AMH za sve ispitanice ukupno. Ispitujući samo uzorak žena bez ženskog uzroka neplodnosti pokazuje se rubna tendencija ostvarivanja cikličnosti, ali nije dosegnuta statistički značajna razlika. Razlike između ovih rezultata se mogu objasniti činjenicom da u ukupnom uzorku imamo 12 žena oboljelih od PCOS-a s prosječnom vrijednosti AMH $41,9 \pm 10,9$ pmol/L koji bi mogli

utjecati na vjerodostojnost rezultata. Razlog graničnosti nalaza za skupinu žena bez ženskog uzroka neplodnosti može se objasniti malim brojem ispitanika (n=25).

Istraživanja o utjecaju na spolne hormone daju vrlo heterogene rezultate. Merhi i suradnici u svom istraživanju pokazuju povećanje stvaranja progesterona u prisutnosti prekursora pregnenolona i vitamina D (57), a ti rezultati su analogni rezultatima Parikha i suradnika koji pokazuju da je inkubacija humanih jajnih stanica s vitaminom D potaknula veće stvaranje progesterona, estrogena, estrona i *insulin-like growth factor 1* (60). Suprotne rezultate donose Knight i suradnici čiji rezultati kažu da povećanje 25(OH) D_3 za 10 nmol/L, smanjuje progesteron za faktor od 10%, a estradiol za faktor od 3% (61).

Chang i suradnici iznose pozitivnu korelaciju ukupnog testosterona i vitamina D, kao i korelaciju sa estradiolom i indeksom slobodnih androgena kod zdravih, ne pretilih žena (58). Yildizhan i suradnici pokazuju negativnu korelaciju testosterona i vitamina D kod žena oboljelih od PCOS-a (65).

U kulturi humanih granulosa stanica, Merhi i suradnici su pokazali smanjenu ekspresiju FSH receptora i AMH II receptora, ali bez utjecaja na AMH nakon inkubacije stanica kalcidiolom (57).

Istraživanje koje su proveli Pagliardini i suradnici u sjevernoj Italiji nije pokazalo korelacije između vitamina D i FSH, LH, estradiola, prolaktina, TSH i AMH (124).

Chang i suradnici su pokazali da u njihovom istraživanju nije bilo povezanosti s LH, dehidroepiandrosteronom (DHEAS) i 17 α -hidroksiprogesteronom, kao ni s AMH i FSH (58).

U našem istraživanju nije pokazana statistički značajna razlika između vitamina D i FSH, LH, AMH, estradiola, progesterona, ukupnog testosterona, TSH i prolaktina. Ovako velika heterogenost između naših rezultata i opisanih istraživanja, ali i između njih samih može se objasniti s mnogo stajališta. Preporuke za vrednovanje nedostatka vitamina D koje koriste pojedine studije su različite. Pagliardini i suradnici poslužili su se graničnom vrijednosti vitamina D od 75 nmol/L prema smjernicama društva *Endocrine Society*, dok su se Chang i suradnici rukovodili granicom od 50 nmol/L (58). Također različite biokemijske metode se koriste između studija u određivanju vitamina D kao što su imunokemijske metode koje pokazuju veću varijabilnost za razliku od kromatografskih metoda i tandemске masene spektrometrije (124). Osim pitanja kvantitavnih mjerenja, postoje i razlike između tjelesnih uzoraka koje su koristili pojedini istraživači za određivanje vitamina D. Merhi je u svom

istraživanju koristio mjerenja folikularne tekućine (57), dok su drugi koristili serumske uzroke. Također postoje određene razlike između geografskih širina provedenih studija, broja uključenih ispitanika, dobi, etniciteta, rase i kulture življenja ispitanika.

Rezultati našeg istraživanja najviše odgovaraju rezultatima Pagliardinija i suradnika (125), a također se podudaraju i po dizajnu studije: obje studije su retrospektivne, korištene su jednake biokemijske metode određivanja kalcidiola, a po geografskoj širini se može ugrubo zaključiti da su ekvidistantne. Razlike između studija uključuju antropometrijska mjerenja, nedostatak podataka o metodi određivanja spolnih hormona te razlika u broju ispitanika.

Nakon ispunjenih ciljeva istraživanja, koji za sada nisu pokazali statistički značajnu razliku, htjeli smo vidjeti postoji li razlika u mjerenim parametrima između grupa žena oboljelih od endometrioze, hipotireoze i PCOS-a te vidjeti postoji li razlika u statusu vitamina D između žena koje su ostale trudne i onih koje nisu.

Sindrom policističnih jajnika je stanje koje osim posljedica na reproduktivno zdravlje, ima i brojne nepovoljne metaboličke učinke, a utjecaj vitamina D na obje razine pokazuje pozitivne korelacije.

Wher i suradnici su proveli istraživanje u kojem su uspoređivali 545 žena oboljelih od PCOS-a s 145 žena kontrolne skupine koje su bile zdrave. Rezultati usporedbe prosječnih vrijednosti vitamina D govore u prilog većoj pojavnosti hipovitaminoze D kod žena oboljelih od PCOS-a (66,1% naprema 43,4%; $p < 0,001$) uz postavljenju graničnu vrijednost vitamina D na 75 nmol/L (126). Za jednako postavljenu graničnu vrijednost vitamina D jednake rezultate donose i Mazloomi i suradnici koji također nalažu veću pojavnosti hipovitaminoze kod žena oboljelih od PCOS-a (127). Za razliku od njih, Li i suradnici nisu pokazali statističku značajnost u vrijednosti vitamina D uspoređujući žene s PCOS-om i žene koje su imale uredne ovulatorne cikluse a liječe se od neplodnosti (128). U suprotnosti svim navedenim radovima, Mahmoudi i suradnici, istražujući mogu li se abnormalnosti vitamina D, PTH, kalcija i fosfora povezati s rizikom za PCOS i pretilost, našli su korelaciju da žene oboljele od PCOS-a imaju značajno više vrijednosti vitamina D (129), a trend inverze ovisnosti ovih parametara prikazuju Panidis i suradnici (130).

Naše istraživanje je pokazalo da žene oboljele od PCOS-a nisu pokazale statističku značajnost u odnosu na ostale skupine iako se moguća razlika mogla naslutiti iz prosječnih

vrijednosti vitamina D, posebno između skupina žena s PCOS-om i s endometriozom ($50,6 \pm 23,5$ naprema $70,6 \pm 26,7$).

Obzirom da je Mahmoudi pokazao da žene oboljele od PCOS-a imaju i značajno više vrijednosti PTH, prva sumnja pada na povezanost ovih mehanizama jer je poznato da PTH povećava aktivnost 1α -hidroksilaze. U konačnici ovog rada se njihova zavisnost ne povezuje, a glavna sumnja pada na to da se vitamin D povisio kao kompenzacija inzulinske rezistencije. Razlozi zašto kod žena oboljelih od PCOS-a pronalazimo i snižene vrijednosti vitamina D mogu ležati i u činjenici da PCOS u svojoj patofiziološkoj i kliničkoj slici, nosi debljinu i dlakavost. Psihološke posljedice toga su da se oboljele žene manje sunčaju i nose odjeću koja prekriva veći dio tijela. Razlika s našim rezultatima u kojima ne pronalazimo značajnu razliku, može kriti uzročno-posljedičnu vezu da niti jedna naša pacijentica nije imala BMI viši od 28 kg/m^2 te da je 62% žena pripadalo skupini s BMI nižim od 25 kg/m^2 , pa su pacijentice u toj skupini zadovoljnije svojim izgledom i vjerojatno se više izlažu suncu.

Endometrioza je estrogenski ovisna bolest, a zbog svojih proliferativnih, angiogenskih i upalnih svojstava zanimljiva je meta istraživanja povezanosti s vitaminom D. Kao ni za do sada navedena istraživanja, ni istraživanja o endometriozu i vitaminu D ne daju jednoznačne podatke.

U istraživanju Miyashite i suradnika ispitivan je *in vitro* utjecaj $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ na endometralne stromalne stanice (ESS) sakupljene iz ovarijskih endometrioma. Ispitivan je utjecaj na citokine i dokazano je statistički značajno smanjenje IL- 1β i TNF- α ali i odgovor drugih citokina uključenih u patofiziologiju ove bolesti. Također, između oboljelih i kontrola nije pokazana značajna razlika u vrijednostima vitamina D, ali je pokazan veći gradijent vitamina D s težinom bolesti (80)

Somigliana i suradnici pokazali su da žene oboljele od endometrioze imaju više prosječne vrijednosti kalcidiola u serumu za razliku od kontrolne skupine, ali nije pokazana statistička značajnost za aktivnu formu, kalcitriol. Kao i Miyashita i suradnici, također su pokazali da koncentracije vitamina D u krvi koreliraju s težinom bolesti (9,81).

Između ovih studija, Hartwell je pokazao da su koncentracije kalcidiola bile slične kod žena s endometriozom i kontrolne skupine, dok su serumske koncentracije kalcitriola pokazale tendenciju prema višim vrijednostima kod oboljelih žena, ali razlika nije bila statistički značajna (82).

U našem istraživanju, uspoređujući prosječne vrijednosti vitamina D skupine žena sa endometriozom i ostalih skupina, nismo pronašli statistički značajnu razliku iako je skupina s endometriozom skoro dostizala preporučene vrijednosti vitamina D. Takav naš nalaz je u korelaciji sa istraživanjima Miyashita i Hartwella. U tumačenju mogućih razlika između naše i Hartwellove sa studijom Somigliana i suradnika, važno je naglasiti da su oni imali puno veći broj ispitanika nego naša i Hartwellova studija. U argumentiranju ovih razlika nije za zanemariti činjenicu da vrijednosti vitamina D više od 70 nmol/L predstavljaju rizični čimbenik za nastanak endometrioze (81). Obzirom na to, teško je tumačiti uzročno posljedičnu vezu vitamina D i endometrioze, ali važno je imati na umu pronalazak da su vrijednosti vitamina D više što je bolest u naprednijoj fazi obzirom na etiopatogenezu ove bolesti.

U ukupnom nalazu za skupine žena oboljelih od PCOS-a i endometrioze nismo pronašli statistički značajnu razlika što se također slaže s istraživanjem koje prikazuju Dressler i suradnici istražujući učestalost hipovitaminoze D u dva njemačka centra (131)

Hipotireoza među ženama koje se liječe od neplodnosti nije rijetka. Prema našem istraživanju 24% žena je imalo neki oblik hipotiroidizma, što bi značilo da svaka četvrta žena koja se liječi od neplodnosti ima nedovoljnu funkciju štitnjače. Prema istraživanju Mansournija i suradnika na Iranskoj populaciji, pokazan je inverzni odnos vitamina D i Hasimotova tiroiditisa, odnosno da za svakih 12,5 nmol/L se rizik za nastanak ove bolesti smanjuje za 19% (132). Ove podatke potkrepljuje Kim koji je pokazao da je nedostatak vitamina D povezan s autoimunim bolestima štitnjače i hipotireoze te da je niska serumska koncentracija vitamina D neovisno povezana s visokim vrijednostima TSH (133).

Naše istraživanje ne pronalazi statistički značajnu razliku između vitamina D žena s hipotireozom i kontrolne skupine, kao ni drugih skupina, ali se u usporedbi s navedenim studijama može jednostavno objasniti. Obzirom da se ženama koje ulaze u postupke potpomognute oplodnje rutinski mjeri TSH, onima kojima vrijednosti TSH nadmašuju 2,5 mU/L uvodi se terapija L-tiroksinom zbog povećanog rizika pobačaja, ranijeg porođaja i mogućeg negativnog utjecaja na razvoj središnjeg živčanog sustava ploda. (134). Uzimajući u obzir ovu činjenicu, nismo očekivali statističku značajnost za ovu skupinu žena.

Nedostatak vitamina D naširoko je ispitivan u pogledu IVF-a i ostvarenja kliničke trudnoće. Klinička trudnoća se definira kao trudnoća koja je potvrđena s visokim nalazom hCG-a i ultrazvučnim nalazom postojanja gestacijske vreće ili kucaja čedinjeg srca (135).

Jedno od prvih istraživanja o utjecaju vitamina D u trudnoći proveli su Ozkan i suradnici na 84 pacijentice u postupcima IVF-a (136). Oni su pokazali da je serumska koncentracija vitamina D korelirala s koncentracijama u folikularnoj tekućini te da su više vrijednosti povezane s ostvarenjem kliničke trudnoće. Analitički gledano, za svaki nmol/L porasta vitamina D, pokazala se 6% viša šansa ostvarivanja kliničke trudnoće. Također, pokazali su i veći postotak implantacija. Farzadi i suradnici su pokazali da su žene sa serumskim koncentracijama vitamina D višim od 30ng/mL (75 nmol/L) imale najveću šansu trudnoće. Također su te žene imale i značajno veću šansu dobitka embrija visoke kvalitete i transfera u stadiju blastociste, potkrjepljujući time pogodan utjecaj vitamina D i na jajnike i na endometriji (86).

Suprotne rezultate donose Anifandis i suradnici koji pokazuju da su više vrijednosti vitamina D u folikularnoj tekućini povezane s nepovoljnijim ishodom IVF-a u pogledu broja folikula i kvalitete embrija (137).

U istraživanjima koje su neovisno jedan o drugome proveli Aleyasin i Firouzabadi sa suradnicima nije pokazan utjecaj i povezanost statusa vitamina D na ishode IVF-a (138,139).

Da bi se razjasnio utjecaj vitamina D na receptivnost endometrija, njegova uloga ispitana je na modelu žena koje su u postupcima IVF-a išle na ostvarivanje trudnoće putem doniranih jajnih stanica. Ovo istraživanje je pokazalo da su uredne vrijednosti vitamina D povezane s većom šansom ostvarivanja kliničke trudnoće i pokazuje važnu ulogu vitamina D na receptivnost endometrija. (140).

U našem istraživanju nismo pokazali razlike u statusu vitamina D između žena koje su ostvarile trudnoću i onih koje nisu.

Firouzabadi u svom radu izlaže nekoliko objašnjenja ovako heterogenih rezultata (139). Vitamin D ima šarolike mogućnosti djelovanja, uključujući stimulaciju ovarijske steroidogeneze i sinteze *insuline-like growth factor-binding protein-1* (IGFBP-1) putem VDR-a, a također pojačava inhibitorni učinak inzulina na sintezu IGFBP-1. Inzulin i vitamin D stimuliraju produkciju estradiola, estrona i progesterona. Stoga ako postoji smanjenje

koncentracije glukoze u folikularnoj tekućini, ono će se odraziti kao negativni utjecaj na kvalitetu embrija. Također, vitamin D putem VDR-a inducira transkripciju gena HOXA10 koji je važan u implantaciji oplođene jajne stanice, te se time potkrepljuje nalaz bolje receptivnosti endometrija kod žena s optimalnim vrijednostima vitamina D. U sindromu policističnih jajnika vitamin D je pokazao mnoge pogodne učinke na metaboličke posljedice bolesti, posebno u pogledu inzulinske rezistencije. Predloženi obrazac djelovanja uključuje da povećanje koncentracije vitamina D u folikularnoj tekućini može utjecati na metabolizam glukoze i povećati iskorištavanje inzulina. Takvo stanje je nepoželjno zbog direktnog negativnog utjecaja na sazrijevanje oocite, rast stanica granulose i kumulusa i kvalitetu embrija te u konačnici na ishod IVF-a.

Bez obzira na podatak da nismo dokazali hipotezu da žene koje su ostale trudne su imale višu koncentraciju vitamina D, pretražujući literaturu i istražujući mnoge aspekte djelovanja vitamina D došli smo do teoretskog zaključka zašto bi vitamin D mogao imati povoljan utjecaj na ostvarivanje kliničke trudnoće, a koliko je nama poznato, takva poveznica još nije istraživana. Ideja razmišljanja je potekla čitajući o imunološkom utjecaju vitamina D. On je pokazao značajna imunomodulatorna svojstva, a pokazano je da suprimira i proliferaciju T limfocita i uzrokuje skretanje s Th1 na Th2 fenotip te olakšava indukciju T regulatornih stanica, što u prijevodu znači da se odgovor imunološkog sustava usmjerava s proupalnog, na protuupalni. Jedan od važnih posrednika proupalnog ugovora je TNF- α , čija je sinteza pod djelovanjem vitamina D suprimirana (38). Također istraživanja su pokazala da osim Th1 supresije, vitamin D suprimira i sintezu matriks metaloproteinaza (MMP), posebice tipova 2 i 9. Ovakva oba nalaza se potkrepljuju nalazima u modelima ulceroznog kolitisa i endometrioze koji također pokazuju supresiju (26,77-80). Ova dva medijatora upalnog odgovora su nam bitna ako ih promatramo kroz prizmu indukcije degradacije žutog tijela kao finalnih induktora luteolize (47). U smislu tog razmišljanja, ako više vrijednosti vitamina D djeluju inhibitorno na stvaranje ovih medijatora, to bi značilo da se funkcija žutog tijela može duže održati, kao i posljedično stvaranje progesterona koji podržava uvjete trudnoće. Može li takav utjecaj nadmašiti primjenu inhibitora ciklooksigeze i drugih lijekova koji se koriste u sprečavanju prerane luteolize ostaje u nasljedstvo budućim istraživanjima, ali barem u teoretskom smislu ih sigurno može podržati.

Obzirom da naše istraživanje, ali i istraživanja Firouzabadija i Aleyasina nisu pokazali povezanost, ali ni negativan utjecaj, ne smiju se zanemariti dobrobiti vitamina D u razvoju

ploda. Tijekom trudnoće nedostatak vitamina D je povezan s povećanim rizikom gestacijskog dijabetesa, ponavljanih spontanijih pobačaja, preeklampsije i intrauterinog zastoja rasta (1,16).

Prema svjetskim statistikama čak 88,1% populacije svijeta ima vrijednosti vitamina D ispod 75 nmol/L (93). Kod žena u postupcima MPO, istraživanja daju relativno slične podatke. Prema Pagliardiniju, u uzorku od 1072 žene u postupcima MPO, 77,4% je imalo vrijednosti niže od 75 nmol/L (30ng/mL) tijekom cijele godine (125). U meta-analizi Chu i suradnika koja je obuhvatila 11 istraživanja žena u postupku potpomognute oplodnje prikazuju se rezultati da je 74,3% žena vrijednosti niže 75 nmol/L, a samo 25,7% žena imalo uredne vrijednosti (141). Pacijentice u našem istraživanju su imale uredne vrijednosti vitamina D u 21,2% slučajeva, odnosno 78,8% žena je imalo nedostatak. Ovakav nalaz sugerira da žene koje se liječe od neplodnosti imaju jednak postotak nedostatka vitamina D kao i ukupna populacija. U svim velikim studijama u općoj populaciji nisu gledani samo zdravi ispitanici, već populacija u cjelini koja sa sobom nosi teret drugih bolesti za koje je pokazana povezanost s nedostatkom vitamina D (27-31,33,34,37,38). Prednost naše studije je što smo među ispitanicama izveli kontrolnu skupinu žena koje u anamnezi nisu imale niti jednu akutnu ili kroničnu bolest. U toj usporedbi nismo pronašli statistički značajnu razliku koja potvrđuje da bi žene koje se liječe od određenog uzroka neplodnosti imale niži status vitamina D od zdravih žena ($t=1,166$, $p=0,248$), što bi značilo da manjak vitamina D možda ne predstavlja dodatni negativni rizik, ali i dalje ne isključuje njegov mogući utjecaj na patofiziološku osnovu neplodnosti.

U perspektivi ljetnog razdoblja, prosječne vrijednosti vitamina D koje su iznosile $66,2 \pm 22,3$ nmol/L i dalje ne zadovoljavaju preporučene vrijednosti što nalaže da izlaganje suncu, čak i u našem podneblju, nije toliko realna opcija prevencije hipovitaminoze obzirom na današnji stil života. Stoga bi vrijedilo slijediti preporuke za nadoknadu vitamina D navedene u tablici 2.

U općoj populaciji neplodnih parova, muški faktor je uzrokom neplodnosti u 40 do 50% slučajeva, a ženski u 35 do 50%. Kombinacija oba uzroka nalazi se u oko 20% parova, a 10% parova pati od idiopatske neplodnosti (96,100). Prema faktorima neplodnosti, naši rezultati su pokazali da je muški faktor bio uzrokom neplodnosti u 24% parova, ženski u 32%, kombinirani u 24% i idiopatski u 20% parova. Razlozi ovih razlika vjerojatno leže u selektiranom uzroku pacijenata od kojih smo mogle retrospektivno prikupiti podatke i vjerojatno ne predstavljaju stvarnu sliku faktora neplodnosti u našem Centru, a ne mogu se

objasniti nedostatkom vitamina D jer je učestalost njegova manjka jednaka učestalosti u općoj populaciji.

Opće poznat je utjecaj pušenja na zdravlje. Povećani su rizici kardiovaskularnih oboljenja, razvitak karcinoma i autoimunih bolesti te mnogih oboljenja dišnog sustava, ali i neplodnosti. Prema podacima Eurostata iz 2014. godine, u 28 europskih zemalja ukupno puši oko 24% populacije, a podatci za Hrvatsku su nešto viši, 28,7% hrvatske populacije čine pušači (142). Među parovima koji prolaze postupke MPO-a, Pagliardiniji izlaže podatak da među njihovim ispitanicima je bilo 22% pušača (125). Među našim ispitanicama 37,9% pacijentica puši. Ovakve razlike mogu ležati u činjenicama da su cigarete znatno skuplje u Italiji i drugim europskim zemljama nego kod nas, ali i da se u naš habitus ponašanja kao mladoj zemlji članici Europske Unije (EU) još uvijek nisu uvriježile direktive EU i svijest o štetnosti pušenja. Također, zašto pacijentice koje se liječe od neplodnosti puše znatno više od hrvatskog prosjeka se može objasniti i sa stajališta da osobe koje puše imaju i viši rizik komorbiditeta, ali i neplodnosti koji su pokazali Sarokhani i suradnici (143). Ovakvi naši podatci su zabrinjavajući obzirom na činjenicu da aktivno pušenje smanjuje koncentraciju AMH i umanjuje uspjeh *in vitro* oplodnje (IVF). Osim toga, pokazano je da je potrebno skoro dvostruko više postupaka IVF-a za ostvarivanje trudnoće kod pušača, nego kod ne pušača što je ekonomski teret države, ali i psihološki teret pacijentica (144,145).

Ispitujući korelaciju pušenja cigareta s vitaminom D i hormonima pojedinačno pronašli smo sljedeće: žene koje su pušile su imale statistički značajno niži prolaktin i viši AMH, dok povezanost s drugim hormonima nije pokazana, a povezanost s vitaminom D pokazuje negativni trend iako nije dosegnuta statistička značajnost. Povezanost pušenja i prolaktina, iako na prvu ruku iznenađujući rezultat, pokazan je i u drugim studijama (146). Obzirom na činjenicu da je dopamin jedan od glavnih inhibitora sinteze prolaktina, pretpostavlja se uloga uključenja dopaminergičnih puteva u ovom mehanizmu, a ovoj sumnji dodatne temelje daje i pokazana negativna povezanost pušenja i Parkinsonove bolesti (146). Povezanost pušenja i AMH prvo nas je nagnala da ispitamo puše li više mlađe žene i one koje boluju od PCOS-a. U tim ispitivanjima nismo dobili značajnu razliku, stoga ovakav nalaz prema postojećoj literaturi ne možemo objasniti.

Prema nacionalnom izvješću Američkog centra za kontrolu i prevenciju bolesti (CDC) iz 2015. godine, prosječna dob pacijentica koje su prolazile postupke potpomognute oplodnje iznosila je 36 godina (147). U našem istraživanju prosjek dobi je iznosio 34,2 ($\pm 4,4$) godine, a

postotak žena mlađih od 35 godina iznosi 62,1%. Obzirom na to da je najveća stopa zanošenja između 20. i 30. godine i drastično opada nakon 38. godine, naše pacijentice se javljaju još uvijek u povoljnom razdoblju kada je uspjeh MPO-a zadovoljavajući.

Starija životna dob je povezana sa smanjenom sintezom vitamina D jer koža u tim godinama ima manje kolesterola iz kojeg bi se mogao sintetizirati vitamin D, ali i osobe starije životne dobi manje izlaze vani i ne izlažu se dovoljno suncu zbog nekih drugih komorbiditeta koji se javljaju s dobi (4). Naši rezultati nisu pokazali statističku značajnost između žena starijih i mlađih od 35 godina što smo i očekivali. Naša najstarija pacijentica imala 47 godina, a ta dob još uvijek ne predstavlja rizik za nedostatak vitamina D.

Prema dobivenim podacima, prosječni indeks tjelesne mase (ITM) naših pacijentica iznosi $22,69 \text{ kg/m}^2$, uz podatak da je najveći izmjereni ITM 28 kg/m^2 . Razlog uskog raspona ITM, odnosno što u istraživanju nemamo niti jednu pacijenticu s ITM iznad 28 kg/m^2 je u tome što sve žene koje imaju ITM iznad 30 kg/m^2 ne ulaze u postupke MPO zbog velikih rizika kasnije trudnoće, sindroma ovarijske hiperstimulacije i tromboembolijskih događaja, kao i slabog odgovora na terapiju u postupku. Također, jedno od ograničenja našeg istraživanja je što nismo mjerili težinu i visinu pacijentica, nego su antropometrijski podatci prikupljeni retrospektivo, prisjećanjem pacijentica.

Pretilost i nedostatak vitamina D danas uzimaju pandemijske razmjere, a njihova patofiziološka udruženost povezana je s kardiovaskularnim bolestima, dijabetesom tipa II, metaboličkim sindromom i drugim bolestima (148). Uzimajući u obzir našu ispitivanu populaciju, žene oboljele od PCOS-a su pod dodatnim rizikom obzirom na slične patofiziološke posljedice ovih bolesti. Današnja istraživanja pokazuju da osobe s većim udjelom masnog tkiva imaju veće kapacitete pohrane vitamina D i predstavljaju rizičnu skupinu za razvoj hipovitaminoze (19). To povlači hipotezu da pretile osobe imaju niže vrijednosti vitamina D u serumu što većina studija potvrđuje, a nalaz se potkrjepljuje i slabijim odgovorom na nadoknadu vitamina D kod pretilih. (149,150). Ipak, u literaturi ima istraživanja koja takvu povezanost ne pronalaze (151). U našem istraživanju, uspoređujući vitamin D s BMI-jem nismo pronašli statistički značajnu razliku između žena koje su imale $\text{BMI} < 25 \text{ kg/m}^2$ i žena s BMI-jem između $25\text{-}30 \text{ kg/m}^2$. Ovakav pronalazak se djelomično može objasniti činjenicom da u istraživanju nismo imali pacijentice koje bi pripadale skupini BMI-ja višeg od 30 kg/m^2 pa se ovaj nalaz treba tumačiti uz takvo ograničenje. Također

nismo pronašli ni statistički značajnu razliku u BMI-ju između skupne žena oboljelih od PCOS-a, kao ni njihovu razliku u vitaminu D s ostalim skupinama.

Naše istraživanje ima određena ograničenja. Obzirom da je istraživanje po svom tipu presječno, ono nam ne dopušta konačno utvrđivanje uzročno-posljedične veze promatranih parametara s vitaminom D. Podatci o težini, visini i pušenju su prikupljeni prisjećanjem pacijentica, stoga ne treba isključiti mogućnost skrivanja pravih podataka zbog sukoba interesa. Također, kod većeg dijela pacijentica svi nalazi nisu rađeni istovremeno, već je dopušten maksimalni odmak od 6 mjeseci.

6. ZAKLJUČCI

Učestalost nedostatka vitamina D među pacijenticama u postupcima medicinski potpomognute oplodnje iznosi 78,8%.

Vitamin D je u zimskom dijelu godine bio značajno niži nego u ljetnom dijelu godine.

Vitamin D nema utjecaja na FSH, LH, AMH, estadiol, testosteron, progesteron, TSH i prolaktin.

Status vitamina D se ne razlikuje između kontrolne skupine sa skupinama žena oboljelih od endometrioze, hipotireoze i sindroma policističnih jajnika.

Status vitamina D se ne razlikuje između žena koje su ostale trudne i onih koje nisu ostale trudne.

Vitamin D nije korelirao s indeksom tjelesne mase i pušenjem

Žene koje puše imaju niže koncentracije prolaktina i više koncentracije AMH.

7. POPIS CITIRANE LITERATURE

1. Irani M, Merhi Z. Role of vitamin D in ovarian physiology and its implications in reproduction. *Fertil Steril*. 2014 Aug;102(2):460-468.
2. Bikle DD. Vitamin D metabolism, mechanism of action, and clinical applications. *Biochem Biol*. 2014 Mar;21(3):319-29.
3. Mithal A, Wahl DA, Bonjour JP, Burckhardt P, Dawson-Hughes B, Eisman JA, i sur. Global vitamin D status and determinants of hypovitaminosis D. *Osteoporos Int*. 2009 Nov;20(11):1807-20.
4. Lips P. Vitamin D physiology. *Prog Biophys Mol Biol*. 2006 Sep;92(1):4-8
5. Holick MF, Chen TC. Vitamin D deficiency. *Am J Clin Nutr*. 2008 Apr;87(4):1080S-6S.
6. Fraser DR. Biochemical i clinical aspects of vitamin D function. *Br Med Bull*. 1981 Jan;37(1):37-42.
7. Miller WL. Genetic disorder of vitamin D biosynthesis and degradation. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2017 Jan;165(Pt A):101-8.
8. Weil PA. The diversity of the endocrine system. U: Rodwell VW, Bender DA, Botham KM, Kennelly PJ Weil PA. *Harper's illustrated biochemistry*. New York: McGraw-Hill Education; 2015. str. 498-517.
9. Lorenzen M, Boisen IM, Mortensen LJ, Lanske B, Juul A, Blomberg Jensen M. Reproductive endocrinology of vitamin D. *Mol Cell Endocrinol*. 2017 Sep;453:103-12.
10. Brenza HL, Kimmel-Jehan C, Jehan F, Shinki T, Wakino S, Anazawa H, i sur. Parathyroid hormone activation of the 25-hydroxyvitamin D3-1alpha-hydroxylase gene promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998 Feb;95:1387-91.
11. Kim MS, Fujiki R, Murayama A, Kitagawa H, Yamaoka K, Yamamoto Y, i sur. 1Alpha,25(OH)2D3-induced transrepression by vitamin D receptor through E-box-type elements in the human parathyroid hormone gene promoter. *Mol Endocrinol* 2007 Feb;21:334-42.
12. Bai X, Miao D, Li J, Goltzman D, Karaplis AC. Transgenic mice overexpressing human fibroblast growth factor 23 (R176Q) delineate a putative role for parathyroid hormone in renal phosphate wasting disorders. *Endocrinology* 2004 Nov;145:5269-79.
13. Christakos S, Ajibade DV, Dhawan P, Fechner AJ, Mady LJ. Vitamin D: Metabolism. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2010 Jun; 39(2): 243-53.

14. Dastani Z, Li R, Richards B. Genetic regulation of vitamin D levels. *Calcif Tissue Int.* 2013 Feb;92(2):106-17.
15. Masuda S, Byford V, Arabian A, Sakai Y, Demay MB, St-Arnaud R. Altered Pharmacokinetics of 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ and 25-Hydroxyvitamin D₃ in the Blood and Tissues of the 25-Hydroxyvitamin D-24-Hydroxylase (Cyp24a1). *Endocrinology.* 2005 Feb;146(2):825-34.
16. Nandi A, Sinha N, Ong E, Sonmez H, Poretsky L. Is there a role for vitamin D in human reproduction? *Horm Mol Biol Clin Investig.* 2016 Jan;25(1):15-28.
17. Haussler MR, Haussler CA, Whitfield GK, Hsieh JC, Thompson PD, Barthel TK, i sur. The nuclear vitamin D receptor controls the expression of genes encoding factors which feed the “Fountain of Youth” to mediate healthful aging. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2010 Jul;121(1-2):88-97.
18. Jones G, Strugnell SA, DeLuca HF. Current understanding of the molecular actions of vitamin D. *Physiol Rev.* 1998 Oct;78(4):1193-231.
19. Carrelli A, Bucovsky M, Horst R, Cremers S, Zhang C, Bessler M, i sur. Vitamin D Storage in Adipose Tissue of Obese and Normal Weight Women. *J Bone Miner Res.* 2017 Feb;32(2):237-42.
20. Jones G. Pharmacokinetics of vitamin D toxicity. *Am J Clin Nutr* 2008;88:582S-6S
21. Pludowski P¹, Holick MF², Grant WB³, Konstantynowicz J⁴, Mascarenhas MR⁵, Haq A⁶, i sur. Vitamin D supplementation guidelines. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2018 Jan;175:125-35.
22. Lips P¹, van Schoor NM. The effect of vitamin D on bone and osteoporosis. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2011 Aug;25(4):585-91.
23. Bikle D.D. Vitamin D and bone. *Curr Osteoporos Rep.* 2012 Jun;10(2):151–9.
24. Panda DK¹, Miao D, Bolivar I, Li J, Huo R, Hendy GN, i sur. Inactivation of the 25-hydroxyvitamin D 1 α -hydroxylase and vitamin D receptor demonstrates independent and interdependent effects of calcium and vitamin D on skeletal and mineral homeostasis. *J Biol Chem.* 2004 Apr 16;279(16):16754-66.
25. Ceglia L. Vitamin D and Its Role in Skeletal Muscle. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2009 Nov;12(6):628–33.
26. Li YC, Chen Y, Du J. Critical roles of intestinal epithelial vitamin D receptor signaling in controlling gut mucosal inflammation. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2015 Apr;148:179-83.

27. Vyas N, Companioni RC, Tiba M, Alkhawam H, Catalano C, Sogomonian R, i sur. Association between serum vitamin D levels and gastric cancer: A retrospective chart analysis. *World J Gastrointest Oncol*. 2016 Sep 15; 8(9): 688–94.
28. Maalmi H, Ordóñez-Mena JM, Schöttker B, Brenner H. Serum 25-hydroxyvitamin D levels and survival in colorectal and breast cancer patients: systematic review and meta-analysis of prospective cohort studies. *Eur J Cancer*. 2014 May;50(8):1510-21.
29. Grimm M, Cetindis M, Biegner T, Lehman M, Munz A, Teriete P, i sur. Serum vitamin D levels of patients with oral squamous cell carcinoma (OSCC) and expression of vitamin D receptor in oral precancerous lesions and OSCC. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2015 Mar; 20(2): e188–e195.
30. Wang JB, Abnet CC, Chen W, Dawsey SM, Fan JH, Yin LY, i sur. Association between serum 25(OH) vitamin D, incident liver cancer and chronic liver disease mortality in the Linxian Nutrition Intervention Trials: a nested case–control study. *Br J Cancer*. 2013 Oct;109(7):1997–2004.
31. Cho M1, Peddi PF, Ding K, Chen L, Thomas D, Wang J, i sur. Vitamin D deficiency and prognostics among patients with pancreatic adenocarcinoma. *J Transl Med*. 2013 Sep;11:206.
32. Zgaga L, O'Sullivan F, Cantwell MM, Murray LJ, Thota PN, Coleman HG. Markers of Vitamin D Exposure and Esophageal Cancer Risk: A Systematic Review and Meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2016 Jun;25(6):877-86.
33. Beveridge LA1, Witham MD. Vitamin D and cardiovascular system. *Osteoporos Int*. 2013 Aug;24(8):2167-80.
34. Mulrennan S, Knuiman M, Walsh JP, Hui J, Hunter M, Divitini M, i sur. Vitamin D and respiratory health in the Busselton Healthy Ageing Study. *Respirology*. 2018 Jun;23(6):576-82.
35. Williams S, Malatesta K, Norris K. Vitamin D and Chronic Kidney Disease. *Ethn Dis*. 2009 Autumn;19(4 Suppl 5):S5–8-11.
36. Shalaby SA, Handoka NM, Amin RE. Vitamin D deficiency is associated with urinary tract infection in children. *Arch Med Sci*. 2018 Jan;14(1):115–121.
37. Chen TC1, Holick MF. Vitamin D and prostate cancer prevention and treatment. *Trends Endocrinol Metab*. 2003 Nov;14(9):423-30.
38. Aranow C. Vitamin D and the Immune System. *J Investig Med*. 2011 Aug; 59(6):881–886.

39. Sim JJ, Lac PT, Liu IL, Meguerditchian SO, Kumar VA, Kujubu DA, i sur. Vitamin D deficiency and anemia: a cross-sectional study. *Ann Hematol.* 2010 May;89(5):447-52.
40. Wadhwa B, Relhan V1, Goel K, Kochhar AM, Garg VK. Vitamin D and skin diseases: A review. *Indian J Dermatol Venereol Leprol.* 2015 Jul-Aug;81(4):344-55.
41. Li YC, Pirro AE, Amling M, Delling G, Baron R, Bronson R, i sur. Targeted ablation of the vitamin D receptor: an animal model of vitamin D-dependent rickets type II with alopecia. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997;94(18):9831–9835.
42. Wrzosek M, Łukasziewicz J, Wrzosek M, Jakubczyk A, Matsumoto H, Piątkiewicz P, i sur. Vitamin D and the central nervous system. *Pharmacol Rep.* 2013;65(2):271-8.
43. Silverberg SJ. Vitamin D deficiency and primary hyperparathyroidism. *J Bone Miner Res.* 2007 Dec;22 Suppl 2:V100-4.
44. Muscogiuri G, Mitri J, Mathieu C, Badenhop K, Tamer G, Orio F, i sur. Mechanisms in endocrinology: vitamin D as a potential contributor in endocrine health and disease. *Eur J Endocrinol.* 2014 Sep;171(3):R101-10.
45. Belenchia AM, Tosh AK, Hillman LS, Peterson CA. Correcting vitamin D insufficiency improves insulin sensitivity in obese adolescents: a randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr* 2013;97:774–81.
46. Guyton AC, Hall JE. *Female Physiology Before Pregnancy and Female Hormones.* U: Guyton AC, Hall JE. *Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology.* Philadelphia: Saunders; 2011. Str 987-1002.
47. Šimunić V. Normalan menstruacijski ciklus. U: Šimunić V. i sur. *Reprodukcijska endokrinologija i neplodnost.* Zagreb: Školska knjiga; 2012. str.45-68.
48. Zec I, Tislaric-Medenjak D, Megla ZB, Kucak I. Anti-Müllerian hormone: a unique biochemical marker of gonadal development and fertility in humans. *Biochem Med (Zagreb).* 2011;21(3):219-30.
49. Johnson JA, Grande JP, Roche PC, Kumar R. Immunohistochemical detection and distribution of the 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor in rat reproductive tissues. *Histochem Cell Biol.* 1996 Jan;105(1):7-15.
50. Ma R, Gu Y, Zhao S, Sun J, Groome LJ, Wang Y. Expressions of vitamin D metabolic components VDBP, CYP2R1, CYP27B1, CYP24A1, and VDR in placentas from normal and preeclamptic pregnancies. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2012 Oct;303(7):E928-35.

51. Bikle D.D, Patzek S, Wang Y. Physiologic and pathophysiologic roles of extra renal CYP27b1: Case report and review. *Bone Rep.* 2018 Jun; 8: 255–67.
52. Stumpf WE, Sar M, O'Brien LP. Vitamin D sites of action in the pituitary studied by combined autoradiography-immunohistochemistry. *Histochemistry.* 1987;88(1):11-6.
53. Panda DK, Miao D, Tremblay ML, Sirois J, Farookhi R, Hendy GN, Goltzman D. Targeted ablation of the 25-hydroxyvitamin D 1 α -hydroxylase enzyme: Evidence for skeletal, reproductive, and immune dysfunction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Jun 19;98(13):7498–503.
54. Yoshizawa T, Handa Y, Uematsu Y, Takeda S, Sekine K, Yoshihara Y, i sur. Mice lacking the vitamin D receptor exhibit impaired bone formation, uterine hypoplasia and growth retardation after weaning. *Nat Genet.* 1997 Aug;16(4):391-6.
55. Kinuta K, Tanaka H, Moriwake T, Aya K, Kato S, Seino Y. Vitamin D is an important factor in estrogen biosynthesis of both female and male gonads. *Endocrinology.* 2000 Apr;141(4):1317-24.
56. Malloy PJ, Peng L, Wang J, Feldman D. Interaction of the Vitamin D Receptor with a Vitamin D Response Element in the Müllerian-Inhibiting Substance (MIS) Promoter: Regulation of MIS Expression by Calcitriol in Prostate Cancer Cells. *Endocrinology.* 2009 Apr; 150(4):1580–7.
57. Merhi Z, Doswell A, Krebs K, Cipolla M. Vitamin D Alters Genes Involved in Follicular Development and Steroidogenesis in Human Cumulus Granulosa Cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014 Jun; 99(6): E1137–E1145.
58. Chang EM, Kim YS, Won HJ, Yoon TK, Lee WS. Association between sex steroids, ovarian reserve, and vitamin D levels in healthy nonobese women. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014 Jul;99(7):2526-32.
59. Dennis NA, Houghton LA, Jones GT, van Rij AM, Morgan K, McLennan IS. The level of serum anti-Müllerian hormone correlates with vitamin D status in men and women but not in boys. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012 Jul;97(7):2450-5.
60. Parikh G, Varadinova M, Suwandhi P, Araki T, Rosenwaks Z, Poretsky L, i sur. Vitamin D regulates steroidogenesis and insulin-like growth factor binding protein-1 (IGFBP-1) production in human ovarian cells. *Horm Metab Res.* 2010 Sep;42(10):754-7.
61. Knight JA, Wong J, Blackmore KM, Raboud JM, Vieth R. Vitamin D association with estradiol and progesterone in young women. *Cancer Causes Control.* 2010 Mar;21(3):479-83.

62. Jukic AM1, Steiner AZ, Baird DD. Association between serum 25-hydroxyvitamin D and ovarian reserve in premenopausal women. *Menopause*. 2015 Mar;22(3):312-6.
63. Oguić SK. Hormoni i njihov mehanizam djelovanja U: Šimunić V. i sur. *Reprodukcijaska endokrinologija i neplodnost*. Zagreb: Školska knjiga; 2012. str.25-43.
64. Thomson RL, Spedding S, Buckley JD. Vitamin D in the aetiology and management of polycystic ovary syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2012 Sep;77(3):343-50.
65. Yildizhan R, Kurdoglu M, Adali E, Kolusari A, Yildizhan B, Sahin HG, i sur. Serum 25-hydroxyvitamin D concentrations in obese and non-obese women with polycystic ovary syndrome. *Arch Gynecol Obstet* 2009;280:559–63.
66. Irani M, Minkoff H, Seifer DB, Merhi Z. Vitamin D increases serum levels of the soluble receptor for advanced glycation end products in women with PCOS. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014 May;99(5):E886-90.
67. Wehr E1, Pieber TR, Obermayer-Pietsch B. Effect of vitamin D3 treatment on glucose metabolism and menstrual frequency in polycystic ovary syndrome women: a pilot study. *J Endocrinol Invest*. 2011 Nov;34(10):757-63.
68. Akbari M, Ostadmohammadi V, Lankarani KB, Tabrizi R, Kolahdooz F, Heydari ST, i sur. The Effects of Vitamin D Supplementation on Biomarkers of Inflammation and Oxidative Stress Among Women with Polycystic Ovary Syndrome: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Horm Metab Res*. 2018 Apr;50(4):271-9.
69. Karadağ C, Yoldemir T, Yavuz DG. Effects of vitamin D supplementation on insulin sensitivity and androgen levels in vitamin-D-deficient polycystic ovary syndrome patients. *J Obstet Gynaecol Res*. 2018 Feb;44(2):270-7.
70. Muscogiuri G, Altieri B, de Angelis C, Palomba S, Pivonello R, Colao A, i sur. Shedding new light on female fertility: The role of vitamin D. *Rev Endocr Metab Disord*. 2017 Sep;18(3):273-83.
71. Dabrowski FA1, Grzechocinska B2, Wielgos M3. The role of vitamin D in reproductive health - a Trojan Horse or the Golden Fleece? *Nutrients*. 2015 May 29;7(6):4139-53.
72. Rahimi-Ardabili H, Pourghassem Gargari B, Farzadi L. Effects of vitamin D on cardiovascular disease risk factors in polycystic ovary syndrome women with vitamin D deficiency. *J Endocrinol Invest*. 2013; 36:28–32

73. Viganò P, Lattuada D, Mangioni S, Ermellino L, Vignali M, Caporizzo E, i sur. Cycling and early pregnant endometrium as a site of regulated expression of the vitamin D system. *J Mol Endocrinol.* 2006 Jun;36(3):415-24.
74. Agic A, Xu H, Altgassen C, Noack F, Wolfler MM, Diedrich K, i sur. Relative expression of 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor, vitamin D 1 alpha-hydroxylase, vitamin D 24-hydroxylase, and vitamin D 25-hydroxylase in endometriosis and gynecologic cancers. *Reprod Sci.* 2007 Jul;14(5):486-97.
75. Vilarino FL, Bianco B, Lerner TG, Teles JS, Mafra FA, Christofolini DM, i sur. Analysis of vitamin D receptor gene polymorphisms in women with and without endometriosis. *Hum Immunol.* 2011;72(4):359–63.
76. Harris HR, Chavarro JE, Malspeis S, Willett WC, Missmer SA. Dairy-food, calcium, magnesium, and vitamin D intake and endometriosis: a prospective cohort study. *Am J Epidemiol.* 2013 Mar 1;177(5):420-30.
77. Abbas MA, Taha MO, Disi AM, Shomaf M. Regression of endometrial implants treated with vitamin D3 in a rat model of endometriosis. *Eur J Pharmacol.* 2013;715(1–3):72–5.
78. Yildirim B, Guler T, AkbulutM, Oztekin O, Sariiz G. 1-alpha,25- dihydroxyvitamin D3 regresses endometriotic implants in rats by inhibiting neovascularization and altering regulation of matrixmetalloproteinase. *Postgrad Med.* 2014;126(1):104–10.
79. Mariani M, Viganò P, Gentilini D, Camisa B, Caporizzo E, Di Lucia P, i sur. The selective vitamin D receptor agonist, elocalcitol, reduces endometriosis development in a mouse model by inhibiting peritoneal inflammation. *Hum Reprod.* 2012;27(7):2010–9.
80. Miyashita M, Koga K, Izumi G, Sue F, Makabe T, Taguchi A, i sur. Effects of 1,25-Dihydroxy vitamin D3 on endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2016;101(6):2371-9.
81. E. Somigliana, P. Panina-Bordignon, S. Murone, P. Di Lucia, P. Vercellini, P. Viganò. Vitamin D reserve is higher in women with endometriosis. *Hum Reprod.* 2007 Aug;22(8):2273-8.
82. Hartwell D, Rødbro P, Jensen SB, Christiansen C. Vitamin D metabolites – relation to age, menopause and endometriosis, *Scand. Scand J Clin Lab Invest.* 1990 Apr;50(2):115-21.

83. Ciavattini A1, Serri M1, Delli Carpini G1, Morini S1, Clemente N1. Ovarian endometriosis and vitamin D serum levels. *Gynecol Endocrinol*. 2017 Feb;33(2):164-7.
84. Kebapcilar AG, Kulaksizoglu M, Kebapcilar L, Gonen MS, Unlü A, Topcu A, i sur. Is there a link between premature ovarian failure and serum concentrations of vitamin D, zinc, and copper? *Menopause*. 2013 Jan;20(1):94-9.
85. Ersoy E1, Ersoy AO, Yildirim G, Buyukkagnici U, Tokmak A, Yilmaz N. Vitamin D Levels in Patients with Premature Ovarian Failure. *Ginekol Pol*. 2016;87(1):32-6.
86. Farzadi L, Khayatzaeh Bidgoli, H, Ghojazadeh, M, Bahrami, Z, Fattahi, A, Latifi, Z, i sur. Correlation between follicular fluid 25-OH vitamin D and assisted reproductive outcomes. *Iran. J. Reprod. Med*. 2015, 13, 361–6.
87. de Angelis C, Galdiero M, Pivonello C, Garifalos F, Menafrà D, Cariati F, i sur. The role of vitamin D in male fertility: A focus on the testis. *Rev Endocr Metab Disord*. 2017 Sep;18(3):285-305.
88. Blomberg Jensen M1, Bjerrum PJ, Jessen TE, Nielsen JE, Joensen UN, Olesen IA, i sur. Vitamin D is positively associated with sperm motility and increases intracellular calcium in human spermatozoa. *Hum Reprod*. 2011 Jun;26(6):1307-17.
89. Hammoud AO, Meikle AW, Peterson CM, Stanford J, Gibson M, Carrell DT. Association of 25-hydroxy-vitamin D levels with semen and hormonal parameters. *Asian J Androl*. 2012 Nov;14(6):855-9.
90. Kwiecinski GG, Petrie GI, DeLuca HF. Vitamin D is necessary for reproductive functions of the male rat. *J Nutr*. 1989 May;119(5):741-4.
91. Arabi A, El Rassi R, El-Hajj Fuleihan G. Hypovitaminosis D in developing countries - prevalence, risk factors and outcomes. *Nat Rev Endocrinol*. 2010 Oct;6(10):550-61.
92. Cashman KD, Dowling KG, Škrabáková Z, Gonzalez-Gross M, Valtueña J, De Henauw S, i sur. Vitamin D deficiency in Europe: pandemic? *Am J Clin Nutr*. 2016 Apr;103(4):1033–1044.
93. Hilger J, Friedel A, Herr R, Rausch T, Roos F, Wahl DA, i sur. A systematic review of vitamin D status in populations worldwide. *Br J Nutr*. 2014 Jan;111(1):23-45.
94. Hurley D. Vitamin D supplements: Panacea, placebo or something in between? [Internet]. *The Washington Post*. WP Company; 2015 [cited 2018Jul16]. Available from: https://www.washingtonpost.com/national/health-science/vitamin-d-supplements-panacea-placebo-or-something-in-between/2015/09/14/662699d2-469d-11e5-846d-02792f854297_story.html?utm_term=.6ba8689e474f

95. Infertility definitions and terminology [Internet]. World Health Organization. World Health Organization; 2016 [cited 2018 Jul 12]. Available from: <http://www.who.int/reproductivehealth/topics/infertility/definitions/en/>
96. Ciglar S. Bračna neplodnost. U: Šimunić V i sur. Ginekologija. Zagreb: Ljevak; 2001. str. 349-57.
97. Šimunić V. Plodnosti neplodnost čovjeka. U: Šimunić V. i sur. Reprodukcijska endokrinologija i neplodnost. Zagreb: Školska knjiga; 2012. str.119-40.
98. Global prevalence of infertility, infecundity and childlessness [Internet]. World Health Organization. World Health Organization; 2014 [cited 2018Jul16]. Available from: <http://www.who.int/reproductivehealth/topics/infertility/burden/en/>
99. Vander Borgh M, Wyns C. Fertility and infertility: Definition and epidemiology. Clin Biochem. 2018 Mar;S0009-9120(18)30220-0.
100. Šimunić V. Neplodnost. U: Šimunić V. i sur. Reprodukcijska endokrinologija i neplodnost. Zagreb: Školska knjiga; 2012. str.145-46.
101. Zitzmann M. Effects of age on male fertility. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab. 2013 Aug;27(4):617-28.
102. Bellver J, Melo MA, Bosch E, Serra V, Remohí J, Pellicer A. Obesity and poor reproductive outcome: the potential role of the endometrium. Fertil Steril. 2007 Aug;88(2):446-51.
103. Van der Steeg JW, Steures P, Eijkemans MJ, Habbema JD, Hompes PG, Burggraaff JM, i sur. Obesity affects spontaneous pregnancy chances in subfertile ovulatory women. Hum Reprod. 2008 Feb;23(2):324-8.
104. Dağ ZÖ, Dilbaz B. Impact of obesity on infertility in women. J Turk Ger Gynecol Assoc. 2015;16(2):111–7.
105. Van Voorhis BJ, Dawson JD, Stovall DW, Sparks AE, Syrop CH. The effects of smoking on ovarian function and fertility during assisted reproduction cycles. Obstet Gynecol. 1996 Nov;88(5):785-91.
106. Šimunić V. Prevencija neplodnosti. U: Šimunić V. i sur. Reprodukcijska endokrinologija i neplodnost. Zagreb: Školska knjiga; 2012. str.141-4.
107. Pavičić Baldani. Kronične anovulacije – Sindrom policističnih jajnika. U: Šimunić V. i sur. Reprodukcijska endokrinologija i neplodnost. Zagreb: Školska knjiga; 2012. str. 275-96.
108. Sirmans SM, Pate KA. Epidemiology, diagnosis, and management of polycystic ovary syndrome. Clin Epidemiol. 2013 Dec;18;6:1-13.

109. Šimunić V. Poremećaj menstruacijskog ciklusa (amenoreja, oligomenoreja i kronične anovulacije). U: Šimunić V i sur. Ginekologija. Zagreb: Ljevak; 2001. str. 195-222.
110. Norman RJ, Dewailly D, Legro RS, Hickey TE. Polycystic ovary syndrome. Lancet. 2007 Aug 25;370(9588):685-97.
111. Legro RS1, Arslanian SA, Ehrmann DA, Hoeger KM, Murad MH, Pasquali R, i sur. Diagnosis and treatment of polycystic ovary syndrome: an Endocrine Society clinical practice guideline. J Clin Endocrinol Metab. 2013 Dec;98(12):4565-92.
112. Ciglar S. Endometrioza. U: Šimunić V i sur. Ginekologija. Zagreb: Ljevak; 2001. str. 241-7.
113. Šimunić V. Endometrioza. U: Šimunić V. i sur. Reprodukcijska endokrinologija i neplodnost. Zagreb: Školska knjiga; 2012. str. 205-24.
114. Šimunić V, Despot A. Adenomioza. U: Šimunić V. i sur. Reprodukcijska endokrinologija i neplodnost. Zagreb: Školska knjiga; 2012. str. 205-24.
115. Dun EC, Nezhat CH. Tubal factor infertility: diagnosis and management in the era of assisted reproductive technology. Obstet Gynecol Clin North Am. 2012 Dec;39(4):551-66.
116. Ciglar S. Upale gornjeg dijela spolnog sustava žene. U: Šimunić V i sur. Ginekologija. Zagreb: Ljevak; 2001. str. 259-69.
117. Šprem Goldštajn M. Umanjena funkcija jajnika i prijevremena menopauza. U: Šimunić V. i sur. Reprodukcijska endokrinologija i neplodnost. Zagreb: Školska knjiga; 2012. str. 297-307.
118. Ježek D. Poremećaji građe i funkcije muške spolne žlijezde i neplodnost muškarca. U: Šimunić V. i sur. Reprodukcijska endokrinologija i neplodnost. Zagreb: Školska knjiga; 2012. str. 309-21.
119. Kaštelan Ž, Hauptman D. Muška neplodnost. U: Šimunić V. i sur. Reprodukcijska endokrinologija i neplodnost. Zagreb: Školska knjiga; 2012. str. 423-32.
120. Dumić M. Bolesti endokrinog sustava. U: Mardešić D. i sur. Pedijatrija. Zagreb: Školska knjiga; 2016. str. 595-646.
121. Šitum M. Bolesti krvnih žila u urologiji. U: Šitum M. i sur. Urologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2012. str 169-75.
122. Moghissi KS, Wallach EE. Unexplained infertility. Fertil Steril. 1983 Jan;39(1):5-21.
123. DeLuca HF. History of the discovery of vitamin D and its active metabolites. Bonekey Rep. 2014;3:479.

124. Couchman L, Moniz CF. Analytical considerations for the biochemical assessment of vitamin D status. *Ther Adv Musculoskelet Dis*. 2017 Apr;9(4):97-104.
125. Pagliardini L, Vigano P, Molgora M, Persico P, Salonia A, Vailati SH, i sur. High Prevalence of Vitamin D Deficiency in Infertile Women Referring for Assisted Reproduction. *Nutrients*. 2015 Dec;7(12):9972–84.
126. Wehr E, Trummer O, Giuliani A, Gruber HJ, Pieber TR, Obermayer-Pietsch B. Vitamin D-associated polymorphisms are related to insulin resistance and vitamin D deficiency in polycystic ovary syndrome. *Eur J Endocrinol*. 2011 May;164(5):741-9.
127. Mazloomi S, Sharifi F, Hajhosseini R, Kalantari S, Mazloomzadeh S. Association between Hypoadiponectinemia and Low Serum Concentrations of Calcium and Vitamin D in Women with Polycystic Ovary Syndrome. *ISRN Endocrinol*. 2012; 2012:949427.
128. Li HW, Brereton RE, Anderson RA, Wallace AM, Ho CK. Vitamin D deficiency is common and associated with metabolic risk factors in patients with polycystic ovary syndrome. *Metabolism*. 2011 Oct;60(10):1475-81.
129. Mahmoudi T, Gourabi H, Ashrafi M, Yazdi RS, Ezabadi Z. Calcitropic hormones, insulin resistance, and the polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*. 2010 Mar 1;93(4):1208-14.
130. Panidis D, Balaris C, Farmakiotis D, Rousso D, Kourtis A, Balaris V, et al. Serum parathyroid hormone concentrations are increased in women with polycystic ovary syndrome. *Clin Chem*. 2005 Sep;51(9):1691-7.
131. Dressler N, Chandra A, Aguirre Dávila L, Spineli LM, Schippert C, von Versen-Höynck F. BMI and season are associated with vitamin D deficiency in women with impaired fertility: a two-centre analysis. *Arch Gynecol Obstet*. 2016 Apr;293(4):907-14.
132. Mansournia N, Mansournia MA, Saeedi S, Dehghan J. The association between serum 25OHD levels and hypothyroid Hashimoto's thyroiditis. *J Endocrinol Invest*. 2014 May;37(5):473-6.
133. Kim D. Low vitamin D status is associated with hypothyroid Hashimoto's thyroiditis. *Hormones (Athens)*. 2016 Jul;15(3):385-93.
134. Dumić M. Endokrinopatije i neplodnost. U: Šimunić V. i sur. Reprodukcijska endokrinologija i neplodnost. Zagreb: Školska knjiga; 2012. str. 323-34.
135. Škrablin S. Implantacija i rana trudnoća. U: Šimunić V. i sur. Reprodukcijska endokrinologija i neplodnost. Zagreb: Školska knjiga; 2012. str. 101-14.

136. Ozkan S, Jindal S, Greenseid K, Shu J, Zeitlian G, Hickmon C, i sur. Replete vitamin D stores predict reproductive success following in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 2010 Sep;94(4):1314-9.
137. Anifandis GM, Dafopoulos K, Messini CI, Chalvatzas N, Liakos N, Pournaras S, i sur. Prognostic value of follicular fluid 25-OH vitamin D and glucose levels in the IVF outcome. *Reprod Biol Endocrinol*. 2010 Jul 28;8:91.
138. Aleyasin A, Hosseini MA, Mahdavi A, Safdarian L, Fallahi P, Mohajeri MR, i sur. Predictive value of the level of vitamin D in follicular fluid on the outcome of assisted reproductive technology. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2011 Nov;159(1):132-7.
139. Firouzabadi RD1, Rahmani E, Rahsepar M, Firouzabadi MM. Value of follicular fluid vitamin D in predicting the pregnancy rate in an IVF program. *Arch Gynecol Obstet*. 2014 Jan;289(1):201-6.
140. Budick BJ, Ingles SA, Chung K, Stanczyk FZ, Paulson RJ, Bendikson KA. Influence of vitamin D levels on in vitro fertilization outcomes in donorrecipient cycles. *Fertil Steril*. 2014 Feb;101(2):447-52.
141. Chu J, Gallos I, Tobias A, Tan B, Eapen A, Coomarasamy A. Vitamin D and assisted reproductive treatment outcome: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod*. 2018 Jan 1;33(1):65-80.
142. Eurostat - Tables, Graphs and Maps Interface (TGM) table [Internet]. Social protection statistics - unemployment benefits - Statistics Explained. [cited 2018 Jul 12]. Available from: http://ec.europa.eu/eurostat/tgm/refreshTableAction.do?tab=table&plugin=1&pcode=sdg_03_30&language=en
143. Sarokhani M, Veisani Y, Mohamadi A, Delpisheh A, Sayehmiri K, Direkvand-Moghadam A, i sur. Association between cigarette smoking behavior and infertility in women: a case-control study. *Biomedical Research and Therapy*. 2017;4(10):1705-15.
144. White AJ, Sandler DP, D'Aloisio AA, Stanczyk F, Whitworth KW, Baird DD, i sur. Anti-Müllerian Hormone (AMH) in relation to tobacco and marijuana use and sources of indoor heating/cooking. *Fertil Steril*. 2016 Sep;106(3):723–30.
145. Feichtinger W, Papalambrou K, Poehl M, Krischker U, Neumann K. Smoking and In Vitro Fertilization: A Meta-Analysis. *J Assist Reprod Genet*. 1997 Nov;14(10): 596–9.
146. Baron JA, Bulbrook RD Wang DY, Kwa HG. Cigarette smoking and prolactin in women. *Br Med J (Clin Res Ed)*. 1986 Aug 23;293(6545):482–3.

147. Centers for Disease Control and Prevention, American Society for Reproductive Medicine, Society for Assisted Reproductive Technology. 2015 Assisted Reproductive Technology National Summary Report. Atlanta (GA): US Dept of Health and Human Services; 2017.
148. Soskić S, Stokić E, Isenović ER. The relationship between vitamin D and obesity. *Curr Med Res Opin.* 2014 Jun;30(6):1197-9.
149. Wortsman J, Matsuoka LY, Chen TC, Lu Z, Holick MF. Decreased bioavailability of vitamin D in obesity. *Am J Clin Nutr.* 2000 Sep;72(3):690-3.
150. Abbasi AA, Amin M, Smiertka JK, Grunberger G, MacPherson B, Hares M, i sur. Abnormalities of vitamin D and calcium metabolism after surgical treatment of morbid obesity: a study of 136 patients. *Endocr Pract.* 2007 Mar-Apr;13(2):131-6.
151. Baradaran A, Behradmanesh S, Nasri H. Association of body mass index and serum vitamin D level in healthy Iranian adolescents. *Endokrynol Pol.* 2012;63(1):29-33.

8. SAŽETAK

Cilj istraživanja: Cilj ovog istraživanja bio je ispitati učestalost manjka vitamina D i pokazati njegov utjecaj na hormonske parametre plodnosti i trudnoću kod žena liječenih postupcima MPO te utvrditi postoje li razlike u vrijednostima vitamina D između skupina žena oboljelih od endometrioze, PCOS-a i hipotireoze kao čestih uzroka neplodnosti.

Materijali i metode: U istraživanje je uključeno 66 pacijentica koje se liječe od neplodnosti na Zavodu za ginekološku endokrinologiju i humanu reprodukciju Klinike za ženske bolesti i porode KBC-a Split. Retrospektivno su prikupljeni podaci o vrijednostima spolnih hormona i vitamina D, antropometrijskim mjerama kao i podatak o ostvarenoj trudnoći. Pacijentice su prema uzrocima neplodnosti podijeljene u 4 skupine: skupina bez ženskog uzroka neplodnost (kontrolna skupina) te skupine oboljenih od endometrioze, hipotireoze i PCOS-a, te u skupine žena koje su ostale trudne i one koje nisu.

Rezultati: prosječna vrijednosti vitamina D iznosila je $57,7 \pm 22,2$ nmol/L, a 78,8% ispitanika imalo je nedostatak vitamina D. Pokazana je cikličnost vitamina D tijekom godine ($p=0,007$), dok AMH nije pratio ovu cikličnost za sve ispitanice ukupno ($p=0,864$), a u kontrolnoj skupini pokazuje trend ostvarenja cikličnosti ($p=0,058$). Povezanost vitamina D sa svakim pojedinim hormonom nije pokazala statističku značajnost: FSH ($p=0,209$), LH ($p=0,700$), AMH ($p=0,827$), estradiol ($p=0,548$), testosteron ($p=0,965$), progesteron ($p=0,239$), TSH ($p=0,374$), prolaktin ($p=0,310$). Status vitamina D nije se razlikovao između kontrolne skupine i skupine žena oboljelih od endometrioze ($p=0,896$), hipotireoze ($p=1,0$) i PCOS-a ($p=0,599$). Također nije postojala razlika u statusu vitamina D između skupine žena koje su ostale trudne i onih koje nisu ($p=0,530$) kao ni povezanost s pušenjem ($p=0,066$) i indeksom tjelesna mase ($p=0,618$). Kao slučajne nalaze, pronašli smo da žene koje puše imaju niži prolaktin ($p=0,042$) i viši AMH ($p=0,027$).

Zaključak: Povezanost vitamina D s niti jednim promatranim parametrom nije dosegla statističku značajnost, stoga u našem istraživanju možemo zaključiti da vitamin D ne igra ulogu u liječenju neplodnosti kao ni u pogledu ostvarivanja trudnoće. Rezultati brojnih svjetskih studija ne pokazuju jednoznačne rezultate, ali većinom govore u prilog značajnih dobrobiti vitamina D u liječenju PCOS-a, ishodima IVF-a i ostvarenju kliničke trudnoće te u prevenciji fetalnih anomalija i brojnih patoloških stanja u trudnoći. U tom pogledu, ima smisla nadoknaditi manjak vitamina D jer je jeftin, jednostavan za primjenu i neškodljiv, a iako nije pokazao utjecaj na postizanje trudnoće, zasigurno ima utjecaj na njen povoljniji tijek kao i na zdravlje općenito.

9. SUMMARY

Aim: The aim of this study was to investigate the incidence of vitamin D deficiency and to demonstrate its influence on the hormonal parameters of fertility and on pregnancy in women undergoing in vitro fertilisation. Moreover, we aimed to determine whether there are differences in vitamin D status between women suffering from endometriosis, polycystic ovary syndrome and hypothyroidism as frequent causes of infertility.

Materials and Methods: The study included 66 patients who were undergoing in vitro fertilisation at the Institute for Gynecological Endocrinology and Human Reproduction of the Clinic for Female Diseases and Birth of KBC Split. The data on the values of sex hormones and vitamin D, anthropometric measures as well as data on pregnancy have been collected retrospectively. Depending on the causes of infertility, the patients were divided into 4 groups: women with no female disease as the cause of infertility (control group), women with endometriosis, hypothyroidism and PCOS, and pregnant and non-pregnant women.

Results: Average vitamin D values were 57.7 ± 22.2 nmol/L, and 78.8% had vitamin D deficiency. Vitamin D differed between summer and winter part of the year ($p = 0.007$), while AMH did not show this difference for all subjects in total ($p = 0.864$), but in the control group it has shown the trend toward it ($p = 0.058$). The correlation of vitamin D with each hormone did not show any statistical significance: FSH ($p = 0,209$), LH ($p = 0,700$), AMH ($p = 0,827$), estradiol ($p = 0,548$), testosterone ($p = 0,965$), progesterone = 0.239, TSH ($p = 0.374$), prolactin ($p = 310$). The status of vitamin D did not differ between the control group and the group of women suffering from endometriosis ($p = 0.896$), hypothyroidism ($p = 1.0$) and PCOS ($p = 0.599$). There was also no difference in the status of vitamin D between the women who were pregnant and those who were not ($p = 0.530$) as same as there was no evident association with smoking ($p = 0.066$) and body mass index ($p = 0.618$). As random findings, we found that women who smoke had lower prolactin ($p = 0.042$) and higher AMH ($p = 0.027$).

Conclusion: Vitamin D correlation did not reach statistical significance for any observed parameter. Therefore in our research we can conclude that vitamin D does not play a major role in the treatment of infertility or in the pregnancy achievement. The results of many world studies do not show unambiguous results, but most of them are in favor of significant benefits of vitamin D in the treatment of PCOS, IVF outcomes and clinical pregnancy, but also in the prevention of fetal anomalies and numerous pathological conditions in pregnancy. In this respect, it makes sense to compensate for vitamin D deficiency because it is

inexpensive, easy to use and safe, and although it has not had an impact on achieving pregnancy, it has influence of affecting its more favorable course as well as health in general.

10. ŽIVOTOPIS

OSOBNI PODATCI

Ime i prezime: Doria Gabrić

Datum rođenja: 10. lipnja 1993.

Mjesto rođenja: Zagreb, Hrvatska

Državljanstvo: Hrvatsko

Adresa stanovanja: Frane Supila 7, Metković, Hrvatska

Mobitel: +385981760441

e-mail: doria.gabric@gmail.com

OBRAZOVANJE

2000. - 2008. Osnovna škola Stjepana Radića, Metković

2008. - 2012. Gimnazija Metković

2012. - 2014. Medicinski fakultet Sveučilišta u Mostaru, studijski program Medicina

2014. - 2018. Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu, studijski program Medicina

ZNANJA I VJEŠTINE

- aktivno korištenje engleskog jezika (razina B2)

- pasivno korištenje njemačkog i španjolskog jezika

- vozačka dozvola B kategorije

AKTIVNOSTI

- 2014.-2017. Članica udruge CroMSIC
2017. Sudjelovanje na 6. studentskom kongresu za neuroznanost NeuRI u Rijeci
2017. Sudjelovanje na 1. tečaju Praktična znanja za studente u Splitu
2017. Organizator humanitarne akcije Medicinari velikog srca na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Splitu u suradnji s Medicinskim fakultetom Sveučilišta u Zagrebu
2018. Sudjelovanje na 7 studentskom kongresu za neuroznanost NeuRI u Rijeci
2018. Sudjelovanje na 2. tečaju Praktična znanja za studente u Splitu
2018. Demonstrator na Katedri za medicinsku propedeutiku