



Sveučilište u Zagrebu

FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

Ana Ćuk

**FEROPORTIN I TOPLJIVI
TRANSFERINSKI RECEPTORI U ŽENA S
RANIM ZADRŽANIM SPONTANIM
POBAČAJEM**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2026.



Sveučilište u Zagrebu

FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

Ana Ćuk

**FEROPORTIN I TOPLJIVI
TRANSFERINSKI RECEPTORI U ŽENA S
RANIM ZADRŽANIM SPONTANIM
POBAČAJEM**

DOKTORSKI RAD

Mentori:

izv. prof. dr. sc. Ivanka Mikulić

prof. dr. sc. Lada Rumora

Zagreb, 2026.



Sveučilište u Zagrebu

FACULTY OF PHARMACY AND BIOCHEMISTRY

Ana Ćuk

FERROPORTIN AND SOLUBLE TRANSFERRIN RECEPTORS IN WOMEN WITH EARLY MISSED ABORTION

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisors:

Assistant Professor Ivanka Mikulić, Ph. D.

Full Professor with tenure Lada Rumora, Ph. D.

Zagreb, 2026

Rad je predan na ocjenu Fakultetskom vijeću Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja akademskog stupnja doktora znanosti iz područja biomedicine i zdravstva, polje farmacija, grana medicinska biokemija.

Rad je izrađen u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku Sveučilišne kliničke bolnice Mostar u Mostaru u sklopu doktorskog studija „Farmaceutsko-biokemijske znanosti“ Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Ovaj je doktorski rad izrađen pod voditeljstvom izv. prof. dr. sc. Ivanke Mikulić i prof. dr. sc. Lade Rumora, u sklopu Sveučilišnoga poslijediplomskog dokorskog studija Farmaceutsko-biokemijske znanosti pri Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.

ZAHVALA

Posebnu i iskrenu zahvalnost dugujem svojim mentoricama, prof. Ivanki Mikulić i prof. Ladi Rumora, bez kojih ovo putovanje ne bi bilo isto. Ivanka hvala na povjerenju i podršci kroz sve godine našeg zajedničkog rada. Od prvog dana do danas bila si puno više od mentorice i veliki dio mog profesionalnog i osobnog razvoja dugujem tebi.

Prof. Lada veliko hvala na neizmjernoj pomoći, stručnosti i predanosti kojom ste me vodili tijekom izrade ove disertacije. Neizmjerно sam zahvalna na svakom savjetu, razgovoru i svakoj prilici za učenje. Vaša dostupnost i spremnost da mi pomognete, bez obzira na vrijeme i okolnosti, pružale su mi sigurnost i motivaciju u trenucima kad mi je bilo najpotrebnije. Bila je privilegija imati Vas za mentoricu.

Hvala prijateljima i kolegama, posebno Tini, Niti, Nikolini, Ivoni koji su svojim znanjem i podrškom bili neizostavan dio ovog istraživačkog i životnog puta. Ova disertacija nosi i vaš trag.

Najdublju zahvalnost upućujem svojim roditeljima, Ivanu i Vesni. Hvala vam na svim odricanjima, strpljenju, razumijevanju i vjeri u mene, čak i onda kada sama nisam vjerovala u sebe. Ova disertacija jednako je vaša koliko i moja. Hvala za sve što svaki dan činite za mene.

Hvala mojoj sestri Mariji i bratu Filipu na izvoru snage, mojim najmanjima Tamari (Milici), Evi, Vidi, Tomi i Cviti koji su u trenucima umora i izazova podsjećali na ono najvažnije, ljubav.

Tebi koji znaš sve! (E.)

„Sve mogu u Onome koji mi daje snagu“ (Fil 4,13)

SAŽETAK

Zadržani spontani pobačaj je poseban tip spontanog pobačaja kojeg karakteriziraju embrij ili fetus bez srčane akcije koji je ostao u maternici danima ili tjednima tijekom prvih 14 tjedana trudnoće. Novija istraživanja ukazuju na moguću povezanost između poremećaja regulatora homeostaze željeza i ranog spontanog pobačaja. Rutinska analiza statusa željeza mogla bi biti nedovoljna za dobivanje uvida u stvarni status željeza majke, o kojem, posebno u ranoj trudnoći, ali i kasnije, ovisi organogeneza embrija i rast fetusa. Stoga je cilj ovog rada pronaći nove biokemijske biljege za rano prepoznavanje nepovoljnog ishoda trudnoće u prvom tromjesečju, a dosadašnja istraživanja ukazuju na potrebu za određivanjem serumske koncentracije Fpn-a i sTfR-a.

U istraživanje je uključeno ukupno 104 ispitanice, 52 u skupini ispitanica sa zadržanim pobačajem i 52 u skupini žena s urednom trudnoćom. Svim ispitanicama određena je koncentracija Hb-a, Fe-a, UIBC-a, feritina, transferina, hepcidina, Fpn-a, sTfR-a te određeni računski parametri TIBC-a, TSAT-a, sTfR indeksa, kao i kombinacije različitih omjera.

Rezultati ovog istraživanja pokazali su da su ispitanice sa zadržanim spontanim pobačajem imale značajno niže koncentracije Fpn-a ($P < ,0001$) i vrijednosti omjera Fpn/sTfR ($P < 0,001$) te značajno više koncentracije sTfR-a ($P = 0,001$) u odnosu na ispitanice s urednom trudnoćom. Najniže koncentracije sTfR-a bile su u podskupini ispitanica uredne trudnoće s koncentracijom feritina ≤ 15 ng/mL, a najviše u ispitanica zadržanog spontanog pobačaja s koncentracijom feritina ≤ 15 ng/mL ($P = 0,001$). sTfR, sTfR indeks te omjeri feritin/Fpn, Fe/Fpn, TSAT/Fpn, transferin/Fpn, Hb/Fpn i Hb/Fe imali su $OR > 1$ dok su Fe, feritin, TSAT, Fpn te omjeri Fpn/sTfR, Hb/sTfR, Fe/sTfR, feritin/sTfR, transferin/sTfR i TSAT/sTfR imali $OR < 1$ što ukazuju na smanjen rizik za zadržani spontani pobačaj. U multivariatnoj logističkoj regresiji model 3 uključivao je sTfR, hepcidin i Fpn te je ispravno klasificirao 80 % odnosno 78 % slučajeva, s AUC-om od 0,837 (0,756 – 0,900) odnosno 0,850 (0,771 – 0,911), ovisno o tome je li model bio prilagođen dobi ili nije.

Ovo istraživanje pridonosi novim saznanjima o metabolizmu željeza u trudnoći, a daljnjim istraživanjima mogli bi dobiti odgovore na mnoga pitanja, ali i alate u dijagnosticiranju spontanih pobačaja i/ili identificiranju žena s rizikom od spontanih pobačaja u ranoj fazi trudnoće.

Ključne riječi: zadržani spontani pobačaj, feroportin, topljivi transferinski receptori, homeostaza željeza

SUMMARY

Introduction: Missed abortion is a special type of spontaneous abortion characterized by an embryo without cardiac activity or fetus that has remained in the uterus for several days or weeks and is diagnosed by ultrasound examination during the first 14 weeks of pregnancy. Recent studies suggest a possible association between disorders of iron homeostasis regulators and early spontaneous abortion. In laboratory practice, the diagnosis of iron status relies on the measurement of iron (Fe), Hb and ferritin concentrations, but this is insufficient to gain insight into the actual iron status of the mother, on which, especially in early pregnancy, but also later, embryonic organogenesis and fetal growth depend. Iron homeostasis is a dynamic regulatory process that uses transferrin to transport iron between sites of absorption, recycling and storage to sites of iron utilization. Iron absorption and distribution in tissues are mainly controlled by the interaction of the liver hormone hepcidin and Fpn. Fpn is expressed in tissues that store and transport iron, such as the placenta, and functions as a hepcidin receptor and is the only known exporter of elemental iron from cells in a multicellular organism. Following absorption, iron is transported into the circulation via Fpn, where it binds to transferrin, the major iron transporter in plasma. Iron from the maternal circulation, from the iron-transferrin complex, is taken up by transferrin receptor 1 located on the apical membrane of the syncytiotrophoblast (the epithelium on the placental villi that connects to the maternal blood and participates in the exchange of nutrients). After intracellular processing, iron is exported by Fpn to the basal side of the placental syncytiotrophoblast and is transported into the fetal circulation. TfR1 and transferrin then return to the apical membrane of the syncytiotrophoblast where transferrin is released into the maternal circulation and the cycle repeats. sTfR is a truncated monomer of the tissue receptor, without the first 100 amino acids, and serum concentrations of sTfR are proportional to the concentration of cellular TfR1. Therefore, the aim of this work is to identify new biochemical markers for early recognition of adverse pregnancy outcomes in the first trimester, and previous research indicates the need to determine serum concentrations of Fpn and sTfR in missed abortion in comparison to normal pregnancy with the aim of finding early prognostic indicators of iron bioavailability in the mother.

Materials and methods: Taking into account the research objective and planned statistical processing, a pilot study was conducted to assess differences in Fpn and sTfR concentrations between the two groups of subjects. Slightly stricter criteria were set for calculating the sample size with an assumed $\alpha = 0.05$ and a research power of 90 %. According to the given criteria,

104 test subjects were calculated, 52 in the group of test subjects with missed abortion and 52 in the group of women with normal pregnancies. In this research, only the amount of blood, i.e. serum and plasma, which remained after routine diagnostic tests was used. For the examined group, it was a blood sample taken in the morning at the Clinic for Gynecology and Obstetrics, after receiving the patient and ultrasound determination of a missed abortion, before induction with medications, to determine the routine diagnostic tests (CBC, CRP, coagulogram) necessary for appropriate treatment. For the control group, it was the remaining blood sample taken in the morning at the Transfusion Center, after the determined blood group and the indirect Coombs test. In the subjects of the control group, after a confirmed normal pregnancy, CBC, CRP, Fe and a hepatogram are determined in the routine diagnostic process. Inclusion criteria for the control group: subjects with normal pregnancy, age range 18 - 45 years, gestational week < 14, ultrasound-confirmed normal development of the embryo or fetus, with history of no spontaneous abortions, singleton pregnancy, Hb > 110 g/L. Inclusion criteria for the study group: subjects with retained spontaneous abortion, age range 18 - 45 years, gestational week < 14, ultrasound-confirmed cessation of development (no cardiac activity) of the embryo or fetus, required induction of abortion with mifepristone or misoprostol, singleton pregnancy, no bleeding, Hb > 110 g/L. Exclusion criteria for both groups: bleeding, anemia, inflammation, hypertension, diabetes, endocrine abnormalities, ultrasound detected fetal anomalies, thyroid dysfunction, urinary tract infection, uterine malformations, oncological diseases, acquired and hereditary thrombophilia(s), autoimmune diseases, artificial insemination, iron supplementation, CRP > 5 mg/L.

In all subjects Hb, Fe, UIBC, ferritin, transferrin, hepcidin, Fpn, sTfR concentration were determined and certain calculation parameters of TIBC, TSAT, sTfR index, as well as combinations of different ratios. Fpn and hepcidin parameters were determined by immunochemical ELISA method at the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry, and other parameters at automatic analyzers in SKB Mostar. The concentration of Fpn in serum was determined by the immunochemical ELISA method within 3 months from the day of storage at - 80 °C on an EZ Read 800 Plus analyzer (Biochrom, Cambridge, UK). The sensitivity of the test is 0.19 µg/L and the inter and intra coefficients of variation (CV) for the three levels (low, medium and high level) were 5.43, 5.9, 3.14 % and 6.12, 4.50, 4.35 %, respectively, according to the manufacturer's recommendation. The linearity of the test is 0.31 - 20 µg/L. The concentration of sTfR in the serum sample was determined nephelometrically

on a BN II Siemens automatic analyzer. Hepcidin 25 (bioactive) HS ELISA Kit (DRG, catalog number EIA-5782, Marburg, Germany) was used to measure hepcidin concentration.

Results: Statistical analysis of the data showed that subjects with missed abortion had significantly lower Fpn concentrations, i.e. the median and IQR values for subjects with normal pregnancy were 10.90 (7.15 – 20.98) ng/mL and for subjects with missed abortion 6.58 (4.43 – 9.41) ng/mL ($P < 0.001$). On the other hand, sTfR concentrations were significantly higher in subjects with missed abortion compared to subjects with normal pregnancy, and the median and IQR values for subjects with normal pregnancy were 0.83 (0.62 – 1.04) mg/L, while the values for subjects with missed abortion were 1.00 (0.84 – 1.15) mg/L ($P = 0.001$). The Fpn/sTfR ratio values were statistically significantly lower in subjects with missed abortion compared to subjects with normal pregnancies. The median and IQR values obtained for subjects with normal pregnancies were 15.29 (8.34 – 21.65) ng/mL and for subjects with missed abortion 6.65 (4.04 – 8.97) ng/mL ($P < 0.001$). Fpn concentrations were statistically significantly different within the group of subjects with normal pregnancies with ferritin ≤ 15 ng/mL and ferritin > 15 ng/mL, and subjects with normal pregnancies and ferritin > 15 ng/mL also had significantly higher Fpn values compared to those with missed abortion with ferritin > 15 ng/mL. The highest Fpn values were found in subjects with normal pregnancies with ferritin > 15 ng/mL, and the lowest in subjects with missed abortion and ferritin ≤ 15 ng/mL ($P < 0.001$). The lowest sTfR concentrations were in the subgroup of subjects with normal pregnancies with ferritin concentration ≤ 15 ng/mL, and the highest in subjects with missed abortion with ferritin concentration ≤ 15 ng/mL ($P = 0.001$). Hepcidin was statistically significantly lower in subjects with ferritin ≤ 15 ng/mL within groups as well as in subjects with ferritin ≤ 15 ng/mL of normal pregnancies compared to the same subgroup of missed abortion. The lowest sTfR concentrations were in the subgroup of normal pregnancies with ferritin concentrations ≤ 15 ng/mL, and the highest in subjects with missed abortion with ferritin concentrations ≤ 15 ng/mL ($P = 0.001$). The highest Fpn values were in subjects with normal pregnancies with ferritin > 15 ng/mL, and the lowest in subjects with missed abortion and ferritin ≤ 15 ng/mL ($P < 0.001$). The highest median ferritin concentrations were in subjects with normal pregnancies and $GT \geq 10$ and were statistically significantly different from all other subgroups (normal pregnancies with $GT < 10$, missed abortion with $GT < 10$ and ≥ 10). Fpn correlated weakly positively with ferritin and weakly negatively with the sTfR index. sTfR was weakly negatively correlated with Fe, ferritin, and TSAT, and weakly positively with UIBC, TIBC, and transferrin.

sTfR, sTfR index, and the ratios ferritin/Fpn, Fe/Fpn, TSAT/Fpn, transferrin/Fpn, Hb/Fpn, and Hb/Fe had OR > 1, indicating that elevated values of these parameters indicate an increased risk for missed abortion. Fe, ferritin, TSAT, Fpn, and the ratios Fpn/sTfR, Hb/sTfR, Fe/sTfR, ferritin/sTfR, transferrin/sTfR, and TSAT/sTfR had OR < 1, indicating that elevated values of these parameters indicate a decreased risk for missed abortion. Several models were created that included Fe, ferritin, TSAT, sTfR, sTfR index, Fpn and all ratios that showed statistical significance in univariate logistic regression analysis, and the presented models proved to be the best. Given that there was a statistically significant difference in age between subjects with normal pregnancy and subjects with missed abortion, the multivariate regression analysis models were adjusted for age. In multivariate logistic regression, model 3 included sTfR, hepcidin and Fpn and correctly classified 80% and 78% of cases, respectively, with an AUC of 0.837 (0.756 – 0.900) and 0.850 (0.771 – 0.911), respectively, depending on whether the model was adjusted for age or not.

Conclusion: In this doctoral thesis, the concentration of Fpn was measured for the first time in both normal pregnancy and missed abortion. Given that Fpn is a key membrane protein responsible for the release of iron from enterocytes, hepatocytes and macrophages into the circulation, its reduced expression or reduced concentration may lead to disorders in the iron availability. It is known that iron availability is very important for placental and fetal development during pregnancy, and disturbances in its regulation may contribute to adverse pregnancy outcomes, such as spontaneous abortion. Our results are in agreement with existing knowledge about the role of the hepcidin-Fpn axis in the regulation of iron homeostasis, where elevated hepcidin levels or reduced Fpn expression lead to functional iron deficiency. These significantly lower Fpn concentrations in missed abortion could help in understanding the mechanism of iron transport, i.e. insufficient placental supply, which can result in adverse pregnancy outcomes. According to available literature data, only three studies have been published that measured serum Fpn concentrations in different conditions and populations. The iron status parameters sTfR and sTfR index are most commonly used in clinical practice in the diagnosis or differentiation of iron deficiency anemia and anemia of chronic disease, but not in determining iron status in pregnancy, especially not in early pregnancy. The results of sTfR and sTfR index in this study show significantly higher values in subjects with missed abortion compared to normal pregnancy. An elevated sTfR index reflects an increased need for iron in erythropoiesis and is a sensitive marker for detecting iron deficiency, even when the concentrations of classical parameters (Hb, ferritin) are still within the reference interval. In

this case, higher values indicate a greater functional iron deficiency or reduced iron availability to tissues in the spontaneous abortions group. This is also in line with the results of lower serum Fe concentrations, lower ferritin and lower TSAT values in the group with normal pregnancy, which all together indicate impaired iron homeostasis. sTfR and sTfR index further enhance the interpretation because they are less susceptible to the influence of the acute phase and inflammation, so the difference gains weight.

This research contributes to new knowledge about iron metabolism in pregnancy, and further research could provide answers to many questions, as well as tools for diagnosing spontaneous abortions and/or identifying women at risk of spontaneous abortions in the early stages of pregnancy.

Keywords: missed abortion, ferroportin, soluble transferrin receptor, iron homeostasis

Sadržaj:

1. UVOD	1
1.1. Definicija, opće karakteristike i tipovi spontanih pobačaja	2
1.1.1. Rizici za spontani pobačaj	4
1.1.2. Zadržani spontani pobačaj	4
1.2. Uloga željeza u organizmu	6
1.2.1. Specifični proteini u homeostazi željeza	7
1.3. Os hepcidin – ferroportin	16
1.4. Željezo i trudnoća	19
1.4.1. Intestinalna apsorpcija željeza	21
1.4.2. Prijenos željeza kroz posteljicu	26
1.4.3. Laboratorijska dijagnostika statusa željeza u trudnoći	28
2. OBRAZLOŽENJE TEME	32
2.1. Cilj i hipoteze istraživanja	35
3. ISPITANICE I METODE	37
3.1. Ispitanice	38
3.2. Uzorci i metode	39
3.2.1. Određivanje koncentracije Fpn-a	40
3.2.2. Određivanje koncentracije hepcidina	41
3.3. Statistička analiza	41
4. REZULTATI	43
4.1. Osnovne kliničke karakteristike ispitanica	44
4.2. Usporedba koncentracija biokemijskih parametara statusa željeza, koncentracija CRP-a i vrijednosti omjera u ispitanica s urednom trudnoćom i u ispitanica sa zadržanim spontanom pobačajem	45
4.3. Biokemijski parametri statusa željeza u odnosu na koncentraciju feritina	52
4.4. Biokemijski parametri statusa željeza prema gestacijskom tjednu	56
4.5. Ispitivanje međusobne povezanosti biokemijskih parametara statusa željeza	64
4.6. Predviđanje zadržanog spontanog pobačaja	67
4.6.1. Univariatna logistička regresijska analiza	67
4.6.2. Multivariatna logistička regresijska analiza	70
4.7. Dijagnostička točnost parametara statusa željeza	72
5. RASPRAVA	74
6. ZAKLJUČCI	91
7. LITERATURA	94
8. POPIS KRATICA	115
9. ŽIVOTOPIS I POPIS OBJAVLJENIH RADOVA	118
10. PRILOZI	120

1. UVOD

1.1. Definicija, opće karakteristike i tipovi spontanih pobačaja

Spontani pobačaj ili intrauterini gubitak trudnoće su sinonimi koji predstavljaju svaki prirodni gubitak trudnoće prije 20. tjedna trudnoće i predstavlja jedan od najčešćih štetnih ishoda trudnoće. Otprilike 10 do 15 % potvrđenih trudnoća završi spontanim pobačajem, a preko 80 % spontanih pobačaja dogodi se u prvom tromjesečju (1 - 3). Međutim, ove statistike vjerojatno ne prikazuju stvarnu učestalost spontanog pobačaja jer mnogi spontani pobačaji ostaju neevidentirani (bez hospitalizacije) ili nedijagnosticirani jer se prisutno krvarenje pogrešno tumači kao jaka, kasna menstruacija. Studije koje su pratile trudnoće mjerenjem serumskih koncentracija β -humanog korionskog gonadotropina (β -hCG) procjenjuju veću incidenciju od približno 38 % (4). Mnoga društva koriste i druge slične termine kao što je rani gubitak trudnoće, pa Američki koledž opstetričara i ginekologa (engl. *American College of Obstetricians and Gynecologists, ACOG*) definira spontani pobačaj u prvom tromjesečju kao neodrživu intrauterinu trudnoću s praznom gestacijskom vrećicom ili gestacijskom vrećicom koja sadrži embrij ili fetus bez srčane aktivnosti embrija/fetusa unutar prvih 13 tjedana trudnoće (5), dok Europsko društvo za humanu reprodukciju i embriologiju (engl. *European Society of Human Reproduction and Embryology, ESHRE*) smatra ranim gubitkom trudnoće onaj gubitak koji se dogodio prije 10. tjedna trudnoće (6). Iako među društvima ne postoji konsenzus o ispravnoj terminologiji, literaturni podaci pokazuju da postoji 11 – 22 % rizika od pobačaja do 20. tjedna trudnoće, s tim da je rizik od pobačaja najveći do 14. tjedna (7, 8). Također, terminologija se razlikuje u definiranju stupnja trudnoće, odnosno embrionalni (< 10 tjedana gestacije) ili fetalni ($\geq$ 10 tjedana) stupanj trudnoće (5). Iako je krvarenje u ranoj trudnoći uobičajeno, polovina nastalih krvarenja završi spontanim pobačajem, pa su i najčešći simptomi spontanog pobačaja krvarenje iz maternice, grčevita bol u zdjelici i izbacivanje ploda (9).

Spontani pobačaj klasificira se na sljedeći način:

- a) Prijeteći pobačaj je privremena dijagnoza u pacijentica s vaginalnim krvarenjem, zatvorenim cerviksom i sonografskom vizualizacijom intrauterinog regulatura s embrionalnom/fetalnom srčanom aktivnošću koja se može detektirati. Izraz "prijeteći" koristi se za opisivanje ovih slučajeva jer gubitak ploda ne slijedi uvijek nakon vaginalnog krvarenja, čak ni nakon ponovljenih epizoda krvarenja ili obilnih krvarenja i potencijalno se trudnoća može nastaviti bez komplikacija. Kako trudnoća napreduje krvarenje povećava rizik od spontanog pobačaja (10, 11).
- b) Neizbježni pobačaj karakterizira obilno krvarenje, a vrat maternice je otvoren (1).

- c) Nepotpuni ili neuspjeli pobačaj odnosi se na nepotpuno izbacivanje produkta začeca. Prisutno je obilno krvarenje i mučnina (13).
- d) Potpuni pobačaj karakterizira potpuni gubitak produkta začeca i cerviks je zatvoren. Za potvrdu se koristi mjerenje koncentracije β -hCG-a (1).
- e) Ponavljajući pobačaj definira se kao gubitak dvije ili više trudnoća potvrđenih ultrazvukom ili gubitak više od tri trudnoće koje ne moraju biti intrauterine (14, 15). Postoji rizik od 15 % od ponavljanja spontanog pobačaja nakon prvog te rizik raste na 17 - 31 % nakon dva uzastopna pobačaja i na 25 - 46 % nakon tri ili više pobačaja (16, 17).
- f) Biokemijski pobačaj dijagnosticira se u potpunosti na temelju povećane koncentracije β -hCG-a koja se postepeno snižava bez potvrđivanja trudnoće ultrazvukom. Najčešće se ovaj tip pobačaja događa prije 6. tjedna trudnoće (18).
- g) Zadržani pobačaj (engl. *missed abortion*) ili asimptomatski gubitak trudnoće definira se kao ultrazvučno potvrđena smrt embrija ili fetusa bez krvarenja ili otvaranje maternice te produkt začeca nije izbačen (19).

Tablica 1. Dijagnostički pokazatelji različitih tipova spontanih pobačaja

dijagnoza	karakteristike
prijeteći pobačaj	• krvarenje • grčevi
neizbježni pobačaj	• krvarenje • grčevi
nepotpuni pobačaj	• krvarenje • grčevi • izbacivanje tkiva/ugrušaka
potpuni pobačaj	• krvarenje • završeno izbacivanje/prolaz začeca produkta i ugrušaka
zadržani pobačaj	• asimptomatski • prestanak uobičajenih simptoma trudnoće

1.1.1. Rizici za spontani pobačaj

Najčešći faktor rizika za rani gubitak trudnoće je dob majke, odnosno incidencija gubitka trudnoće u žena dobi od 20 do 30 godina je 9 – 17 %, a u žena dobi od 45 godina i više 75 – 80 % (20). Također, postojanje spontanih pobačaja u anamnezi pacijentice povećava rizik od ponovljenog gubitka trudnoće, pri čemu se rizik povećava svakim dodatnim gubitkom. Krvarenje, koje se često javlja u prvom tromjesečju (25 % trudnoća), povećava rizik od gubitka trudnoće (1, 22). Nekoliko kroničnih bolesti može dovesti do ranog gubitka trudnoće, uključujući pretilost, dijabetes, hiperprolaktinemiju, celijakiju, bolest štitnjače i autoimuna stanja, osobito antifosfolipidni sindrom (23 – 26). Osim navedenog, studije su pokazale da su majke pacijentica sa spontanim pobačaj također u svojoj anamnezi imale spontani pobačaj što ukazuje na potencijalno nasljednu komponentu (27).

1.1.2. Zadržani spontani pobačaj

Zadržani spontani pobačaj je poseban tip spontanog pobačaja kojeg karakteriziraju embrij ili fetus bez srčane akcije koji je ostao u maternici danima ili tjednima i zatvoreni cerviks (28). Pacijentice najčešće nemaju kliničkih simptoma kao što je vaginalno krvarenje ili bol u abdomenu te se zadržani spontani pobačaj uglavnom potvrđuje ultrazvučnim pregledom (29, 30). Zadržani pobačaj je pobačaj s višestrukim etiološkim čimbenicima koji se odnose na fetalnu smrt s neuspjelim prirodnim izbacivanjem zadržanog intrauterinog produkta začeca te se nastala fetalna smrt može kategorizirati prema tri glavna uzorka: fetalni čimbenici, placentni čimbenici i čimbenici majke (31). Zadržani pobačaj, koji je poznat i kao tihi pobačaj, zbog svoje asimptomatske prirode, dijagnosticira se ultrazvučnim pregledom tijekom prvih 14 tjedana trudnoće. Od simptoma žene mogu imati manja vaginalna krvarenja ili bolove prije postavljanja dijagnoze, dok se produkt začeca u potpunosti zadržava u maternici, zbog toga i naziv zadržani spontani pobačaj (32, 33).

Dovršavanje zadržanog pobačaja u prvom tromjesečju može se napraviti na nekoliko načina. Preporučena prva linija liječenja za zadržani pobačaj je iščekivanje u trajanju od 7 do 14 dana, tijekom kojih žene čekaju da maternica prirodnim putem izbaci tkivo trudnoće i produkt začeca. Ukoliko se to ne dogodi ili čekanje nije prihvatljivo za ženu, tada je poželjno medikamentno liječenje. Medikamentno liječenje ubrzava izbacivanje zadržanog tkiva i produkta začeca trudnoće uz pomoć medicinskih lijekova te je preferirana opcija za mnoge

žene i preporučuje se u međunarodnim kliničkim smjernicama (20, 32, 34). Za dovršavanje zadržanog spontanog pobačaja najčešće se koriste misoprostol i mifepriston. Misoprostol, analog prostaglandina, obično se koristi za indukciju pobačaja kako bi se potaknule kontrakcije miometrija te kako bi se pomoglo izbacivanje ploda (34). Međutim, misoprostol nije uvijek učinkovit, a 15 – 40 % žena treba dodatnu dozu misoprostola, čime se produljuje trajanje liječenja (35, 36). Neuspjeh medikamentnog liječenja može rezultirati naknadnim kirurškim zahvatom (37). Kako bi se povećao učinak misoprostola, ponekad se u kombinaciji koristi steroidni antiprogesteron mifepriston. Mifepriston je kompeticijski antagonist progesteronskih receptora koji priprema miometrij prije izlaganja prostaglandinu (34). Prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji (engl. *The World Health Organization, WHO*) kandidati za medikamentozni pobačaj misoprostolom ili mifepristonom su žene u prvom tromjesečju trudnoće odnosno trudnoće u trajanju do 84 dana (12 0/7 tjedana) (38). U Sjedinjenim Američkim Državama (SAD), mifepriston je odobrila Američka agencija za hranu i lijekove (engl. *United States Food and Drug Administration, FDA*) za medikamentno zaustavljanje intrauterine regulacije do 70 dana gestacije (39). Upotreba u žena izvan ove gestacijske dobi nije odobrena. U SAD-u postoji više različitih protokola za korištenje mifepristona/misoprostola za poticanje izbacivanje ploda gdje pojedini protokoli ograničavaju gestacijsku dob za pobačaj mifepristonom/misoprostolom na 77 dana (11 0/7 tjedana), dok drugi predlažu protokole do 84 dana (12/0 tjedana) (40, 41). Pobačaj lijekovima u prvom tromjesečju nakon 70 dana može rezultirati nižom učinkovitošću (i značajnijim krvarenjem i grčevima) pa je ova povećana granica gestacijske dobi popraćena preporukom za automatsku drugu dozu misoprostola koja se daje pacijenticama od 9 0/7 do 12 0/7 tjedana trudnoće, tri do šest sati nakon prve doze (42, 43).

1.2. Uloga željeza u organizmu

Željezo (Fe) je jedan od najzastupljenijih elemenata u zemljinoj kori. Njegova sposobnost doniranja i prihvatanja elektrona u redoks reakcijama ga čini važnim elementom za temeljne biološke procese kao što su sinteza nukleinskih kiselina, stanično disanje u mitohondrijima, rast stanica, obrana domaćina i stanična signalizacija, a uz to se može naći u dva oksidacijska stanja (44, 45). Također, željezo ugrađeno u hem je glavna komponenta hemoglobina (Hb) pa je ključan za transport kisika i opskrbu eritrocita kisikom. Iako je željezo neophodno za funkcioniranje organizma, ono također može biti toksično u prisutnosti vodikovog peroksida (H_2O_2) (46). Divalentno željezo (Fe^{2+}) može reagirati s H_2O_2 pri čemu se oksidira u Fe^{3+} , a u reakciji nastaje i hidroksilni radikal, jedan od reaktivnih kisikovih spojeva (engl. *reactive oxygen species, ROS*). Hidroksilni radikal je poznat kao jedan od najreaktivnijih i najštetnijih oksidanasa koji djeluje na sve važne biološke makromolekule poput proteina, lipida, nukleinskih kiselina i ugljikohidrata (47). Zbog štetnosti slobodne frakcije željeza (željezo koje nije uklopljeno u proteinima) u visokim koncentracijama iznimno je važna regulacija željeza kako bi se izbjeglo njegovo nakupljanje. S druge strane, puno češći poremećaj je smanjena dostupnost željeza što rezultira umjerenim do teškim anemijama (48, 49). Nedostatak željeza pogađa između 1 i 1,5 milijarde ljudi diljem svijeta, od kojih oko 400 milijuna ima anemiju uzrokovanu nedostatkom željeza. Preporučeni unos željeza varira u različitim životnim fazama. Potrebe su veće kod žena u reproduktivnoj dobi (18 mg/dan) u usporedbi s odraslim muškarcima (8 mg/dan) i povećavaju se na 27 mg/dan tijekom trudnoće (50).

Željezo koje se unosi u organizam putem hrane prisutno je u dva oblika, hemske i nehemske. Hemske željezo čini 40 % ukupnog željeza u tkivima. Njegova apsorpcija je dobra i na nju ne utječe status željeza u organizmu. Apsorpcija nehemske željezo se povećava kako status željezo opada. Hemske i nehemske željezo se apsorbiraju različitim mehanizmima. Iako je mehanizam apsorpcije hemske željezo i dalje slabo opisan, sve je više znanja o molekularnim mehanizmima apsorpcije nehemske željezo i središnje uloge hepcidina u regulaciji apsorpcije željezo (51). Hemske željezo apsorbira se otprilike dvostruko bolje od nehemske željezo. Nehemske željezo se apsorbira u cijelom tankom crijevu, posebno u dvanaesniku. Apsorpciju povećavaju vitamin C i određene aminokiseline, a inhibiraju je kalcij, fitinske kiseline i soli taninske kiseline - tanati (52).

Odrasla osoba ima ukupni sadržaj željezo od približno 3 do 4 g, od čega je 75 % prisutno u proteinima s hemske prostetske skupinom (hemoglobin, mioglobin, citokrom c, citokrom

P450 i peroksidaze) dok je ostatak ukupnog tjelesnog željeza (20 – 30 %) prisutno u skladišnim proteinima kao što su feritin i hemosiderin. Manje od 1 % željeza prisutno je u metaloenzimima željeza, poput onih koji su ključni u sintezi tirozina, dopamina, serotonina i noradrenalina. Ostali metaloenzimi koji sadrže željezo uključuju aldehyd-oksidadu, NADH-dehidrogenazu, triptofan-hidroksilazu, jantarnu dehidrogenazu i ksantin-oksidadu (53). Željezo je potrebno kao kofaktor za nekoliko enzima, uključujući fosfoenolpiruvat-karboksikinazu (korak koji ograničava brzinu u glukoneogenezi), ribonukleotid-reduktazu (sinteza DNA i RNA) i akonitazu (enzim u ciklusu limunske kiseline).

1.2.1. Specifični proteini u homeostazi željeza

Razumijevanje metabolizma željeza i obilježja nedostatka i viška željeza temelji se na biologiji niza važnih proteina, uključujući sljedeće:

- transferin (Tf) – prijenosni protein željeza u plazmi,
- transferinski receptor (TfR) – stanični receptor za prijenos vezanog željeza,
- feritin – stanični protein za skladištenje željeza,
- regulacijski proteini za željezo 1 i 2 - IRP1 i IRP2 (engl. *iron regulatory protein 1,2, IRP1, IRP2*),
- divalentni metalni prijenosnik 1 (engl. *divalent metal transporter 1, DMT1*) – uvoznik duodenalnog željeza na luminalnoj površini,
- duodenalni citokrom B (DyctB) – reduktaza na luminalnoj strani enterocita omogućava redukciju željeza za apsorpciju,
- feri reduktaza STEAP3 (engl. *six transmembrane prostate protein 3, STEAP3*) – unutarstanična feri reduktaza neophodna za međustanični prijenos željeza,
- feroportin (Fpn) – stanični iznosnik željeza,
- hafestin – vjerojatno surađuje s Fpn-om za izvoz željeza iz enterocita u cirkulaciju,
- ceruloplazmin – metaloprotein plazme potreban Fpn-u za izvoz željeza iz makrofaga, hepatocita i glijalnih stanica,
- poly(rC) vezni proteini 1 i 2 (engl. *poly(rC)-binding protein 1,2, PCBP1, PCBP2*) – vežu se za citozine u RNA, a služe kao unutarstanični željezni šaperoni,
- hepcidin – ključni negativni regulator intestinalne apsorpcije željeza i otpuštanja željeza iz makrofaga,

- HFE – nasljedna hemokromatoza (engl. *hereditary haemochromatosis*) mogući senzor željeza čija je varijanta C282Y odgovorna za uobičajeni oblik nasljedne hemokromatoze,
- transferinski receptor 2 (engl. *transferrin receptor 2, TFR2*) - modulira odgovor na eritropoetin, a patogene varijante odgovorne su za rijedak oblik nasljedne hemokromatoze,
- koštani morfogogenetski proteini (engl. *bone morphogenetic protein, BMP*) – tip citokina koji aktivira hepcidin vezanjem na receptore za BMP i signalizacijom putem SMAD (engl. *suppressor of mothers against decapentaplegic*) proteina,
- hemojuvelin – koreceptor za BMP i regulator hercidina čije su patogene varijante odgovorne za uobičajeni oblik juvenilne hemokromatoze,
- matriptaza 2/TMPRSS6 – inhibitor jetrenog hepcidina s glavnom ulogom u nedostatku željeza,
- eritroferon – hormon kojeg proizvode eritroblasti, a koji smanjuje hepcidin kao odgovor na širenje eritropoeze,
- suaktivator nuklearnog receptora 4 (engl. *nuclear receptor coactivator 4, NCOA4*) – osigurava selektivnu dostavu feritinskog kompleksa u autofagosom, nakon čega slijedi proces razgradnje feritinske proteinske ljuske koji nazivamo feritinofagija.

1.2.1.1. Transferin

Gen za apo-transferin (apoTf) nalazi se na dugom kraku kromosoma 3. On kodira protein koji čvrsto veže jedan ili dva atoma željeza (Fe^{3+}) i glavni je prijenosnik željeza u plazmi. Većina Tf-a, čiji je poluživot osam dana, stvara se u jetri, gdje je njegova sinteza znatno povećana u stanjima nedostatka željeza ili smanjena nakon nakupljanja željeza ili upale nepoznatim mehanizmima (54, 55). ApoTf dobiva željezo od feroportina i može biti monoferični ili diferični. Smatra se da transferin (Tf) veže željezo različitim afinitetima na N-terminalnim i C-terminalnim krajevima. Vezanje na C-terminalni kraj pogoduje vezanju N-terminalnog kraja i omogućava kontrolirani prijenos željeza. Diferični transferin je pravi ligand obaju transferinskih receptora (TfR1 i TfR2), dok monoferični Tf vjerojatno ima regulacijsku funkciju (56).

Koncentracija Tf-a se može izmjeriti u plazmi ili serumu s imunokemijskom ELISA (engl. *enzyme linked immunosorbent assay*) metodom ili turbidimetrijski.

Ukupni kapacitet vezanja željeza (engl. *total iron binding capacity*, *TIBC*) za Tf može se izmjeriti izravno korištenjem metodologije vezanja željeza (mg kapaciteta vezanja željeza/dL plazme) ili se može izračunati množenjem rezultata kemijske ili imunološke metode faktorom pretvorbe koji izračunava pojedinačni laboratorij, kako slijedi:

$TIBC (\mu\text{g Fe/dL}) = Tf (\text{mg proteina/dL}) \times (\text{faktor pretvorbe}).$

Raspon faktora pretvorbe: 1,40 - 1,49.

Potpuni nedostatak transferina najvjerojatnije je nespojiv sa životom. Hipotransferinemija je rijedak autosomno recesivni poremećaj povezan s niskim koncentracijama transferina (< 10 mg/dL), teškom anemijom uzrokovanom nedostatkom željeza s hipokromnim, mikrocitnim eritrocitima i preopterećenjem jetre i drugih parenhimskih organa željezom (57). Visoke koncentracije transferina kao posljedica nedostatka željeza povezane su s povećanim rizikom od tromboembolijskih događaja koji mogu uzrokovati pojačani učinak transferina na aktivnost prokoagulacijskih faktora trombina i faktora XIIa (58).

1.2.1.2. Transferinski receptor

Gen za TfR (*TFRC*) se nalazi na istom dugom kraku kromosoma 3 kao i za Tf. *TFRC* kodira homodimerni transmembranski protein koji se nalazi u staničnoj membrani većine stanica, a najviše u eritroidnim prekursorima i stanicama posteljice. Svaka molekula TfR-a može vezati dvije diferične molekule Tf-a (četiri Fe^{3+} atoma). Željezo se isporučuje u zakiseljene vakuole, a kompleks apoTf-TfR se reciklira na površinu stanice, gdje se apoTf ispušta i vraća natrag u cirkulaciju. TfR može biti podvrgnut proteasomalnoj degradaciji ubikvitin-ligazama, čime se kontrolira stanično nakupljanje željeza (59).

Postoji nekoliko važnih uloga TfR-a u tkivima koje su istraživane na mišjim modelima.

- a) Inaktivacija TfR-a u zametnim stanicama miševa je smrtonosna za embrij zbog teške anemije i abnormalnog razvoja središnjeg živčanog sustava. Haploinsuficijencija TfR-a uzrokuje mikrocitozu i smanjenje ukupne tjelesne težine (60).
- b) Ciljana srčana inaktivacija TfR-a isključivanjem *TFRC* gena u miševa uzrokuje kardiomegaliju, smanjenu srčanu funkciju, zatajenje mitohondrijskog disanja i ranu smrt (61).

- c) Ciljana inaktivacija TfR-a, isključivanjem gena *TFRC* gena u epitelnim stanicama crijeva miša uzrokuje poremećaj epitelne barijere i ranu smrt te autori sugeriraju da je TfR uključen u održavanje crijevnog epitela (62).
- d) Ciljana inaktivacija TfR-a u jetri isključivanjem *TFRC* gena ukazuje na to da TfR nije neophodan za bazalnu opskrbu hepatocelularnog željeza, ali je neophodan za ekspresiju hepcidina kao odgovor na opterećenje hepatocita željezom (63). Druga studija utvrdila je da TFR1 u suradnji s HFE proteinom regulira hepcidin što igra ključnu ulogu u patološkom nakupljanju željeza kod β -talasemije. Studija pokazuje da isključivanje gena TfR-a u jetri smanjuje preopterećenje željezom čime se taj put identificira kao potencijalna meta za buduće terapije (64).

Topljivi transferinski receptori (sTfR) proizvod su membranskog TfR-a koji se oslobađaju u cirkulaciju pomoću membranskih proteaza kada TfR nije povezan sa svojim ligandom, diferičnim Tf-om, kao što se događa kod nedostatka željeza (65). Koncentracije sTfR-a izmjerene u serumu izravno koreliraju s eritropoetskom aktivnošću (66). Koncentracije sTfR-a mogu biti pokazatelj nedostatka željeza i potrebe eritroidnih prekursora koštane srži za željezom.

1.2.1.3. Feritin

Feritin je protein koji pohranjuje željezo u organizmu, a sastoji se od 24 podjedinice. Laki lanci (L feritin, gen na kromosomu 19) i teški lanci (H feritin, gen na kromosomu 11) mogu pohraniti do 4500 atoma željeza unutar njegove sferne šupljine (67). H feritin ima aktivnost feroksidaze, potrebnu za unos željeza feritinom. L feritin stabilizira multimernu feritinsku ljusku. Smatra se da je PCBP1 potreban kao citosolni šaperon za isporuku željeza u feritin (68). Istraživanje na miševima je pokazalo da delecija gena *PCBP1* uzrokuje mikrocitnu anemiju (69). PCBP1 i PCBP2 tvore homodimerne i heteromerne komplekse s visokim afinitetom vezanja željeza i različitim funkcijama u staničnoj isporuci željeza, pri čemu se za PCBP2 smatra da utječe na isporuku željeza od DMT1 do FPN1 (70, 71).

Sinteza feritina podložna je različitim razinama kontrole, uključujući regulaciju na razini transkripcije i translacije. Feritin je također reaktant akutne faze i zajedno s Tf-om i TfR-om član je obitelji proteina koji sudjeluju u obrani stanice od oksidacijskog stresa i upale (72, 73). Gen za H feritin se aktivira oksidacijskim stresom preko elementa koji reagira na antioksidanse (engl. *antioxidant response element*, *ARE*) i nekoliko upalnih citokina, kao što su interleukin IL-1, IL-6 ili faktor nekroze tumora α (engl. *tumor necrosis factor-alpha*, *TNF- α*). Istraživanja

su također pokazala da miševi u gestaciji kojima nedostaje H feritin umiru rano (74). Miševi heterozigoti za H feritin imaju blago povišen tkivni L feritin i 7 - 10 puta više L feritina u serumu nego miševi s divljim tipom, iako nemaju preopterećenje tkiva željezom. Ova opažanja sugeriraju da bi smanjena ekspresija H feritina kod ljudi mogla biti odgovorna za visoke koncentracije serumskog L feritina u odsutnosti preopterećenja željezom (75). Uvjetna inaktivacija H feritina u duodenalnim stanicama kod miševa uzrokuje preopterećenje željezom, što ukazuje da je feritin u crijevima važan u kontroli apsorpcije željeza (76).

Velik dio željeza pohranjenog u feritinu dostupan je za metaboličke potrebe. Feritin razgrađuju lizosomi kroz proces koji se naziva feritinofagija, a za koji je potreban protein NCOA4 (77, 78). Ovaj proces je važan za obnavljanje unutarstaničnog željeza kada je potrebno. Inaktivacija NCOA4 kod miševa uzrokuje povećane agregate feritina u makrofagima slezene, jetre i drugih organa (79). *In vitro* smanjena regulacija NCOA4 utječe na sazrijevanje eritroida i sintezu hemoglobina (69). Feritin unutar eritroidnih prekursora može donirati željezo za sintezu hema, osobito na početku akumulacije hemoglobina, u vrijeme kada je kompleks Tf-TfR nedostupan (80).

U kliničkim laboratorijima obično se u serumu ili plazmi mjeri apoferitin. Koncentracija feritina općenito pokazuje ukupnu zalihu željeza, pri čemu 1 ng feritina po mL ukazuje na približno 10 mg skladištenog željeza. Odrasla osoba s koncentracijom feritina 50 - 100 ng/mL ima zalihe željeza od približno 500 do 1000 mg (81). Uloga i podrijetlo cirkulirajućeg feritina kao i putovi stanične sekrecije feritina uglavnom su nepoznati (82).

Koncentracija feritina u serumu < 15 ng/mL je specifična za postavljanje dijagnoze subkliničkog nedostatka željeza, iako je za dijagnozu nedostatka željeza potrebna interpretacija više laboratorijskih parametara.

1.2.1.4. Regulacijski proteini za željezo (IRP1, IRP2), IRE

IRP1, IRP2 ili elementi koji vežu željezo (engl. *iron response element, IRE*) su uključeni u staničnu apsorpciju i skladištenje željeza. Vezanje IRP1 i IRP2 za njihove ciljne slijedove događa se kada stanica ima manjak željeza. Ovo ima različite učinke ovisno o tome je li položaj IRE na 5' ili 3' kraju mRNA. Kada se IRP-ovi vežu na 5' kraj transkripta IRE feritina, Fpn, eALAS- α ili HIF-2 α , brzina i učinak translacije mRNA i biosinteze proteina su smanjene. S druge strane kada se IRP-ovi vežu za 3' kraj transkripta kao što su TfR ili DMT1, poluživot mRNA je produljen i brzina i učinak biosinteze su povećani. IRP1 i IRP2 na različite načine

prepoznaju dostupnost metabolički aktivnog željeza u stanici (83). Cilj ovih IRP-ova je da u stanju preopterećenosti željezom povećaju sintezu feritina (kako bi se omogućilo odgovarajuće skladištenje), feroportina (za izvoz viška željeza) i eALAS- α (za potrošnju željeza), kao i da smanjuju sintezu TfR-a i DMT1 (kako bi se smanjio unos željeza). S druge strane, u nedostatku željeza cilj ovih IRP-ova je smanjiti sintezu feritina i Fpn-a te povećati sintezu TfR-a.

Opažanja istraživanja na miševima pokazala su da delecija gena koji kodira IRP1 ne dovodi do značajnih hematoloških promjena u odrasloj dobi, dok delecija gena koji kodira IRP2 uzrokuje poremećaj regulacije metabolizma željeza, refraktornu mikrocitnu anemiju i neurodegeneracijsku bolest zbog abnormalnog nakupljanja željeza u neuronima (84). Ova opažanja ukazala su na glavnu ulogu IRP2 u regulaciji unosa željeza u eritroidne stanice. Međutim, pokazalo se da HIF-2 α osobito značajno kontrolira IRP1 (85). Ovo pokazuje još jedan primjer veze željeza i hipoksije. IRP1^{-/-} miševi, kad su mladi ili imaju nedostatak željeza, razvijaju policitemiju, plućnu hipertenziju i iznenadnu smrt od krvarenja, zbog nemogućnosti suzbijanja sinteze HIF-2 α koji stimulira i eritropoetin u bubrezima i endotelin 1 u stanicama plućnog endotela (86, 87).

1.2.1.5. DMT1 i DcytB

DMT1 kodiran genom *SLC11A2* na kromosomu 12p13 predstavlja glavni put unos nehemskog željeza iz intestinalnog lumena. Pogrešne (engl. *missense*) mutacije gena za DMT1 kod miševa smatraju se odgovornim za oblik mikrocitne anemije sa značajnim poremećajem u intestinalnom prijenosu željeza (88). DMT1 osim željeza prenosi i druge teške metale kao što su olovo, cink i bakar procesom koji ovisi o ATP-u i protonima. DMT1 je posvuda eksprimiran, a osobito u proksimalnom duodenumu. Ekspresija izoforme koja sadrži IRE posebno je pojačana kod nedostatka željeza i hipoksije kroz djelovanje HIF-2 α (88, 89). Ekspresija DMT1 najveća je na resicama apikalnog pola enterocita odnosno na glavnom mjestu apsorpcije željeza. Patogene varijante u *SLC11A2* izuzetno su rijetke i uzrokuju cjeloživotnu mikrocitnu anemiju, povećanu zasićenost Tf-a i nakupljanje željeza u jetri, ali s niskim ili samo umjereno visokim koncentracijama feritina u serumu (90).

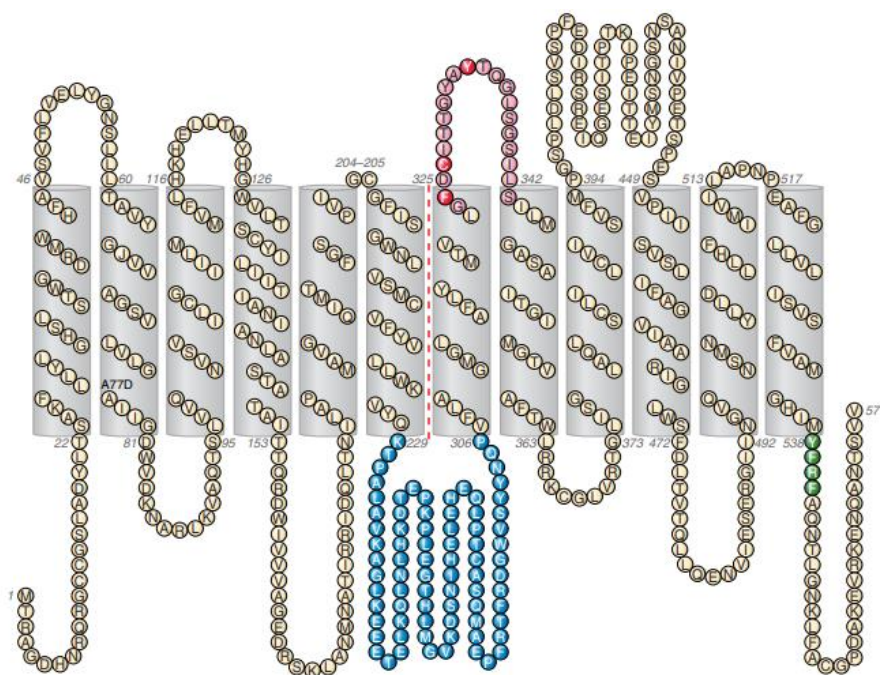
Pri unosu željeza, DMT1 surađuje s duodenalnim citokromom b (DYCTB), membranskom reduktazom koja olakšava apsorpciju željeza iz lumena dvanaesnika (91).

Lokalna intestinalna hipoksija ima važnu ulogu u povećanju ekspresije gena uključenih u prijenos željeza, posebno luminalnih proteina DMT1 i DcytB te bazolateralnog izvoznika

željeza Fpn-a. Pokazalo se da se HIF-2 α veže za promotor DMT1 i regulira ekspresiju DMT1 u stanicama dvanaesnika. Tkivno specifična delecija HIF-2 α u enterocitima miša smanjuje intestinalnu apsorpciju željeza kao i ekspresiju DMT1 u enterocitima (89). Opisane su četiri izoforme DMT1 u različitim stanicama uključujući crijevne stanice, eritroidne stanice, makrofage, moždane stanice ili bubrežne stanice. Te izoforme imaju različite funkcije specifične za organe i substanične funkcije za razmjenu željeza, no to još nije u potpunosti razjašnjeno (92).

1.2.1.6. Ferroportin

Ljudski gen za Fpn nalazi se na kromosomu 2q32 i jako je eksprimiran u bazalnom dijelu placentnog sinciciotrofoblasta, bazolateralnoj površini duodenalnih enterocita, makrofaga, hepatocita, kardiomiocita, eritrocita i drugih stanica (93 - 95). Fpn se sastoji od 12 transmembranskih uzvojnica organiziranih u dvije strukturno slične domene (N- i C- domenu) (Slika 1). Struktura se izmjenjuje između konformacija okrenutih prema van (okrenutih prema izvanstaničnom prostoru) i prema unutra (okrenutih prema citoplazmi) kako bi se željezo prenosilo preko membrane (96). Prvi pokušaji da se rasvijetli struktura Fpn-a pomoću tehnika molekularnog modeliranja otkrili su da je Fpn član superobitelji vodećih prijenosnih proteina (engl. *major facilitator superfamily*, *MFS*) (97 - 99) koji predstavljaju najveću klasu sekundarnih aktivnih prijenosnika (100). Uzvojnice N-terminalne domene 1 - 6 i uzvojnice C-terminalne domene 7 - 12 organizirane su simetrično i povezane rotacijom od ~180 ° oko središnje osi (102).



Slika 1. Struktura feroportina. Preuzeto iz Ganz T. (101)

Transportni ciklus Fpn-a odvija se kroz proces poznat kao mehanizam izmjeničnog pristupa, u kojem se odvijaju konformacijske promjene između različitih stanja (otvoreno prema unutra, zatvoreno i otvoreno prema van). Ovaj se proces oslanja na relativnu rotaciju krutog tijela N-terminalne i C-terminalne domene Fpn-a (101 – 103). Tijekom ovog procesa, prvi set uzvojnica (uzvojnice 1, 4, 7 i 10) i drugi set uzvojnica (uzvojnice 2, 5, 8 i 11) prolaze kroz konformacijsku promjenu i prebacuju svoju interakciju s citoplazmatskih na izvanstanične krajeve proteina. Ove konformacijske promjene N-terminalne i C-terminalne domene omogućuju kretanje supstrata (kao što je željezo) preko stanične membrane (104).

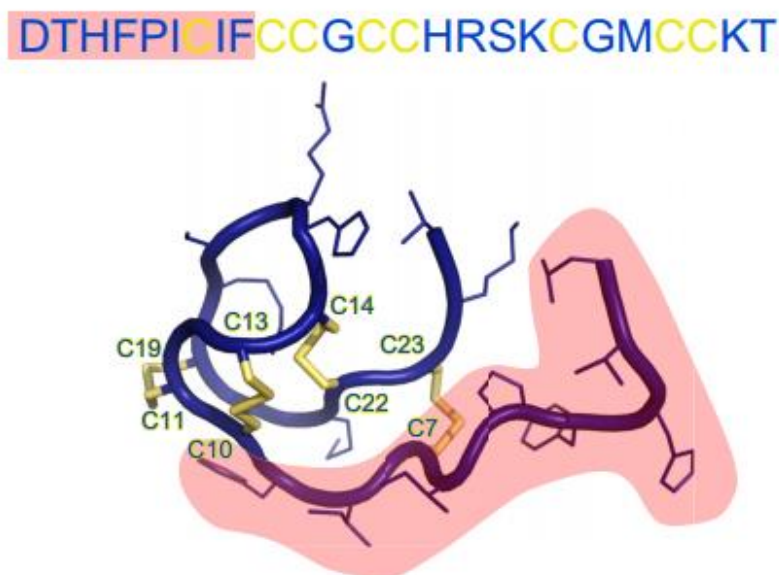
Mutacije Fpn-a uzrokuju hemokromatozu tipa 4, bolest koju karakteriziraju dva različita fenotipa nakupljanja željeza (105). Ovi različiti fenotipovi rezultat su mutacija s gubitkom funkcije, koje oštećuju transportnu aktivnost, ili mutacija s povećanom funkcijom, koje utječu na internalizaciju i degradaciju Fpn-a posredovanu hepcidinom (106).

U životinjskim i ljudskim *in vitro* modelima, Fpn je posttranskripcijski reguliran količinom dostupnog željeza, zbog prisutnosti IRE u 5' kraju UTR-u (107 – 110). Izoforma Fpn-a bez 5' kraja IRE (feroportin B) identificirana je u duodenalnoj sluznici. Ova izoforma nije podložna posttranskripcijskoj regulaciji posredovanoj željezom u uvjetima nedostatka željeza (109). Ista je izoforma eksprimirana i u eritroidnim stanicama gdje regulira sustavno korištenje željeza

(111). Najvažnija kontrola Fpn-a je posttranslacijska, budući da se koncentracija Fpn smanjuje preko njegove interakcije s hepcidinom (106, 112)

1.2.1.7. Hepcidin

Humani hepcidin je peptid od 25 aminokiselina. Glavni izvor hepcidina su hepatociti, dok su drugi izvori neutrofili aktivirani bakterijama i makrofagi. Struktura bioaktivnog hepcidina je jednostavna ukosnica s 8 cisteina koja tvori 4 disulfidne veze u konfiguraciji nalik ljestvama (Slika 2). Mokraća sadrži peptid od 25 aminokiselina i skraćene N-terminalne oblike humanog hepcidina od 20 i 22 aminokiseline (113, 114). Gen za ljudski hepcidin kodira prekursor od 84 aminokiseline, preprohepcidin, koji se zatim pretvara u bioaktivni peptid od 25 aminokiselina. Ovo kidanje vrši prohormon konvertaza furin stvarajući aktivni hormon, zajedno s oblicima od 22 i 20 aminokiselina (115). Prisutnost hepcidina u plazmi negativno regulira, odnosno sprječava izlazak željeza iz stanica i na taj način hepcidin smanjuje željezo u krvi (116 – 118). Poznata su četiri puta koja kontroliraju sintezu hepcidina u jetri: regulacija povezana s pohranom željeza, regulacija eritropoetske aktivnosti, regulacija povezana s upalom i regulacija signalnog puta. Svi regulatori stupaju u interakciju s hepatocitima kako bi stimulirali/inhibirali sintezu hepcidina u svrhu održavanja homeostaze željeza (119 – 121).



Slika 2. Struktura hepcidina. Preuzeto iz Ganz T. (101)

Proizvodnja hemoglobina se povećava nakon eritropoetskih podražaja kao što su gubitak krvi, anemija ili hipoksija, što ujedno utječe i na regulaciju hepcidina. Tijekom hipoksije, homeostatski odgovor dovodi do stvaranja više eritrocita te se smanjuje razina hepcidina; smanjuju se inhibicijski učinci hepcidina i stoga je više željeza dostupno iz prehrane i iz skladištenog željeza. Odgovor hepcidina na anemiju može biti posredovan hipoksijom tkiva, povećanom koncentracijom eritropoetina i povećanom eritropoetskom aktivnošću. Istraživanja su pokazala da eritropoetska aktivnost ima najjači potiskujući učinak na sintezu hepcidina (113, 122). Anemije uzrokovane opterećenjem željeza karakterizirane su neučinkovitom eritropoezom i povećanom intestinalnom apsorpcijom željeza. Najčešće anemije opterećenja željezom su srednje teški i teški oblici β -talasemije, a ostale rijetke anemije uključuju kongenitalnu dizeritropoetsku anemiju, X-vezanu sideroblastičnu anemiju i anemiju koja je povezana s mutacijom *DMT1*. U prisutnosti sustavnog preopterećenja željezom koncentracije hepcidina u mokraći su niske, što ukazuje na dominantan učinak eritropoetskog sustava koji potiskuje sintezu hepcidina (123). Anemija uzrokovana upalom česta je posljedica kroničnih infekcija, neinfektivnih upalnih poremećaja ili karcinoma, a može se razviti i tijekom sepse. Ove anemije karakterizira smanjena koncentracija željeza u serumu i sposobnost vezanja željeza, povećana koncentracija feritina i prisutnost željeza u makrofagima koštane srži, što ukazuje na poremećenu mobilizaciju željeza iz zaliha. Veza između infekcija, hipoferitinemije i anemija uzorkovane upalom sugerira da su one dio obrambenog odgovora domaćina na infekciju. Bolesnici s hipoferitinemijom i anemijama koje su uzrokovane infekcijama ili upalnim poremećajima imaju povećano izlučivanje hepcidina mokraćom. Osobe koje su na eksperimentalnoj terapiji IL-6 i stanja koja su povezane s viškom IL-6 kao što su multipli mijelom i juvenilni reumatoidni artritis također razvijaju anemiju (124).

1.3. Os hepcidin – feroportin

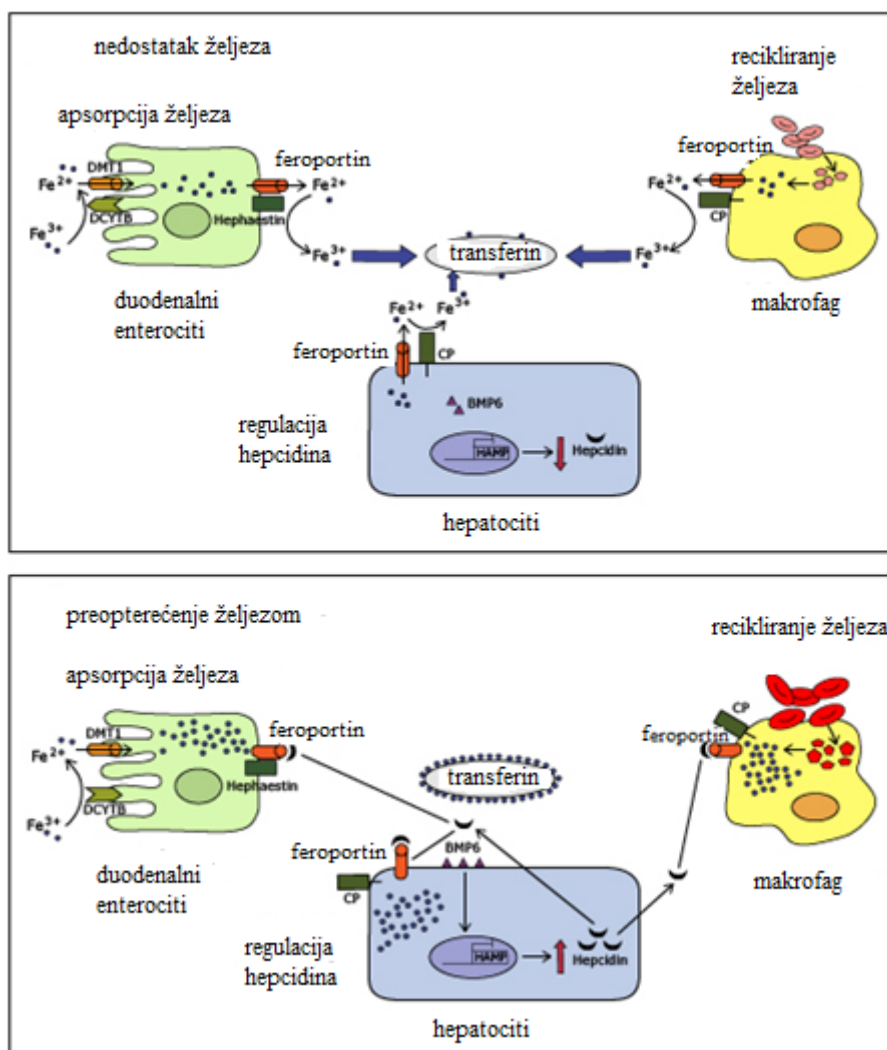
Nedostatak hepcidina dovodi do razvoja sustavnog preopterećenja željezom koje je uzrokovano pretjeranom apsorpcijom željeza. U nedostatku hepcidina, ekspresija Fpn-a na bazolateralnoj površini enterocita je povećana, čime se povećava prijenos željeza iz hrane u plazmu. U nedostatku hepcidina, makrofagi također pokazuju povećanu ekspresiju Fpn-a na svojim staničnim membranama i stoga iznose više željeza. Višak željeza u plazmi nakuplja se u organima jer unos željeza premašuje iznos željeza. Jetra je najčešće pogođena preopterećenjem željezom zbog povećanog unosa željeza, koje nije vezano za Tf, u hepatocite.

U stanjima preopterećenja željezom koncentracija hepcidina u mokraći i serumu je snižena unatoč preopterećenju željeza (125, 126).

Zaključno, glavne stanice uključene u sustavnu regulaciju željeza su:

- enterociti koji apsorbiraju nehemsko željezo iz prehrane putem DMT1;
- hepatociti koji sintetiziraju hepcidin u koncentracijama koje ovise o željezu;
- makrofagi koji oslobađaju željezo tijekom razgradnje hemoglobina iz starih eritrocita (Slika 3) (127).

Fpn iznosi željezo iz svih ovih stanica u cirkulaciju uz djelovanje feroksidaze (hefestin u enterocitima i ceruloplazmin u makrofagima i hepatocitima) koja oksidira Fe^{2+} u Fe^{3+} . Za prijenos željeza iz stanice Fpn-om koji prenosi feri željezo potrebna je oksidacija u fero željezo pomoću feroksidaza prije nego što se željezo veže na Tf. Za Fpn koji je prisutan na površini stanice veže se hepcidin. To inducira fosforilaciju Fpn-a i pokreće internalizaciju kompleksa hepcidin-Fpn, što dovodi do ubikvitinizacije i lizosomske degradacije obaju proteina. Ekspresija hepcidina ograničava apsorpciju željeza i otpuštanje željeza iz makrofaga te smanjuje zalihe željeza u tijelu, čime se ograničava željezo koje je dostupno za eritropoezu (118, 128, 129).



Slika 3. Regulacija ravnoteže željeza. Preuzeto i prilagođeno prema Clara Camaschella (127)

Kod nedostatka željeza postoji povećana apsorpcija i recikliranje željeza. Apsorpciju željeza u enterocitima olakšava DYCTB, reduktaza željeza, pri čemu je sinteza hepcidina potisnuta. Fpn otpušta željezo iz makrofaga i enterocita, nakon čega se željezo veže za Tf.

Kod preopterećenja željezom smanjena je apsorpcija i recikliranje željeza. Sintaza hepcidina je visoka; njegovu sintezu stimulira BMP6, što je inducirano povećanjem koncentracije željeza u jetri. Hepcidin oslobođen u cirkulaciju veže se na Fpn, a kompleks hepcidin-Fpn se internalizira i razgrađuje, što dovodi do sprječavanja otpuštanja željeza u cirkulaciju.

1.4. Željezo i trudnoća

Fiziološke potrebe za željezom tijekom trudnoće značajno se povećavaju kako bi se podržao razvoj fetoplacente i prilagodba majke na trudnoću. Osnovni gubici željeza u majčinom tijelu tijekom trudnoće procijenjeni su na ~230 mg i bili bi veći da nema prestanka menstruacije. Za razvoj posteljice i fetusa potrebno je ~360 mg Fe. Dodatnih 450 mg Fe potrebno je za povećanje ukupnog volumena eritrocita u majke tijekom trudnoće. Stoga se ~1 g željeza mora unijeti tijekom trudnoće kako bi se očuvala ravnoteža željeza u majke i podržao fetoplacentni razvoj. Dio tog željeza se reciklira nakon trudnoće kada se ukupni volumen eritrocita smanji na vrijednosti koje su bile prije trudnoće, s iznimkom željeza koje se gubi krvarenjem pri porodu (~150 mg). Stoga se prosječni neto gubitak željeza kod majke tijekom trudnoće procjenjuje na 740 mg. Međutim, potrebe za željezom nisu ujednačene tijekom tri tromjesečja trudnoće. U prvom tromjesečju, potrebe (procijenjene na ~0,8 mg/dan) su niže nego prije trudnoće jer prestaje menstruacija. Kako trudnoća napreduje, povećava se ukupni volumen eritrocita, a rast placente i fetusa ubrzava, što rezultira povećanjem fizioloških potreba za željezom na 3,0 – 7,5 mg/dan u trećem tromjesečju (130, 131). Kako bi se zadovoljile sve veće fiziološke potrebe za željezom potrebno je povećati i apsorpciju željeza iz hrane i mobilizaciju željeza iz zaliha. Mnoge žene ulaze u trudnoću s nedovoljnim zalihama željeza da zadovolje potrebe trudnoće. U SAD-u prevalencija nedostatka željeza u žena reproduktivne dobi je 12 %, odnosno 19 % i 22 % u afroameričkih i latinoameričkih žena (132). Nedostatak željeza i anemija uzrokovana nedostatkom željeza tijekom trudnoće povezani su s nepovoljnim ishodima za majku i dijete, uključujući povećani rizik od smrtnosti majki, preranog poroda, niske porođajne težine i poremećaja neurorazvoja u dojenčadi (133). Iz tog razloga suplementacija željeza se u nekim zemljama gotovo univerzalno preporučuje tijekom trudnoće što s druge strane pokreće pitanje mogućih rizika neselektivnog dodavanja željeza.

Anemija u trudnoći se može definirati na sljedeći način (134 – 136):

- prvo tromjesečje – hemoglobin < 11 g/dL,
- drugo tromjesečje – hemoglobin < 10,5 g/dL,
- treće tromjesečje – hemoglobin < 11 g/dL,
- nakon poroda – hemoglobin < 10 g/dL.

Postpartalnu anemiju karakterizira koncentracija hemoglobina < 10 g/dL, a temelji se na smjernici iz Ujedinjenog Kraljevstva, kako je predložila WHO, i uvelike je u skladu s drugim smjernicama (137).

Fiziološke promjene tijekom trudnoće rezultiraju dilucijskom anemijom unatoč ukupnom povećanju broja eritrocita. Volumen plazme povećava se za 10 do 15 % od 6. do 12. tjedna trudnoće, a brzo se povećava od 30. do 34. tjedna te se nakon toga zadržava na tome ili blago smanjuje do termina poroda. Ukupno povećanje volumena plazme za terminsku trudnoću iznosi od 1100 do 1600 mL i rezultira ukupnim volumenom plazme od 4700 do 5200 mL, što je 40 do 50 % (60 % za blizanačku trudnoću) više od onoga prije trudnoće. Ukupni volumen eritrocita se također povećava, i to za 15 - 20 %. Ove promjene rezultiraju blagom anemijom (hemoglobin 10 - 11 g/dL), ali ne postoji specifična vrijednost hemoglobina koja se može koristiti za razlikovanje fiziološke dilucijske anemije od drugih uzroka anemije (136). Prevalencija nedostatka željeza tijekom trudnoće ovisi o gestacijskoj dobi i granici feritina koja se koristi za procjenu nedostatka željeza. Razlozi nedostatka željeza mogu biti različiti, od nedovoljnog unosa željeza prehranom do gubitka krvi iz prethodnih trudnoća, menstruacija, kratki intervali između trudnoća, kao i mnogi drugi. Smatra se da žene u reproduktivnoj dobi trebaju dnevno unositi veće koncentracije željeza kako bi nadoknadile gubitak željeza menstruacijom (131).

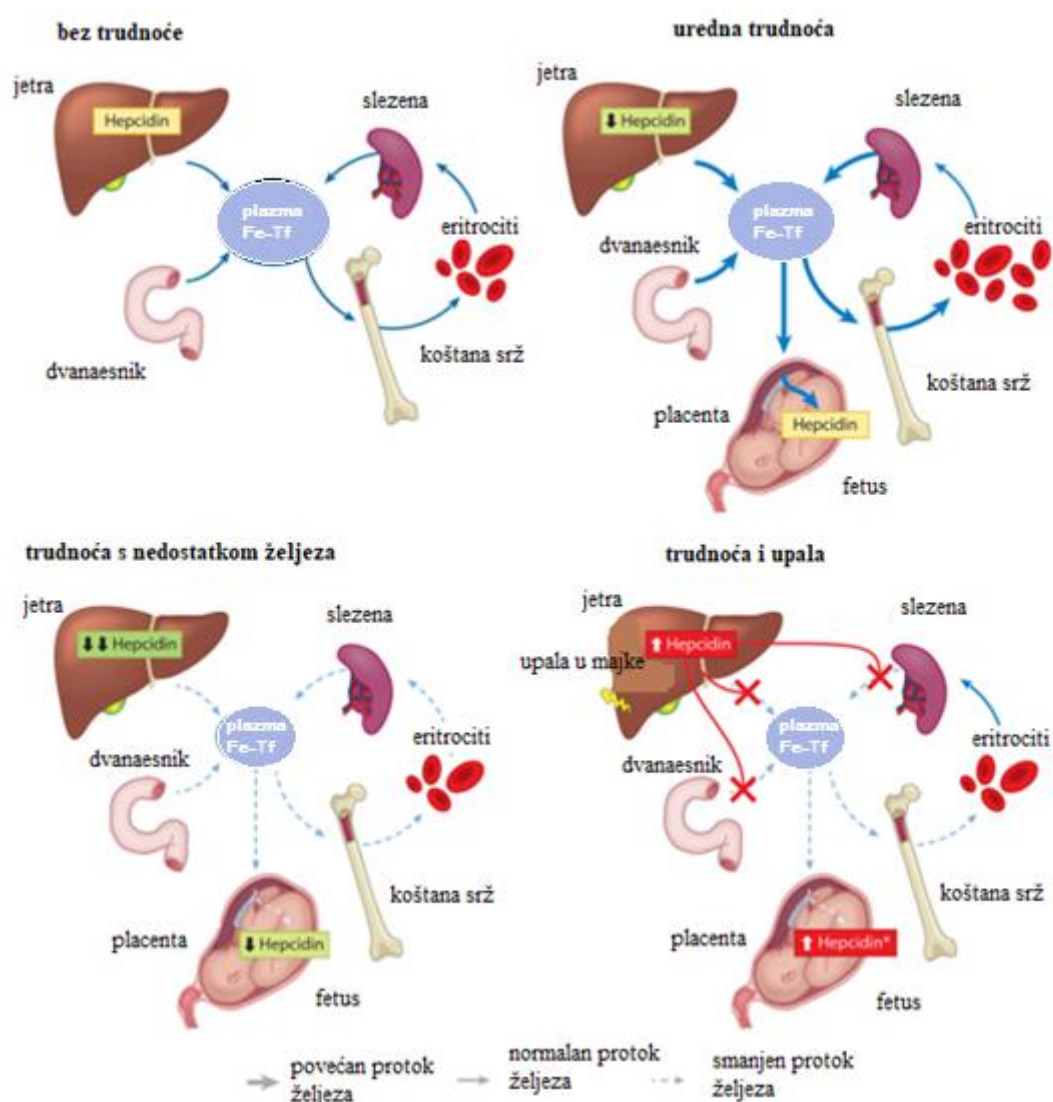
U kliničkoj praksi najčešće se koristi određivanje koncentracije feritina za dijagnosticiranje nedostatka željeza, no neki pojedinci s nedostatkom željeza mogu imati koncentracije serumskog feritina unutar referentnog intervala te je u tom slučaju potrebno odrediti saturaciju transferina (TSAT) za dijagnosticiranje nedostatka željeza. Na temelju podataka iz istraživanja u kojem su pregledane zdrave žene u općoj populaciji, preporučuje se istodobno određivanje koncentracije serumskog feritina i TSAT-a za procjenu dostupnosti željeza (138). To posebno vrijedi za pacijente s aktivnom upalom, koja može povećati koncentracije feritina budući da je on reaktant akutne faze, dok naknadno određivanje TSAT-a zahtijeva ponovno uzorkovanje krvi. Određivanje kompletne krvne slike (KKS) se smatra kasnim nalazom za otkrivanje ili isključivanje nedostatka željeza. Ovi podatci ilustrirani su u istraživanju koje je retrospektivno analiziralo > 17000 trudnica, od kojih je samo 345 trudnica imalo, uz KKS, određenu i koncentraciju feritina tijekom prvog tromjesečja trudnoće (139). Koncentracija hemoglobina < 11 g/dL ili nizak prosječni volumen eritrocita (engl. *mean corpuscular volume*, MCV) (< 80 fL) imalo je osjetljivost od samo 30 % za otkrivanje nedostatka željeza (definiran kao koncentracija feritina < 30 ng/mL). Od 1749 sudionica kojima se određivala koncentracija feritina u bilo kojem trenutku tijekom trudnoće, približno 50 % onih s nedostatkom željeza nije imalo ni anemiju ni mikrocitozu (140).

Također, istraživanja pokazuju da bi trudnice trebale odmah testirati status željeza jer nedostatak željeza može napredovati do anemije. Nedostatak željeza je najčešći patološki uzrok anemije u trudnoći. Mikrocitoza može biti prisutna, ali mikrocitoza je kasni nalaz nedostatka željeza, dok s druge strane, odsutnost mikrocitoze ne eliminira mogućnost nedostatka željeza kao što ni prisutnost to ne potvrđuje. Najčešće se prilikom testiranja na nedostatak željeza većini trudnica bez komorbiditeta određuje koncentracija feritina u serumu (141). Koncentracija feritina ≥ 30 ng/mL ukazuje u većini slučajeva da nije prisutan nedostatak željeza, iako se granične koncentracije feritina za nedostatak željeza razlikuju. Granične koncentracije feritina trebale bi potaknuti određivanje kompletnog profila statusa željeza dostupnim laboratorijskim testovima u svakodnevnoj praksi koji uključuju mjerenje koncentracije feritina, serumskog željeza, TIBC-a i izračun TSAT-a. Smatra se da je TSAT ispod 20 % dokaz nedostatka željeza bez obzira je li koncentracija feritina snižena ili normalna; ova praksa je u skladu s drugim izvorima, koji navode vrijednosti ispod 16 % bez upale i ispod 20 % s upalom (141 - 143). Skupina „*Preventive Services Task Force*“ u SAD-u primijetila je da bi određivanje koncentracije serumskog feritina moglo imati ograničenu važnost tijekom kasne trudnoće jer njegova koncentracija često opada s odmakom gestacijske dobi budući da se majčine zalihe željeza koriste za opskrbu posteljice i fetalne cirkulacije, ali, s druge strane, za određivanje statusa željeza nedovoljno je samo mjerenje koncentracije hemoglobina ili hematokrita (144). Osim nedostatka željeza, nisu identificirani drugi uzroci niskih koncentracija serumskog feritina. Ovisno o graničnim vrijednostima koje se koriste za definiranje nedostatka željeza, oko 40 % žena ima nedostatak željeza tijekom prvog tromjesečja. Tek u novije vrijeme počela se istraživati homeostaza željeza majke, placente i fetusa te se počelo raspravljati o mogućim uzrocima poremećaja homeostaze željeza koji bi mogli rezultirati patološkom trudnoćom. Dosadašnje spoznaje o mehanizmu regulacije željeza proizašle su iz istraživanja na životinjskim modelima te su potrebna daljnja istraživanja kako bi se ista saznanja mogla u budućnosti primijeniti i na trudnoću u žena (145 - 148).

1.4.1. Intestinalna apsorpcija željeza

Apsorpcija nehemskog željeza se povećava tijekom trudnoće, pa se pretpostavlja da se i apsorpcija hema povećava na sličan način (149). Smanjena koncentracija željeza u jetri i slezeni u trudnoći u odnosu na koncentracije željeza bez trudnoće na životinjskim modelima pokazuje da se skladišteno željeza učinkovito mobilizira tijekom trudnoće. Smatra se da upravo taj proces omogućava prijenos željeza kroz placentu i prilagodbu majke na trudnoću (150, 151).

Regulaciju i dostupnost željeza u velikoj mjeri kontrolira hormon hepcidin koji se sintetizira u jetri, a kontrolira koncentraciju željeza u plazmi i prijenos do tkiva (152). Hepcidin inhibira glavne putove željeza u plazmu kao što su intestinalna apsorpcija, otpuštanje iz makrofaga koji recikliraju željezo iz starih eritrocita i mobilizaciju skladištenog željeza (Slika 4). Hepcidin djeluje preko svog receptora Fpn-a koji je eksprimiran u svim tkivima koja aktivno otpuštaju željezo u plazmu. Hepcidin vezanjem za Fpn potiče njegovu razgradnju što rezultira smanjenim otpuštanjem željeza u plazmu. Dakle, otpuštanje željeza do ciljanih tkiva (kao što je placenta) je u obrnutoj korelaciji s koncentracijom hepcidina (94).



Slika 4. Protok željeza u različitim stanjima. Preuzeto i prilagođeno prema Sangkhae Veena. (145).

Općenito, u intestinalnoj crijevnoj apsorpciji željezo može potjecati iz hema ili feritina ili se može pojaviti kao slobodno nehemsko željezo. Prijenos željeza podrijetlom iz hema vjerojatno je posredovan endocitozom hema nakon čega slijedi oslobađanje željeza iz hema unutar endosoma pomoću hem-oksigenaze (HO). Nehemsko feri željezo mora se reducirati, po mogućnosti pomoću DCYTB-a ili drugih ferireduktaza na staničnoj površini, a potom unijeti u stanice putem DMT1. Protonski gradijent koji potiče aktivnost DMT1 održava se kombiniranim djelovanjem apikalnog izmjenjivača natrij/vodik i bazolateralne $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPaze}$. DCYTB olakšava redukciju feri željeza putem prijenosa elektrona iz unutarstaničnog askorbata što predstavlja potencijalni mehanizam kojim vitamin C poboljšava apsorpciju željeza (153, 154). DCYTB je snažno eksprimiran u duodenalnim enterocitima tijekom nedostatka željeza i akutne hipoksije (155, 156) te DCYTB može objasniti aktivnost ferireduktaze koja reducira Fe^{3+} u Fe^{2+} i olakšava unos željeza putem DMT1 (157). Ovi podaci sugeriraju na važnu fiziološku ulogu DCYTB-a u crijevnom prijenosu željeza. Međutim, nedavna istraživanja na miševima s ciljano inaktiviranim genom (engl. *knockout*) pokazala su da DCYTB nije potreban za učinkovitu apsorpciju željeza (158). Stoga je vjerojatno da su, u bazalnim uvjetima, druge reduktaze važne ili da komponente prehrane ili gastrointestinalne sekrecije osiguravaju redukcijsku snagu potrebnu za promicanje apsorpcije željeza pa enzimska redukcija ne mora ograničavati brzinu. Također je važno uzeti u obzir da je navedeno opaženo na laboratorijskim glodavcima. Logično je predviđanje da bi se fiziologija prijenosa nehemskog željeza mogla razlikovati u sisavaca, pogotovo jer štakori i miševi mogu sintetizirati askorbinsku kiselinu, a ljudi ne mogu.

Željezo iz feritina apsorbira se u enterocite nepoznatim mehanizmom i vjerojatno se zatim oslobađa unutar lizosoma. Željezo dobiveno iz sva tri izvora (reciklirano, crijevna apsorpcija, zalihe) čini ukupno unutarstanično željezo. Nije poznato postoje li željezni šaperoni u enterocitima i stoga nije jasno kako se željezo prenosi unutar stanica nakon apsorpcije. Željezo namijenjeno iznosu prolazi bazolateralnu membranu putem Fpn-a. Iznos fero željeza funkcionalno je povezano s oksidacijom željeza preko hefestina, a moguće i drugih feroksidaza. U konačnici, feri željezo se veže za transferin u intersticijskim tekućinama ili u vaskulaturi i distribuira se po cijelom tijelu.

Istraživanja su pokazala da se crijevna apsorpcija željeza stimulira kada se zalihe željeza u tijelu smanjuju. Apsorpcija željeza se povećava i kada se stimulira eritropoeza (npr. gubitkom krvi ili akutnom hemolizom), budući da sinteza hemoglobina u eritrocitima u razvoju zahtijeva velike količine željeza. Također, apsorpcija željeza se povećava kao odgovor na hipoksiju tkiva. Iako se to djelomično može odnositi na promjene u brzini eritropoeze, specifično se

odnosi na koncentracije kisika. Na primjer, apsorpcija željeza se povećava tijekom hipoksije prije povećanja proizvodnje eritrocita, što ukazuje da hipoksija ima izravan učinak na crijeva. U skladu s ovim opažanjem, regulacijske molekule željeza u jetri i geni koji kodiraju prijenosnike željeza u dvanaesniku izravno reagiraju hipoksiju (159 - 163).

Peptidni hormon hepcidin pokazao se važan u regulaciji sustavne homeostaze željeza tijekom preopterećenja željezom i infekcije (upale). Njegovo djelovanje se očituje smanjenjem cirkulirajućeg željeza blokiranjem crijevne apsorpcije željeza i inhibicijom oslobađanja željeza iz skladištenog oblika feritina (164). Istraživanja su pokazala da miševi kod kojih postoji prekomjerna ekspresija hepcidina razvijaju tešku anemiju uzrokovanu nedostatkom željeza (165).

Fiziološki učinci hepcidina posredovani su interakcijom cirkulirajućeg peptida s Fpn-om na membrani ciljnih stanica, što dovodi do internalizacije i eventualne degradacije Fpn-a, čime se ograničava otpuštanje željeza (106, 128).

Ekspresija hepcidina inducira se kada su zalihe željeza u tijelu povišene, kao i tijekom infekcije i upale, a krajnji rezultat je niža koncentracija željeza u serumu. Utvrđen je obrnuti odnos između izlučivanja hepatičkog hepcidina te ekspresije i aktivnosti duodenalnih prijenosnika željeza kao što su DMT1 i Fpn (166).

Duodenalni enterociti predstavljaju važnu metu hepcidina, što vjerojatno objašnjava učinak ovog peptida na intestinalni prijenos željeza. U skladu sa svojom ulogom u regulaciji homeostaze željeza, ekspresija hepcidina mijenja se prema tjelesnim potrebama za željezom (163). Sinteza hepcidina smanjuje se tijekom nedostatka željeza, hipoksije i trudnoće te kada se stimulira eritropoeza, što omogućuje odgovarajuću apsorpciju željeza i učinkovito otpuštanje željeza iz zaliha. Suprotno tome, ekspresija hepcidina se povećava kada su koncentracije željeza u tijelu odgovarajuće ili povišene, učinkovito smanjujući crijevnu apsorpciju i dopuštajući da se višak željeza skladišti u retikuloentodelnim (RE) makrofagima i hepatocitima. Upala također inducira ekspresiju hepcidina, što vjerojatno objašnjava hipoferitinemiju koja prati kronična upalna stanja (121, 167).

Kada su koncentracije hepcidina povećane, željezo se zadržava u enterocitima ili makrofagima i nije dostupno za stvaranje eritrocita. Kada se koncentracija hepcidina smanji, bilo zbog nedostatka željeza ili povećane eritropoeze, apsorbirano željezo u enterocitima ili pohranjeno željezo u makrofagima mobilizira se u cirkulaciju (168, 169). Na apsorpciju željeza iz hrane također utječu izvor željeza i pH dvanaesnika. Udio željeza apsorbiranog iz hem željeza i

neprehrambenih izvora kao što su željezne soli ili saharati je otprilike 10 – 15 % elementarnog željeza, dok se manje od 2 % elementarnog željeza apsorbira iz biljnih izvora. Nedostatak željeza može udvostručiti udio apsorpcije željeza iz bilo kojeg izvora (170). Željezo se prenosi iz enterocita do plazmatskog prijenosnog proteina željeza transferina. Količina željeza vezanog za transferin u cirkulaciji u normalnim okolnostima je približno 0,2 mg/kg. Skladišno željezo nalazi se u makrofagima slezene, koštane srži ili jetre te u stanicama jetrenog parenhima (5 - 6 mg/kg u žena, 10 - 12 mg/kg u muškaraca). Željezo iz makrofaga uglavnom se dobiva recikliranjem starih eritrocita, dok stanice jetrenog parenhima primaju željezo iz transferina ili oslobađaju željezo koje se onda veže na transferin. Najveća količina željeza u tijelu nalazi se u cirkulirajućim eritrocitima i eritroidnim prekursorima u koštanoj srži (približno 28 mg/kg u žena i 32 mg/kg u muškaraca). Gotovo svo željezo iz eritrocita je u obliku Hb-a (171).

Poznato je da tijekom trudnoće dolazi do majčinog potiskivanja ekspresije hepcidina, ali mehanizam samog potiskivanja još nije poznat. Pretpostavlja se da bi djelomično potiskivanje ekspresije hepcidina moglo uzrokovati razrjeđenje plazme, no s obzirom na to koliko je smanjena ekspresija hepcidina taj razlog je nedovoljan (166). Dodatno na potiskivanje ekspresije hepcidina može utjecati postupni razvoj nedostatka željeza. Hepcidin je najniži u trudnica s eritropoezom ograničenom željezom; međutim, i majke s velikim zalihama željeza imaju niske koncentracije hepcidina pri porodu, što sugerira da bi ekspresija hepcidina mogla biti stalno potisnuta tijekom trudnoće (172).

Glavni podražaji za koje se zna da reguliraju sintezu hepcidina uključuju željezo (i cirkulirajuće i pohranjeno željezo povećavaju hepcidin), eritropoetsku aktivnost (suzbija hepcidin) i upalu (povećava hepcidin) (160). Čini se da je regulacija ekspresije hepcidina svim tim putovima očuvana tijekom trudnoće, no slabi kako trudnoća napreduje. U studijama na ljudima, tijekom trudnoće, pa čak i pri porodu, majčine koncentracije hepcidina u pozitivnoj su korelaciji sa serumskim feritinom i TSAT-om i obrnuto koreliraju sa sTfR-om i Hb-om, što ukazuje na stimulaciju sinteze hepcidina pomoću željeza i potiskivanje sinteze hepcidina zbog nedostatka željeza i eritropoetske aktivnosti (173 - 176). Međutim, odmah nakon poroda koncentracije hepcidina u serumu rastu, vjerojatno zbog velikih fizioloških promjena koje su povezane s porodom i nisu u korelaciji sa serumskim feritinom ili koncentracijama željeza u serumu.

Također, slabo je poznato kako suplementacija željezom utječe na ekspresiju hepcidina tijekom trudnoće. Uzimanje dodataka željeza u žena koje nisu trudne brzo povećava ekspresiju hepcidina i, posljedično, smanjuje apsorpciju željeza. Ako dodatak željeza u trudnoći ima isti učinak na ekspresiju majčina hepcidin, dnevni dodatak željeza možda neće biti optimalan za

postizanje najučinkovitije apsorpcije željeza (177, 178). Istraživanja su pokazala da ishodi kod majki koje su svakodnevno uzimale nadomjestak željeza tijekom trudnoće nisu bili bolji u usporedbi s majkama i novorođenčadi koje su uzimale nadomjestak željeza samo povremeno (179).

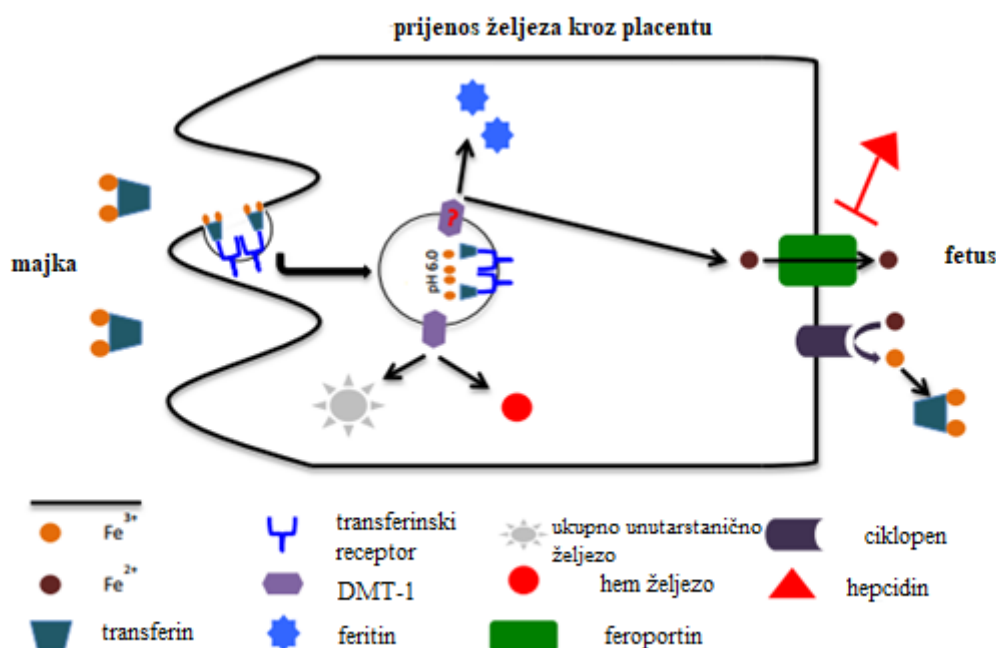
Isto tako, smatra se da blaga upala ne izaziva veliko povećanje ekspresije hepcidina, što sugerira da koncentracije hepcidina nisu u korelaciji s upalnim biljezima. Što se tiče trudnoća s komplikacijama povezanih s intenzivnijom upalom može doći do većeg povećanja ekspresije hepcidina, a to može rezultirati smanjenom dostupnošću željeza za fetus (173, 176). Također se očekuje da će povećana ekspresija hepcidina smanjiti apsorpciju željeza iz dodataka koji se obično propisuju trudnicama i čak bi mogao smanjiti učinkovitost intravenske terapije željezom. Blago povišene koncentracije hepcidina u serumu zabilježene su u pretilih i u trudnica sa preeklampsijom u usporedbi sa zdravim trudnicama (180, 181). Ove koncentracije nisu imale očigledan negativan utjecaj na hematološke parametre ili parametre željeza u majke ili novorođenčeta u ovim studijama, što sugerira da su koncentracije hepcidina još uvijek dovoljno niske da omoguće učinkovito korištenje željeza tijekom trudnoće. Potrebna su sustavna istraživanja hepcidina u trudnoćama s komplikacijama kako bi se odredio raspon koncentracija hepcidina u različitim stanjima i utjecaj koncentracija hepcidina na ishode trudnoće (182).

1.4.2. Prijenos željeza kroz posteljicu

U trudnoći posteljica povezuje majku i fetus tako što regulira prijenos hranjivih tvari uključujući i željezo. Taj prijenos ide samo u jednom smjeru, odnosno nakon što posteljica preuzme željezo od majke ne može ga ponovno vratiti u majčinu cirkulaciju. To upućuje na bržu potrošnju zaliha željeza kod majke nego kod fetusa (183, 184). Također je poznato da se, kako trudnoća napreduje, povećava brzina prijenosa željeza kroz placentu, što ukazuje na važnost željeza u razvoju embrija i fetusa. Kako se mijenjaju potrebe fetusa za željezom tako se mijenja i mehanizam prijenosa kroz posteljicu.

Prijenos željeza u crijevima i kroz posteljicu se razlikuje, odnosno prijenos kroz posteljicu je posredovan isključivo transferinom. To su potvrdila mnoga istraživanja na miševima koja su pokazala da je novorođenčad miševa s nedostatkom transferina bila jako anemična i preživljavala je samo 2 tjedna (185). Prijenos željeza kroz posteljicu počinje vezanjem holo-transferina na transferinski receptor na apikalnoj membrani sinciciotrofoblasta, a onda dolazi do endocitoze nastalog kompleksa u klatrinom obložene vezikule (183). Nakon endocitoze

mehanizam željeza je sličan kao i kod drugih stanica. Smanjeni pH u endosomu pomaže oslobađanju željeza iz kompleksa Tf-TfR. Nakon redukcije željezo se iz endosoma oslobađa putem DMT-1 i dalje može biti pohranjeno u obliku feritina ili ugrađeno u hem ili proteine koji imaju hem kao prostetsku skupinu unutar posteljice ili se može prenijeti uz pomoć Fpn-a u fetalnu cirkulaciju (186, 187). Ciklopen feroksidaza u ovom procesu oksidira željezo nakon prijenosa uz pomoć Fpn-a (Slika 5) (188).



Slika 5. Prijenos željeza kroz placentu. Preuzeto i prilagođeno prema Duck KA (189)

Za razliku od regulacije prijenosa željeza preko enterocita, regulacijski prijenos željeza kroz posteljicu utječe na status željeza i majke i fetusa. Primarni regulator homeostaze željeza i za majku i za fetus je fetalna jetra. Kako trudnoća napreduje tako se fetalna apsorpcija željeza povećava, što znači da se koncentracija željeza u majke smanjuje, a ekspresija TfR (TfR1, TfR2) na apikalnoj membrani sinciotrofoblasta se povećavaju. Rezultati istraživanja na miševima su pokazali da dostupnost željeza u prehrani izravno utječe na status željeza i kod majke i fetusa. Također, ekspresija hepcidina kod majke snažno korelira s koncentracijom željeza u fetusu, iz čega proizlazi i očekivanje da se TfR na bazalnoj membrani sinciotrofoblasta smanjuje kako se povećava koncentracija željeza u fetalnoj jetri (190, 191).

1.4.3. Laboratorijska dijagnostika statusa željeza u trudnoći

Anemija s koncentracijom Hb-a ne nižom od 10 g/dL na kraju trećeg tromjesečja, javlja se u gotovo svim trudnoćama i u većini slučajeva odražava fiziološki proces, a ne stanje nedostatka željeza ili temeljni hematološki poremećaj. Značajna anemija u trudnoći (definirana kao koncentracija Hb < 11 g/dL u prvom tromjesečju ili < 10 g/dL u drugom i trećem tromjesečju) javlja se kod 2 % - 26 % žena (trudnica), ovisno o ispitivanoj populaciji (192, 193). Nedostatak željeza u trudnoći obično uzrokuje tzv. fiziološku anemiju koja u konačnici dovodi do poboljšanja placentarne perfuzije smanjenjem viskoznosti krvi majke i olakšavanja dostave kisika i hranjivih tvari do fetusa povećanjem ukupnog volumena eritrocita (194).

Laboratorijski parametri koji se koriste za identifikaciju anemije u kliničkoj praksi (hematokrit (Hct), Hb, broj eritrocita (RBC)), izražavaju se kao koncentracije/broj na temelju volumena cijele krvi, a povećan volumen plazme uzrokuje njihovo smanjenje pa parametri mogu pokazivati "anemiju". Prema ovom kriteriju, fiziološka anemija u trudnoći zapravo nije anemija: povećanje ukupnog volumena eritrocita od 15 % - 25 % događa se u trudnoći, ali je prikriveno učinkom razrjeđivanja krvi zbog povećanja volumena plazme (195). To je potaknuto povećanjem koncentracije eritropoetina u serumu tijekom kasnog drugog i ranog trećeg tromjesečja i olakšano je ili potencijalno ograničeno dostupnošću željeza. Trudnice koje koriste dodatke željeza imaju veći porast broja eritrocita nego žene koje ne koriste dodatke željeza, a žene s ograničenim zalihama željeza na početku trudnoće imat će ograničen porast broja eritrocita (192, 196).

Nakon ponovnog uspostavljanja ravnoteže između volumena plazme i broja eritrocita, općenito se smatra da koncentraciju Hb < 11 g/dL u kasnom prvom tromjesečju i < 10 g/dL u drugom i trećem tromjesečju treba ispitati, odnosno pronaći uzrok koji nije fiziološka anemija trudnoće. Volumen plazme majke općenito se smanjuje tijekom posljednjih tjedana trudnoće, a posljedično se povećavaju Hct, Hb i broj eritrocita (197, 198). Volumen krvi majke se vraća na razine prije trudnoće u roku od jednog do šest tjedana nakon poroda, a majčina eritropoeza se povećava u kasnoj gestaciji i vraća se u normalu oko mjesec dana nakon poroda (199).

U kliničkoj praksi najčešći laboratorijski testovi u trudnoći za određivanje statusa željeza su serumski feritin i TSAT. Nedostatak željeza može postojati i kada su zalihe željeza smanjene, a da deficit željeza nije dovoljno velik da dovede do smanjenja koncentracije Hb-a. U studiji koja je definirala normalni raspon koncentracija sTfR-a u serumu, nedostatak željeza s normalnom krvnom slikom primijećen je u 9,5 % zdravih žena, dok u drugoj studiji 42 % žena je imao nedostatak željeza u prvom tromjesečju trudnoće bez anemije (200). Nedostatak željeza

bez anemije često je samo prolazna faza te je klinički značaj nedostatka željeza bez anemije danas predmet mnogih istraživanja.

Anemija uzrokovana nedostatkom željeza se razvija kada je unos željeza nedovoljan da zadovolji stalne potrebe za proizvodnjom eritrocita. Početni stadij naziva se eritropoeza s nedostatkom željeza ili ponekad eritropoeza s ograničenjem željeza. Ovaj se izraz također koristi za opisivanje eritropoeze u okolnostima kao što je anemija kronične bolesti/upale gdje sinteza hepcidina koju potiču citokini smanjuje mobilizaciju željeza usprkos dovoljnom skladištenju željeza. U početnim fazama eritropoeze s nedostatkom željeza, koncentracija Hb-a i Hct-a počinje postupno padati, ali eritrociti ostaju morfološki normalni. Koncentracija željeza u serumu, TIBC, koncentracija transferina i koncentracija feritina sniženi su u ovoj fazi. U konačnici to znači ako je unos željeza dovoljan za održavanje Hb-a i Hct-a i dnevnih gubitaka, pacijent može ostati u stabilnom stanju eritropoeze s nedostatkom željeza. U suprotnom, kako se nezadovoljene potrebe za željezom nastavljaju, dolazi do pada Hb-a od 1 - 2 mg/dL (što još uvijek može biti unutar referentnog intervala Hb-a), a MCV počinje padati ubrzo nakon toga, kao i prosječna koncentracija hemoglobina u eritrocitima (engl. *mean corpuscular hemoglobin concentration, MCHC*). Brzina kojom se te promjene događaju i napredak do anemije uzrokovane nedostatkom željeza ovisi o trenutnom deficitu željeza. Ovaj proces smanjenog MCV-a i MCHC-a dovodi do karakterističnog morfološkog izgleda stanica u prisustvu anemije uzrokovane nedostatkom željeza (201).

Status željeza procjenjuje se određivanjem različitih parametara. Ipak, dobivene rezultate potrebno je pažljivo interpretirati unutar specifičnog skupa okolnosti. Koncentracija feritina u serumu je pokazatelj skladištenog željeza u RES-u, a koncentracija feritina u serumu koja je ispod normalnog raspona je najspecifičniji biokemijski pokazatelj nedostatka željeza. Brojne studije sugeriraju da je određivanje koncentracije feritina najučinkovitiji pojedinačni test za probir nedostatka željeza u trudnoći. Međutim, postoje neslaganja oko koncentracije feritina u serumu koja bi predstavljala granicu za dijagnosticiranje nedostataka željeza u žena (202 - 204). Posljedično, ta neslaganja uzorkuju visoku učestalost asimptomatskog nedostatka željeza među zdravim ženama na kojima su izvedeni referentni intervali. Na primjer, jedna studija predlaže donju granicu referentnog intervala za koncentraciju feritina u serumu 11 ng/mL u žena, dok druge studije sugeriraju da je koncentracija feritina koja ukazuje na odsutnost ili značajno smanjene zalihe željeza u koštanoj srži približno 30 ng/mL feritina, bez obzira na spol (205, 206). Nedavni sustavni pregled koji je proučavao granične koncentracije serumskog feritina za definiranje subkliničkog nedostatka željeza u trudnoći došao je do zaključka da je

većina studija koristila granične koncentracije od 12 - 15 ng/mL, ali je i predložio granične koncentracije feritina 30 ng/mL za subklinički nedostatak željeza. Obrazloženja za definiranje graničnih koncentracija feritina za subklinički nedostatak željeza rijetko su opisivana, a zaključak autora bio je da je potrebna standardizacija granične koncentracije feritina za definiranje subkliničkog nedostatka željeza (203). Postavljanje nižih graničnih koncentracija feritina povezane su sa značajno smanjenom osjetljivošću za nedostatak željeza uz minimalno povećanje osjetljivosti. Procijenjeno je da je granična koncentracija feritina od 30 ng/mL 98 % specifična i 92 % osjetljiva za nedostatak željeza, dok je granična koncentracija feritina u serumu od 10 ng/mL samo 25 % osjetljiva (199). Iako je niska koncentracija serumskog feritina uvijek pokazatelj nedostatka željeza, poznato je da je serumski feritin reaktant akutne faze i može se povećati nerazmjerno zalihamo željeza zbog infekcije, upale, bolesti jetre, maligne bolesti ili drugih stanja. U takvim okolnostima, nedostatak željeza može biti prisutan s normalnom ili blago povećanom koncentracijom feritina u serumu. To obično nije problem kod zdravih mladih žena, ali može biti zbunjujući čimbenik kod pacijenata s više dijagnoza/stanja. Predložene su metode za prilagodbu serumskog feritina na temelju markera upale kao što je C-reaktivni protein (CRP), iako će u većini slučajeva upotreba dodatnih laboratorijskih testova identificirati nedostatak željeza kada se sumnja na njega u pacijenata s koncentracijom feritina u referentnim vrijednostima u serumu (207).

Kao što je ranije navedeno, željezo potrebno za eritropoezu cirkulira vezano za transferin. Transferin se može izravno mjeriti i izraziti kao koncentracija ili zajedno s koncentracijom željeza izraziti kao TIBC. Iz kliničke perspektive, i transferin i TIBC služe istoj dijagnostičkoj svrsi, a klinički laboratoriji često koriste jedno ili drugo. Transferin i TIBC su povišeni kod nekomplikiranog nedostatka željeza, ali mogu biti smanjeni u upali (208, 209). Slično, smanjena koncentracija željeza u serumu ili plazmi može odražavati smanjene zalihe željeza ili može odražavati poremećenu mobilizaciju željeza zbog upale posredovane hepcidinom. Dostupnost željeza za eritropoezu (za razliku od zaliha željeza dobivenih serumskim feritinom) određuje se postotkom TSAT-a. Smanjena vrijednost TSAT-a (osobito kada je koncentracija transferina tj. vrijednost TIBC-a normalna ili povišena) korelira s drugim pokazateljima nedostatka željeza u trudnoći i može ukazivati na nedostatak željeza u trudnica s normalnom koncentracijom feritina kod kojih se sumnja na nedostatak željeza (210, 211).

Povećana koncentracija serumskog sTfR-a povezana je s nedostatkom željeza, ali također i s povećanom eritropoezom zbog kongenitalnih hemoglobinopatija, drugih uzroka hemolize ili neučinkovite eritropoeze. Ne povećava se niti smanjuje upalom (200). U trudnoći, dokaz

povišene koncentracije sTfR-a u serumu, osobito kod pacijentica s normalnom ili povišenom koncentracijom feritina u serumu za koju se sumnja da je povišena nerazmjerno zalihama željeza, potvrđuje nedostatak željeza (212). Specifičnost sTfR-a za nedostatak željeza može se povećati korištenjem omjera sTfR-a i logaritamske vrijednosti serumskog feritina (sTfR indeks). Međutim, neka istraživanja pokazuju da sTfR indeks nije učinkovitiji od koncentracije feritina u serumu (213).

Uloga hepcidina kao primarnog medijatora homeostaze željeza već je spomenuta. Koncentracije hepcidina su povećane u anemiji upale/kronične bolesti i smanjene kod stanja s nedostatkom željeza te se koncentracije hepcidina mogu koristiti za razlikovanje ova dva poremećaja, od kojih su oba povezana s hipoferitinemijom. Mjerenje koncentracije hepcidina u kliničke svrhe trenutno nije široko dostupno, ali bi moglo postati u sljedećih nekoliko godina. Čini se da je hepcidin učinkovit pokazatelj nedostatka željeza u trudnoći, ali njegovu specifičnu ulogu u dijagnostici tek treba odrediti (214 - 216).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Najnovija istraživanja bave se razjašnjavanjem mehanizama regulacije prijenosa željeza kroz posteljicu, s naglaskom na ulogu glavnog regulatora željeza hepcidina te se po prvi put opisuju strukturni i biokemijski mehanizmi vezanja hepcidina na Fpn (19, 182, 217, 218). Novija istraživanja također ukazuju na moguću povezanost između poremećaja regulatora homeostaze željeza, osobito hepcidina, i ranog spontanog pobačaja. Iako se u današnje vrijeme laboratorijska dijagnostika statusa željeza oslanja na mjerenje koncentracije željeza (Fe), Hb-a i feritina, to nije dovoljno za dobivanje uvida u stvarni status željeza majke, o kojem, posebno u ranoj trudnoći, ali i kasnije, ovisi organogeneza embrija i rast fetusa. Stoga je važno pronaći nove biokemijske biljege za rano prepoznavanje nepovoljnog ishoda trudnoće u prvom tromjesečju. Većina spontanih pobačaja se događa u ranoj trudnoći. Postoji 11 – 22 % rizika od pobačaja do 20. tjedna trudnoće, s tim da je rizik od pobačaja najveći do 14. tjedna (7, 8). Urednu trudnoću karakterizira čak deset puta veća potreba za željezom da bi se održao rast posteljice i ploda te pojačana eritropoeza majke (165, 175). Volumen plazme se povećava za 10 – 15 % od 6. - 12. tjedna trudnoće, a broj eritrocita se povisuje između 8. do 10. tjedna trudnoće te se do kraja trudnoće ukupno poveća za 20 do 30 % (219, 220). Ima više različitih tipova gubitka trudnoće, a jedan od njih je zadržani pobačaj kod kojeg postoji asimptomatska ili „zadržana“ smrt (bez otkucaja srca) embrija ili fetusa bez dovoljnih kontrakcija maternice za izbacivanjem ploda (19).

Homeostaza željeza dinamičan je regulacijski proces koji koristi transferin za prijenos željeza između mjesta apsorpcije, recikliranja i skladištenja do mjesta iskorištavanja željeza (221). Apsorpcija i razdioba željeza u tkivu uglavnom su kontrolirane interakcijom jetrenoga hormona hepcidina i Fpn-a. Fpn je eksprimiran u tkivima koja pohranjuju i prenose željezo, poput posteljice, te funkcionira kao receptor hepcidina i jedini je poznati izvoznik elementarnog željeza iz stanica u višestaničnom organizmu (106, 222). Nakon apsorpcije željezo se prenosi u cirkulaciju preko Fpn-a, gdje se veže na transferin, glavni prijenosnik željeza u plazmi (45). Željezo iz cirkulacije majke, s kompleksa željezo-transferin, preuzima transferinski receptor 1 (TfR1) koji se nalazi na apikalnoj membrani sinciotrofoblasta (epitel na resicama posteljice koji se povezuje s majčinom krvlju i sudjeluje u razmjeni hranjivih tvari). Nakon otpuštanja željezo se izvozi uz pomoć Fpn-a na bazalnu stranu placentalnog sinciotrofoblasta te se prenosi u fetalnu cirkulaciju. TfR1 i transferin se zatim vraćaju na apikalnu membranu sinciotrofoblasta gdje se transferin oslobađa u cirkulaciju majke i ciklus se ponavlja (223, 224). sTfR je skraćeni monomer tkivnog receptora, bez prvih 100 aminokiselina, a serumske koncentracije sTfR-a su proporcionalne koncentraciji staničnog TfR1 (225, 226). Koncentracije sTfR-a ostaju nepromijenjene sve dok se ne potroše zalihe željeza. Na manjak

željeza u krvi ukazuje porast koncentracije sTfR-a koji je proporcionalan manjku željeza u tkivima. Porast sTfR-a se događa prije pojave značajnog pada Hb-a. Za razliku od feritina, sTfR nije pozitivni reaktant akutne faze te zbog toga serumski feritin pruža samo ograničene informacije o zalihama željeza, a sTfR se može koristiti za točnu procjenu statusa željeza.

U posljednjem desetljeću došlo je do značajnog napretka u razumijevanju sustavne homeostaze željeza, odnosno hepcidina kao glavnog regulatora željeza. Međutim, samo nekoliko istraživanja određivalo je koncentraciju hepcidina tijekom uredne trudnoće i trudnoće s komplikacijama. Zaključeno je da je koncentracija hepcidina u trudnica niža nego u žena koje nisu trudne te da se koncentracija hepcidina smanjuje kako trudnoća napreduje (u drugom i trećem tromjesečju), ali nisu poznati mehanizmi koji potiskuju ekspresiju hepcidina tijekom trudnoće (227, 228). Istraživanje koje se bavilo određivanjem koncentracija serumskog hepcidina tijekom rane uredne trudnoće i spontanijh pobačaja zaključilo je da su koncentracije hepcidina u spontanijh pobačajima prvoga tromjesečja skoro dva puta više nego u urednim trudnoćama prvoga tromjesečja te su još više povišene u odnosu na koncentraciju hepcidina kod žena koje nisu trudne. Bitno je naglasiti da pritom među ispitivanim skupinama nije bilo promjena u uobičajenim parametrima koji se koriste za procjenu statusa željeza (Fe, feritin) (229). Nadalje, isti rezultati su dobiveni u istraživanju u kojem se ispitivao status željeza u urednim trudnoćama i spontanijh pobačajem u ranoj trudnoći, s naglaskom na regulatore hepcidin i eritroferon, gdje je utvrđeno povećanje koncentracije serumskog hepcidina kod spontanog pobačaja za 55 % u odnosu na koncentraciju hepcidina u urednoj trudnoći prvog tromjesečja. Autori su zaključili da je omjer hepcidin/eritroferon značajno povećan u odnosu na urednu trudnoću, kao i omjer eritropoetin/eritroferon koji je bio za 41 % veći u odnosu na urednu trudnoću. Svrha navedenog istraživanja bila je pronalazak pokazatelja nepovoljnoga ishoda trudnoće, jer se dosadašnji pokazatelji metabolizma željeza (Fe, feritin, eritropoetin, nezasićeni kapacitet vezanja željeza (UIBC), TIBC, Hb) nisu mogli u tom smislu upotrijebiti. Iako je postojala jaka povezanost između spontanijh pobačaja i poremećaja homeostaze željeza teško je bilo razjasniti izravnu uzročnu vezu (230). U navedenim istraživanjima nije bio definiran tip spontanoga pobačaja u ranoj trudnoći. Spontani pobačaj je, između ostalog, potvrđivan padom β -HCG-a što upućuje na to da su uključivali i biokemijsku trudnoću. Također, istraživanja na miševima pokazuju da manjak željeza uzrokovan prekomjernom ekspresijom hepcidina ima za posljedicu spontani pobačaj (231). Do danas je poznato samo jedno istraživanje, i to na modelu miševa, koje se temeljilo na ispitivanju ekspresije Fpn-a i TfR1 te njihovoj ulozi u prijenosu željeza od majke kroz posteljicu do ploda, u ovisnosti o statusu željeza majke. Rezultati ovoga istraživanja pokazali su da hepcidin ženki miševa

određuje koncentraciju željeza koju preuzima posteljica i na taj način štiti fetus od viška željeza i onda kada je ženka preopterećena željezom. Također, autori su utvrdili da tijekom značajnog manjka željeza posteljica smanjuje regulaciju Fpn-a kako bi održala vlastitu homeostazu željeza, što rezultira smanjenom dostupnosti željeza za prijenos do ploda. Upravo taj odgovor posteljice koji je dao prednost placentnom zadržavanju željeza, unatoč fetalnom manjku željeza, je od ključne važnosti za daljnja istraživanja (232, 233). Dosadašnja istraživanja ukazuju na potrebu za određivanjem serumske koncentracije Fpn-a i sTfR-a u ranom zadržanom spontanom pobačaju u odnosu na urednu trudnoću s ciljem pronalaska ranih prognostičkih pokazatelja bioraspoloživosti željeza kod majke.

2.1. Cilj i hipoteze istraživanja

Hipoteza:

Snizene serumske koncentracije Fpn-a i povećane serumske koncentracije sTfR-a pokazatelj su poremećaja homeostaze željeza te bi mogli biti važni za razumijevanje ranog zadržanog spontanog pobačaja.

Glavni cilj:

Utvrditi promjene koncentracija Fpn-a i sTfR-a u žena s ranim zadržanim spontanim pobačajem u odnosu na žene s urednom trudnoćom u prvom tromjesečju.

Specifični ciljevi:

- ispitati razlike u vrijednostima različitih omjera izvedenih od parametara statusa željeza između skupina,
- utvrditi postoji li razlika u koncentracijama parametara statusa željeza i vrijednostima omjera s obzirom na koncentraciju feritina,
- utvrditi postoji li razlika u koncentracijama parametara statusa željeza i vrijednostima omjera prije i nakon organogeneze, odnosno po gestacijskom tjednu između skupina,
- utvrditi postoji li međusobna povezanost Fpn-a i sTfR-a, kao i njihova povezanost s drugim parametrima statusa željeza u obje ispitivane skupine,

- za sve parametre procijeniti predikcijski potencijal te predložiti kombinirani model od više parametara s najvećim predikcijskim potencijalom za identifikaciju žena s rizikom za zadržani spontani pobačaj,
- ispitati dijagnostičku točnost: osjetljivost, specifičnost i površinu ispod krivulje za parametre statusa željeza.

3. ISPITANICE I METODE

3.1. Ispitanice

Istraživanje je provedeno u razdoblju od 1. 2. 2023. do 1. 2. 2024. god. u Klinici za ginekologiju i porodništvo te u Transfuzijskom centru Sveučilišne kliničke bolnice (SKB) Mostar (BiH). Ispitanice su podijeljene u dvije skupine: uredna trudnoća (kontrolna skupina) i zadržani spontani pobačaj (ispitivana skupina). Broj ispitanica (veličina uzorka) koji je sudjelovao u istraživanju za dvije skupine procijenjen je uz pomoć programa MedCalc (verzija 20.027). Uzevši u obzir istraživački cilj i planirane statističke obrade, za izračunavanje razlika u koncentracijama Fpn-a i sTfR-a između dvije skupine ispitanica, napravljeno je pilot istraživanje. Za izračun veličine uzorka zadani su nešto stroži kriteriji s pretpostavljenom $\alpha = 0,05$ i snagom istraživanja od 90 %. Prema zadanim kriterijima dobiven je izračun od ukupno 104 ispitanice, 52 u svakoj skupini. U ovom istraživanju koristila se isključivo ona količina krvi, odnosno seruma i plazme, koja je preostala nakon rutinskih dijagnostičkih pretraga. Za ispitivanu skupinu to je bio uzorak krvi uzorkovan u jutarnjim satima u Klinici za ginekologiju i porodništvo, nakon zaprimanja pacijentice i ultrazvučnog utvrđivanja ranog zadržanog spontanog pobačaja, prije indukcije medikamentima, u svrhu određivanja rutinskih dijagnostičkih pretraga (KKS, CRP, koagulogram) potrebnih za odgovarajuće liječenje. Za kontrolnu skupinu to je bio preostali uzorak krvi uzorkovan u jutarnjim satima u Transfuzijskom centru, nakon utvrđene krvne grupe i indirektnoga Coombsova testa. Ispitanicama kontrolne skupine, nakon potvrđene uredne trudnoće, u rutinskoj dijagnostičkoj obradi određuje se KKS, CRP, Fe i hepatogram. Sve potencijalne ispitanice su uključene u istraživanje nakon potpisanog informiranog pristanka. Za planirano istraživanje ishodila se suglasnost Etičkoga povjerenstva SKB Mostar (broj protokola: 1036/21) i Povjerenstva za etičnost eksperimentalnog rada Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta (broj protokola: 251-62-03-22-19). Sve ispitanice kontrolne skupine kontaktirane su dva mjeseca poslije pristanka sudjelovanja u istraživanju i uzorkovanja krvi kako bi se provjerio uredan tijek trudnoće, odnosno da nije došlo do naknadnog spontanoga pobačaja u prvom tromjesečju.

Kriteriji uključenja za kontrolnu skupinu:

1. ispitanice s urednom trudnoćom,
2. raspon dobi 18 - 45 godina,
3. gestacijski tjedan < 14 ,
4. ultrazvučno potvrđen normalan razvoj embrija ili fetusa,

5. anamneza prethodnih normalnih trudnoća - bez spontanih pobačaja,
6. jednoplodna trudnoća,
7. $Hb > 110 \text{ g/L}$.

Kriteriji uključenja za ispitivanu skupinu:

1. ispitanice sa zadržanim spontanom pobačajem,
2. raspon dobi 18 - 45 godina,
3. gestacijski tjedan < 14 ,
4. ultrazvučno potvrđen prestanak razvoja (bez srčane akcije) embrija ili fetusa,
5. potrebna indukcija pobačaja s mifepristonom ili misoprostolom,
6. jednoplodna trudnoća,
7. bez započetoga krvarenja,
8. $Hb > 110 \text{ g/L}$.

Kriteriji isključenja za obje skupine: krvarenje, anemija, upala, hipertenzija, dijabetes, endokrine abnormalnosti, ultrazvučno vidljive anomalije ploda, tiroidna disfunkcija, mokraćna infekcija, malformacije maternice, onkološke bolesti, stečena i nasljedna trombofilija, autoimune bolesti, umjetna oplodnja, suplementacija željeza, $CRP > 5 \text{ mg/L}$.

Plan istraživanja bio je podijeljen u 3 faze:

1. prikupljanje uzoraka krvi ispitanica,
2. određivanje Fpn-a i sTfR-a te pokazatelja statusa i regulatora željeza: Hb, Fe, UIBC, feritin, transferin i hepcidin u obje ispitivane skupine,
3. statistička analiza.

3.2. Uzorci i metode

Parametri Fpn i hepcidin određeni su imunokemijskom metodom ELISA na Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu, a ostali parametri u SKB Mostar. Koncentracija Hb-a određena je iz pune krvi s K_3 -etilendiamintetraoctenom kiselinom (EDTA) na hematološkom brojaču Sysmex XN 1000 na dan prikupljanja uzoraka. Uzorci seruma za biokemijske biljege dobiveni su centrifugiranjem pune krvi bez antikoagulansa tijekom 10 minuta na 3500 rpm. Nakon izmjerenih koncentracija rutinskih pretraga preostali serum je pohranjen na -80°C do analiza koje nisu rutinske. Uzorci plazme, nakon analize krvne slike,

dobiveni su centrifugiranjem pune krvi s antikoagulansom EDTA tijekom 15 minuta na 4000 rpm, pa je plazma pohranjena na -80 °C do analize.

Koncentracija Fe-a i UIBC-a u uzorcima seruma odredila se fotometrijskom metodom na automatskom analizatoru Beckman Coulter DxC 700 AU, dok se koncentracija transferina u uzorku plazme odredila imunoturbidimetrijskom metodom na automatskom analizatoru Alinity ci-serije. Koncentracija sTfR-a u uzorku seruma odredila se nefelometrijski na automatskom analizatoru BN II Siemens. Koncentracija feritina odredila se iz uzorka seruma kemiluminiscentnom metodom na analizatoru Vitros 3600.

Računski su se odredili sljedeći parametri:

- a) $TIBC = Fe (\mu\text{mol/L}) + UIBC (\mu\text{mol/L})$,
- b) $TSAT (\%) = Fe (\mu\text{mol/L}) / TIBC (\mu\text{mol/L}) \times 100$,
- c) sTfR indeks = koncentracija sTfR / log koncentracija feritina,
- d) omjeri: Fe/hepcidin, feritin/hepcidin, Hb/hepcidin, transferin/hepcidin, TSAT/hepcidin, Fpn/hepcidin, feritin/Fpn, Fe/Fpn, TSAT/Fpn, transferin/Fpn, Hb/Fpn, Hb/Fe, Hb/feritin, transferin/feritin, Hb/sTfR, Fe/sTfR, feritin/sTfR, transferin/sTfR, TSAT/sTfR i Fpn/sTfR.

Svi serumski i plazmatski parametri mjereni su unutar 6 mjeseci od dana pohranjivanja uzoraka na -80 °C.

3.2.1. Određivanje koncentracije Fpn-a

Koncentracija Fpn-a u serumu određena je imunokemijskom ELISA metodom unutar 3 mjeseca od dana skladištenja na - 80 °C na EZ Read 800 Plus analizatoru (Biochrom, Cambridge, UK).

Za mjerenje koncentracije Fpn-a se koristio Human Fpn ELISA Kit (AssayGenie, kataloški broj HUES03226, Dublin 2, Irska). Standardi i uzorci se dodaju u jažice mikrotitarske pločice koje su obložene sa specifičnim antitijelima. Apsorpcija se mjeri spektrofotometrijski na 450 nm ± 2 nm. Koncentracija Fpn-a u uzorcima izračunava se usporedbom apsorbancije uzoraka s krivuljom standarda. Kalibracijska krivulja se dobiva serijskim razrjeđivanjem radnih otopina. Preporuka razrjeđenja je sljedeći niz: 20, 10, 5, 2,5, 1,25, 0,63, 0,31 i 0 µg/L (zadnja epruveta je slijepa proba). Ovaj kit nema zasebnih kontrola kvalitete osim definiranih kalibratora za dobivanje kalibracijske krivulje. Osjetljivost testa je 0,19 µg/L i inter i intra koeficijenti varijacije (CV) za tri razine (niska, srednja i visoka razina) bili su 5,43, 5,90, 3,14 % odnosno 6,12, 4,50, 4,35 %, prema preporuci proizvođača. Linearnost testa je 0,31 - 20 µg/L.

Svaki standard i uzorak mjereni su u duplikatu. Uzorci čija je koncentracija bila $> 20 \mu\text{g/L}$ razrijeđeni su u omjeru 1:2. Koncentracija razrijeđenih uzoraka izračunata je iz kalibracijske krivulje i pomnožena je s faktorom razrjeđenja. Linearnost testa za razrjeđenja 1:2 je u rasponu 88 - 100 %.

3.2.2. Određivanje koncentracije hepcidina

Za mjerenje koncentracije hepcidina se koristio Hcpidin 25 (bioactive) HS ELISA Kit (DRG, kataloški broj EIA-5782, Marburg, Germany). Standardi i uzorci se dodaju u jažice mikrotitrarske pločice koje su obložene sa specifičnim antitijelima. Apsorpcija se mjeri spektrofotometrijski na $450 \text{ nm} \pm 10 \text{ nm}$. Koncentracija hepcidina u uzorcima izračunava se usporedbom apsorbancije uzoraka s krivuljom standarda. Kalibracijska krivulja se dobiva sa 6 standarda poznatih koncentracija: 0, 1, 3, 9, 27 i 81 ng/mL. Koncentracija uzoraka može se očitati izravno iz kalibracijske krivulje. Uzorci s koncentracijama većim od najvećeg standarda moraju se dodatno razrijediti 1:10 ili 1:100. Osjetljivost testa je 0,153 ng/mL i inter i intra koeficijenti varijacije (CV) za četiri srednje vrijednosti (3,20, 15,47, 21,93, 58,68) u uzorku seruma su 3,8, 4,1, 2,2, 0,8 % odnosno 14,4, 10,5, 9,5, 11,2 %, prema preporuci proizvođača. Linearnost testa je 0,153 - 81 ng/mL. Svaki standard i uzorak mjereni su u duplikatu. Referentni interval za muškarce i žene je 0,25 – 47,66 ng/mL.

3.3. Statistička analiza

Rezultati učinjenih mjerenja prikazani su primjerenim mjerama središnjice i rasapa, ovisnim o veličini uzorka i raspodjeli. Kolmogorov-Smirnovljevim testom ispitana je normalnost raspodjela dobivenih podataka te su se ovisno o tome koristili parametrijski ili neparametrijski statistički testovi. Ukoliko su podatci slijedili normalnu raspodjelu, usporedba rezultata između dvije skupine testirala se t-testom, a ukoliko podatci nisu slijedili normalnu raspodjelu usporedba se učinila Mann-Whitneyevim testom. Za ispitivanje razlike varijabli između više od dvije skupine nezavisnih mjerenja korišten je neparametrijski Kruskal-Wallisov test. Provela se univariatna i multivariatna logistička regresijska analiza. Statistički značajnom smatrale su se sve razlike uz $P < 0,05$. Za utvrđivanje povezanosti ispitivanih varijabli koristio se parametrijski Pearsonov koeficijent korelacije ili neparametrijski Spearmanov koeficijent korelacije ovisno o prirodi izmjerenih podataka i njihovom zadovoljavanju kriterija za Pearsonovu ili Spearmanovu korelaciju.

Dobiveni koeficijent korelacije:

- $r = 0$ do $0,25$ ili 0 do $-0,25$ (nema povezanosti)
- $r = 0,26$ do $0,50$ ili $-0,26$ do $-0,50$ (slaba povezanost)
- $r = 0,51$ do $0,75$ ili $-0,51$ do $-0,75$ (umjerena do dobra povezanost)
- $r = 0,76$ do 1 ili $-0,76$ do -1 (vrlo dobra do izvrsna povezanost)

U analizi dijagnostičke točnosti, površina ispod krivulje interpretirala se na sljedeći način:

- krivulje s površinom $0,900 - 1,000$ – izvrsna dijagnostička točnost
- krivulje s površinom $0,800 - 0,899$ – vrlo dobra dijagnostička točnost
- krivulje s površinom $0,700 - 0,799$ – dobra dijagnostička točnost
- krivulje s površinom $0,600 - 0,699$ – dovoljna dijagnostička točnost
- krivulje s površinom $0,500 - 0,599$ – loša dijagnostička točnost

Vrijednost površine ispod krivulje $< 0,5$ predstavlja nedovoljnu dijagnostičku točnost.

4. REZULTATI

4.1. Osnovne kliničke karakteristike ispitanica

Ispitanice uključene u istraživanje podijeljene su u dvije skupine: ispitanice s urednom trudnoćom i ispitanice sa zadržanim spontanim pobačajem, u prvom tromjesečju trudnoće, odnosno do 14. tjedna trudnoće. U Tablici 2. navedene su osnovne karakteristike ispitanica (dob, gestacijski tjedan i indeks tjelesne mase (engl. *body mass indeks*, BMI) za obje ispitivane skupine. Prikazani gestacijski tjedan odnosi se na tjedan u kojem je ispitanica bila u vrijeme uzorkovanja krvi za analizu. Podaci za dob i gestacijski tjedan trudnoće nisu slijedili normalnu raspodjelu te su prikazani medijanom i interkvartilnim rasponom (IQR), s tim da je dob prikazana medijanom i rasponom (minimalno - maksimalno). Podaci za BMI su slijedili normalnu raspodjelu te su prikazani aritmetičkom sredinom i standardnom devijacijom (SD). U općim karakteristikama ispitanica postoji statistički značajna razlika za dob pri čemu su ispitanice sa zadržanim spontanim pobačajem starije, dok ispitanice s urednom trudnoćom imaju veći BMI. Za gestacijski tjedan trudnoće nema statistički značajne razlike.

Tablica 2. Osnovne kliničke karakteristike ispitanica s urednom trudnoćom i zadržanim spontanim pobačajem

parametar	uredna trudnoća (N = 52)	zadržani spontani pobačaj (N = 52)	P
dob	29 (24 – 41)	33 (20 – 42)	0,004
gestacijski tjedan	10 (7 - 12)	10 (8 - 11)	0,814
BMI	23,8 ± 1,8	22,9 ± 2,0	0,028

BMI, indeks tjelesne mase (engl. *body mass index*)

Dob je prikazana kao medijan (raspon). Kvantitativni podaci prikazani su kao srednja vrijednost ± standardna devijacija i medijan (interkvartilni raspon). Statistički značajnim razlikama smatrale su se vrijednosti $P < 0,05$.

4.2. Usporedba koncentracija biokemijskih parametara statusa željeza, koncentracija CRP-a i vrijednosti omjera u ispitanica s urednom trudnoćom i u ispitanica sa zadržanim spontanim pobačajem

Statističkim testovima ovisno o raspodjeli podataka (t-test i Mann-Whitney) analizirane su koncentracije biokemijskih parametara upale i statusa željeza u obje skupine ispitanica (Tablica 3.).

Nije bilo statistički značajne razlike u koncentraciji CRP-a između ispitanica s urednom trudnoćom i ispitanica koje su imale zadržani spontani pobačaj. Također, nije bilo statistički značajne razlike u koncentracijama UIBC-a, TIBC-a, Hb-a, transferina i hepcidina između ispitivanih skupina.

Uočena je statistički značajna razlika serumskih koncentracija Fe-a između ispitivanih skupina, s tim da su nižu koncentraciju Fe-a imale ispitanice sa zadržanim spontanim pobačajem ($P = 0,001$).

Također, iz Tablice 3. je vidljivo da su ispitanice sa zadržanim spontanim pobačajem imale nižu koncentraciju feritina ($P = 0,026$) kao i nižu vrijednost TSAT-a ($P = 0,015$).

Sukladno koncentracijama feritina i sTfR-a (Slika 6.), sTfR indeks je pokazao više vrijednosti kod ispitanica sa zadržanim spontanim pobačajem u odnosu na žene s urednom trudnoćom ($P = 0,001$).

Koncentracije sTfR-a i Fpn-a prikazane su grafički te je statističkom obradom podataka dobivena statistički značajna razlika u navedenim koncentracijama između ispitivanih skupina (Slika 6., Slika 7.)

Tablica 3. Biokemijski parametri statusa željeza i CRP u ispitanica s urednom trudnoćom i zadržanim spontanim pobačajem

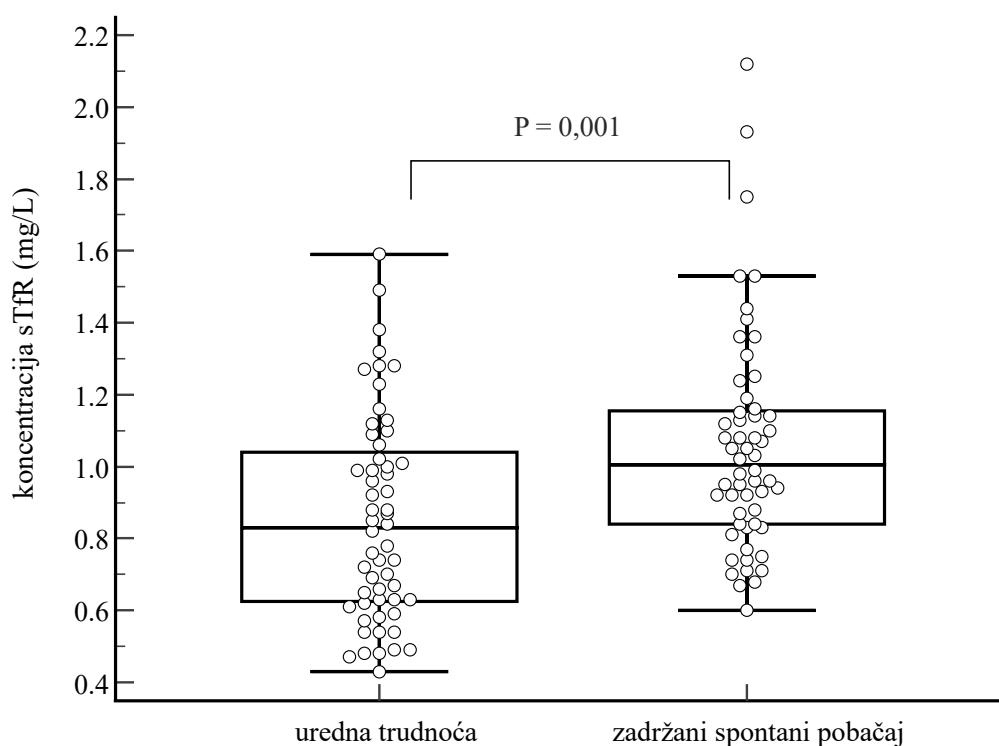
parametar	uredna trudnoća (N = 52)	zadržani spontani pobačaj (N = 52)	P
CRP	1,9 ± 1,1	2,3 ± 1,3	0,170
Fe (μmol/L)	19,5 ± 8,2	14,7 ± 7,0	0,001
UIBC (μmol/L)	43,8 ± 12,7	47,2 ± 13,1	0,138
TIBC (μmol/L)	61,8 (57,2 – 72,6)	61,1 (54,7 – 68,7)	0,522
Hb (g/L)	130 (124 – 135)	127 (120 – 135)	0,184
feritin (ng/mL)	21,5 (11,9 – 37,4)	17,3 (11,0 – 22,1)	0,026
transferin (mg/dL)	282 ± 44	282 ± 51	0,945
TSAT (%)	28 (19 – 39)	22 (13 – 34)	0,015
sTfR indeks	0,68 (0,43 – 0,82)	0,80 (0,64 – 1,10)	0,001
hepcidin (ng/mL)	4,06 (2,03 – 7,72)	5,15 (2,95 – 9,16)	0,128

CRP, C-reaktivni protein; Fe, željezo; UIBC, nezasićeni kapacitet vezanja željeza; TIBC, ukupni kapacitet vezanja željeza; Hb, hemoglobin; TSAT, zasićenje transferina; sTfR indeks, sTfR/log feritin

Kvantitativni podaci prikazani su kao srednja vrijednost ± standardna devijacija i medijan (interkvartilni raspon).

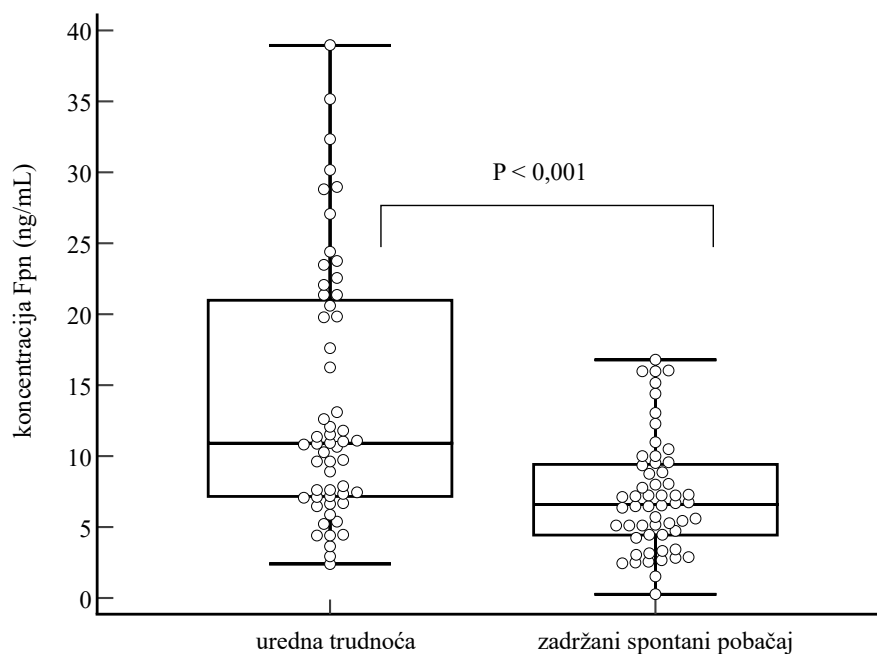
Statistički značajnim razlikama smatrale su se vrijednosti $P < 0,05$.

Koncentracije sTfR-a prikazane su grafički na Slici 6. te je vidljivo da je koncentracija sTfR-a bila značajno viša u ispitanica sa zadržanim spontanim pobačajem u odnosu na ispitanice sa urednom trudnoćom. Statističkom obradom podataka dobivene su vrijednosti medijana i IQR-a za ispitanice s urednom trudnoćom 0,83 (0,62 – 1,04) mg/L, dok su vrijednosti za ispitanice sa zadržanim spontanim pobačajem iznosile 1,00 (0,84 – 1,15) mg/L.



Slika 6. Koncentracije sTfR-a u ispitanica s urednom trudnoćom i u ispitanica sa zadržanim spontanim pobačajem. Vrijednosti su prikazane kao medijan i interkvartilni raspon. Razlike među skupinama ispitane su Mann-Whitneyevim testom. Konektor na slici prikazuje uočenu statistički značajnu razliku.

Na Slici 7. prikazane su koncentracije Fpn-a u obje ispitivane skupine. Iz grafičkog prikaza vidljivo je da su ispitanice sa zadržanim spontanim pobačajem imale značajno niže koncentracije Fpn-a u odnosu na ispitanice uredne trudnoće. Nakon statističke obrade podataka dobivene su vrijednosti medijana i IQR-a za ispitanice sa urednom trudnoćom 10,90 (7,15 – 20,98) ng/mL te za ispitanice sa zadržanim spontanim pobačajem 6,58 (4,43 – 9,41) ng/mL.



Slika 7. Koncentracije Fpn-a u ispitanica s urednom trudnoćom i u ispitanica sa zadržanim spontanim pobačajem. Vrijednosti su prikazane kao medijan i interkvartilni raspon. Razlike među skupinama ispitanice su Mann-Whitneyevim testom. Konektor na slici prikazuje uočenu statistički značajnu razliku.

U Tablici 4. prikazani su omjeri izvedeni iz različitih kombinacija parametara statusa željeza. Nije bilo statistički značajne razlike u vrijednostima omjera Hb/hepcidin, hepcidin/sTfR, transferin/hepcidin te transferin/feritin u ispitanica s urednom trudnoćom i ispitanica sa zadržanim spontanim pobačajem.

Statistički značajno niže vrijednosti omjera Fe/hepcidin, feritin/hepcidin, TSAT/hepcidin, Fpn/hepcidin, hemoglobin/sTfR, Fe/sTfR, feritin/sTfR, transferin/sTfR, TSAT/sTfR i Fpn/sTfR imale su ispitanice sa zadržanim spontanim pobačajem u odnosu na ispitanice s urednom trudnoćom.

S druge strane, ispitanice sa zadržanim spontanim pobačajem u odnosu na ispitanice s urednom trudnoćom imale su statistički značajno više vrijednosti omjera feritin/Fpn, Fe/Fpn, TSAT/Fpn, transferin/Fpn, Hb/Fpn, Hb/Fe i Hb/feritin.

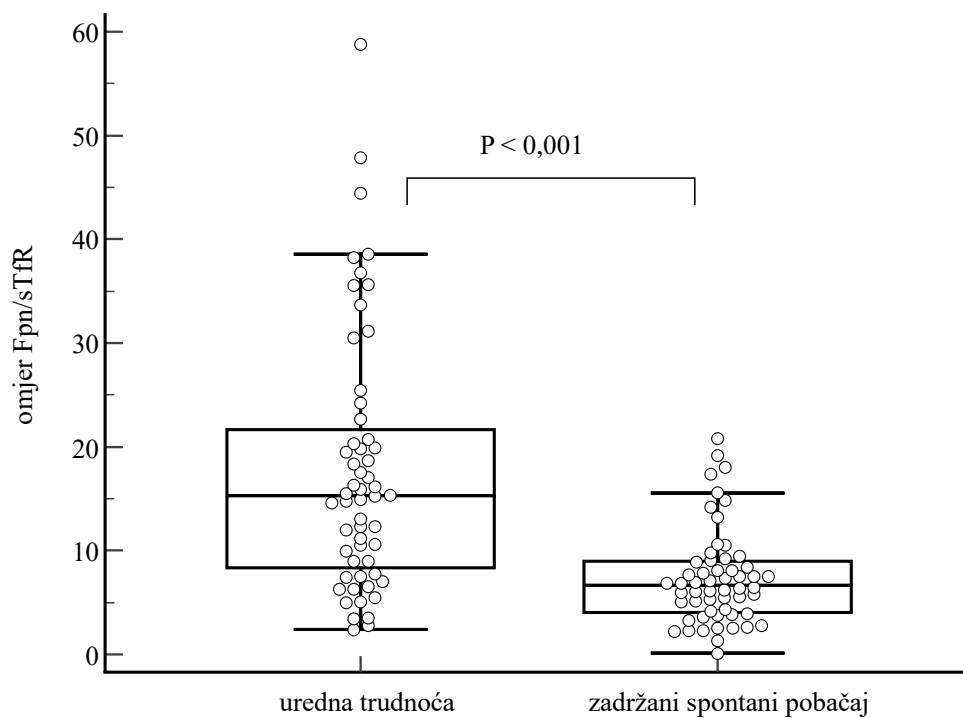
Tablica 4. Omjeri statusa željeza u ispitanica s urednom trudnoćom i ispitanica sa zadržanim spontanom pobačajem

parametar	uredna trudnoća (N = 52)	zadržani spontani pobačaj (N = 52)	P
Fe/hepcidin	5,24 (2,46 – 7,90)	2,67 (1,48 – 5,08)	0,001
feritin/hepcidin	5,62 (3,64 – 7,91)	3,19 (1,72 – 5,14)	< 0,001
Hb/hepcidin	29,90 (17,18 – 63,52)	24,38 (14,06 – 39,35)	0,118
hepcidin/sTfR	5,12 (2,66 – 8,54)	5,47 (2,96 – 10,29)	0,847
transferin/hepcidin	67,87 (36,08 – 140,38)	46,99 (26,08 – 94,65)	0,157
TSAT/hepcidin	7,70 (4,15 – 11,53)	4,05 (2,51 – 8,54)	0,001
Fpn/hepcidin	2,72 (1,51 – 4,61)	1,24 (0,65 – 2,13)	< 0,001
feritin/Fpn	1,80 (1,28 – 2,80)	2,78 (1,56 – 3,81)	0,008
Fe/Fpn	1,48 (0,96 – 2,33)	2,06 (1,17 – 3,75)	0,033
TSAT/Fpn	2,46 (1,47 – 3,95)	3,54 (1,83 – 6,40)	0,023
transferin/Fpn	26,56 (14,72 – 36,93)	41,80 (29,48 – 65,94)	< 0,001
Hb/Fpn	11,90 (6,08 – 17,77)	20,03 (14,09 – 28,31)	< 0,001
Hb/Fe	6,94 (5,28 – 9,28)	9,35 (6,50 – 14,11)	0,002
Hb/feritin	6,20 (3,47 – 11,05)	7,44 (5,64 – 11,74)	0,033
transferin/feritin	13,00 (7,61 – 25,52)	15,78 (11,04 – 25,43)	0,052
Hb/sTfR	157,2 (125,4 – 214,9)	125,6 (107,5 – 153,1)	< 0,001
Fe/sTfR	22,9 (14,6 – 37,5)	15,5 (7,5 – 22,8)	< 0,001
feritin/sTfR	27,1 (14,4 – 43,7)	19,7 (9,3 – 23,9)	0,001
transferin/sTfR	358,2 (278,3 – 434,8)	267,8 (220,3 – 312,6)	< 0,001
TSAT/sTfR	34,5 (24,4 – 54,5)	24,9 (12,7 – 39,1)	0,001

Fe, željezo; Hb, hemoglobin; sTfR, topljivi transferinski receptori; TSAT, saturacija transferina; Fpn, feroportin
Razlike među skupinama ispitanice su Mann-Whitneyevim testom.

Kvantitativni podaci prikazani su kao medijan (interkvartilni raspon). Statistički značajnim razlikama smatrale su se vrijednosti $P < 0,05$.

Vrijednosti omjera Fpn/sTfR bile su statistički značajno niže u ispitanica sa zadržanim spontanim pobačajem u odnosu na ispitanice s urednom trudnoćom. Dobivene su vrijednosti medijana i IQR-a za ispitanice sa urednom trudnoćom 15,29 (8,34 – 21,65) ng/mL te za ispitanice sa zadržanim spontanim pobačajem 6,65 (4,04 – 8,97) ng/mL (Slika 8).



Slika 8. Vrijednosti omjera Fpn/sTfR u ispitanica s urednom trudnoćom i u ispitanica sa zadržanim spontanim pobačajem. Vrijednosti su prikazane kao medijan i interkvartilni raspon. Razlike među skupinama ispitanice su Mann-Whitneyevim testom. Konektor na slici prikazuje uočenu statistički značajnu razliku.

4.3. Biokemijski parametri statusa željeza u odnosu na koncentraciju feritina

Ispitanice obje skupine, uredna trudnoća i zadržani spontani pobačaj su podijeljeni u podskupine slijedeći općeprihvaćene smjernice Svjetske zdravstvene organizacije (SZO) za granične vrijednosti feritina u serumu koja predstavlja graničnu vrijednost za subklinički nedostatak željeza: podskupine s koncentracijom željeza ≤ 15 ng/mL i > 15 ng/mL.

U Tablici 5. prikazane su dobivene vrijednosti parametara statusa željeza po svakoj podskupini, uredna trudnoća s feritinom ≤ 15 i > 15 ng/mL, te zadržani spontani pobačaj s feritinom ≤ 15 i > 15 ng/mL.

Koncentracije Fe-a bile su statistički značajno niže unutar skupine ispitanica s urednom trudnoćom koje su imale koncentraciju feritina ≤ 15 ng/mL u odnosu na podskupinu s koncentracijom feritina > 15 ng/mL. Također, koncentracija Fe-a se značajno razlikovala između ispitanica uredne trudnoće s koncentracijom feritina > 15 ng/mL i ispitanica obje podskupine zadržanog spontanog pobačaja, odnosno s koncentracijom feritina $\leq$ i > 15 ng/mL. Između podskupina zadržanog spontanog pobačaja nije bilo statistički značajne razlike u koncentracijama Fe-a.

U obje ispitivane skupine UIBC, TIBC i transferin su značajno niži u podskupinama s koncentracijom feritina > 15 ng/mL u odnosu na podskupine s koncentracijom feritina ≤ 15 ng/mL.

Za koncentracije Hb-a nije bilo statistički značajne razlike između ispitivanih podskupina.

Izračunati parametri TSAT i sTfR indeks pokazali su statistički značajnu razliku u usporedbi unutar podskupina uredne trudnoće kao i zadržanog spontanog pobačaja. Isto tako postojala je statistički značajna razlika između ispitanica uredne trudnoće s koncentracijom feritina > 15 ng/mL i iste podskupine zadržanog spontanog pobačaja.

Hepcidin je bio statistički značajno niži kod ispitanica s koncentracijom feritina ≤ 15 ng/mL unutar istih skupina kao i u ispitanica s koncentracijom feritina ≤ 15 ng/mL uredne trudnoće u odnosu na istu podskupinu zadržanog spontanog pobačaja.

Tablica 5. Koncentracije parametara statusa željeza u odnosu na koncentraciju feritina

parametar	uredna trudnoća		zadržani spontani pobačaj		P
	feritin ≤ 15 ng/mL (N = 20)	feritin > 15 ng/mL (N = 32)	feritin ≤ 15 ng/mL (N = 25)	feritin > 15 ng/mL (N = 27)	
Fe (μmol/L)	13,4 (10,7 – 17,7) ^b	23,1 (16,6 – 26,8) ^{a, c, d}	11,4 (7,0 – 16,9) ^b	14,8 (10,9 – 21,3) ^b	< 0,001
UIBC (μmol/L)	52,8 (46,0 – 61,5) ^{b, d}	40,8 (31,8 – 45,9) ^{a, c}	52,7 (40,0 – 64,8) ^{b, d}	42,0 (35,9 – 49,8) ^{a, c}	< 0,001
TIBC (μmol/L)	70,1 (58,6 – 73,6) ^{b, d}	60,2 (55,9 – 66,4) ^{a, c}	67,6 (57,7 – 75,4) ^{b, d}	59,9 (52,5 – 75,4) ^{a, c}	0,002
Hb (g/L)	127 (121 – 135)	131 (125 – 135) ^c	124 (117 – 131) ^b	129 (121 – 137)	0,051
transferin (mg/dL)	312 (261 – 337) ^{b, d}	266 (237 – 291) ^{a, c}	309 (255 – 357) ^{b, d}	272 (235 – 296) ^{a, c}	0,003
TSAT (%)	19 (15 – 27) ^{b, d}	36 (26 – 44) ^{a, c, d}	18 (11 – 25) ^{b, d}	29 (19 – 35) ^{a, b, c}	< 0,001
sTfR indeks	0,81 (0,66 – 1,02) ^{b, c, d}	0,61 (0,37 – 0,78) ^{a, c, d}	1,14 (0,88 – 1,36) ^{a, b, d}	0,72 (0,58 – 0,77) ^{a, b, c}	< 0,001
hepcidin (ng/mL)	1,45 (1,20 – 2,45) ^{b, c, d}	5,44 (3,94 – 12,01) ^{a, c}	3,06 (1,85 – 5,73) ^{a, b, d}	7,14 (4,21 – 12,63) ^{a, c}	< 0,001

Fe, željezo; UIBC, nezasićeni kapacitet vezanja željeza; TIBC, ukupni kapacitet vezanja željeza; Hb, hemoglobin; TSAT, zasićenje transferina; sTfR indeks, topljivi transferinski receptor/log feritin

^a statistički značajna razlika između ispitanica uredne trudnoće (feritin > 15 ng/mL) i/ili zadržanog spontanog pobačaja (feritin ≤ i > 15 ng/mL) s ispitanicama uredne trudnoće (feritin ≤ 15 ng/mL),

^b statistički značajna razlika između ispitanica uredne trudnoće (feritin ≤ 15 ng/mL) i/ili zadržanog spontanog pobačaja (feritin ≤ i > 15 ng/mL) s ispitanicama uredne trudnoće (feritin > 15 ng/mL),

^c statistički značajna razlika između ispitanica uredne trudnoće (feritin ≤ i > 15 ng/mL) i/ili zadržanog spontanog pobačaja (feritin > 15 ng/mL) s ispitanicama zadržanog spontanog pobačaja (feritin ≤ 15 ng/mL),

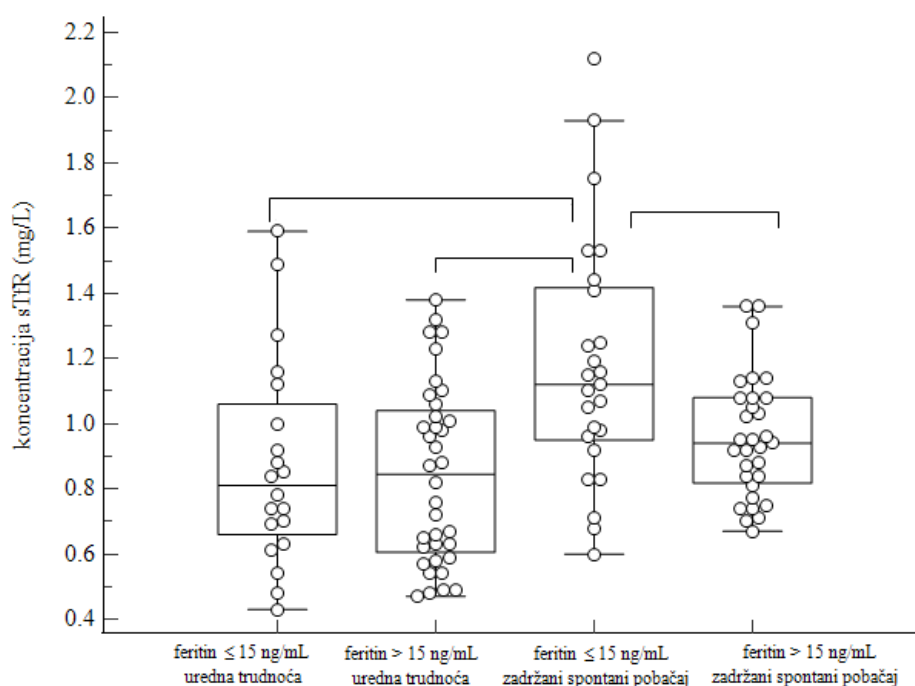
^d statistički značajna razlika između ispitanica uredne trudnoće (feritin ≤ i > 15 ng/mL) i/ili zadržanog spontanog pobačaja (feritin ≤ 15 ng/mL) s ispitanicama zadržanog spontanog pobačaja (feritin > 15 ng/mL).

Kvantitativni podaci prikazani su kao srednja vrijednost ± standardna devijacija i medijan (interkvartilni raspon), provedena je post hoc analiza. Statistički značajnim razlikama smatrale su se vrijednosti P < 0,05.

Za koncentracije sTfR-a nije bilo statistički značajne razlike u ispitanica uredne trudnoće između podskupina sa koncentracijom feritina $\leq$ i > 15 ng/mL, kao ni između podskupina uredne trudnoće i zadržanog spontanog pobačaja sa koncentracijama feritina > 15 ng/mL.

Statistički značajno niže koncentracije sTfR-a imale su ispitanice sa zadržanim spontanim pobačajem i koncentracijom feritina > 15 ng/mL u odnosu na iste ispitanice s koncentracijom feritina ≤ 15 ng/mL (Slika 9.). Koncentracije sTfR-a statistički su se značajno razlikovale i između ispitanica uredne trudnoće i zadržanog spontanog pobačaja s koncentracijama feritina ≤ 15 ng/mL.

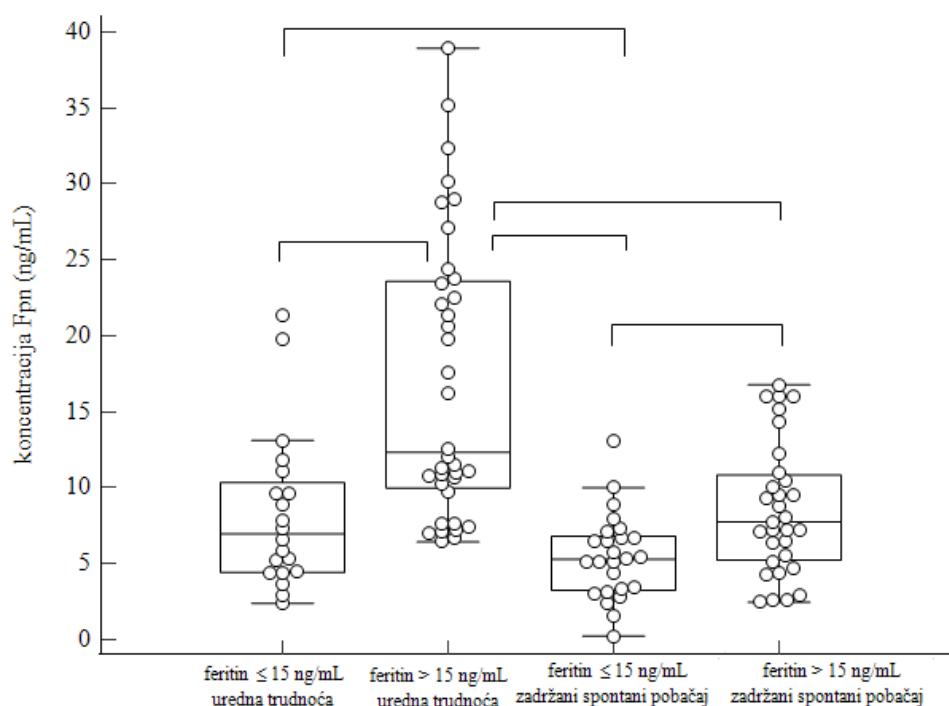
Najniže koncentracije sTfR-a bile su u podskupini ispitanica uredne trudnoće s koncentracijom feritina ≤ 15 ng/mL, a najviše u ispitanica zadržanog spontanog pobačaja s koncentracijom feritina ≤ 15 ng/mL ($P = 0,001$).



Slika 9. Koncentracija sTfR-a u ispitanica s urednom trudnoćom i u ispitanica sa zadržanim spontanim pobačajem podijeljenih prema koncentraciji feritina $\leq$ i > 15 ng/mL. Vrijednosti su prikazane kao medijan i interkvartilni raspon. Razlike među skupinama ispitanice su Kruskal-Wallisovim testom, nakon čega je provedena post hoc analiza. Konektori na slici označavaju između kojih skupina je u post hoc analizi uočena statistički značajna razlika, pri čemu je $P < 0,05$.

Koncentracije Fpn-a su se statistički značajno razlikovale unutar skupine ispitanica uredne trudnoće s koncentracijom feritina ≤ 15 ng/mL i koncentracijom feritina > 15 ng/mL, a ispitanice s urednom trudnoćom i feritinom > 15 ng/mL su imale i značajno više vrijednosti Fpn u odnosu na obje podskupine zadržanog spontanog pobačaja, koncentracija feritina $\leq$ i > 15 ng/mL. Značajno su se razlikovale i koncentracije Fpn-a u ispitanica podskupina zadržanog spontanog pobačaja. Također, rezultati su pokazali statistički značajnu razliku u koncentraciji Fpn-a između ispitanica uredne trudnoće i zadržanog spontanog pobačaja u podskupinama s koncentracijom feritina ≤ 15 ng/mL (Slika 10.).

Najviše vrijednosti Fpn-a imale su ispitanice uredne trudnoće s koncentracijom feritina > 15 ng/mL, a najniže ispitanice sa zadržanim spontanim pobačajem i koncentracijom feritina ≤ 15 ng/mL ($P < 0,001$).



Slika 10. Koncentracija Fpn-a u ispitanica s urednom trudnoćom i u ispitanica sa zadržanim spontanim pobačajem podijeljenih prema koncentraciji feritina $\leq$ i > 15 ng/mL. Vrijednosti su prikazane kao medijan i interkvartilni raspon. Razlike među skupinama ispitanice su Kruskal-Wallisovim testom, nakon čega je provedena post hoc analiza. Konektori na slici označavaju između kojih skupina je u post hoc analizi uočena statistički značajna razlika, pri čemu je $P < 0,05$.

4.4. Biokemijski parametri statusa željeza prema gestacijskom tjednu

Ispitanice su naknadno podijeljene prema gestacijskom tjednu (GT) trudnoće, odnosno po pretpostavljenom završetku organogeneze embrija prema amenoreji tj. zadnjoj mjesečnici (na kraju 8. tjedna nakon oplodnje ili 10 tjedana amenoreje embrij se smatra fetusom), na podskupine s GT-om < 10 i GT-om ≥ 10 te su uspoređene koncentracije biokemijskih parametara statusa željeza (Tablica 6.).

Očekivano, koncentracije Fe-a su se statistički značajno razlikovale između ispitanica s urednom trudnoćom i GT-om < 10 i ispitanica sa zadržanim spontanim pobačajem i GT-om ≥ 10 . Također, statistički značajno više koncentracije Fe-a su imale ispitanice s urednom trudnoćom i GT-om ≥ 10 u odnosu na istu podskupinu (GT ≥ 10) ispitanica sa zadržanim spontanim pobačajem.

Najveći medijan koncentracije feritina su imale ispitanice s urednom trudnoćom i GT-om ≥ 10 i statistički su se značajno razlikovale u odnosu na sve ostale podskupine (uredna trudnoća s GT-om < 10 , zadržani spontani pobačaj s GT-om $< i \geq 10$).

Od računskih parametara statusa željeza, statistički značajno viši TSAT i niži sTfR indeks imale su ispitanice uredne trudnoće s GT-om < 10 u odnosu na ispitanice zadržanog spontanog pobačaja s GT-om < 10 .

Tablica 6. Biokemijski parametri statusa željeza prema gestacijskom tjednu

parametar	uredna trudnoća		zadržani spontani pobačaj		P
	GT < 10 (N = 26)	GT ≥ 10 (N = 26)	GT < 10 (N = 25)	GT ≥ 10 (N = 27)	
Fe (μmol/L)	17,1 (12,6 – 24,0) ^d	20,5 (14,6 – 24,2) ^{c, d}	15,5 (10,8 – 21,4) ^b	11,8 (8,3 – 18,1) ^{a, b}	0,005
UIBC (μmol/L)	44,0 (35,6 – 49,4)	43,5 (35,7 – 54,3)	47,3 (35,3 – 56,7)	49,3 (38,6 – 58,7)	0,471
TIBC (μmol/L)	58,6 (55,9 – 66,9)	66,0 (60,4 – 73,2)	61,1 (53,7 – 70,3)	61,1 (56,1 – 67,6)	0,166
Hb (g/L)	129 (124 – 136)	130 (124 – 134)	127 (120 – 136)	128 (120 – 133)	0,462
ferritin (ng/mL)	17,8 (11,0 – 28,3) ^b	26,3 (14,4 – 44,5) ^{a, c, d}	17,1 (11,1 – 22,2) ^b	17,5 (10,6 – 22,0) ^b	0,022
transferin (mg/dL)	256 (240 – 294)	285 (263 – 331)	286 (230 – 315)	279 (245 – 315)	0,241
TSAT (%)	26 (19 – 40) ^d	30 (21 – 38) ^d	28 (16 – 38)	19 (12 – 30) ^{a, b}	0,036
sTfR indeks	0,70 (0,44 – 0,86) ^d	0,65 (0,41 – 0,81) ^{c, d}	0,77 (0,64 – 1,03) ^b	0,82 (0,68 – 1,28) ^{a, b}	0,012
hepcidin (ng/mL)	3,32 (1,59 – 6,44)	4,98 (2,98 – 11,52)	4,98 (2,91 – 7,82)	5,55 (3,00 – 13,00)	0,117

GT, gestacijski tjedan; Fe, željezo; UIBC, nezasićeni kapacitet vezanja željeza; TIBC, ukupni kapacitet vezanja željeza; Hb, hemoglobin; TSAT, zasićenje transferina; sTfR indeks, topljivi transferinski receptor/log ferritin

^a statistička značajna razlika između ispitanica uredne trudnoće (GT ≥ 10) i/ili zadržanog spontanog pobačaja (GT ≤ i > 10) s ispitanicama uredne trudnoće (GT < 10),

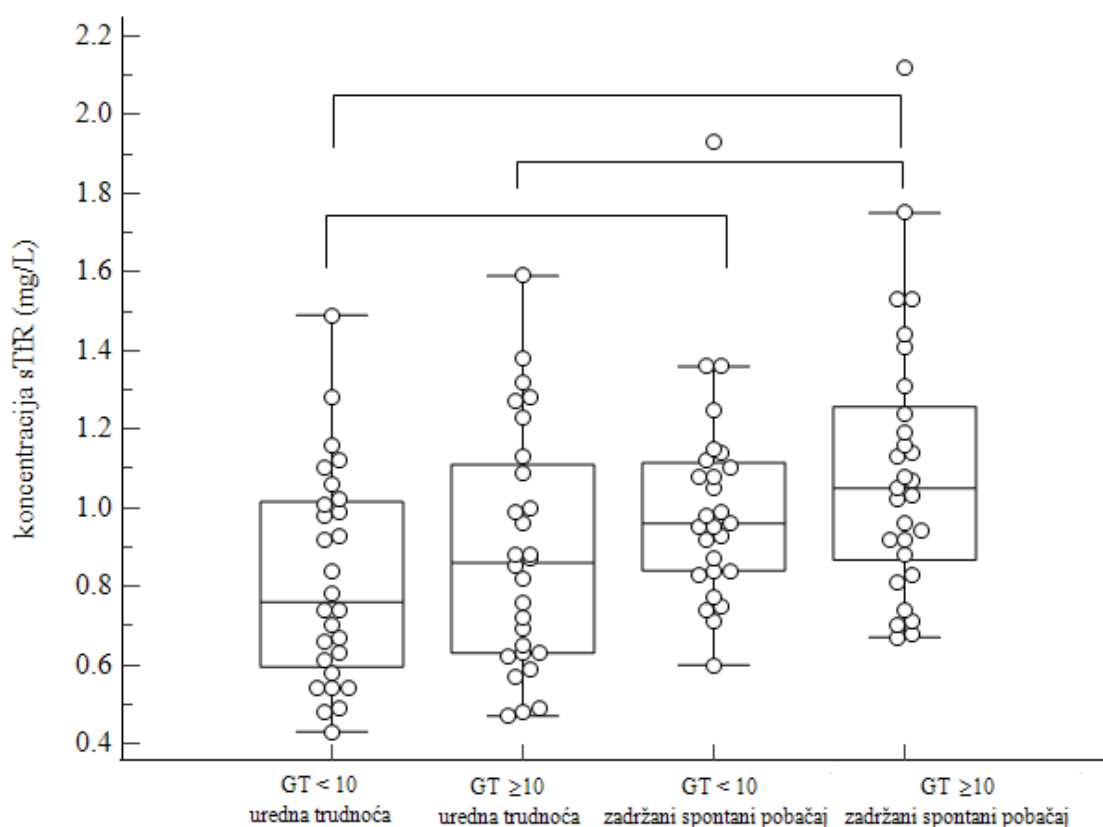
^b statistički značajna razlika između ispitanica uredne trudnoće (GT < 10) i/ili zadržanog spontanog pobačaja (GT ≤ i > 10) s ispitanicama uredne trudnoće (GT ≥ 10),

^c statistički značajna razlika između ispitanica uredne trudnoće (GT < i ≥ 10) i/ili zadržanog spontanog pobačaja (GT ≥ 10) sa ispitanicama zadržanog spontanog pobačaja (GT < 10),

^d statistički značajna razlika između ispitanica uredne trudnoće (GT < i ≥ 10) i/ili zadržanog spontanog pobačaja (GT < 10) sa ispitanicama zadržanog spontanog pobačaja (GT ≥ 10).

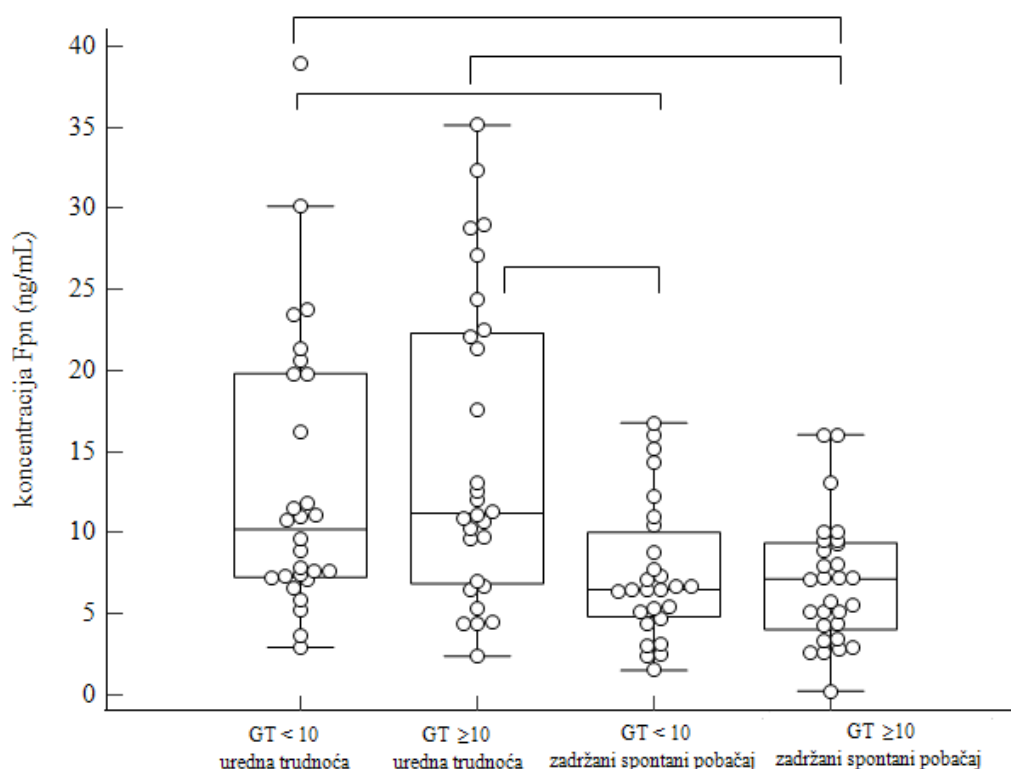
Kvantitativni podaci prikazani su kao medijan (interkvartilni raspon), provedena je post hoc analiza. Statistički značajnim razlikama smatrale su se vrijednosti P < 0,05.

Ispitanice sa zadržanim spontanim pobačajem i GT-om ≥ 10 imale su značajno više vrijednosti sTfR-a u odnosu na obje podskupine ispitanica s urednom trudnoćom (GT < 10 i GT ≥ 10), dok su ispitanice s urednom trudnoćom i GT-om < 10 imale značajno niže vrijednosti sTfR-a u odnosu na obje podskupine ispitanica sa zadržanim spontanim pobačajem, odnosno GT-om < 10 i GT-om ≥ 10 (Slika 11.). Nije bilo statistički značajne razlike u koncentracijama sTfR-a između ispitanica s urednom trudnoćom i GT-om ≥ 10 i ispitanica sa zadržanim spontanim pobačajem i GT-om < 10 , dok je bilo statistički značajne razlike između ispitanica s urednom trudnoćom i GT-om ≥ 10 i ispitanica sa zadržanim spontanim pobačajem i GT-om ≥ 10 . Nije bilo statistički značajne razlike u koncentraciji sTfR-a između podskupina unutar ispitanica uredne trudnoće, kao ni između podskupina ispitanica zadržanog spontanog pobačaja.



Slika 11. Koncentracija sTfR-a u ispitanica s urednom trudnoćom i u ispitanica sa zadržanim spontanim pobačajem podijeljenih po gestacijskom tjednu na GT < 10 i GT ≥ 10 . Vrijednosti su prikazane kao medijan i interkvartilni raspon. Razlike među skupinama ispitanice su Kruskal-Wallisovim testom, nakon čega je provedena post hoc analiza. Konektori na slici označavaju između kojih skupina je u post hoc analizi uočena statistički značajna razlika, pri čemu je $P < 0,05$.

U usporedbi koncentracije Fpn-a po GT-ima dobiveno je da su vrijednosti Fpn-a bile značajno niže u ispitanica sa zadržanim spontanim pobačajem, i to u obje podskupine, odnosno GT-om < 10 i ≥ 10 u odnosu na ispitanice s urednom trudnoćom, GT < 10 i GT ≥ 10 . Nije bilo statistički značajne razlike u koncentracijama Fpn-a između podskupina uredne trudnoće, kao niti između podskupina ispitanica sa zadržanim spontanim pobačajem (Slika 12.).



Slika 12. Koncentracija Fpn-a u ispitanica s urednom trudnoćom i u ispitanica sa zadržanim spontanim pobačajem podijeljenih po gestacijskom tjednu na GT < 10 i GT ≥ 10 . Vrijednosti su prikazane kao medijan i interkvartilni raspon. Razlike među skupinama ispitanice su Kruskal-Wallisovim testom, nakon čega je provedena post hoc analiza. Konektori na slici označavaju između kojih skupina je u post hoc analizi uočena statistički značajna razlika, pri čemu je $P < 0,05$.

U analizi omjera izvedenih s hepcidinom (Fe/hepcidin, feritin/hepcidin, TSAT/hepcidin, Fpn/hepcidin) prema gestacijskom tjednu ispitanice uredne trudnoće s GT-om < 10 imale su statistički značajno više vrijednosti u odnosu na obje podskupine ispitanica sa zadržanim pobačajem (GT-om $< i \geq 10$). Nije bilo statistički značajne razlike između skupina u drugim omjerima izvedenim s hepcidinom (Hb/hepcidin, transferin/hepcidin, hepcidin/sTfR).

Omjeri izvedeni s Fpn-om (transferin/Fpn, Hb/Fpn) su pokazali statistički značajno niže vrijednosti u ispitanica uredne trudnoće s GT-om < 10 u odnosu na obje skupine ispitanica zadržanog spontanog pobačaja (GT-om $< i \geq 10$). Nije bilo statistički značajne razlike između skupina u drugim omjerima (feritin/Fpn, Fe/Fpn, TSAT/Fpn) prema GT-u.

Omjeri Hb/sTfR i transferin/sTfR pokazali su statistički značajno više vrijednosti u ispitanica uredne trudnoće s GT-om $< i \geq 10$ u odnosu na obje podskupine zadržanog spontanog pobačaja (GT-om $< i \geq 10$). Ispitanice s urednom trudnoćom i GT-om < 10 imale su statistički značajno više vrijednosti omjera Fe/sTfR, feritin/sTfR i TSAT/sTfR u odnosu na ispitanice sa zadržanim pobačajem i GT-om ≥ 10 , dok su ispitanice s urednom trudnoćom i GT-om ≥ 10 imale značajno više vrijednosti u odnosu na obje podskupine ispitanica sa zadržanim spontanim pobačajem (GT-om $< i \geq 10$) (Tablica 7.).

Tablica 7. Omjeri statusa željeza prema gestacijskom tjednu

parametar	uredna trudnoća		zadržani spontani pobačaj		P
	GT < 10 (N = 26)	GT ≥ 10 (N = 26)	GT < 10 (N = 25)	GT ≥ 10 (N = 27)	
Fe/hepcidin	6,07 (3,32 – 8,37) ^{c, d}	4,73 (1,74 – 7,00) ^d	3,09 (1,62 – 6,20) ^a	1,86 (0,77 – 4,15) ^{a, b}	0,001
ferritin/hepcidin	5,66 (3,83 – 8,26) ^{c, d}	5,46 (3,32 – 7,43) ^d	4,23 (2,01 – 5,87) ^a	2,71 (1,59 – 5,00) ^{a, b}	< 0,001
Hb/hepcidin	38,07 (820,48 – 81,78)	26,52 (11,47 – 40,84)	28,75 (15,37 – 40,53)	20,96 (9,63 – 38,82)	0,097
hepcidin/sTfR	3,85 (2,12 – 7,77)	6,97 (3,88 – 10,90)	6,00 (2,87 – 8,94)	5,40 (3,10 – 12,64)	0,342
transferin/hepcidin	81,36 (7,22 – 162,15)	60,63 (23,74 – 123,19)	55,18 (36,30 – 88,46)	45,04 (20,81 – 104,29)	0,253
TSAT/hepcidin	10,29 (5,79 – 14,85) ^{b, c, d}	6,66 (3,23 – 9,18) ^{a, d}	5,69 (3,08 – 9,14) ^{a, d}	3,38 (1,38 – 6,31) ^{a, b, c}	< 0,001
Fpn/hepcidin	3,71 (1,89 – 6,04) ^{c, d}	1,98 (1,41 – 3,58) ^{c, d}	1,45 (0,80 – 2,32) ^{a, b}	1,09 (0,53 – 1,83) ^{a, b}	< 0,001
ferritin/Fpn	1,75 (1,12 – 2,54) ^{c, d}	1,85 (1,49 – 3,51)	2,20 (1,55 – 4,43) ^a	2,90 (1,93 – 3,59) ^a	0,032
Fe/Fpn	1,44 (0,86 – 2,43)	1,61 (1,06 – 2,24)	2,41 (1,16 – 4,22)	2,03 (1,17 – 3,47)	0,195
TSAT/Fpn	2,52 (1,33 – 4,16)	2,45 (1,60 – 3,93)	3,94 (2,03 – 6,43)	3,47 (1,76 – 6,30)	0,139
transferin/Fpn	29,57 (16,85 – 36,93) ^{c, d}	25,31 (11,57 – 35,81) ^{c, d}	38,56 (29,31 – 63,15) ^{a, b}	44,51 (31,94 – 72,30) ^{a, b}	< 0,001
Hb/Fpn	12,61 (6,73 – 17,77) ^{c, d}	11,49 (5,87 – 18,63) ^{c, d}	20,36 (14,17 – 24,99) ^{a, b}	19,70 (14,09 – 30,93) ^{a, b}	< 0,001
Hb/Fe	7,87 (5,38 – 10,76) ^d	6,23 (5,28 – 8,43) ^{c, d}	8,26 (5,82 – 11,12) ^b	10,82 (6,89 – 15,58) ^{a, b}	< 0,001
Hb/ferritin	7,56 (4,71 – 11,43) ^b	4,91 (2,91 – 8,80) ^{a, c, d}	7,08 (5,80 – 11,59) ^b	7,68 (5,61 – 11,85) ^b	0,022
transferin/ferritin	15,90 (9,21 – 25,52)	10,68 (6,00 – 22,58)	16,06 (9,92 – 22,99)	15,50 (11,80 – 27,92)	0,101
Hb/sTfR	159,1 (126,4 – 221,3) ^{c, d}	157,2 (120,2 – 206,3) ^{c, d}	128,9 (112,6 – 152,5) ^{a, b}	124,8 (103,2 – 154,1) ^{a, b}	0,001
Fe/sTfR	19,5 (14,1 – 30,2) ^d	23,8 (17,9 – 39,2) ^{c, d}	17,4 (8,0 – 25,7) ^b	11,2 (6,9 – 19,0) ^{a, b}	< 0,001
ferritin/sTfR	20,4 (13,6 – 33,7) ^d	28,7 (16,7 – 71,5) ^{c, d}	20,7 (11,1 – 24,5) ^b	19,4 (8,7 – 23,2) ^{a, b}	0,004
transferin/sTfR	349,7 (270,7 – 415,5) ^{c, d}	383,1 (285,9 – 463,2) ^{c, d}	274,7 (218,7 – 353,9) ^{a, b}	265,7 (230,8 – 305,6) ^{a, b}	0,003
TSAT/sTfR	30,6 (23,0 – 54,2) ^d	36,6 (26,3 – 55,4) ^{c, d}	31,2 (13,6 – 42,4) ^b	18,4 (12,5 – 32,2) ^{a, b}	0,003

GT, gestacijski tjedan; Fe, željezo; Hb, hemoglobin; sTfR, topljivi transferinski receptori; TSAT, zasićenje transferina; Fpn, feroportin

^a statistički značajna razlika između ispitanica uredne trudnoće ($GT \geq 10$) i/ili zadržanog spontanog pobačaja ($GT \leq i < 10$) s ispitanicama uredne trudnoće ($GT < 10$),

^b statistički značajna razlika između ispitanica uredne trudnoće ($GT < 10$) i/ili zadržanog spontanog pobačaja ($GT \leq i > 10$) s ispitanicama uredne trudnoće ($GT \geq 10$),

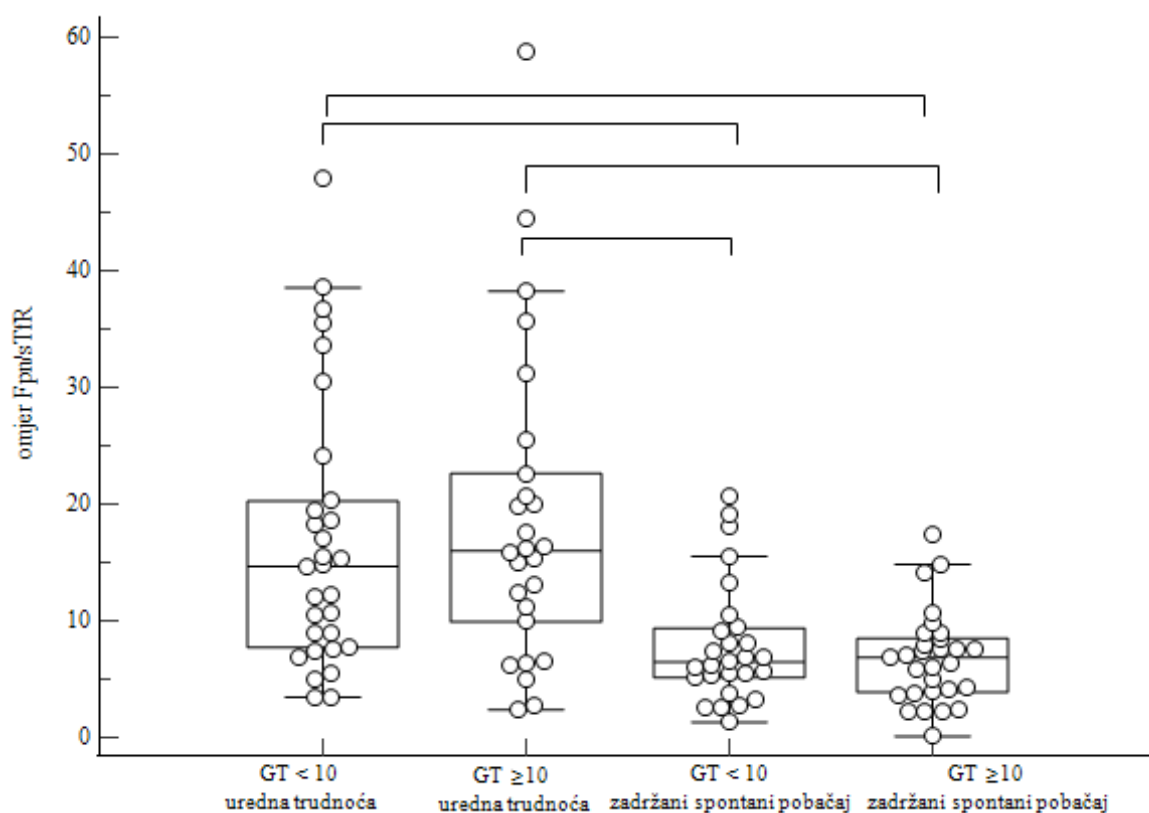
^c statistički značajna razlika između ispitanica uredne trudnoće ($GT < i \geq 10$) i/ili zadržanog spontanog pobačaja ($GT \geq 10$) sa ispitanicama zadržanog spontanog pobačaja ($GT < 10$),

^d statistički značajna razlika između ispitanica uredne trudnoće ($GT < i \geq 10$) i/ili zadržanog spontanog pobačaja ($GT < 10$) sa ispitanicama zadržanog spontanog pobačaja ($GT \geq 10$)

Kvantitativni podaci prikazani su kao medijan (interkvartilni raspon), provedena je post hoc analiza. Statistički značajnim razlikama smatrale su se vrijednosti $P < 0,05$.

Značajno niže vrijednosti omjera Fpn/sTfR bile su u obje podskupine zadržanog spontanog pobačaja u odnosu na podskupine uredne trudnoće (Slika 13.).

Nije bilo statistički značajne razlike u vrijednostima omjera Fpn/sTfR između podskupina uredne trudnoće, kao niti između podskupina ispitanica sa zadržanim spontanim pobačajem.



Slika 13. Omjer Fpn/sTfR u ispitanica s urednom trudnoćom i u ispitanica sa zadržanim spontanim pobačajem podijeljenih po gestacijskom tjednu na $GT < 10$ i $GT \geq 10$. Vrijednosti su prikazane kao medijan i interkvartilni raspon. Razlike među skupinama ispitanice su Kruskal-Wallisovim testom, nakon čega je provedena post hoc analiza. Konektori na slici označavaju između kojih skupina je u post hoc analizi uočena statistički značajna razlika, pri čemu je $P < 0,05$.

4.5. Ispitivanje međusobne povezanosti biokemijskih parametara statusa željeza

Korelacijskom analizom ispitana je povezanost između mjerenih i izračunatih biokemijskih parametara statusa željeza u ispitanica s urednom trudnoćom (Tablica 8.). Spearmanov test korelacije pokazao je slabu pozitivnu povezanost između koncentracije Fe-a i feritina, Fe i hepcidina, kao i Fe i Fpn-a, te slabu negativnu povezanost između Fe-a i sTfR-a te Fe i sTfR indeksa. Rezultati upućuju na slabu negativnu povezanost između UIBC-a i feritina, UIBC-a i hepcidina te UIBC-a i Fpn-a, kao i slabu pozitivnu povezanost između UIBC-a i sTfR-a. Feritin je pokazao slabu negativnu povezanost sa sTfR indeksom i transferinom, te slabu pozitivnu povezanost s Fpn-om i dobru pozitivnu povezanost s hepcidinom. Utvrđena je i slaba pozitivna povezanost Hb-a i Fpn-a, kao i slaba negativna povezanost transferina i hepcidina. Uočljiva je slaba pozitivna povezanost hepcidina i Fpn-a.

U skupini ispitanica sa zadržanim spontanim pobačajem (Tablica 9.) koncentracija Fe-a pokazala je slabu negativnu povezanost s koncentracijom sTfR-a i sTfR indeksom, dok je UIBC pokazao dobru pozitivnu povezanost sa sTfR indeksom. Feritin je pokazao slabu negativnu povezanost s transferinom i sTfR-om. Fpn je slabo pozitivno korelirao s feritinom i slabo negativno sa sTfR indeksom. sTfR je slabo negativno korelirao s TSAT-om, a slabo pozitivno s UIBC-om, TIBC-om i transferinom.

Tablica 8. Koeficijenti korelacije s pripadajućom statističkom značajnošću biokemijskih parametara statusa željeza u urednoj trudnoći

		Fe	UIBC	TIBC	feritin	Hb	sTfR indeks	transferin	TSAT	hepcidin	Fpn	sTfR
Fe	r P	1	- 0,735 < 0,001	-0,129 0,341	0,273 0,041	0,172 0,204	-0,366 0,005	-0,197 0,143	0,950 < 0,001	0,371 0,004	0,309 0,020	-0,347 0,008
UIBC	r P		1	0,766 < 0,001	-0,401 0,002	-0,174 0,199	0,355 0,007	0,780 < 0,001	-0,887 < 0,001	-0,472 < 0,001	-0,339 0,010	0,285 0,033
TIBC	r P			1	-0,328 0,013	-0,091 0,500	0,173 0,200	0,955 < 0,001	-0,399 0,002	-0,340 0,010	-0,204 0,130	0,088 0,517
feritin	r P				1	0,228 0,089	-0,333 0,012	-0,302 0,023	0,334 0,011	0,752 < 0,001	0,501 < 0,001	-0,131 0,334
Hb	r P					1	-0,167 0,217	-0,075 0,557	0,156 0,248	0,192 0,155	0,289 0,030	-0,007 0,953
sTfR indeks	r P						1	0,167 0,217	-0,366 0,005	-0,210 0,119	0,031 0,816	0,709 < 0,001
transferin	r P							1	-0,447 < 0,001	-0,349 0,008	-0,192 0,154	0,098 0,470
TSAT	r P								1	0,444 < 0,001	0,348 0,008	-0,342 0,009
hepcidin	r P									1	0,489 < 0,001	-0,071 0,602
Fpn	r P										1	0,066 0,624
sTfR	r P											1

r, koeficijent korelacije; Fe, željezo; UIBC, nezasićeni kapacitet vezanja željeza; TIBC, ukupni kapacitet vezanja željeza; Hb, hemoglobin; sTfR indeks, topljivi transferinski receptor/log feritin; TSAT, zasićenje transferina; Fpn, feroportin; sTfR, topljivi transferinski receptori

Statistički značajnim razlikama smatrale su se vrijednosti s $P < 0,05$.

Tablica 9. Koeficijenti korelacije s pripadajućom statističkom značajnošću biokemijskih parametara statusa željeza u zadržanom spontanom pobačaju

		Fe	UIBC	TIBC	feritin	Hb	sTfR indeks	transferin	TSAT	hepcidin	Fpn	sTfR
Fe	r P	1	-0,706 < 0,001	-0,231 0,085	0,274 0,040	0,056 0,678	-0,409 0,001	-0,255 0,057	0,949 < 0,001	0,137 0,311	-0,117 0,387	-0,433 < 0,001
UIBC	r P		1	0,852 < 0,001	-0,422 0,001	-0,102 0,451	0,522 < 0,001	0,845 < 0,001	-0,864 < 0,001	-0,304 0,022	-0,056 0,680	0,481 < 0,001
TIBC	r P			1	-0,377 0,004	-0,099 0,466	0,413 0,001	0,973 < 0,001	-0,486 < 0,001	-0,317 0,017	-0,164 0,226	0,339 0,010
feritin	r P				1	0,210 0,119	-0,607 < 0,001	-0,352 0,007	0,325 0,014	0,271 0,043	0,385 0,003	-0,406 0,001
Hb	r P					1	-0,267 0,045	-0,095 0,485	0,094 0,486	0,071 0,598	0,090 0,505	-0,133 0,328
sTfR indeks	r P						1	0,409 0,001	-0,444 < 0,001	-0,198 0,142	-0,286 0,032	0,863 < 0,001
transferin	r P							1	-0,501 < 0,001	-0,296 0,026	-0,130 0,339	0,346 0,009
TSAT	r P								1	0,214 0,112	-0,057 0,675	-0,450 < 0,001
hepcidin	r P									1	0,094 0,486	-0,126 0,352
Fpn	r P										1	-0,149 0,271
sTfR	r P											1

r, koeficijent korelacije; Fe, željezo; UIBC, nezasićeni kapacitet vezanja željeza; TIBC, ukupni kapacitet vezanja željeza; Hb, hemoglobin; sTfR indeks, topljivi transferinski receptor/log feritin; TSAT, zasićenje transferina; Fpn, feroportin; sTfR, topljivi transferinski receptori

Statistički značajnim razlikama smatrale su se vrijednosti s $P < 0,05$.

4.6. Predviđanje zadržanog spontanog pobačaja

4.6.1. Univariatna logistička regresijska analiza

Korištenjem logističke regresijske analize ispitana je sposobnost biokemijskih parametara statusa željeza u predviđanju zadržanog spontanog pobačaja. U univariatnu logističku regresiju uključeni su svi parametri statusa željeza (Tablica 10.) kao i omjeri feritina, hepcidina, sTfR-a i Fpn-a s drugim parametrima statusa željeza (Tablica 11.).

U univariatnoj logističkoj regresijskoj analizi Fe, feritin, TSAT, sTfR, sTfR indeks, Fpn te omjeri feritin/Fpn, Fe/Fpn, TSAT/Fpn, transferin/Fpn, Hb/Fpn, Hb/Fe, Fpn/sTfR, Hb/sTfR, Fe/sTfR, feritin/sTfR, transferin/sTfR i TSAT/sTfR identificirani su kao prediktori zadržanog spontanog pobačaja.

sTfR, sTfR indeks te omjeri feritin/Fpn, Fe/Fpn, TSAT/Fpn, transferin/Fpn, Hb/Fpn i Hb/Fe imali su $OR > 1$ što ukazuje da povišene vrijednosti ovih parametara ukazuju na povećan rizik za zadržani spontani pobačaj.

Fe, feritin, TSAT, Fpn te omjeri Fpn/sTfR, Hb/sTfR, Fe/sTfR, feritin/sTfR, transferin/sTfR i TSAT/sTfR imali su $OR < 1$ što ukazuje da povišene vrijednosti ovih parametara ukazuju na smanjen rizik za zadržani spontani pobačaj.

Tablica 10. Univariatna logistička regresija biokemijskih parametara statusa željeza

parametar	OR	95 % CI	P
Fe (μmol/L)	0,91	0,87 – 0,97	0,001
UIBC (μmol/L)	1,02	0,99 – 1,05	0,166
TIBC (μmol/L)	0,98	0,94 – 1,02	0,423
Hb (g/L)	0,97	0,93 – 1,01	0,220
feritin (ng/mL)	0,94	0,91 – 0,98	< 0,001
transferin (mg/dL)	1,00	0,99 – 1,00	0,946
TSAT (%)	0,96	0,93 – 0,99	0,010
sTfR (mg/L)	11,34	2,60 – 49,37	< 0,001
sTfR indeks	5,16	1,51 – 17,64	0,002
hepcidin (ng/mL)	1,03	0,97 – 1,09	0,244
Fpn (ng/mL)	0,84	0,77 – 0,91	< 0,001

OR, omjer izgleda; CI, interval pouzdanosti; Fe, željezo; UIBC, nezasićeni kapacitet vezanja željeza; TIBC, ukupni kapacitet vezanja željeza; Hb, hemoglobin; TSAT, zasićenje transferina; sTfR indeks, topljivi transferinski receptori/log feritin

Statistički značajnim razlikama smatrale su se vrijednosti $P < 0,05$.

Tablica 11. Univariatna logistička regresijska analiza omjera

parametar	OR	95 % CI	P
Fe/hepcidin	1,00	0,99 – 1,01	0,445
feritin/hepcidin	1,00	0,98 – 1,01	0,526
Hb/hepcidin	1,00	0,99 – 1,00	0,359
hepcidin/sTfR	0,99	0,95 – 1,03	0,894
transferin/hepcidin	1,00	0,99 – 1,00	0,330
TSAT/hepcidin	1,00	0,99 – 1,01	0,464
Fpn/hepcidin	1,00	0,98 – 1,02	0,631
feritin/Fpn	1,33	1,05 – 1,70	0,007
Fe/Fpn	1,34	1,06 – 1,69	0,003
TSAT/Fpn	1,23	1,06 – 1,44	0,001
transferin/Fpn	1,02	1,01 – 1,04	< 0,001
Hb/Fpn	1,07	1,02 – 1,11	< 0,001
Hb/Fe	1,13	1,04 – 1,23	0,001
Hb/feritin	1,08	0,99 – 1,17	0,052
transferin/feritin	1,02	0,99 – 1,05	0,087
Fpn/sTfR	0,83	0,76 – 0,90	< 0,001
Hb/sTfR	0,98	0,97 – 0,99	< 0,001
Fe/sTfR	0,93	0,89 – 0,96	< 0,001
feritin/sTfR	0,95	0,92 – 0,98	< 0,001
transferin/sTfR	0,99	0,98 – 0,99	< 0,001
TSAT/sTfR	0,96	0,94 – 0,98	< 0,001

OR, omjer izgleda; CI, interval pouzdanosti; Fe, željezo; Hb, hemoglobin; sTfR, topljivi transferinski receptori; TSAT, saturacija transferina; Fpn, feroportin

Statistički značajnim razlikama smatrale su se vrijednosti $P < 0,05$.

4.6.2. Multivariatna logistička regresijska analiza

U multivariatnu logističku regresijsku analizu uključeni su biokemijski parametri statusa željeza koji su se kao pojedinačni parametri pokazali najboljim prediktorima bolesti ili su pokazivali najmanji rizik za zadržani spontani pobačaj u univariatnoj logističkoj regresijskoj analizi.

Izrađeno je više modela u koje su uključeni Fe, feritin, TSAT, sTfR, sTfR indeks, Fpn i svi omjeri koji su pokazali statističku značajnost u univariatnoj logističkoj regresijskoj analizi, a najboljima su se pokazali prikazani modeli.

Budući da je starija dob rizični faktor za spontane pobačaje u žena reproduktivne dobi i zbog značajne razlike u dobi ispitivanih skupina, u multivariatnoj regresijskoj analizi modeli su analizirani prilagođeno/neprilagođeno dobi.

Model 1. predstavlja rutinske parametre za određivanje statusa željeza, dok Modeli 2. i 3. obuhvaćaju parametre koji se ne koriste u rutinskoj praksi za određivanje statusa željeza (sTfR) ili se ne koriste uopće u kliničkoj praksi (hepcidin, Fpn) (Tablica 12).

Tablica 12. Multiparametrijski model analiziran logističkom regresijom

neprilagođeno					prilagođeno*		
model	parametar	OR	95 % CI	P	OR	95 % CI	P
1	Fe (μmol/L)	0,75	0,62 – 0,92	0,005	0,73	0,59 – 0,90	0,003
	feritin (ng/mL)	0,94	0,90 – 0,98	0,010	0,94	0,90 – 0,98	0,012
	TSAT (%)	1,13	1,02 – 1,26	0,020	1,16	1,03 – 1,30	0,009
Ova analiza ispravno je klasificirala 70 % od ukupnog broja ispitanika, uz vrijednost AUC-a od 0,739 (0,648 – 0,818).					Ova analiza ispravno je klasificirala 70 % od ukupnog broja ispitanika, uz vrijednost AUC-a od 0,772 (0,683 – 0,846).		
2	sTfR (mg/L)	12,85	2,22 – 74,17	0,004	11,54	1,91 – 69,47	0,007
	Fpn (ng/mL)	0,85	0,78 – 0,92	< 0,001	0,85	0,78 – 0,93	< 0,001
Ova analiza ispravno je klasificirala 74 % od ukupnog broja ispitanika, uz vrijednost AUC-a od 0,804 (0,718 – 0,873).					Ova analiza ispravno je klasificirala 72 % od ukupnog broja ispitanika, uz vrijednost AUC-a od 0,818 (0,733 – 0,884).		
3	sTfR (mg/L)	14,50	2,37 – 88,59	0,003	12,25	1,97 – 76,18	0,007
	hepcidin (ng/mL)	1,12	1,03 – 1,23	0,006	1,12	1,03 – 1,22	0,008
	Fpn (ng/mL)	0,81	0,73 – 0,89	< 0,001	0,81	0,73 – 0,90	< 0,001
Ova analiza ispravno je klasificirala 80 % od ukupnog broja ispitanika, uz vrijednost AUC-a od 0,837 (0,756 – 0,900).					Ova analiza ispravno je klasificirala 78 % od ukupnog broja ispitanika, uz vrijednost AUC-a od 0,850 (0,771 – 0,911).		
OR, omjer izgleda; CI, interval pouzdanosti; AUC, površina ispod krivulje; Fe, željeza; TSAT, saturacija transferina; sTfR, topljivi transferinski receptori; sTfR indeks, topljivi transferinski receptori/log feritina; Fpn, feroportin							
*prilagođeno prema dobi							

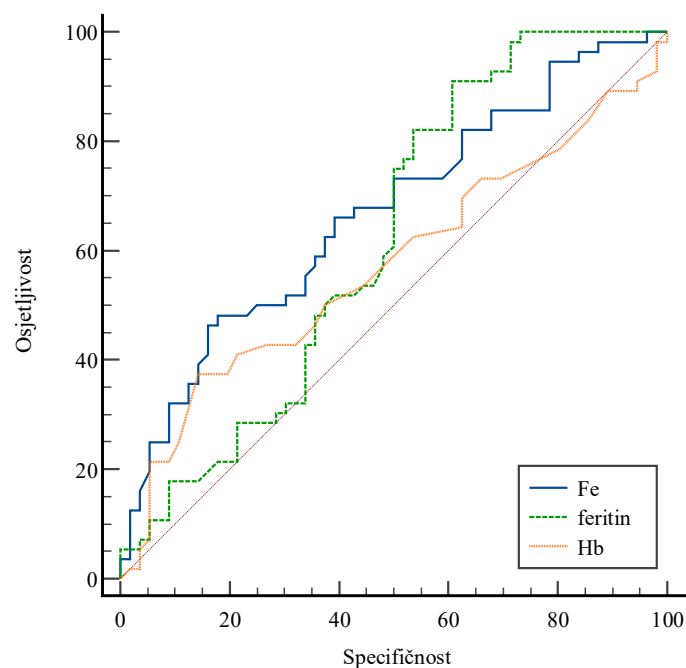
4.7. Dijagnostička točnost parametara statusa željeza

ROC analiza dvodimenzijski je grafički prikaz koji pokazuje odnos između dijagnostičke specifičnosti i osjetljivosti pretrage. Dijagnostička specifičnost pokazatelj je učestalosti negativnih rezultata u ispitanica za koje je poznato da je ishod uredna trudnoća, točnije, koje nemaju zadržani spontani pobačaj. Dijagnostička osjetljivost pretrage pokazatelj je učestalosti pozitivnih rezultata u ispitanica za koje se zna da imaju zadržani spontani pobačaj, odnosno da su stvarno pozitivne. Optimalna kombinacija osjetljivosti i specifičnosti na ROC krivulji za pojedini test obilježena je točkom najbližom gornjemu lijevom kutu krivulje, a određena je najvećom površinom ispod krivulje (engl. *area under the ROC curve*, *AUC*). Veće vrijednosti AUC-a označavaju bolje diskriminacijske sposobnosti testa. U ovom su dijelu rezultata s pomoću ROC statističke analize krivuljom vizualizirana i klasificirana svojstva određivanja koncentracije rutinskih parametara statusa željeza (Fe-a, feritina i Hb-a) i predloženih novih parametara u predviđanju spontanog pobačaja, sTfR-a, Fpn-a i omjera Fpn/sTfR. ROC analizom ispitana je njihova dijagnostička točnost odnosno njihova moć diskriminacije ili ispravne klasifikacije između skupina ispitanica s urednom trudnoćom i sa zadržanim spontanom pobačajem (Tablica 13.). Pregledom osjetljivosti, specifičnosti i AUC-a za Fe, feritin i Hb (Slika 14.) može se zaključiti da imaju slabe karakteristike razlikovanja navedenih skupina, dok Fpn, sTfR i omjer Fpn/sTfR (Slika 15.) imaju nešto bolje, odnosno umjerene/prihvatljive karakteristike diskriminacije između skupina.

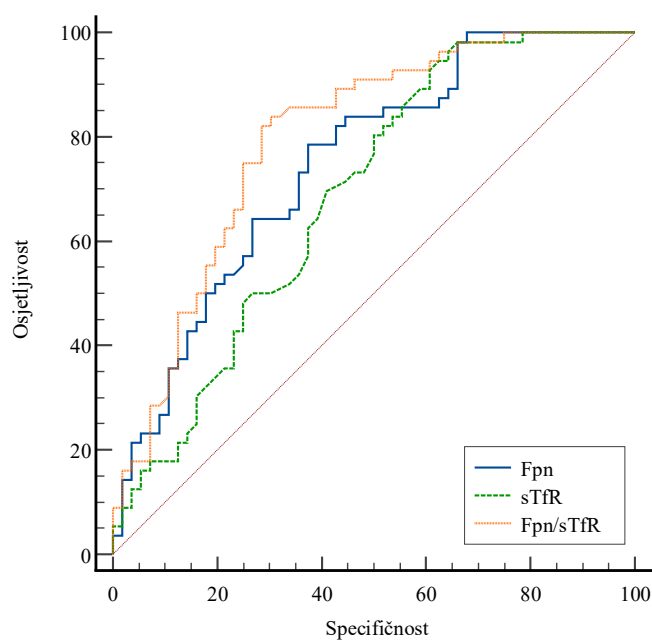
Tablica 13. Dijagnostička točnost ispitana analizom ROC krivulje za parametre i omjere statusa željeza u razlikovanju ispitanica s urednom trudnoćom i zadržanim spontanom pobačajem

parametar	AUC	osjetljivost	specifičnost	granična vrijednost	P
Fe ($\mu\text{mol/L}$)	0,669	46,4	83,9	$\leq 12,2$	0,001
feritin (ng/mL)	0,621	91,0	39,3	$\leq 27,0$	0,024
Hb (g/L)	0,573	37,50	85,71	≤ 121	0,186
Fpn (ng/mL)	0,746	78,6	62,5	$\leq 9,54$	$< 0,001$
sTfR (mg/L)	0,688	98,2	33,9	$> 0,66$	$< 0,001$
Fpn/sTfR	0,797	82,1	71,4	$\leq 9,77$	$< 0,001$

AUC – površina ispod krivulje; Fe, željezo; sTfR indeks, topljivi transferinski receptori/log feritin; Fpn, ferroportin



Slika 14. ROC krivulja prikazuje dijagnostičku točnost Fe-a, feritina i Hb-a u razlikovanju ispitanica s urednom trudnoćom i sa zadržanim spontanim pobačajem



Slika 15. ROC krivulja prikazuje dijagnostičku točnost Fpn-a, sTfR-a i omjera Fpn/sTfR u razlikovanju ispitanica s urednom trudnoćom i sa zadržanim spontanim pobačajem

5. RASPRAVA

Puno je otvorenih pitanja i istraživanja u dijagnostici metabolizma željeza, dijagnostici nedostatka željeza kod svih dobnih skupina i stanja, pa tako i u trudnoći i različitim komplikacijama trudnoće u koje se ubraja i zadržani spontani pobačaj. Ono što je poznato do sada za trudnoću je da anemija zbog nedostatka željeza tijekom trudnoće može uzrokovati niz problema za majku i fetus, uključujući prijevremeni porod, intrauterini zastoj u razvoju, probleme s posteljicom, smanjenje zaliha željeza kod novorođenčeta, rizik od smanjenja rezervi majčine krvi tijekom poroda i potrebu za transfuzijom u slučajevima velikog gubitka krvi, srčanog stresa, simptoma anemije, produljenog boravka u bolnici, smanjene proizvodnje majčinog mlijeka i iscrpljivanja zaliha željeza kod majke tijekom i nakon poslijeporođajnog razdoblja (234). Istraživanja o statusu željeza u trudnoći su mnogobrojna jer je anemija uzrokovana nedostatkom željeza najčešća hematološka komplikacija trudnoće, a razlozi tome su značajno povećana potreba za željezom (za volumen krvi majke, za razvoj fetusa i posteljice), s tim da potreba raste kako trudnoća napreduje, odnosno najveća je u drugom i trećem tromjesečju. Mnoge žene reproduktivne dobi nemaju dovoljne zalihe željeza u tijelu kako bi zadovoljile potrebe za željezom u trudnoći. Ovisno o graničnim vrijednostima koje se koriste za definiranje nedostatka željeza, do 40 % trudnoća u prvom tromjesečju u SAD-u može imati nedostatak željeza (148).

Uspješno rano prepoznavanje poremećaja homeostaze željeza te prevencija i praćenje statusa željeza tijekom trudnoće u prvom redu ovisi o pravodobnoj i točnoj laboratorijskoj dijagnostici. Stoga su u svakodnevnom kliničkom radu važni specifični i dostupni laboratorijski parametri koji će što ranije otkriti promjene u poremećaju metabolizma željeza. U ovom su radu izloženi rezultati ispitivanja koncentracije sTfR-a i Fpn-a u usporedbi s parametrima općeg statusa željeza u serumu koji su trenutačno u upotrebi (Fe, UIBC, TIBC, Hb, feritin, transferin, TSAT), a s ciljem što boljeg razumijevanja i otkrivanja poremećaja homeostaze željeza u najranijoj trudnoći. Ovo istraživanje je prvo koje je izmjerilo koncentracije Fpn-a u žena s urednom trudnoćom i trudnoćom s komplikacijama, a također je sveobuhvatno procijenilo različite parametre povezane s homeostazom željeza u žena s ranim (prije 14. gestacijskog tjedna) zadržanim spontanim pobačajem, specifičnom vrstom spontanog pobačaja bez vaginalnog krvarenja.

Osim toga, u pokušaju prepoznavanja nepovoljnih ishoda trudnoće i određivanja reprezentativnih biljega koji bi mogli identificirati disregulaciju homeostaze željeza i/ili pojavu spontanog pobačaja tijekom rane trudnoće, uključili smo različite kombinacije parametara (indeksa ili omjera) koji bi mogli pomoći u razumijevanju istoga. Također, u ovoj doktorskoj disertaciji ispitani su pojedinačni parametri i omjeri u podskupinama ispitanica uredne trudnoće

i zadržanog spontanog pobačaja podijeljenih prema graničnoj vrijednosti feritina za subklinički nedostatak željeza prema smjernicama WHO-a i po gestacijskom tjednu prema amenoreji.

Rezultati ovog istraživanja pokazuju da je koncentracija Fe-a značajno niža u ispitanica sa zadržanim spontanim pobačajem u odnosu na urednu trudnoću, s tim da je u obje skupine, koncentracija Fe-a unutar referentnog intervala. Prema metodologiji istraživanja zadovoljeni su uvjeti dobre laboratorijske prakse za interpretaciju koncentracija Fe-a: dnevni ritam Fe-a (uzorkovanje u jutarnjim satima), prije terapije (ispitanice sa zadržanim spontanim pobačajem), bez suplementacije željeza i bez utjecaja upale (kriterij isključenja CRP > 5 mg/L). U usporedbi koncentracija Fe-a s obzirom na koncentracije feritina po skupinama očekivano su koncentracije Fe-a niže u podskupina s koncentracijom feritina ≤ 15 ng/mL, bez obzira na ishod trudnoće. Značajno najviše koncentracije Fe-a imale su ispitanice uredne trudnoće s feritinom > 15 ng/mL u odnosu na sve ostale podskupine. Isto tako, značajno više koncentracije Fe-a su imale ispitanice uredne trudnoće u odnosu na zadržani spontani pobačaj, bez obzira na GT. Ipak, najviše koncentracije Fe-a su imale ispitanice uredne trudnoće u GT ≥ 10 što se može objasniti dovoljnim rezervama željeza, dobro reguliranom homeostazom željeza i izostankom menstruacije.

Također, rezultati prikazani u Tablici 3. pokazuju da su ispitanice sa zadržanim spontanim pobačajem imale značajno niže vrijednosti feritina što ukazuje na povećanu potrošnju rezervi. Značajno niže koncentracije feritina u ispitanica zadržanog spontanog pobačaja (17,3 (11,0 – 22,1) ng/mL) u odnosu na koncentracije feritina u ispitanica s urednom trudnoćom (21,5 (11,9 – 37,4) ng/mL) upućuju na smanjeni kapacitet skladištenog željeza. Poznato je da se višak željeza pohranjuje u obliku feritina primarno u jetri, slezeni i koštanoj srži (stanice RES-a), dok se, s druge strane, može osloboditi za sintezu hemoglobina ili vezati za transferin i prenositi do tkiva gdje se ugrađuje u hemoproteine i enzime ovisne o željeza. I jetra i posteljica imaju izvanrednu sposobnost pohranjivanja željeza u obliku feritina kako bi zaštitili majku i fetus od velikih promjena u dostupnosti željeza. Gledano s kliničke strane, nalaz niske koncentracije feritina u serumu dijagnostički je pokazatelj nedostatka željeza. Referentne vrijednosti za koncentracije feritina u trudnica su dostupne i prihvaćene u praksi, međutim problem postoji u definiranju i prihvaćanju graničnih vrijednosti za različita druga stanja. Također, otežavajuća stvar je što povišene ili čak normalne koncentracije feritina u serumu mogu biti teške za interpretaciju jer je feritin reaktant akutne faze, odnosno koncentracija feritina u referentnom rasponu može prikriti stanje nedostatka željeza ako je prisutna upala. Trenutne preporuke su mjerenje biomarkera upale, čije se koncentracije ne razlikuju statistički značajno između naših ispitanica, a ujedno su koncentracije CRP-a izvan referentnog intervala bile kriterij isključenja.

Općenito, podatak o koncentraciji feritina u serumu, ako je dostupan, treba koristiti zajedno s koncentracijom Hb-a kako bi se preciznije definirao status željeza u trudnoći. Također, bitno je naglasiti važnost metode mjerenja koncentracije feritina, odnosno proizvođač reagensa korištenog u našem istraživanju za određivanje koncentracije feritina posebno preporučuje referentne vrijednosti za žene do 45 godina starosti (žene reproduktivne dobi) od 7 do 133 ng/mL, a za žene starije od 45 godina od 14 do 295 ng/mL, što se razlikuje od drugih proizvođača reagensa za mjerenje koncentracije serumskog feritina na automatskim analizatorima koji preporučuju samo jedan općeniti referentni interval za žene. Stoga, prema preporučenim referentnim vrijednostima proizvođača reagensa, sve žene koje su sudjelovale u ovoj studiji su imale koncentraciju feritina unutar referentnog intervala. Standardizaciju testa te validaciju metode potiču i rezultati studije koja je usporedila dva testa za određivanje koncentracije feritina pri čemu test Ortho-Clinical Diagnostics, kojeg smo koristili u ovom istraživanju, mjeri niže koncentracije feritina u usporedbi s testom Abbott Architecta za čak 36 – 40 % (235). Cochraneov sustavni pregled o koncentraciji feritina u serumu i plazmi kao pokazatelja nedostatka i preopterećenja željezom uključio je, između ostalih, 72 studije s preko 6000 sudionika s nedostatkom željeza i došao do zaključka da bi granična koncentracija feritina između 15 – 30 ng/mL mogla ukazivati na nedostatak željeza u koštanoj srži zdrave populacije, s posebnim naglaskom da je premalo studija da bi se s pouzdanjem preporučio određeni granični prag. Također, ističu da su istraživanja i podaci u kritičnim podskupinama, kao što su djeca i trudnice, previše rijetki da bi se sa sigurnošću moglo reći da isti zaključak vrijedi i za te podskupine (236). Jedna od zadnjih studija iz ovog područja, provedena u Irskoj, bavila se longitudinalnim promjenama biomarkera željeza tijekom trudnoće u populaciji s visokim standardima te je predložila granične vrijednosti statusa željeza u ranoj trudnoći koje bi mogle predvidjeti nedostatak željeza u trećem tromjesečju. Parametri željeza mjereni su u 15., 20. i 33. tjednu trudnoće te rezultati njihove studije pokazuju da se prevalencija nedostatka željeza (koncentracija feritina < 15 ng/mL) povećavala tijekom trudnoće s 4,5 % u 15. tjednu trudnoće na 13,7 % u 20. tjednu trudnoće te na 51,2 % u 33. tjednu trudnoće. Korištenjem graničnog praga koncentracije feritina od < 30 ng/mL, prevalencija nedostatka željeza bila je 20,7 %, 43,7 % i 83,8 % u istim vremenskim točkama. Korištenjem metode analize graničnih vrijednosti (AUC = 0,750), koncentracija feritina od < 60 ng/mL utvrđena je kao granični prag u 15. tjednu koji je predviđao prisutnost nedostatka željeza (feritin < 15 ng/mL) u 33. tjednu (237). Još uvijek se postavlja pitanje i provode se studije o tome koliko trudnica u prvom tromjesečju rutinski određuje koncentraciju feritina jer u nekim zemljama feritin ne spada u rutinske testove u pregledu statusa željeza u trudnoći. U kanadskoj studiji trudnica iz urbanih područja, autori

su uključili 44552 trudnice kako bi utvrdili prevalenciju određivanja koncentracije feritina tijekom 5-godišnjeg razdoblja. Samo u njih 59 % je određena koncentracija feritina tijekom trudnoće, najčešće tijekom prvog tromjesečja (71,4 %), a od toga je 25 % njih kasnije u trudnoći imalo težak oblik nedostatka željeza, što podupire ideju da se nedostatak željeza pojavljuje već u ranoj trudnoći (238). Značajan izazov u tumačenju literature je nedostatak konsenzusa o laboratorijskoj dijagnostici nedostatka željeza u trudnoći, budući da postojeće studije koriste nedosljedne granične vrijednosti feritina za definiranje nedostatka željeza i mogućeg poremećaja homeostaze željeza.

Hemoglobin se između skupina nije razlikovao što sugerira da još nije nastupila hematološka manifestacija nedostatka željeza te bi rezultati mogli upućivati na subklinički oblik poremećaja metabolizma željeza. Dugi niz godina se mjerenje koncentracije Hb-a koristilo kod pacijenata svih dobnih skupina za probir statusa željeza zbog njegove široke dostupnosti, jednostavnosti mjerenja i niske cijene analize, posebno u područjima s niskim standardima. Referentne i granične vrijednosti za koncentraciju Hb-a u anemijama su općeprihvaćene tako da dijagnoza anemije nije problematična. Ipak, postoje značajne zabrinutosti oko oslanjanja isključivo na probir Hb-om. Budući da ugradnja željeza u hemoglobin predstavlja proces od jako velike važnosti u organizmu, anemija se pojavljuje kao krajnji rezultat poremećene ravnoteže željeza. Stoga, koncentracija Hb-a nema osjetljivost za otkrivanje ranih faza nedostatka željeza ili poremećaja homeostaze željeza kada već postoje fiziološki učinci na tkiva. Osim toga, anemiju uzrokuju i druga stanja osim nedostatka željeza, uključujući hemoglobinopatije, hemolizu i upalu/kronične bolesti. Oslanjanje na samu koncentraciju Hb-a nema dovoljnu dijagnostičku osjetljivost i specifičnost za utvrđivanje nedostatka željeza u trudnoći. Biomarkeri specifični za željezo, poput feritina, TSAT-a i hepcidina, mogu se koristiti za razlikovanje anemije uzrokovane nedostatkom željeza od drugih uzroka anemije (239). Inače, vrijednosti Hb-a obično se koriste za definiranje stupnja anemije. Za trudnice starije od 15 godina, težina anemije prema WHO-u definirana je kao blaga (10 – 10,9 g/dL Hb-a), umjerena (7 – 9,9 g/dL Hb-a) i teška (< 7 g/dL Hb-a). Istraživanje koje se bavilo analizom parametara statusa željeza u trudnica i žena nakon poroda u Indiji pronašlo je samo slabu ili nikakvu povezanost između Hb-a i biomarkera željeza feritina, sTfR-a, TSAT-a i hepcidina (240). U ovom doktorskom radu Hb je pokazao samo slabu pozitivnu povezanost s Fpn-om u urednoj trudnoći i slabu negativnu povezanost sa sTfR indeksom u zadržanom spontanom pobačaju. Isto tako, Hb nije pokazao statistički značajnu razliku u koncentraciji između skupina podijeljenih prema koncentraciji feritina, kao ni između skupina podijeljenih prema GT-u. To bi moglo ukazivati

na to da sama koncentracija Hb-a nije učinkovit marker poremećaja homeostaze željeza u trudnoći.

Niže koncentracije hepcidina, iako statistički neznčajne, kod ispitanica s urednom trudnoćom u odnosu na zadržani spontani pobačaj mogle bi upućivati na fiziološki odgovor organizma kojim se nastoji povećati intestinalna apsorpcija i mobilizacija skladištenog željeza. Važno je napomenuti da CRP kao pokazatelj upale nije pokazao značajne razlike između skupina, što isključuje upalni proces kao mogući čimbenik dobivenih rezultata. Za hepcidin je poznato da je ključni regulator sustavne homeostaze željeza te je njegova uloga bitna i za reguliranje homeostaze željeza tijekom trudnoće. Koncentracije hepcidina u majke kontroliraju koncentraciju željeza u cirkulaciji i određuju koliko će željeza biti dostavljeno posteljici i fetusu. Tijekom trudnoće, koncentracija hepcidina u početku se povećava zbog prestanka menstruacije, ali progresivno se smanjuje u drugom i trećem tromjesečju do gotovo nemjerljivih vrijednosti (173). Ovo smanjenje koncentracije hepcidina potiče povećanu apsorpciju željeza u crijevima i oslobađanje željeza iz zaliha u jetri kako bi se maksimalno povećale koncentracije željeza u cirkulaciji (232, 241). Povećana mobilizacija željeza potiče majčinu hematopoezu i unos željeza od strane posteljice te prijenos na fetus u razvoju. Nekoliko studija na mišjim modelima ističe važnost regulacije hepcidina u majke tijekom trudnoće. Odsutnost majčinog hepcidina rezultira održivim, ali željezom preopterećenim potomstvom, dok povišene koncentracije majčinog hepcidina rezultiraju embrionalnom anemijom uzrokovanom nedostatkom željeza, manjim embrijima, pa čak i embrionalnom smrću (173). Ovi podaci upućuju na to da je potiskivanje ekspresije majčinog hepcidina bitno za zdravu i urednu trudnoću. Unatoč važnosti, još se uvijek istražuju mehanizmi koji upravljaju potiskivanjem ekspresije hepcidina u majke tijekom trudnoće. Ipak, utvrđeno je da su poznati regulacijski mehanizmi uključeni u modulaciju ekspresije hepcidina. U usporedbi različitih omjera izvedenih s hepcidinom statistički značajno niže vrijednosti omjera Fe/hepcidin, feritin/hepcidin, TSAT/hepcidin i Fpn/hepcidin su imale ispitanice sa zadržanim spontanim pobačajem u odnosu na urednu trudnoću. Navedeno bi moglo upućivati na ograničavanje mobilizacije željeza, disproporciju između skladištenog željeza i regulacije metabolizma željeza hepcidinom kao i na moguću smanjenu bioraspoloživost željeza i poremećaj u otpuštanju željeza iz stanice. Omjeri Hb/hepcidin, hepcidin/sTfR i transferin/hepcidin nisu pokazali statističku značajnost između skupina s urednom trudnoćom i zadržanim pobačajem. S druge strane, omjer hepcidina i feritina, omjer hepcidina i željeza, omjer hepcidina i TSAT-

a te omjer feritina i hemoglobina primijenjeni su u istraživanjima različitih bolesti i stanja, ali nikada u trudnoći, bilo urednoj ili abnormalnoj (242 - 245).

U usporedbi koncentracija hepcidina u odnosu na koncentracije feritina, hepcidin je značajno niži u skupinama sa subkliničkim nedostatkom željeza (feritin ≤ 15 ng/mL) bez obzira na ishod trudnoće. To odražava fiziološki odgovor potiskivanja ekspresije hepcidina u svrhu povećanog preuzimanja i mobilizacije željeza, odnosno povećane potrebe za željezom. Koncentracija hepcidina bila je najniža u ispitanica s urednom trudnoćom i subkliničkim nedostatkom željeza, dok je značajno viša koncentracija hepcidina u podskupini uredne trudnoće s dovoljnim zalihama željeza. S druge strane, kod zadržanog pobačaja koncentracije hepcidina su bile više u odnosu na odgovarajuće podskupine uredne trudnoće. U ispitanica sa zadržanim spontanim pobačajem hepcidin je bio viši čak i sa subkliničkim nedostatkom željeza što upućuje na poremećenu regulaciju metabolizma željeza i potencijalno funkcionalno ograničenje njegove dostupnosti. Ovi rezultati pokazuju da hepcidin u zadržanom spontanom pobačaju ne prati u potpunosti fiziološko potiskivanje ekspresije hepcidina kada postoji manjak željeza što može dovesti do funkcionalnog nedostatka željeza, odnosno do toga da hepcidin blokira željezo iako je ono u nedostatku. Nije bilo statistički značajne razlike u koncentracijama hepcidina između ispitanica podijeljenih prema gestacijskom tjednu niti između skupina niti unutar pojedinih skupina. Međutim, postojala je značajna razlika u omjerima izvedenim s hepcidinom po GT-u, odnosno značajno najniže vrijednosti omjera Fe/hepcidin, feritin/hepcidin, TSAT/hepcidin i Fpn/hepcidin su imale ispitanice u GT-u ≥ 10 zadržanog spontanog pobačaja u odnosu na sve ostale podskupine. Najviše vrijednosti navedenih omjera imale su ispitanice uredne trudnoće u GT-u < 10 . Također, u urednoj trudnoći ovi omjeri su imali značajno više vrijednosti u odnosu na zadržani pobačaj bez obzira na GT trudnoće. Ispitivanjem povezanosti u obje skupine, hepcidin je pokazao slabu pozitivnu povezanost s Fe-om i TSAT-om, slabu negativnu povezanost s UIBC-om, TIBC-om i transferinom te dobru pozitivnu povezanost s feritinom u skupini ispitanica s urednom trudnoćom. S druge strane, u skupini ispitanica sa zadržanim spontanim pobačajem pokazao je slabu pozitivnu povezanost s feritinom, te slabu negativnu povezanost s UIBC-om, TIBC-om i transferinom, dok nije bilo povezanosti s Fe-om, Hb-om, sTfR indeksom i TSAT-om. U ranijim istraživanjima rezultati su pokazali da su koncentracije hepcidina u krvi majke značajno korelirale s pokazateljima statusa željeza u majke. Tijekom prvog tromjesečja trudnoće, hepcidin (serum, mokraća) je pozitivno korelirao s feritinom i negativno sa sTfR indeksom. Slično tome, tijekom cijelog gestacijskog razdoblja, serumski hepcidin pozitivno je korelirao s feritinom i TSAT-om, a negativno sa sTfR-om i koncentracijom Hb-a (173, 176).

Vrijednosti TSAT-a bile su statistički značajno niže u ispitanica sa zadržanim spontanom pobačajem u odnosu na ispitanice s urednom trudnoćom, dok nije bilo statističke značajnosti u transferinu između skupina. Prema preporukama ACOG-a referentni interval TSAT-a u trudnoći je 16 – 60 % (219). Poznato je da se koncentracije Fe-a u serumu smanjuju rano tijekom poremećene ravnoteže željeza, odnosno nedostatka željeza, čime se smanjuje TSAT. U drugoj fazi nedostatka željeza, koncentracije transferina se povećavaju kako bi se optimizirao kapacitet vezanja željeza za transport, što još više smanjuje TSAT. Sve ove promjene događaju se prije mikrocitoze ili anemije. Mjerenje TSAT-a potvrdilo je „krhak“ status željeza kod velikog broja preanemičnih žena s nedostatkom željeza (137). Istraživanja o poremećajima metabolizma željeza se godinama provode u pokušaju pronalaska svih potrebnih dokaza za dijagnosticiranje poremećaja, nedostatka željeza ili anemije uzrokovane nedostatkom željeza, ali na zdravoj populaciji ili u stanjima koja poznato uzrokuju anemiju kao sekundarnu dijagnozu. S druge strane, postoji manje istraživanja koja se bave predviđanjem nedostatka željeza, ali se istraživanja odnose na drugo i treće tromjesečje trudnoće. Također, u slaborazvijenim zemljama klinička praksa rutinske obrade statusa željeza na početku trudnoće uključuje samo mjerenje koncentracije Hb-a, Fe-a, UIBC-a, TIBC-a i feritina. Sve više rezultata upućuje da je to nedovoljno za dijagnosticiranje poremećaja metabolizma željeza u trenutku uzorkovanja krvi i za predviđanje razvoja nedostatka željeza tijekom daljnje trudnoće. Novija istraživanja i iskustva iz kliničke prakse ukazuju na važnost i potrebu uvođenja drugih parametara statusa željeza na početku trudnoće iako nijedna međunarodna smjernica još uvijek ne podržava ovu ideju, a također mnoge radne skupine diljem svijeta ne zauzimaju stav (137, 244). Jedna studija je koristila standardne kriterije za definiranje nedostatka željeza te je 42 % trudnica imalo manjak željeza na temelju sniženog feritina, TSAT-a ili oboje (137).

Parametri statusa željeza sTfR i sTfR indeks se u kliničkoj praksi najčešće koriste u dijagnostici odnosno razlikovanju sideropenične anemije i anemije kronične bolesti, ali ne i pri određivanju statusa željeza u trudnoći, posebice ne u ranoj trudnoći. Važno je napomenuti da je koncentracija sTfR-a osim u sideropeničnoj anemiji povećana i u stanjima pojačane eritropoeze u hemolitičkim anemijama i talasemijama. S druge strane, smatra se jako korisnim parametrom statusa željeza na koje ne utječu upalna/infektivna stanja i bolesti jetre za razliku od feritina i drugih biokemijskih pokazatelja (Fe, TSAT, TIBC). Još uvijek nije predložen referentni interval za sTfR i sTfR indeks u trudnoći, odnosno u prvom tromjesečju trudnoće. sTfR kao biokemijski parametar ima užu referentni interval (u našem slučaju 0,76 – 1,76 mg/L), a za sTfR indeks stručna literatura navodi općenito vrijednost > 1,8 kao graničnu vrijednost za

dijagnostiku nedostatka željeza. Rezultati sTfR-a i sTfR indeksa u ovom istraživanju pokazuju značajno više vrijednosti u ispitanica sa zadržanim spontanim pobačajem u odnosu na urednu trudnoću. Povišen sTfR indeks odražava povećanu potrebu za željezom u eritropoezi i osjetljiv je biljeg za otkrivanje manjka željeza, čak i kada su koncentracije klasičnih parametara (Hb, feritin) još uvijek unutar referentnog intervala. U ovom slučaju, više vrijednosti ukazuju na izraženiji funkcionalni manjak željeza ili smanjenu dostupnost željeza tkivima u skupini sa spontanim pobačajem. To je u skladu i s rezultatima nižih koncentracija serumskog Fe-a, nižeg feritina i nižih vrijednosti TSAT-a u skupini uredne trudnoće, što sve zajedno upućuje na narušenu homeostazu željeza. sTfR i sTfR indeks dodatno pojačavaju interpretaciju jer su manje podložni utjecaju akutne faze i upale, pa razlika dobiva na težini. Gotovo svi omjeri sa sTfR-om (osim omjera hepcidin/sTfR) pokazali su značajno niže vrijednosti u skupini sa zadržanim spontanim pobačajem. To sugerira da u ovoj skupini postoji povećana ekspresija sTfR-a u odnosu na raspoložive rezerve željeza, cirkulirajuće Fe i prijenosne proteine. Značajno niži omjeri Hb/sTfR, Fe/sTfR, feritin/sTfR, transferrin/sTfR i TSAT/sTfR dodatno potvrđuju slabiju raspoloživost željeza za eritropoezu kod ispitanica sa spontanim pobačajem. U ispitivanju sTfR indeksa u odnosu na granične vrijednosti feritina očekivano najviše vrijednosti imala je skupina zadržanog spontanog pobačaja (feritin ≤ 15 ng/mL) te je postojala značajna razlika u vrijednostima unutar uredne trudnoće i unutar zadržanog pobačaja kao i između istih podskupina prema koncentraciji feritina. Što se tiče koncentracije sTfR-a u skupinama podijeljenim prema koncentraciji feritina, skupina zadržanog pobačaja (feritin ≤ 15 ng/mL) imala je značajno najviše koncentracije u odnosu na sve ostale skupine. Značajne razlike u koncentracijama sTfR-a bile su između skupina zadržanog spontanog pobačaja. Ovi rezultati podupiru važnost sTfR-a i sTfR indeksa kao osjetljivijih biomarkera funkcionalnog nedostatka željeza od samog feritina. Povišene vrijednosti sTfR-a u ispitanica sa zadržanim spontanim pobačajem, uz niže vrijednosti feritina, upućuju na poremećenu homeostazu željeza koja bi mogla biti povezana s patofiziologijom zadržanog spontanog pobačaja. Važnost željeza za razvoj ploda i posteljice u trudnoći potvrđuju i rezultati ispitivanja sTfR-a i sTfR indeksa po GT-ovima. Kako trudnoća napreduje tako se potrebe za željezom povećavaju. Značajno najviše vrijednosti sTfR indeksa imale su ispitanice zadržanog pobačaja u GT-u ≥ 10 , a istodobno su značajno više u odnosu na žene u istom GT-u uredne trudnoće. Nije bilo značajne razlike u vrijednostima unutar skupina uredne trudnoće i zadržanog pobačaja, bez obzira na GT. Značajno nižu koncentraciju sTfR-a imale su ispitanice uredne trudnoće u odnosu na zadržani pobačaj, bez obzira na GT. Redom, koncentracije sTfR-a su bile više kako je trudnoća napredovala, odnosno medijan sTfR-a uredne trudnoće u GT-u < 10 iznosio je 0,76 (0,59 –

1,01) mg/L, uredne trudnoće u GT-u ≥ 10 (0,86 (0,63 – 1,11) mg/L), zadržanog pobačaja u GT-u < 10 (0,96 (0,84 – 1,11) mg/L) te zadržanog pobačaja u GT-u ≥ 10 (1,05 (0,86 – 1,25) mg/L). Važno je napomenuti da su koncentracije sTfR-a u svim skupinama bile unutar preporučenog referentnog intervala koji se odnosi na opću populaciju. Iz tog razloga jako je bitno definirati referentne intervale i granične vrijednosti sTfR-a za svako tromjesečje trudnoće. sTfR indeks predložen je kao dobar pokazatelj iscrpljivanja željeza i samo je taj indeks do sada primijenjen u kohortnom istraživanju provedenom u žena s normalnom trudnoćom (174, 246). Samo su dva rada istih autora odredila parametre statusa željeza kod žena sa spontanom pobačajem, ali nije bio naglašen tip spontanog pobačaja (229, 230). Te su studije uključivale kineske žene koje nisu trudne, trudnice u prvom tromjesečju, žene koje su doživjele spontani pobačaj u prvom tromjesečju i trudnice u drugom tromjesečju. Koncentracije željeza u prvom i drugom tromjesečju bile su usporedive s onima kod žena koje nisu trudne, ali su bile značajno povećane kod žena sa spontanom pobačajem. Koncentracija hepcidina bila je slična ili povišena u prvom tromjesečju i smanjena u drugom tromjesečju u usporedbi sa ženama koje nisu trudne, te je bila povećana u skupini sa spontanom pobačajem. Osim toga, TIBC je bio smanjen, a TSAT i feritin povećani kod žena sa spontanom pobačajem u usporedbi s trudnicama u prvom tromjesečju. Podaci o suplementaciji željezom nisu bili dostupni za jednu od te dvije studije (229), dok je u drugoj studiji samo manji broj žena primao suplementaciju vitaminima, bez specifikacija je li željezo bilo uključeno u te pripravke, iako se može pretpostaviti da jest (230). Dvije dodatne studije istraživale su pokazatelje statusa željeza u sva tri tromjesečja samo uredne trudnoće (173, 174) kao i 24 sata nakon poroda i 6 tjedana nakon poroda (173). Van Santen i sur. otkrili su da su koncentracije Hb-a, Fe-a, feritina, hepcidina i vrijednosti TSAT-a bile najniže u trećem tromjesečju, dok su u istom razdoblju trudnoće koncentracije sTfR-a te vrijednosti TIBC-a i sTfR indeksa bile najviše. Međutim, 6 tjedana nakon poroda koncentracije parametara bile su slične onima u prvom tromjesečju, osim koncentracije sTfR-a i sTfR indeksa koje su i dalje bile povišene. Većina sudionica bila je iz sjeverne Europe, a u ovom istraživanju nisu predstavljene informacije o suplementaciji željezom. Slično tome, Bah i sur. pokazali su značajno smanjene koncentracije Hb-a, Fe-a, feritina i hepcidina te povišene koncentracije sTfR-a u 30. tjednu trudnoće u usporedbi s 14. i 20. tjednom, a samo su se koncentracije Hb-a i hepcidina razlikovale između prvog i drugog tromjesečja trudnoće. U ovo istraživanje uključene su samo afričke žene koje su primale suplementaciju željezom. Razlike u rezultatima između prethodnih istraživanja koja su uključivala žene s normalnom trudnoćom i/ili spontanom pobačajem i naših rezultata bi mogle biti, barem djelomično, povezane s različitom veličinom studijskih skupina, etničkom pripadnošću, suplementacijom željezom, prisutnošću

anemije zbog nedostatka željeza i vrstom spontanog pobačaja. U ovoj doktorskoj disertaciji uključene su samo žene sa zadržanim spontanom pobačajem, te žene su bile iz Istočne Europe, dok su i anemija i suplementacija željezom bili naši kriteriji isključenja, između ostalih.

U ovom doktorskom radu po prvi put je mjerena koncentracija Fpn-a i u urednoj trudnoći i u zadržanom spontanom pobačaju. Dobiveni rezultati pokazali su statistički značajno niže koncentracije Fpn-a u ispitanica sa zadržanim spontanom pobačajem u odnosu na žene s urednom trudnoćom što upućuje na moguću ulogu poremećene homeostaze željeza u etiologiji spontanog pobačaja. S obzirom na to da je Fpn ključni membranski protein odgovoran za oslobađanje željeza iz enterocita, hepatocita i makrofaga u cirkulaciju, njegova smanjena ekspresija ili snižena koncentracija može dovesti do poremećaja u raspoloživosti željeza. Poznato je da je dostupnost željeza jako bitna za razvoj posteljice i ploda u trudnoći, a moguće je da poremećaji u regulaciji mogu doprinijeti nastanku nepovoljnih ishoda trudnoće, kao što je spontani pobačaj. Naši rezultati se slažu s postojećim saznanjima o ulozi hepcidin-Fpn osi u regulaciji homeostaze željeza gdje povišene koncentracije hepcidina ili smanjena ekspresija Fpn-a dovode do funkcionalnog nedostatka željeza. Upravo ove značajno niže koncentracije Fpn-a u zadržanom spontanom pobačaju bi mogle pomoći u razumijevanju mehanizma prijenosa željeza, odnosno nedovoljne opskrbe posteljice što može rezultirati nepovoljnim ishodom trudnoće. U izvedenim omjerima Fpn-a s drugim parametrima željeza, feritin/Fpn, Fe/Fpn, TSAT/Fpn, transferin/Fpn, Hb/Fpn, rezultati pokazuju statistički značajno niže vrijednosti u urednoj trudnoći u odnosu na zadržani spontani pobačaj, osim omjera Fpn/sTfR i Fpn/hepcidin koji imaju značajno više vrijednosti u urednoj trudnoći u odnosu na spontani pobačaj. Sve skupa ukazuje na nedovoljnu opskrbu željezom u trenutku kada je potreba organizma za željezom povećana, što može dovesti do poremećaja u opskrbi posteljice i ploda. Prema dostupnim literaturnim podacima objavljene su samo tri studije koje su mjerile serumske koncentracije Fpn-a u različitim stanjima i populacijama. Jedna od njih je studija koja je dio našeg istraživanja, ali ne i ovog doktorskog rada, a u kojoj je mjerena koncentracija Fpn-a u 100 žena reproduktivne dobi te je prvi put predložen referentni interval Fpn-a za žene reproduktivne dobi (247). Međutim, potrebna su daljnja istraživanja na još većem broju ispitanika kako bi se odredile referentne vrijednosti u zdravoj populaciji i muškog i ženskog spola, kao i različitih dobnih skupina. S obzirom da su u navedenom istraživanju korišteni ista metoda i isti reagens za određivanje koncentracije Fpn-a kao u ovom doktorskom radu, možemo usporediti dobivene rezultate. Koncentracija Fpn-a u prvom tromjesečju uredne trudnoće (10,90 (7,15 – 20,98) ng/mL) viša je u odnosu na žene reproduktivne dobi koje nisu

trudne (9,74 (5,84 – 15,69) ng/mL), dok najnižu koncentraciju Fpn-a imaju žene sa zadržanim spontanim pobačajem (6,58 (4,43 – 9,41) ng/mL). Također, u navedenom istraživanju uspoređena je koncentracija Fpn-a u podskupinama s koncentracijom feritina $\leq$ i > 15 ng/mL kao i u ovom doktorskom radu. Podskupina žena reproduktivne dobi koje nisu trudne s koncentracijom feritina > 15 ng/mL imala je koncentracije Fpn-a 15,21 (10,34 – 21,93) ng/mL, odnosno više koncentracije Fpn-a u usporedbi s koncentracijama Fpn-a žena s urednom trudnoćom i feritinom > 15 ng/mL (12,33 (9,99 – 23,59) ng/mL) te zadržanim pobačajem i feritinom > 15 ng/mL (7,76 (5,24 – 10,84) ng/mL). Podskupina žena reproduktivne dobi koje nisu trudne s koncentracijom feritina ≤ 15 ng/mL imala je niže koncentracije Fpn-a (5,93 (4,84 – 8,36) ng/mL) u odnosu na urednu trudnoću i feritin ≤ 15 ng/mL (6,98 (4,43 – 10,34) ng/mL), te više koncentracije Fpn-a u odnosu na zadržani spontani pobačaj i feritin ≤ 15 ng/mL (5,28 (3,26 – 6,81) ng/mL). Međutim, važno je naglasiti da je postojala značajna razlika u koncentracijama Fpn-a u podskupinama unutar uredne trudnoće kao i spontanog pobačaja, ali i između istih podskupina uredne trudnoće i zadržanog pobačaja.

Druge dvije studije koje su mjerile koncentraciju Fpn-a provedene su u drugim stanjima i bolestima. Jedna od njih je studija koja je mjerila koncentraciju Fpn-a u 60 žena s rakom dojke i usporedila je s 30 žena kontrolne skupine, u dobi između 30 i 70 godina, pokazujući statistički značajno više koncentracije Fpn-a ($4,44 \pm 1,20$ ng/mL) u kontrolnoj skupini u usporedbi sa ženama s rakom dojke ($2,47 \pm 1,59$ ng/mL). Kontrolna skupina ove studije uključivala je i žene koje nisu reproduktivnoj dobi, a zbog nedostatka informacija o mogućim drugim stanjima i poremećajima, kao i nedostupnih informacija o analitičkim specifikacijama testa i proizvođaču reagensa, teško je usporediti ove rezultate s onima iz našeg istraživanja (248). Druga studija je mjerila serumsku koncentraciju Fpn-a te je regrutirala pacijentice sa shizofrenijom i bipolarnim poremećajem te zdrave ispitanike kao kontrolnu skupinu. Međutim, njihova kontrolna skupina sastoji se od samo 42 osobe, žena (N = 23) i muškaraca (N = 19). Pokazali su da je skupina pacijenata sa shizofrenijom imala značajno više koncentracije serumskog Fpn-a ($0,46 \pm 0,22$ ng/mL) od zdravih ispitanika ($0,26 \pm 0,18$ ng/mL) i pacijenata s bipolarnim poremećajem ($0,30 \pm 0,20$ ng/mL), dok se koncentracije hepcidina, željeza, Hb-a i feritina nisu razlikovale između skupina i bile su unutar referentnih vrijednosti. Autori ove studije sugeriraju da antipsihotici mogu utjecati na mehanizam djelovanja Fpn-a (249).

Danas su na tržištu dostupni samo ELISA kitovi za određivanje koncentracije Fpn-a iz seruma ili plazme, te je potrebna standardizacija metode i verifikacija testa prema CLSI EP15-A3 protokolu za medicinsko-laboratorijske testove. Zbog uloge željeza u mnogim funkcijama u

tijelu, važno je znati koncentraciju Fpn-a u serumu/plazmi radi boljeg razumijevanja različitih poremećaja homeostaze željeza.

U ovom doktorskom radu ispitivana je povezanost između parametara te je u skupini ispitanica s urednom trudnoćom Fpn pokazao slabu pozitivnu povezanost s Fe-om, feritinom, Hb-om, TSAT-om i hepcidinom, te slabu negativnu povezanost sa UIBC. U skupini zadržanog spontanog pobačaja Fpn je pokazao slabu pozitivnu povezanost s feritinom i slabu negativnu povezanost sa sTfR indeksom. S drugim parametrima statusa željeza nije bilo povezanosti.

U usporedbi koncentracije Fpn-a po GT-ima postojala je značajna razlika u koncentraciji Fpn-a između uredne trudnoće s GT-om < 10 (10,21 (7,27 – 19,82) ng/mL) i zadržanog pobačaja s GT-om < 10 (6,50 (4,83 – 10,03) ng/mL), kao i između uredne trudnoće s GT-om ≥ 10 (11,22 (6,87 – 22,32) ng/mL) i zadržanog pobačaja s GT-om ≥ 10 (7,15 (4,05 – 9,38) ng/mL). Nema statistički značajne razlike u koncentraciji Fpn-a u kasnijem prvom tromjesečju (GT ≥ 10) u odnosu na ranu trudnoću (GT < 10) unutar istih skupina, odnosno bez obzira na ishod.

Također, analizom omjera Fpn/sTfR dobiveni rezultati ukazuju na značajno niže vrijednosti omjera Fpn/sTfR u ispitanica sa zadržanim spontanim pobačajem u odnosu na ispitanice s urednom trudnoćom. Medijan omjera u urednoj trudnoći iznosio je 15,29 (8,34 – 21,65), dok je u skupini sa zadržanim spontanim pobačajem bio gotovo dvostruko niži te je iznosio 6,65 (4,04 – 8,97). Dosadašnja istraživanja su dodatno naglasila da niska ekspresija Fpn-a u placenti može ograničiti prijenos željeza prema fetusu, što se dovodi u vezu s nepovoljnim ishodima (250). S druge strane, vrijednosti sTfR-a su već ranije prepoznate kao osjetljiv marker povećane potrebe za željezom u trudnoći. Pregledni rad Sangkhae i Nemeth ističe da promjene u hepcidin–feroportin osi, zajedno s biljezima kao što je sTfR, čine ključnu ulogu u osiguravanju ravnoteže između potreba majke i fetusa (240). U novijim istraživanjima također se navodi povezanost poremećaja metabolizma željeza s većim rizikom od spontanog pobačaja, pri čemu se naglašava uloga placentne regulacije prijenosa željeza (231). Naši rezultati doprinose ovom području ukazujući da omjer Fpn/sTfR može jasnije prikazati interakciju između raspoloživosti i iskorištavanja željeza nego što to omogućuje analiza pojedinačnih parametara. Ukupno gledano, literaturni podaci potvrđuju naše nalaze da je poremećaj homeostaze željeza jedan od važnih mehanizama u patofiziologiji spontanog pobačaja. Predloženi omjer Fpn/sTfR može se smatrati potencijalnim integracijskim biomarkerom kojim bi se rizične trudnoće mogle prepoznati u ranoj fazi, što je u skladu s globalnim trendovima razvoja predikcijskih pokazatelja u perinatalnoj medicini. Također, omjer Fpn/sTfR pokazao je značajnu razliku

između ispitanica s urednom trudnoćom i onih sa zadržanim spontanom pobačajem, bez obzira na gestacijsku dob. U ispitanica s urednom trudnoćom vrijednosti su bile više, medijan u GT-u < 10 je iznosio 14,67 (11,2 – 20,26), dok je u GT-u ≥ 10 iznosio 16,01 (12,6 – 21,3). Nasuprot tome, kod ispitanica sa zadržanim spontanom pobačajem vrijednosti su bile značajno niže te su iznosile 6,46 (5,15 – 9,38) u GT-u < 10 i 6,88 (3,90 – 8,50) u GT-u ≥ 10 ($P < 0,001$). Ovi rezultati ukazuju da je omjer Fpn/sTfR stabilan biljeg u fiziološkoj trudnoći, jer vrijednosti ostaju relativno ujednačene i u ranoj i u kasnijoj gestaciji. Uz to, kod zadržanog spontanog pobačaja vrijednosti su niže i u ranom i kasnom prvom tromjesečju, što sugerira da se poremećaj homeostaze željeza javlja već u najranijim fazama trudnoće te se nastavlja dalje u trudnoći. Niži omjer odražava smanjenu dostupnost željeza za rast i razvoj fetusa uslijed nedovoljne ekspresije Fpn i relativnog povećanja potreba na razini stanica. Sve navedeno upućuje na mogući poremećaj u regulaciji metabolizma željeza kao potencijali patofiziološki mehanizam u spontanom pobačaju. Zbog svoje konzistentnosti kroz gestacijske tjedne i jasne diferencijacije između skupina, Fpn/sTfR se nameće kao robustan biomarker koji bi mogao imati važnu kliničku ulogu u ranom probiru trudnoća s povećanim rizikom za nepovoljan ishod. U ovom istraživanju, kako bismo procijenili prognostički potencijal ispitivanih parametara (mjenjenih parametara statusa željeza, računskih testova i izvedenih omjera) proveli smo univariatnu logističku regresijsku analizu. Ova analiza pokazala je povećani rizik za zadržani spontani pobačaj za parametre sTfR, sTfR indeks, omjere feritin/Fpn, Fe/Fpn, TSAT/Fpn, transferin/Fpn, Hb/Fpn, Hb/Fe, dok su Fe, feritin, TSAT, Fpn te omjeri Fpn/sTfR, Hb/sTfR, Fe/sTfR, feritin/sTfR, transferin/sTfR i TSAT/sTfR imali OR manji od 1.

Zatim smo proveli multivariatnu logističku regresiju kako bismo predložili model koji bi identificirao najbolju kombinaciju predikcijskih parametara koji ukazuju na rizik za zadržani spontani pobačaj. Također smo prilagodili naše modele za dob, jer se dob statistički razlikovala između ispitivanih skupina. Predložili smo model koji je uključivao samo rutinske parametre u kliničkoj praksi koji su se pokazali značajnima u našoj univariatnoj analizi (model 1). Uz to, predložili smo najbolji model koji je također obuhvaćao samo parametre koji su bili značajni u univariatnoj analizi, bez obzira na to jesu li uključeni u laboratorijsku praksu ili ne (model 2). Ovaj model sastojao se od sTfR-a i Fpn-a te je ispravno klasificirao 74 % ili 72 % slučajeva, s AUC-om od 0,804 (0,718 – 0,873) odnosno 0,818 (0,733 – 0,88), ovisno o tome je li model bio ili nije bio prilagođen dobi. Međutim, iako se metoda probira univariatne analize za odabir kovarijabli za multivariatnu logističku regresiju široko koristi, sugerirano je da bi mogla propustiti važne kovarijable i dovesti do pogrešnih zaključaka. Konkretno, neka kovarijabla može pokazati značajan učinak u univariatnoj analizi, ali nema ulogu u modelu multivariatne

logističke regresije (kao što je u našem slučaju sTfR indeks u modelu 2), dok suprotno tome, neka kovarijabla može biti bitan dio multivariatne logističke regresije, a da se nije pokazala značajnom u univariatnoj regresiji (251). Stoga, kako se ne bi isključile potencijalno važne kovarijable u višestrukoj analizi, predložili smo i model koji predstavlja najbolju kombinaciju svih ispitivanih parametara, bez obzira jesu li bili značajni ili ne u univariatnoj logističkoj regresiji (model 3). Ovaj model uključivao je sTfR, hepcidin i Fpn te je ispravno klasificirao 80 % odnosno 78 % slučajeva, s AUC-om od 0,837 (0,756 – 0,900) odnosno 0,850 (0,771 – 0,911), ovisno o tome je li model bio prilagođen dobi ili nije. Model 3 ima nešto bolje karakteristike od modela 2, u pogledu udjela ispravno klasificiranih slučajeva i vrijednosti AUC-a. Međutim, model 2 također ima dobre karakteristike i uključuje samo jedan parametar koji nije dio svakodnevne laboratorijske analize (Fpn), dok model 3 uključuje dva takva parametra (hepcidin i Fpn). Stoga bi, zbog financijskih razloga, model 2 mogao biti prihvatljiviji za kliničku primjenu.

Analizom ROC krivulje utvrđeno je da različiti parametri statusa željeza pokazuju varijabilnu dijagnostičku vrijednost u razlikovanju ispitanica s urednom trudnoćom i onih sa zadržanim spontanom pobaćajem. Najnižu diskriminacijsku sposobnost pokazao je Hb (AUC = 0,573) s niskom osjetljivošću (37,5 %) i višom specifičnošću (85,7 %), kao i serumsko Fe koje je pokazalo (AUC = 0,669) relativno nisku osjetljivost (46,4 %) i visoku specifičnost (83,9 %), što upućuje da Hb i Fe nisu dovoljno pouzdani samostalni pokazatelji. Feritin je pokazao visoku osjetljivost (91,0 %), ali nisku specifičnost (39,3 %), što ga čini osjetljivim markerom za detekciju poremećaja statusa željeza, no s ograničenom mogućnošću razlikovanja između skupina. Parametar sTfR imao je AUC vrijednost od 0,690, uz izrazito visoku osjetljivost (98,2 %), ali nisku specifičnost (33,9 %). Ovi nalazi potvrđuju da sTfR može prepoznati gotovo sve slučajeve, ali uz rizik mogućeg povećanog broja lažno pozitivnih rezultata. Fpn je pokazao bolju ravnotežu između osjetljivosti (78,6 %) i specifičnosti (62,5 %), uz AUC od 0,746, što sugerira njegovu potencijalnu kliničku primjenjivost kao pouzdanijeg biomarkera. Najvišu diskriminacijsku sposobnost pokazao je omjer Fpn/sTfR (AUC = 0,797), s dobrom kombinacijom osjetljivosti (82,1 %) i specifičnosti (71,4 %), čime se ističe kao najbolji pojedinačni dijagnostički parametar. Svi analizirani parametri pokazali su statističku značajnost, pri čemu je većina imala vrijednosti $P < 0,001$. Dobivene granične vrijednosti mogu poslužiti kao praktične smjernice u kliničkoj procjeni statusa željeza kod trudnica s rizikom od zadržanog spontanog pobaćaja. U cjelini, rezultati upućuju da pojedinačni rutinski parametri statusa željeza u laboratorijskoj dijagnostici (Fe, feritin i Hb) imaju ograničenu dijagnostičku

vrijednost, dok potencijalno novi biomarkeri, osobito Fpn i omjer Fpn/sTfR, pokazuju bolju sposobnost razlikovanja ispitanica i time predstavljaju obećavajuće alate za daljnju kliničku primjenu i istraživanja.

Za sada nije poznato mogu li promjene u metabolizmu željeza doprinijeti abnormalnoj trudnoći ili obrnuto, uzrokuje li abnormalna trudnoća disregulaciju metabolizma željeza. Stoga su potrebna buduća istraživanja kako bi se razjasnila ova uzročno-posljedična veza. Osim toga, kako bi se pružio bolji uvid i poboljšalo razumijevanje temeljnih mehanizama promjena u metabolizmu željeza u urednim i kompliciranim trudnoćama, posebno u ranoj fazi, potrebna su istraživanja koja uključuju veći broj žena različitog podrijetla (raznolike populacije). Kliničke implikacije ovih rezultata mogu biti značajne jer bi određivanje koncentracija sTfR-a, Fpn-a, hepcidina, u kombinaciji s klasičnim biljezima statusa željeza, moglo doprijeti ranijoj identifikaciji trudnica s rizikom za nepovoljan ishod trudnoće. Nadalje, otvara se pitanje može li modulacija osi hepcidin-Fpn, farmakološkim intervencijama, imati preventivnu ili terapijsku vrijednost. Potrebna su daljnja istraživanja kako bi se definirali i implementirali biomarkeri ili paneli biomarkera za točnu procjenu nedostatka željeza tijekom trudnoće, odnosno istraživanja koja bi uključila ispitanike različite dobi, rase, etničke pripadnosti, u trudnoći i žena koje nisu trudne. Također, potrebna su istraživanja koja bi koristila tri definicije nedostatka željeza: kombinirani početni probir TSAT < 10% i početni probir serumskog feritina < 15 ng/mL (HEIRS); feritin < 15 ng/mL (WHO) i feritin < 25 ng/mL (IDE). Iako je željezo ključno za zdravu trudnoću, postoje nejasnoće i u našem temeljnom i u kliničkom razumijevanju homeostaze željeza i poremećaja u trudnoći. U temeljnim istraživanjima, važna pitanja uključuju razumijevanje regulacijskih mehanizama koji osiguravaju dostupnost željeza tijekom trudnoće, mehanizme prijenosa željeza kroz placentu, oblike željeza koji doprinose razvoju posteljice i fetusa te stanične posljedice nedostatka ili viška željeza tijekom razvoja fetusa. Referentni rasponi za parametre i regulatore željeza u različitim fazama trudnoće nisu dobro dokumentirani, probir na nedostatak željeza se ne provodi rutinski osim u kontekstu anemije, a granične vrijednosti nisu definirane na temelju funkcionalnih ishoda. Poremećaj statusa željeza u majke, bilo da se radi o nedostatku ili višku željeza, povezan je s nepovoljnim ishodima trudnoće i za majku i za dijete (252). Međutim, temeljni mehanizmi koji uzrokuju nepovoljne ishode trudnoće nisu dovoljno proučeni, kao ni posljedice disregulacije željeza na postnatalni razvoj ili rizik od bolesti. Ovo istraživanje pridonosi novim saznanjima o metabolizmu željeza u trudnoći, a daljnjim istraživanjima mogli bi dobiti odgovore na mnoga

pitanja, ali i alate u dijagnosticiranju spontanih pobačaja i/ili identificiranju žena s rizikom od spontanih pobačaja u ranoj fazi trudnoće.

6. ZAKLJUČCI

U ovom doktorskom radu je po prvi put mjerena koncentracija Fpn-a i u urednoj trudnoći i u zadržanom spontanom pobačaju.

Zaključci istraživanja na temelju dobivenih rezultata su sljedeći:

- Dokazane su statistički značajno niže serumske koncentracije Fpn-a u ispitanica sa zadržanim spontanim pobačajem u odnosu na žene s urednom trudnoćom. S obzirom na to da je Fpn ključni membranski protein odgovoran za oslobađanje željeza u cirkulaciju, njegova snižena koncentracija implicira narušenu homeostazu željeza kao važan etiološki čimbenik u nastanku ranog zadržanog spontanog pobačaja.
- Ispitanice sa zadržanim spontanim pobačajem pokazuju statistički značajno više koncentracije sTfR-a u odnosu na skupinu s urednom trudnoćom. Budući da na sTfR ne utječu upalna/infektivna stanja te bolesti jetre, njegove povećane koncentracije u patološkoj trudnoći predstavljaju pouzdan, objektivan i specifičan biljeg izraženog funkcionalnog manjka željeza i njegove smanjene dostupnosti na staničnoj razini.
- Statistički značajne razlike u omjerima Fpn-a i sTfR-a s ostalim klasičnim pokazateljima statusa željeza potvrđuju postojanje izrazitog sustavnog poremećaja u homeostazi željeza. Značajno viši omjeri s Fpn-om (ferritin/Fpn, Fe/Fpn, TSAT/Fpn, transferin/Fpn, Hb/Fpn) te značajno niži omjeri sa sTfR-om (Hb/sTfR, Fe/sTfR, ferritin/sTfR, transferin/sTfR, TSAT/sTfR) u ispitanica sa zadržanim spontanim pobačajem dokazuju povećanu staničnu ekspresiju receptora i smanjenu raspoloživost željeza u cirkulaciji kada su povećane potrebe organizma za željezom.
- Analiza podskupina formiranih prema koncentraciji feritina ($\leq$ ili > 15 ng/mL) potvrđuje da ispitanice sa zadržanim spontanim pobačajem konzistentno imaju najniže koncentracije Fpn-a te najviše koncentracije sTfR-a, neovisno o tome jesu li ukupne zalihe željeza iscrpljene ili očuvane. Ovi rezultati izravno podupiru ulogu sTfR-a i Fpn-a kao znatno osjetljivijih biomarkera funkcionalnog staničnog deficita u odnosu na konvencionalno mjerenje feritina.
- Praćenje parametara statusa željeza prema GT-u otkrilo je da se u urednoj trudnoći koncentracije sTfR-a povećavaju kako trudnoća napreduje. Nasuprot tome, ispitanice sa zadržanim pobačajem imaju značajno više koncentracije sTfR-a u oba razdoblja ($GT < 10$, $GT \geq 10$), pri čemu su statistički značajno najviše koncentracije sTfR-a i vrijednosti sTfR indeksa zabilježene u ispitanica sa zadržanim pobačajem u $GT-u \geq 10$.

- Analiza omjera Fpn/sTfR pokazala je gotovo dvostruko niže vrijednosti u skupini sa zadržanim spontanim pobačajem u odnosu na urednu trudnoću. Ovaj novopredloženi omjer jasnije odražava dinamički nesrazmjer između smanjene stanične raspoloživosti željeza i povećanih staničnih potreba nego analiza pojedinačnih parametara, čime se nameće kao potencijalni integracijski biomarker za rano prepoznavanje rizičnih trudnoća.
- Omjer Fpn/sTfR pokazao je iznimnu stabilnost kroz gestacijske tjedne prvog tromjesečja. U urednoj trudnoći vrijednosti ostaju ujednačene i visoke bez obzira na gestacijsku dob. Nasuprot tome, kod zadržanog spontanog pobačaja vrijednosti su konzistentno i značajno niže u oba razdoblja prema GT-u. Ovakvo rano i kontinuirano smanjenje vrijednosti dokazuje da poremećaj homeostaze željeza započinje već u najranijim fazama embriogeneze i perzistira tijekom cijelog prvog tromjesečja.
- Analiza rutinskih biokemijskih pokazatelja statusa željeza potvrđuje prisutnost značajno narušene homeostaze željeza u skupini ispitanica sa zadržanim spontanim pobačajem koja je vidljiva iz statistički značajno nižih koncentracija Fe-a i vrijednosti TSAT-a. Paralelno s tim, uočene su i značajno niže koncentracije feritina što ukazuje na smanjenje ukupnih zaliha željeza u organizmu majke kod nepovoljnog ishoda trudnoće.
- U univariatnoj logističkoj regresijskoj analizi Fe, feritin, TSAT, sTfR, sTfR indeks i Fpn te omjeri feritin/Fpn, Fe/Fpn, TSAT/Fpn, transferin/Fpn, Hb/Fpn, Hb/Fe, Fpn/sTfR, Hb/sTfR, Fe/sTfR, feritin/sTfR, transferin/sTfR i TSAT/sTfR identificirani su kao prediktori zadržanog spontanog pobačaja.
- Multivariatnom logističkom regresijom analizirano je više modela. Najboljim se pokazao Model 3 koji je uključivao sTfR, hepcidin i Fpn te je ispravno klasificirao 80 % odnosno 78 % slučajeva, s AUC-om od 0,837 (0,756 – 0,900) odnosno 0,850 (0,771 – 0,911), ovisno o tome je li model bio prilagođen dobi ili nije.
- Analizom ROC krivulje ispitana je dijagnostička točnost parametara statusa željeza, a dobivene vrijednosti za osjetljivost, specifičnost i AUC ukazale su da parametri Fe, feritin i Hb imaju slabe karakteristike razlikovanja skupina ispitanica s urednom trudnoćom i sa zadržanim spontanim pobačajem, dok Fpn, sTfR i omjer Fpn/sTfR imaju umjerene/prihvatljive karakteristike diskriminacije između navedenih skupina.

7. LITERATURA

1. Hendriks E, MacNaughton H, MacKenzie MC. First Trimester Bleeding: Evaluation and Management. *Am Fam Physician*. 2019 Feb 1;99(3):166-174.
2. Clement EG, Horvath S, McAllister A, Koelper NC, Sammel MD, Schreiber CA. The Language of First-Trimester Nonviable Pregnancy: Patient-Reported Preferences and Clarity. *Obstet Gynecol*. 2019 Jan;133(1):149-154.
3. Magnus MC, Wilcox AJ, Morken NH, Weinberg CR, Håberg SE. Role of maternal age and pregnancy history in risk of miscarriage: prospective register based study. *BMJ*. 2019 Mar 20;364:l869.
4. Jackson T, Watkins E. Early pregnancy loss. *JAAPA*. 2021 Mar 1;34(3):22-27.
5. ACOG Practice Bulletin No. 200 Summary: Early Pregnancy Loss. *Obstetrics & Gynecology* 132(5):p 1311-1313, November 2018.
6. Kolte AM, Bernardi LA, Christiansen OB, Quenby S, Farquharson RG, Goddijn M, Stephenson MD; ESHRE Special Interest Group, Early Pregnancy. Terminology for pregnancy loss prior to viability: a consensus statement from the ESHRE early pregnancy special interest group. *Hum Reprod*. 2015 Mar;30(3):495-8.
7. Avalos L, Galindo C, Li DK. A systematic review to calculate background miscarriage rates using life table analysis. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 2012;94(6):417-23.
8. Savitz DA, Hertz-Picciotto I, Poole C, Olshan AF. Epidemiologic measures of the course and outcome of pregnancy. *Epidemiol Rev*. 2002;24(2):91-101.
9. Hasan R, Baird DD, Herring AH, Olshan AF, Jonsson Funk ML, Hartmann KE. Patterns and predictors of vaginal bleeding in the first trimester of pregnancy. *Ann Epidemiol*. 2010 Jul;20(7):524-31.
10. Tongsong T, Srisomboon J, Wanapirak C, Sirichotiyakul S, Pongsatha S, Polsrisuthikul T. Pregnancy outcome of threatened abortion with demonstrable fetal cardiac activity: a cohort study. *J Obstet Gynaecol (Tokyo 1995)*. 1995 Aug;21(4):331-5.
11. Tannirandorn Y, Sangsawang S, Manotaya S, Uerpaiojkit B, Samritpradit P, Charoenvidhya D. Fetal loss in threatened abortion after embryonic/fetal heart activity. *Int J Gynaecol Obstet*. 2003 Jun;81(3):263-6.
12. Kim C, Barnard S, Neilson JP, Hickey M, Vazquez JC, Dou L. Medical treatments for incomplete miscarriage. *Cochrane Database Syst Rev*. 2017 Jan 31;1(1):CD007223.
13. Raymond EG, Shannon C, Weaver MA, Winikoff B. First-trimester medical abortion with mifepristone 200 mg and misoprostol: a systematic review. *Contraception*. 2013 Jan;87(1):26-37.

14. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Definitions of infertility and recurrent pregnancy loss: a committee opinion. *Fertil Steril*. 2013 Jan;99(1):63.
15. ESHRE Guideline Group on RPL; Bender Atik R, Christiansen OB, Elson J, Kolte AM, Lewis S, Middeldorp S, Nelen W, Peramo B, Quenby S, Vermeulen N, Goddijn M. ESHRE guideline: recurrent pregnancy loss. *Hum Reprod Open*. 2018 Apr 6;2018(2):hoy004.
16. Jaslow CR, Carney JL, Kutteh WH. Diagnostic factors identified in 1020 women with two versus three or more recurrent pregnancy losses. *Fertil Steril*. 2010 Mar 1;93(4):1234-43.
17. Laufer MR, Ecker JL, Hill JA. Pregnancy outcome following ultrasound-detected fetal cardiac activity in women with a history of multiple spontaneous abortions. *J Soc Gynecol Investig*. 1994 Apr-Jun;1(2):138-42.
18. Annan JJ, Gudi A, Bhide P, Shah A, Homburg R. Biochemical pregnancy during assisted conception: a little bit pregnant. *J Clin Med Res*. 2013 Aug;5(4):269-74.
19. Wu HL, Marwah S, Wang P, Wang QM, Chen XW. Misoprostol for medical treatment of missed abortion: a systematic review and network meta-analysis. *Sci Rep*. 2017 May 10;7(1):1664.
20. American College of Obstetricians and Gynecologists' Committee on Practice Bulletins—Gynecology. ACOG Practice Bulletin No. 200: Early Pregnancy Loss. *Obstet Gynecol*. 2018 Nov;132(5):e197-e207.
21. Regan L, Braude PR, Trembath PL. Influence of past reproductive performance on risk of spontaneous abortion. *BMJ*. 1989 Aug 26;299(6698):541-5.
22. Sapra KJ, Joseph KS, Galea S, Bates LM, Louis GM, Ananth CV. Signs and Symptoms of Early Pregnancy Loss. *Reprod Sci*. 2017 Apr;24(4):502-513.
23. Metwally M, Ong KJ, Ledger WL, Li TC. Does high body mass index increase the risk of miscarriage after spontaneous and assisted conception? A meta-analysis of the evidence. *Fertil Steril*. 2008 Sep;90(3):714-26.
24. Maraka S, Ospina NM, O'Keeffe DT, Espinosa De Ycaza AE, Gionfriddo MR, Erwin PJ, Coddington CC 3rd, Stan MN, Murad MH, Montori VM. SubclinicalHypothyroidism in Pregnancy: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Thyroid*. 2016 Apr;26(4):580-90.
25. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Evaluation and treatment of recurrent pregnancy loss: a committee opinion. *Fertil Steril*. 2012 Nov;98(5):1103-11.
26. Gibson CS, MacLennan AH, Hague WM, Haan EA, Priest K, Chan A, et al; South Australian Cerebral Palsy Research Group. Associations between inherited thrombophilias, gestational age, and cerebral palsy. *Am J Obstet Gynecol*. 2005 Oct;193(4):1437.

27. Woolner AMF, Raja EA, Bhattacharya S, Danielian P, Bhattacharya S. Inherited susceptibility to miscarriage: a nested case-control study of 31,565 women from an intergenerational cohort. *Am J Obstet Gynecol*. 2020 Feb;222(2):168.e1-168.e8.
28. Cunningham F, Leveno KJ, Bloom SL, Dashe JS, Hoffman BL, Casey BM, Spong CY. eds. *Williams Obstetrics, 25e*. McGraw-Hill Education; 2018.
29. Fang J, Xie B, Chen B, et al. Biochemical clinical factors associated with missed abortion independent of maternal age: A retrospective study of 795 cases with missed abortion and 694 cases with normal pregnancy. *Medicine (Baltimore)*. 2018;97(50):e13573.
30. Jiang WZ, Yang XL, Luo JR. Risk factors for missed abortion: retrospective analysis of a single institution's experience. *Reprod Biol Endocrinol*. 2022 Aug 9;20(1):115.
31. Emmer R, Ajne G, Papadogiannakis N. Missed abortion in the 11-21-week period: Fetal autopsy and placental histopathological analysis of 794 cases. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2024 May;296:158-162.
32. 2019 exceptional surveillance of ectopic pregnancy and miscarriage: diagnosis and initial management (NICE guideline NG126) [Internet]. London: National Institute for Health and Care Excellence (NICE); 2019 Nov 15. PMID: 35077089.
33. Jurkovic D, Overton C, Bender-Atik R. Diagnosis and management of first trimester miscarriage. *BMJ*. 2013 Jun 19;346:f3676.
34. Medical management of abortion. Geneva: World Health Organization; 2018. PMID: 30702834.
35. Zhang J, Gilles JM, Barnhart K, Creinin MD, Westhoff C, Frederick MM; National Institute of Child Health Human Development (NICHD) Management of Early Pregnancy Failure Trial. A comparison of medical management with misoprostol and surgical management for early pregnancy failure. *N Engl J Med*. 2005 Aug 25;353(8):761-9.
36. Robledo C, Zhang J, Troendle J, Barnhart K, Creinin MD, Westhoff C, et al. Clinical indicators for success of misoprostol treatment after early pregnancy failure. *Int J Gynaecol Obstet*. 2007 Oct;99(1):46-51.
37. Creinin MD, Huang X, Westhoff C, Barnhart K, Gilles JM, Zhang J; National Institute of Child Health and Human Development Management of Early Pregnancy Failure Trial. Factors related to successful misoprostol treatment for early pregnancy failure. *Obstet Gynecol*. 2006 Apr;107(4):901-7.
38. Clinical practice handbook for safe abortion. World Health Organization. Available at: https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/97415/9789241548717_eng.pdf (Accessed on September 17, 2024).

39. Mifeprex (mifepristone) Information. US Food and Drug Administration. Available at: <http://www.fda.gov/Drugs/DrugSafety/PostmarketDrugSafetyInformationforPatientsandProviders/ucm111323.htm> (Accessed on March 30, 2016).
40. Dzuba IG, Chong E, Hannum C, Lichtenberg ES, Lugo Hernández EM, Ngoc NTN, et al. A non-inferiority study of outpatient mifepristone-misoprostol medical abortion at 64-70 days and 71-77 days of gestation. *Contraception*. 2020 May;101(5):302-308.
41. Kapp N, Eckersberger E, Lavelanet A, Rodriguez MI. Medical abortion in the late first trimester: a systematic review. *Contraception*. 2019 Feb;99(2):77-86.
42. Gouk EV, Lincoln K, Khair A, Haslock J, Knight J, Cruickshank DJ. Medical termination of pregnancy at 63 to 83 days gestation. *Br J Obstet Gynaecol*. 1999 Jun;106(6):535-9.
43. Hamoda H, Ashok PW, Flett GM, Templeton A. Medical abortion at 64 to 91 days of gestation: a review of 483 consecutive cases. *Am J Obstet Gynecol*. 2003 May;188(5):1315-9.
44. Sukhbaatar N, Weichhart T. Iron Regulation: Macrophages in Control. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2018 Dec 14;11(4):137.
45. Dev S, Babitt JL. Overview of iron metabolism in health and disease. *Hemodial Int*. 2017 Jun;21 Suppl 1(Suppl 1):S6-S20.
46. Jomova K, Valko M. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology*. 2011 May 10;283(2-3):65-87.
47. Silva B, Faustino P. An overview of molecular basis of iron metabolism regulation and the associated pathologies. *Biochim Biophys Acta*. 2015 Jul;1852(7):1347-59.
48. Wallace DF. The Regulation of Iron Absorption and Homeostasis. *Clin Biochem Rev*. 2016 May;37(2):51-62.
49. Daher R, Karim Z. Iron metabolism: State of the art. *Transfus Clin Biol*. 2017 Sep;24(3):115-119.
50. Subar AF, Krebs-Smith SM, Cook A, Kahle LL. Dietary sources of nutrients among US children, 1989-1991. *Pediatrics*. 1998 Oct;102(4 Pt 1):913-23.
51. Rolfs A, Hediger MA. Intestinal metal ion absorption: an update. *Curr Opin Gastroenterol*. 2001 Mar;17(2):177-183.
52. Institute of Medicine (US) Panel on Micronutrients. Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc. Washington (DC): National Academies Press (US); 2001.
53. Dallman PR. Iron. In: Present knowledge in nutrition, 6th, Brown ML (Ed), International Life Sciences Institute/Nutritional Foundation, Washington, DC 1990. p.241.

54. Hentze MW, Muckenthaler MU, Galy B, Camaschella C. Two to tango: regulation of Mammalian iron metabolism. *Cell*. 2010 Jul 9;142(1):24-38.
55. Kawabata H. Transferrin and transferrin receptors update. *Free Radic Biol Med*. 2019 Mar;133:46-54.
56. Parrow NL, Li Y, Feola M, Guerra A, Casu C, Prasad P, et al. Lobe specificity of iron binding to transferrin modulates murine erythropoiesis and iron homeostasis. *Blood*. 2019 Oct 24;134(17):1373-1384.
57. Athiyarath R, Arora N, Fuster F, Schwarzenbacher R, Ahmed R, George B, et al. Two novel missense mutations in iron transport protein transferrin causing hypochromic microcytic anaemia and haemosiderosis: molecular characterization and structural implications. *Br J Haematol*. 2013 Nov;163(3):404-7
58. Li M, Tang X, Liao Z, Shen C, Cheng R, Fang M, et al. Hypoxia and low temperature upregulate transferrin to induce hypercoagulability at high altitude. *Blood*. 2022 Nov 10;140(19):2063-2075.
59. Wu Y, Jiao H, Yue Y, He K, Jin Y, Zhang J, et al. Ubiquitin ligase E3 HUWE1/MULE targets transferrin receptor for degradation and suppresses ferroptosis in acute liver injury. *Cell Death Differ*. 2022 Sep;29(9):1705-1718.
60. Levy JE, Jin O, Fujiwara Y, Kuo F, Andrews NC. Transferrin receptor is necessary for development of erythrocytes and the nervous system. *Nat Genet*. 1999 Apr;21(4):396-9.
61. Xu W, Barrientos T, Mao L, Rockman HA, Sauve AA, Andrews NC. Lethal Cardiomyopathy in Mice Lacking Transferrin Receptor in the Heart. *Cell Rep*. 2015 Oct 20;13(3):533-545.
62. Chen AC, Donovan A, Ned-Sykes R, Andrews NC. Noncanonical role of transferrin receptor 1 is essential for intestinal homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015 Sep 15;112(37):11714-9.
63. Fillebeen C, Charlebois E, Wagner J, Katsarou A, Mui J, Vali H, et al. Transferrin receptor 1 controls systemic iron homeostasis by fine-tuning hepcidin expression to hepatocellular iron load. *Blood*. 2019 Jan 24;133(4):344-355.
64. Xiao X, Moschetta GA, Xu Y, Fisher AL, Alfaro-Magallanes VM, Dev S, Wang CY, Babitt JL. Regulation of iron homeostasis by hepatocyte TfR1 requires HFE and contributes to hepcidin suppression in β -thalassemia. *Blood*. 2023 Jan 26;141(4):422-432.
65. Kaup M, Dassler K, Weise C, Fuchs H. Shedding of the transferrin receptor is mediated constitutively by an integral membrane metalloprotease sensitive to tumor necrosis factor alpha protease inhibitor-2. *J Biol Chem*. 2002 Oct 11;277(41):38494-502.

66. Beguin Y, Clemons GK, Pootrakul P, Fillet G. Quantitative assessment of erythropoiesis and functional classification of anemia based on measurements of serum transferrin receptor and erythropoietin. *Blood*. 1993 Feb 15;81(4):1067-76.
67. Arosio P, Levi S. Cytosolic and mitochondrial ferritins in the regulation of cellular iron homeostasis and oxidative damage. *Biochim Biophys Acta*. 2010 Aug;1800(8):783-92.
68. Shi H, Bencze KZ, Stemmler TL, Philpott CC. A cytosolic iron chaperone that delivers iron to ferritin. *Science*. 2008 May 30;320(5880):1207-10.
69. Ryu MS, Zhang D, Protchenko O, Shakoury-Elizeh M, Philpott CC. PCBP1 and NCOA4 regulate erythroid iron storage and heme biosynthesis. *J Clin Invest*. 2017 May 1;127(5):1786-1797.
70. Yanatori I, Richardson DR, Toyokuni S, Kishi F. The new role of poly (rC)-binding proteins as iron transport chaperones: Proteins that could couple with inter-organelle interactions to safely traffic iron. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*. 2020 Nov;1864(11):129685.
71. Philpott CC, Patel SJ, Protchenko O. Management versus miscues in the cytosolic labile iron pool: The varied functions of iron chaperones. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*. 2020 Nov;1867(11):118830.
72. Hintze KJ, Theil EC. DNA and mRNA elements with complementary responses to hemin, antioxidant inducers, and iron control ferritin-L expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Oct 18;102(42):15048-52.
73. Wang W, Knovich MA, Coffman LG, Torti FM, Torti SV. Serum ferritin: Past, present and future. *Biochim Biophys Acta*. 2010 Aug;1800(8):760-9.
74. Ferreira C, Bucchini D, Martin ME, Levi S, Arosio P, Grandchamp B, Beaumont C. Early embryonic lethality of H ferritin gene deletion in mice. *J Biol Chem*. 2000 Feb 4;275(5):3021-4.
75. Ferreira C, Santambrogio P, Martin ME, Andrieu V, Feldmann G, Hénin D, Beaumont C. H ferritin knockout mice: a model of hyperferritinemia in the absence of iron overload. *Blood*. 2001 Aug 1;98(3):525-32.
76. Vanoaica L, Darshan D, Richman L, Schümann K, Kühn LC. Intestinal ferritin H is required for an accurate control of iron absorption. *Cell Metab*. 2010 Sep 8;12(3):273-82.
77. Mancias JD, Wang X, Gygi SP, Harper JW, Kimmelman AC. Quantitative proteomics identifies NCOA4 as the cargo receptor mediating ferritinophagy. *Nature*. 2014 May 1;509(7498):105-9.

78. Dowdle WE, Nyfeler B, Nagel J, Elling RA, Liu S, Triantafellow E, et al. Selective VPS34 inhibitor blocks autophagy and uncovers a role for NCOA4 in ferritin degradation and iron homeostasis in vivo. *Nat Cell Biol.* 2014 Nov;16(11):1069-79.
79. Bellelli R, Federico G, Matte' A, Colecchia D, Iolascon A, Chiariello M, Santoro M, De Franceschi L, Carlomagno F. NCOA4 Deficiency Impairs Systemic Iron Homeostasis. *Cell Rep.* 2016 Jan 26;14(3):411-421.
80. Vaisman B, Meyron-Holtz EG, Fibach E, Krichevsky AM, Konijn AM. Ferritin expression in maturing normal human erythroid precursors. *Br J Haematol.* 2000 Aug;110(2):394-401.
81. Finch CA, Bellotti V, Stray S, Lipschitz DA, Cook JD, Pippard MJ, Huebers HA. Plasma ferritin determination as a diagnostic tool. *West J Med.* 1986 Nov;145(5):657-63.
82. Truman-Rosentsvit M, Berenbaum D, Spektor L, Cohen LA, Belizowsky-Moshe S, Lifshitz L, et al. Ferritin is secreted via 2 distinct nonclassical vesicular pathways. *Blood.* 2018 Jan 18;131(3):342-352.
83. Iwai K. Regulation of cellular iron metabolism: Iron-dependent degradation of IRP by SCF^{FBXL5} ubiquitin ligase. *Free Radic Biol Med.* 2019 Mar;133:64-68.
84. Wilkinson N, Pantopoulos K. The IRP/IRE system in vivo: insights from mouse models. *Front Pharmacol.* 2014 Jul 28;5:176.
85. Wilkinson N, Pantopoulos K. IRP1 regulates erythropoiesis and systemic iron homeostasis by controlling HIF2 α mRNA translation. *Blood.* 2013 Aug 29;122(9):1658-68.
86. Anderson SA, Nizzi CP, Chang YI, Deck KM, Schmidt PJ, Galy B, et al. The IRP1-HIF-2 α axis coordinates iron and oxygen sensing with erythropoiesis and iron absorption. *Cell Metab.* 2013 Feb 5;17(2):282-90.
87. Ghosh MC, Zhang DL, Jeong SY, Kovtunovych G, Ollivierre-Wilson H, Noguchi A, et al. Deletion of iron regulatory protein 1 causes polycythemia and pulmonary hypertension in mice through translational derepression of HIF2 α . *Cell Metab.* 2013 Feb 5;17(2):271-81.
88. Gunshin H, Mackenzie B, Berger UV, Gunshin Y, Romero MF, Boron WF, Nussberger S, Gollan JL, Hediger MA. Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature.* 1997 Jul 31;388(6641):482-8.
89. Mastrogiannaki M, Matak P, Peyssonnaud C. The gut in iron homeostasis: role of HIF-2 under normal and pathological conditions. *Blood.* 2013 Aug 8;122(6):885-92.
90. Mims MP, Guan Y, Pospisilova D, Priwitzerova M, Indrak K, Ponka P, et al. Identification of a human mutation of DMT1 in a patient with microcytic anemia and iron overload. *Blood.* 2005 Feb 1;105(3):1337-42.

91. McKie AT, Barrow D, Latunde-Dada GO, Rolfs A, Sager G, Mudaly E, et al. An iron-regulated ferric reductase associated with the absorption of dietary iron. *Science*. 2001 Mar 2;291(5509):1755-9.
92. Yanatori I, Kishi F. DMT1 and iron transport. *Free Radic Biol Med*. 2019 Mar;133:55-63.
93. Abboud S, Haile DJ. A novel mammalian iron-regulated protein involved in intracellular iron metabolism. *J Biol Chem*. 2000 Jun 30;275(26):19906-12.
94. Donovan A, Lima CA, Pinkus JL, Pinkus GS, Zon LI, Robine S, Andrews NC. The iron exporter ferroportin/Slc40a1 is essential for iron homeostasis. *Cell Metab*. 2005 Mar;1(3):191-200.
95. Zhang DL, Wu J, Shah BN, Greutelaers KC, Ghosh MC, Ollivierre H, et al. Erythrocytic ferroportin reduces intracellular iron accumulation, hemolysis, and malaria risk. *Science*. 2018 Mar 30;359(6383):1520-1523.
96. Cronin SJF, Woolf CJ, Weiss G, Penninger JM. The Role of Iron Regulation in Immunometabolism and Immune-Related Disease. *Front Mol Biosci*. 2019 Nov 22;6:116.
97. Wallace DF, Harris JM, Subramaniam VN. Functional analysis and theoretical modeling of ferroportin reveals clustering of mutations according to phenotype. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2010 Jan;298(1):C75-84.
98. Le Gac G, Ka C, Joubrel R, Gourlaouen I, Lehn P, Mornon JP, et al. Structure-function analysis of the human ferroportin iron exporter (SLC40A1): effect of hemochromatosis type 4 disease mutations and identification of critical residues. *Hum Mutat*. 2013 Oct;34(10):1371-80.
99. Bonaccorsi di Patti MC, Polticelli F, Cece G, Cutone A, Felici F, Persichini T, Musci G. A structural model of human ferroportin and of its iron binding site. *FEBS J*. 2014 Jun;281(12):2851-60.
100. Pao SS, Paulsen IT, Saier MH Jr. Major facilitator superfamily. *Microbiol Mol Biol Rev*. 1998 Mar;62(1):1-34.
101. Ganz T. Systemic iron homeostasis. *Physiol Rev*. 2013 Oct;93(4):1721-41.
102. Yan N. Structural advances for the major facilitator superfamily (MFS) transporters. *Trends Biochem Sci*. 2013 Mar;38(3):151-9.
103. Law CJ, Maloney PC, Wang DN. Ins and outs of major facilitator superfamily antiporters. *Annu Rev Microbiol*. 2008;62:289-305.
104. Pasquadibisceglie A, Bonaccorsi di Patti MC, Musci G, Polticelli F. Membrane Transporters Involved in Iron Trafficking: Physiological and Pathological Aspects. *Biomolecules*. 2023 Jul 27;13(8):1172.

105. Ward DM, Kaplan J. Ferroportin-mediated iron transport: expression and regulation. *Biochim Biophys Acta*. 2012 Sep;1823(9):1426-33.
106. E, Tuttle MS, Powelson J, Vaughn MB, Donovan A, Ward DM, Ganz T, et al. Heparin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science*. 2004 Dec 17;306(5704):2090-3.
107. Chen H, Su T, Attieh ZK, Fox TC, McKie AT, Anderson GJ, et al. Systemic regulation of Hephastin and Ireg1 revealed in studies of genetic and nutritional iron deficiency. *Blood*. 2003 Sep 1;102(5):1893-9.
108. Delaby C, Pilard N, Gonçalves AS, Beaumont C, Canonne-Hergaux F. Presence of the iron exporter ferroportin at the plasma membrane of macrophages is enhanced by iron loading and down-regulated by hepcidin. *Blood*. 2005 Dec 1;106(12):3979-84.
109. Zhang DL, Hughes RM, Ollivierre-Wilson H, Ghosh MC, Rouault TA. A ferroportin transcript that lacks an iron-responsive element enables duodenal and erythroid precursor cells to evade translational repression. *Cell Metab*. 2009 May;9(5):461-73.
110. Keel SB, Abkowitz JL. The microcytic red cell and the anemia of inflammation. *N Engl J Med*. 2009 Nov 5;361(19):1904-6.
111. Zhang DL, Senecal T, Ghosh MC, Ollivierre-Wilson H, Tu T, Rouault TA. Heparin regulates ferroportin expression and intracellular iron homeostasis of erythroblasts. *Blood*. 2011 Sep 8;118(10):2868-77.
112. Rivera S, Nemeth E, Gabayan V, Lopez MA, Farshidi D, Ganz T. Synthetic hepcidin causes rapid dose-dependent hypoferrremia and is concentrated in ferroportin-containing organs. *Blood*. 2005 Sep 15;106(6):2196-9.
113. Ganz T. Heparin and its role in regulating systemic iron metabolism. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2006:29-35, 507.
114. Park CH, Valore EV, Waring AJ, Ganz T. Heparin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *J Biol Chem*. 2001 Mar 16;276(11):7806-10.
115. Tomosugi N, Kawabata H, Wakatabe R, Higuchi M, Yamaya H, Umehara H, et al. Detection of serum hepcidin in renal failure and inflammation by using ProteinChip System. *Blood*. 2006 Aug 15;108(4):1381-7.
116. Fleming MD. The regulation of hepcidin and its effects on systemic and cellular iron metabolism. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2008:151-8.
117. Yamaji S, Sharp P, Ramesh B, Srani SK. Inhibition of iron transport across human intestinal epithelial cells by hepcidin. *Blood*. 2004 Oct 1;104(7):2178-80.

118. Lesbordes-Brion JC, Viatte L, Bennoun M, Lou DQ, Ramey G, Houbron C, Hamard G, Kahn A, Vaulont S. Targeted disruption of the hepcidin 1 gene results in severe hemochromatosis. *Blood*. 2006 Aug 15;108(4):1402-5.
119. Kemna EH, Tjalsma H, Willems HL, Swinkels DW. Hepcidin: from discovery to differential diagnosis. *Haematologica*. 2008 Jan;93(1):90-7.
120. Babitt JL, Huang FW, Wrighting DM, Xia Y, Sidis Y, Samad TA, et al. Bone morphogenetic protein signaling by hemojuvelin regulates hepcidin expression. *Nat Genet*. 2006 May;38(5):531-9.
121. Pak M, Lopez MA, Gabayan V, Ganz T, Rivera S. Suppression of hepcidin during anemia requires erythropoietic activity. *Blood*. 2006 Dec 1;108(12):3730-5.
122. Nicolas G, Chauvet C, Viatte L, Danan JL, Bigard X, Devaux I, Beaumont C, Kahn A, Vaulont S. The gene encoding the iron regulatory peptide hepcidin is regulated by anemia, hypoxia, and inflammation. *J Clin Invest*. 2002 Oct;110(7):1037-44.
123. Papanikolaou G, Tzilianos M, Christakis JI, Bogdanos D, Tsimirika K, MacFarlane J, et al. Hepcidin in iron overload disorders. *Blood*. 2005 May 15;105(10):4103-5.
124. Weinstein DA, Roy CN, Fleming MD, Loda MF, Wolfsdorf JI, Andrews NC. Inappropriate expression of hepcidin is associated with iron refractory anemia: implications for the anemia of chronic disease. *Blood*. 2002 Nov 15;100(10):3776-81.
125. Nemeth E, Ganz T. Hepcidin and iron-loading anemias. *Haematologica*. 2006 Jun;91(6):727-32. PMID: 16769573.
126. Nemeth E, Ganz T. The role of hepcidin in iron metabolism. *Acta Haematol*. 2009;122(2-3):78-86.
127. Clara Camaschella. Regulation of iron balance. In: Jennifer S Tirnauer. *UpToDate*. Wolters Kluwer. Updated Nov 26, 2024. Accessed Jan 2025. <https://www.uptodate.com/contents/regulation-of-iron-balance>
128. De Domenico I, Ward DM, di Patti MC, Jeong SY, David S, Musci G, et al. Ferroxidase activity is required for the stability of cell surface ferroportin in cells expressing GPI-ceruloplasmin. *EMBO J*. 2007 Jun 20;26(12):2823-31.
129. De Domenico I, Ward DM, Langelier C, Vaughn MB, Nemeth E, Sundquist WI, et al. The molecular mechanism of hepcidin-mediated ferroportin down-regulation. *Mol Biol Cell*. 2007 Jul;18(7):2569-78.
130. Hallberg L, Rossander-Hultén L. Iron requirements in menstruating women. *Am J Clin Nutr*. 1991 Dec;54(6):1047-58.

131. Bothwell TH. Iron requirements in pregnancy and strategies to meet them. *Am J Clin Nutr*. 2000 Jul;72(1 Suppl):257S-264S.
132. Breymann C. Iron Deficiency Anemia in Pregnancy. *Semin Hematol*. 2015 Oct;52(4):339-47.
133. Rao R, Georgieff MK. Iron in fetal and neonatal nutrition. *Semin Fetal Neonatal Med*. 2007 Feb;12(1):54-63.
134. WHO recommendations on antenatal care for a positive pregnancy experience. World Health Organization; Luxembourg, 2016.
135. Pavord S, Daru J, Prasannan N, Robinson S, Stanworth S, Girling J; BSH Committee. UK guidelines on the management of iron deficiency in pregnancy. *Br J Haematol*. 2020 Mar;188(6):819-830.
136. Anemia in Pregnancy: ACOG Practice Bulletin, Number 233. *Obstet Gynecol*. 2021 Aug 1;138(2):e55-e64.
137. Ruiz de Viñaspre-Hernández R, Gea-Caballero V, Juárez-Vela R, Iruzubieta-Barragán FJ. The definition, screening, and treatment of postpartum anemia: A systematic review of guidelines. *Birth*. 2021 Mar;48(1):14-25.
138. Auerbach M, Abernathy J, Juul S, Short V, Derman R. Prevalence of iron deficiency in first trimester, nonanemic pregnant women. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2021 Mar;34(6):1002-1005.
139. Chao HX, Zack T, Leavitt AD. Screening Characteristics of Hemoglobin and Mean Corpuscular Volume for Detection of Iron Deficiency in Pregnancy. *Obstet Gynecol*. 2025 Jan 1;145(1):91-94.
140. McCarthy EK et al, Longitudinal evaluation of iron status during pregnancy: a prospective cohort study in a high-resource setting. *American Journal of Clinical Nutrition*, 2024.
141. Achebe MM, Gafer-Gvili A. How I treat anemia in pregnancy: iron, cobalamin, and folate. *Blood*. 2017 Feb 23;129(8):940-949.
142. Lopez A, Cacoub P, Macdougall IC, Peyrin-Biroulet L. Iron deficiency anaemia. *Lancet*. 2016 Feb 27;387(10021):907-16.
143. Peyrin-Biroulet L, Williet N, Cacoub P. Guidelines on the diagnosis and treatment of iron deficiency across indications: a systematic review. *Am J Clin Nutr*. 2015 Dec;102(6):1585-94.
144. Cantor AG, Holmes R, Bougatsos C, Atchison C, DeLoughery T, Chou R. Screening and Supplementation for Iron Deficiency and Iron Deficiency Anemia During Pregnancy: Updated Evidence Report and Systematic Review for the US Preventive Services Task Force. *JAMA*. 2024 Sep 17;332(11):914-928.

- 145.Sangkhae V, Fisher AL, Ganz T, Nemeth E. Iron Homeostasis During Pregnancy: Maternal, Placental, and Fetal Regulatory Mechanisms. *Annu Rev Nutr.* 2023 Aug 21;43:279-300.
- 146.Guideline: Daily Iron and Folic Acid Supplementation in Pregnant Women. Geneva: World Health Organization; 2012. PMID: 23586119.
- 147.Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Iron deficiency--United States, 1999-2000. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2002 Oct 11;51(40):897-9.
- 148.Benson AE, Shatzel JJ, Ryan KS, Hedges MA, Martens K, Aslan JE, Lo JO. The incidence, complications, and treatment of iron deficiency in pregnancy. *Eur J Haematol.* 2022 Dec;109(6):633-642.
- 149.Young MF, Griffin I, Pressman E, McIntyre AW, Cooper E, McNanley T, et al. Maternal hepcidin is associated with placental transfer of iron derived from dietary heme and nonheme sources. *J Nutr.* 2012 Jan;142(1):33-9.
- 150.Hubbard AC, Bandyopadhyay S, Wojczyk BS, Spitalnik SL, Hod EA, Prestia KA. Effect of dietary iron on fetal growth in pregnant mice. *Comp Med.* 2013 Apr;63(2):127-35.
- 151.Gao G, Liu SY, Wang HJ, Zhang TW, Yu P, Duan XL, et al. Effects of Pregnancy and Lactation on Iron Metabolism in Rats. *Biomed Res Int.* 2015;2015:105325.
- 152.Ganz T, Nemeth E. Hepcidin and iron homeostasis. *Biochim Biophys Acta.* 2012 Sep;1823(9):1434-43.
- 153.Luo X, Hill M, Johnson A, Latunde-Dada GO. Modulation of Dcytb (Cybrd 1) expression and function by iron, dehydroascorbate and Hif-2 α in cultured cells. *Biochim Biophys Acta.* 2014 Jan;1840(1):106-12.
- 154.Vlachodimitropoulou E, Naftalin RJ, Sharp PA. Quercetin is a substrate for the transmembrane oxidoreductase Dcytb. *Free Radic Biol Med.* 2010 May 15;48(10):1366-9.
- 155.Collins JF, Franck CA, Kowdley KV, Ghishan FK. Identification of differentially expressed genes in response to dietary iron deprivation in rat duodenum. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2005 May;288(5):G964-71.
- 156.Latunde-Dada GO, Van der Westhuizen J, Vulpe CD, Anderson GJ, Simpson RJ, McKie AT. Molecular and functional roles of duodenal cytochrome B (Dcytb) in iron metabolism. *Blood Cells Mol Dis.* 2002 Nov-Dec;29(3):356-60.
- 157.Choi J, Masaratana P, Latunde-Dada GO, Arno M, Simpson RJ, McKie AT. Duodenal reductase activity and spleen iron stores are reduced and erythropoiesis is abnormal in Dcytb knockout mice exposed to hypoxic conditions. *J Nutr.* 2012 Nov;142(11):1929-34.

158. Gunshin H, Starr CN, Drenth C, Fleming MD, Jin J, Greer EL, et al. Cybrd1 (duodenal cytochrome b) is not necessary for dietary iron absorption in mice. *Blood*. 2005 Oct 15;106(8):2879-83.
159. Finch C. Regulators of iron balance in humans. *Blood*. 1994 Sep 15;84(6):1697-702.
160. ERLANDSON ME, WALDEN B, STERN G, HILGARTNER MW, WEHMAN J, SMITH CH. Studies on congenital hemolytic syndromes, IV. Gastrointestinal absorption of iron. *Blood*. 1962 Mar;19:359-78.
161. Raja KB, Simpson RJ, Pippard MJ, Peters TJ. In vivo studies on the relationship between intestinal iron (Fe³⁺) absorption, hypoxia and erythropoiesis in the mouse. *Br J Haematol*. 1988 Mar;68(3):373-8.
162. Peyssonnaud C, Zinkernagel AS, Schuepbach RA, Rankin E, Vaulont S, Haase VH, et al. Regulation of iron homeostasis by the hypoxia-inducible transcription factors (HIFs). *J Clin Invest*. 2007 Jul;117(7):1926-32.
163. Gulec S, Anderson GJ, Collins JF. Mechanistic and regulatory aspects of intestinal iron absorption. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2014 Aug 15;307(4):G397-409.
164. Nicolas G, Bennoun M, Devaux I, Beaumont C, Grandchamp B, Kahn A, et al. Lack of hepcidin gene expression and severe tissue iron overload in upstream stimulatory factor 2 (USF2) knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Jul 17;98(15):8780-5.
165. Nicolas G, Bennoun M, Porteu A, Mativet S, Beaumont C, Grandchamp B, Sirito M, Sawadogo M, Kahn A, Vaulont S. Severe iron deficiency anemia in transgenic mice expressing liver hepcidin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Apr 2;99(7):4596-601.
166. Frazer DM, Wilkins SJ, Becker EM, Vulpe CD, McKie AT, Trinder D, Anderson GJ. Hepcidin expression inversely correlates with the expression of duodenal iron transporters and iron absorption in rats. *Gastroenterology*. 2002 Sep;123(3):835-44.
167. Millard KN, Frazer DM, Wilkins SJ, Anderson GJ. Changes in the expression of intestinal iron transport and hepatic regulatory molecules explain the enhanced iron absorption associated with pregnancy in the rat. *Gut*. 2004 May;53(5):655-60.
168. Camaschella C, Pagani A, Nai A, Silvestri L. The mutual control of iron and erythropoiesis. *Int J Lab Hematol*. 2016 May;38 Suppl 1:20-6.
169. Pagani A, Nai A, Silvestri L, Camaschella C. Hepcidin and Anemia: A Tight Relationship. *Front Physiol*. 2019 Oct 9;10:1294.
170. Taylor P, Martínez-Torres C, Leets I, Ramírez J, García-Casal MN, Layrisse M. Relationships among iron absorption, percent saturation of plasma transferrin and serum ferritin concentration in humans. *J Nutr*. 1988 Sep;118(9):1110-5.

- 171.Means RT. Iron Deficiency and Iron Deficiency Anemia: Implications and Impact in Pregnancy, Fetal Development, and Early Childhood Parameters. *Nutrients*. 2020 Feb 11;12(2):447.
- 172.Rehu M, Punnonen K, Ostland V, Heinonen S, Westerman M, Pulkki K, Sankilampi U. Maternal serum hepcidin is low at term and independent of cord blood iron status. *Eur J Haematol*. 2010 Oct;85(4):345-52.
- 173.van Santen S, Kroot JJ, Zijderveld G, Wiegerinck ET, Spaanderman ME, Swinkels DW. The iron regulatory hormone hepcidin is decreased in pregnancy: a prospective longitudinal study. *Clin Chem Lab Med*. 2013 Jul;51(7):1395-401.
- 174.Bah A, Pasricha SR, Jallow MW, Sise EA, Wegmuller R, Armitage AE, et al. Serum Hepcidin Concentrations Decline during Pregnancy and May Identify Iron Deficiency: Analysis of a Longitudinal Pregnancy Cohort in The Gambia. *J Nutr*. 2017 Jun;147(6):1131-1137.
- 175.MD, Tussing-Humphreys L, Day J, Cadwell B, Nemeth E. Hepcidin and iron homeostasis during pregnancy. *Nutrients*. 2014 Aug 4;6(8):3062-83.
- 176.Schulze KJ, Christian P, Ruczinski I, Ray AL, Nath A, Wu LS, Semba RD. Hepcidin and iron status among pregnant women in Bangladesh. *Asia Pac J Clin Nutr*. 2008;17(3):451-6.
- 177.Moretti D, Goede JS, Zeder C, Jiskra M, Chatzinakou V, Tjalsma H, et al. Oral iron supplements increase hepcidin and decrease iron absorption from daily or twice-daily doses in iron-depleted young women. *Blood*. 2015 Oct 22;126(17):1981-9.
- 178.Nemeth E, Rivera S, Gabayan V, Keller C, Taudorf S, Pedersen BK, et al. IL-6 mediates hypoferremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin. *J Clin Invest*. 2004 May;113(9):1271-6.
- 179.Peña-Rosas JP, De-Regil LM, Gomez Malave H, Flores-Urrutia MC, Dowswell T. Intermittent oral iron supplementation during pregnancy. *Cochrane Database Syst Rev*. 2015 Oct 19;2015(10):CD009997.
- 180.Dao MC, Sen S, Iyer C, Klebenov D, Meydani SN. Obesity during pregnancy and fetal iron status: is Hepcidin the link? *J Perinatol*. 2013 Mar;33(3):177-81.
- 181.Toldi G, Stenczer B, Molvarec A, Takáts Z, Beko G, Rigó J Jr, Vászárhelyi B. Hepcidin concentrations and iron homeostasis in preeclampsia. *Clin Chem Lab Med*. 2010 Oct;48(10):1423-6.
- 182.Fisher AL, Nemeth E. Iron homeostasis during pregnancy. *Am J Clin Nutr*. 2017 Dec;106(Suppl 6):1567S-1574S.

- 183.Srai SK, Bomford A, McArdle HJ. Iron transport across cell membranes: molecular understanding of duodenal and placental iron uptake. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2002 Jun;15(2):243-59.
- 184.Gambling L, Czopek A, Andersen HS, Holtrop G, Srai SK, Krejpcio Z, McArdle HJ. Fetal iron status regulates maternal iron metabolism during pregnancy in the rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2009 Apr;296(4):R1063-70.
- 185.Trenor CC 3rd, Campagna DR, Sellers VM, Andrews NC, Fleming MD. The molecular defect in hypotransferrinemic mice. *Blood*. 2000 Aug 1;96(3):1113-8.
- 186.Gruper Y, Bar J, Bacharach E, Ehrlich R. Transferrin receptor co-localizes and interacts with the hemochromatosis factor (HFE) and the divalent metal transporter-1 (DMT1) in trophoblast cells. *J Cell Physiol*. 2005 Sep;204(3):901-12.
- 187.Donovan A, Brownlie A, Zhou Y, Shepard J, Pratt SJ, Moynihan J, et al. Positional cloning of zebrafish ferroportin1 identifies a conserved vertebrate iron exporter. *Nature*. 2000 Feb 17;403(6771):776-81.
- 188.Chen H, Attieh ZK, Syed BA, Kuo YM, Stevens V, Fuqua BK, et al. Identification of zyklopen, a new member of the vertebrate multicopper ferroxidase family, and characterization in rodents and human cells. *J Nutr*. 2010 Oct;140(10):1728-35.
- 189.Duck KA, Connor JR. Iron uptake and transport across physiological barriers. *Biometals*. 2016 Aug;29(4):573-91.
- 190.Gambling L, Danzeisen R, Fosset C, Andersen HS, Dunford S, Srai SK, McArdle HJ. Iron and copper interactions in development and the effect on pregnancy outcome. *J Nutr*. 2003 May;133(5 Suppl 1):1554S-6S.
- 191.Martin ME, Nicolas G, Hetet G, Vaulont S, Grandchamp B, Beaumont C. Transferrin receptor 1 mRNA is downregulated in placenta of hepcidin transgenic embryos. *FEBS Lett*. 2004 Sep 10;574(1-3):187-91.
- 192.Levy A, Fraser D, Katz M, Mazor M, Sheiner E. Maternal anemia during pregnancy is an independent risk factor for low birthweight and preterm delivery. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2005 Oct 1;122(2):182-6.
- 193.Adebisi OY, Strayhorn G. Anemia in pregnancy and race in the United States: blacks at risk. *Fam Med*. 2005 Oct;37(9):655-62.
- 194.Stangret A, Skoda M, Wnuk A, Pyzlak M, Szukiewicz D. Mild anemia during pregnancy upregulates placental vascularity development. *Med Hypotheses*. 2017 May;102:37-40
- 195.Crispin PJ, Sethna F, Andriolo K. Red Cell and Reticulocyte Parameters for the Detection of Iron Deficiency in Pregnancy. *Clin Lab*. 2019 Nov 1;65(11).

196. Milman N, Graudal N, Nielsen OJ, Agger AO. Serum erythropoietin during normal pregnancy: relationship to hemoglobin and iron status markers and impact of iron supplementation in a longitudinal, placebo-controlled study on 118 women. *Int J Hematol.* 1997 Aug;66(2):159-68.
197. Milman N, Byg KE, Agger AO. Hemoglobin and erythrocyte indices during normal pregnancy and postpartum in 206 women with and without iron supplementation. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2000 Feb;79(2):89-98.
198. de Haas S, Ghossein-Doha C, van Kuijk SM, van Drongelen J, Spaanderman ME. Physiological adaptation of maternal plasma volume during pregnancy: a systematic review and meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2017 Feb;49(2):177-187.
199. Choi JW, Pai SH. Change in erythropoiesis with gestational age during pregnancy. *Ann Hematol.* 2001 Jan;80(1):26-31.
200. Allen J, Backstrom KR, Cooper JA, Cooper MC, Detwiler TC, Essex DW, et al. Measurement of soluble transferrin receptor in serum of healthy adults. *Clin Chem.* 1998 Jan;44(1):35-9.
201. Brugnara C. Iron deficiency and erythropoiesis: new diagnostic approaches. *Clin Chem.* 2003 Oct;49(10):1573-8.
202. Crispin P, Stephens B, McArthur E, Sethna F. First trimester ferritin screening for pre-delivery anaemia as a patient blood management strategy. *Transfus Apher Sci.* 2019 Feb;58(1):50-57.
203. Daru J, Allotey J, Peña-Rosas JP, Khan KS. Serum ferritin thresholds for the diagnosis of iron deficiency in pregnancy: a systematic review. *Transfus Med.* 2017 Jun;27(3):167-174.
204. Daru J, Colman K, Stanworth SJ, De La Salle B, Wood EM, Pasricha SR. Serum ferritin as an indicator of iron status: what do we need to know? *Am J Clin Nutr.* 2017 Dec;106(Suppl 6):1634S-1639S.
205. Milman N, Taylor CL, Merkel J, Brannon PM. Iron status in pregnant women and women of reproductive age in Europe. *Am J Clin Nutr.* 2017 Dec;106(Suppl 6):1655S-1662S.
206. Milman N, Pedersen NS, Visfeldt J. Serum ferritin in healthy Danes: relation to marrow haemosiderin iron stores. *Dan Med Bull.* 1983 Mar;30(2):115-20. PMID: 6851680.
207. Suchdev PS, Williams AM, Mei Z, Flores-Ayala R, Pasricha SR, Rogers LM, Namaste SM. Assessment of iron status in settings of inflammation: challenges and potential approaches. *Am J Clin Nutr.* 2017 Dec;106(Suppl 6):1626S-1633S.
208. Sharma JB, Bumma SD, Saxena R, Kumar S, Roy KK, Singh N, Vanamail P. Cross sectional, comparative study of serum erythropoietin, transferrin receptor, ferritin levels and other hematological indices in normal pregnancies and iron deficiency anemia during pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2016 Aug;203:99-103

209. Ganz T, Nemeth E. Iron sequestration and anemia of inflammation. *Semin Hematol*. 2009 Oct;46(4):387-93.
210. Guida C, Altamura S, Klein FA, Galy B, Boutros M, Ulmer AJ, et al. A novel inflammatory pathway mediating rapid hepcidin-independent hypoferremia. *Blood*. 2015 Apr 2;125(14):2265-75.
211. Byg KE, Milman N, Ole Agger A. Erythropoiesis: Correlations Between Iron Status Markers During Normal Pregnancy in Women with and without Iron Supplementation. *Hematology*. 2000;4(6):529-539.
212. Akinsooto V, Ojwang PJ, Govender T, Moodley J, Connolly CA. Soluble transferrin receptors in anaemia of pregnancy. *J Obstet Gynaecol*. 2001 May;21(3):250-2.
213. Yang Z, Dewey KG, Lönnerdal B, Hernell O, Chaparro C, Adu-Afarwuah S, et al. Comparison of plasma ferritin concentration with the ratio of plasma transferrin receptor to ferritin in estimating body iron stores: results of 4 intervention trials. *Am J Clin Nutr*. 2008 Jun;87(6):1892-8.
214. Zaman B, Rasool S, Jasim S, Abdulah D. Hepcidin as a diagnostic biomarker of iron deficiency anemia during pregnancy. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2021 Apr;34(8):1288-1296.
215. Abioye AI, Aboud S, Premji Z, Etheredge AJ, Gunaratna NS, Sudfeld CR, et al. Hemoglobin and hepcidin have good validity and utility for diagnosing iron deficiency anemia among pregnant women. *Eur J Clin Nutr*. 2020 May;74(5):708-719.
216. Bah A, Muhammad AK, Wegmuller R, Verhoef H, Goheen MM, Sanyang S, et al. Hepcidin-guided screen-and-treat interventions against iron-deficiency anaemia in pregnancy: a randomised controlled trial in The Gambia. *Lancet Glob Health*. 2019 Nov;7(11):e1564-e1574.
217. Griebel CP, Halvorsen J, Golemon TB, Day AA. Management of spontaneous abortion. 2005; vol. 72,7: 1243-50.
218. Christian B Billesbølle, Caleigh M Azumaya, Rachael C Kretsch, Alexander S Powers, Shane Gonen, Simon Schneideret, et al. Structure of hepcidin-bound ferroportin reveals iron homeostatic mechanisms. *Nature*. 2020;586(7831):807-11.
219. American College of Obstetricians and Gynecologists' Committee on Practice Bulletins—Obstetrics. Anemia in Pregnancy: ACOG Practice Bulletin, Number 233. *Obstet Gynecol*. 2021 Aug 1;138(2):e55-e64.
220. Pritchard Ja. Changes in the blood volume during pregnancy and delivery. *Anesthesiology*. 1965 Jul-Aug;26:393-9.
221. Ginzburg YZ. Hepcidin-ferroportin axis in health and disease. *Vitam Horm*. 2019;110:17-45.

- 222.Nemeth E, Ganz T. Hepcidin-Ferroportin Interaction Controls Systemic Iron Homeostasis. *Int J Mol Sci.* 2021;22(12):6493.
- 223.Bastin J, Drakesmith H, Rees M, Sargent I, Townsend A. Localisation of proteins of iron metabolism in the human placenta and liver. *Br J Haematol.* 2006;134(5):532-43.
- 224.Donovan A, Lima CA, Pinkus JL, Pinkus GS, Zon LI, Robine S, Andrews NC. The iron exporter ferroportin/Slc40a1 is essential for iron homeostasis. *Cell Metab.* 2005;1(3):191-200.
- 225.Beguín Y. Soluble transferrin receptor for the evaluation of erythropoiesis and iron status. *Clin Chim Acta.* 2003 Mar;329(1-2):9-22.
- 226.R'zik S, Loo M, Beguin Y. Reticulocyte transferrin receptor (TfR) expression and contribution to soluble TfR levels. *Haematologica.* 2001 Mar;86(3):244-51.
- 227.Sangkhae V, Fisher AL, Chua KJ, Ruchala P, Ganz T, Nemeth E. Maternal hepcidin determines embryo iron homeostasis in mice. *Blood.* 2020;136(19):2206-16.
- 228.Amat Bah, Sant-Rayn Pasricha, Momodou W Jallow, Ebrima A Sise, Rita Wegmuller, Andrew E Armitage, et al. Serum Hepcidin Concentrations Decline during Pregnancy and May Identify Iron Deficiency: Analysis of a Longitudinal Pregnancy Cohort in The Gambia. *J Nutr.* 2017;147(6):1131-7.
- 229.Guo Y, Zhang N, Zhang D, Ren Q, Ganz T, Liu S, et al. Iron homeostasis in pregnancy and spontaneous abortion. *Am J Hematol.* 2019;94(2):184-8.
- 230.Wei S, Liu W, Qi Y, Guo Y, Zhang S, Wang L, et al. Disordered serum erythroferrone and hepcidin levels as indicators of the spontaneous abortion occurrence during early pregnancy in humans. *Br J Haematol.* 2021;192(3):643-51.
- 231.Sangkhae V, Fisher AL, Wong S, Koenig MD, Tussing-Humphreys L, Chu A, et al. Effects of maternal iron status on placental and fetal iron homeostasis. *J Clin Invest.* 2020;130(2):625-40.
- 232.Gaë'l Nicolas, Myriam Bennoun, Arlette Porteu, Sandrine Mativet, Carole Beaumont, Bernard Grandchamp, et al. Severe iron deficiency anemia in transgenic mice expressing liver hepcidin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(7):4596-601.
- 233.Reveiz L, Gyte GM, Cuervo LG. Treatments for iron-deficiency anaemia in pregnancy. *Cochrane Database Syst Rev.* 2007 Apr 18;(2):CD003094.
- 234.Savajols E, Burguet A, Grimaldi M, Godoy F, Sagot P, Semama DS. Maternal haemoglobin and short-term neonatal outcome in preterm neonates. *PLoS One.* 2014 Feb 25;9(2):e89530.
- 235.Majoni SW, Nelson J, Graham J, Abeyaratne A, Fernandes DK, Cherian S, et al. Comparison of two ferritin assay platforms to assess their level of agreement in measuring serum and plasma ferritin levels in patients with chronic kidney disease. *BMC Nephrol.* 2023 Jun 30;24(1):198.

236. Garcia-Casal MN, Pasricha SR, Martinez RX, Lopez-Perez L, Peña-Rosas JP. Serum or plasma ferritin concentration as an index of iron deficiency and overload. *Cochrane Database Syst Rev*. 2021 May 24;5(5):CD011817.
237. McCarthy EK, Schneck D, Basu S, Xenopoulos-Oddsson A, McCarthy FP, Kiely ME, et al. Longitudinal evaluation of iron status during pregnancy: a prospective cohort study in a high-resource setting. *Am J Clin Nutr*. 2024 Nov;120(5):1259-1268.
238. Teichman J, Nisenbaum R, Lausman A, Sholzberg M. Suboptimal iron deficiency screening in pregnancy and the impact of socioeconomic status in a high-resource setting. *Blood Adv*. 2021 Nov 23;5(22):4666-4673.
239. Georgieff MK. Iron deficiency in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*. 2020 Oct;223(4):516-524.
240. Nair M, Choudhury SS, Rani A, Solomi C 5th, Kakoty SD, Medhi R, et al. MaatHRI collaboration. The complex relationship between iron status and anemia in pregnant and postpartum women in India: Analysis of two Indian study cohorts of uncomplicated pregnancies. *Am J Hematol*. 2023 Nov;98(11):1721-1731
241. Sangkhue V, Nemeth E. Regulation of the Iron Homeostatic Hormone Heparin. *Adv Nutr*. 2017 Jan 17;8(1):126-136.
242. Tan TC, Crawford DH, Franklin ME, Jaskowski LA, Macdonald GA, Jonsson JR, et al. The serum hepcidin:ferritin ratio is a potential biomarker for cirrhosis. *Liver Int*. 2012 Oct;32(9):1391-9.
243. Heeney MM, Guo D, De Falco L, Campagna DR, Olbina G, Kao PP, et al. Normalizing hepcidin predicts *TMPRSS6* mutation status in patients with chronic iron deficiency. *Blood*. 2018 Jul 26;132(4):448-452.
244. Galesloot TE, Holewijn S, Kiemeny LA, de Graaf J, Vermeulen SH, Swinkels DW. Serum hepcidin is associated with presence of plaque in postmenopausal women of a general population. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2014 Feb;34(2):446-56.
245. Raman N, Kv P, Ashta KK, Vardhan V, Thareja S, J M, et al. Ferritin and Hemoglobin as Predictors of Fatal Outcome in COVID-19: Two Sides of the Same Coin. *J Assoc Physicians India*. 2021 Aug;69(8):11-12. PMID: 34472812.
246. Auerbach M. Optimizing diagnosis and treatment of iron deficiency and iron deficiency anemia in women and girls of reproductive age: Clinical opinion. *Int J Gynaecol Obstet*. 2023 Aug;162 Suppl 2:68-77.
247. Ćuk A, Rumora L, Mikulić I, Penava N, Cvetković I, Pušić A, et al. Serum concentration of ferroportin in women of reproductive age. *Biochem Med (Zagreb)*. 2024 Oct 15;34(3):030701.

248. Aziz Z, Sarhat E, Zaidan Z. ESTIMATION OF SERUM FERROPORTIN AND LIVER ENZYMES IN BREAST CANCER PATIENTS. Georgian Med News. 2023 Jun;(339):37-41.
249. Keleş Altun İ, Atagün Mİ, Erdoğan A, Oymak Yenilmez D, Yusifova A, Şenat A, et al. Serum hepcidin / ferroportin levels in bipolar disorder and schizophrenia. J Trace Elem Med Biol. 2021 Dec;68:126843.
250. Zaugg J, Solenthaler F, Albrecht C. Materno-fetal iron transfer and the emerging role of ferroptosis pathways. Biochem Pharmacol. 2022 Aug;202:115141
251. Wang H, Peng J, Wang B, Lu X, Zheng JZ, Wang K, et al. Inconsistency Between Univariate and Multiple Logistic Regressions. Shanghai Arch Psychiatry. 2017 Apr 25;29(2):124-128
252. Sangkhae V, Nemeth E. Iron and Pregnancy. Adv Exp Med Biol. 2025;1480:327-343.

8. POPIS KRATICA

ACOG	Američki koledž opstetričara i ginekologa (engl. <i>American College of Obstetricians and Gynecologists</i>)
ApoTf	apo-transferin
ARE	element koji reagira na antioksidanse (engl. <i>antioxidant response element</i>)
AUC	površina ispod krivulje (engl. <i>area under the curve</i>)
BMI	indeks tjelesne mase (engl. <i>body mass indeks</i>)
BMP	koštani morfogogenetski protein (engl. <i>bone morphogenetic protein</i>)
CI	interval pouzdanosti (engl. <i>confidence interval</i>)
CLSI	Institut za standarde u kliničkom laboratoriju (engl. <i>Clinical Laboratory Standards Institute</i>)
CRP	C-reaktivni protein
CV	koeficijent varijacije (engl. <i>coefficient of variation</i>)
DMT1	dvovalentni metalni prijenosnik 1 (engl. <i>divalent metal transporter</i>)
DyctB	duodenalni citokrom B (engl. <i>duodenal cytochrome B</i>)
EDTA	etilendiamintetraoctena kiselina (engl. <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
ELISA	enzimski povezan imunosorpcijski test (engl. <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
ESHRE	Europsko društvo za humanu reprodukciju i embriologiju (engl. <i>European Society of Human Reproduction and Embryology</i>)
FDA	Američka agencija za hranu i lijekove (engl. <i>United States Food and Drug Administration</i>)
Fe	željezo
Fpn	feroportin (engl. <i>ferroportin</i>)
GT	gestacijski tjedan
Hb	hemoglobin
Hct	hematokrit
HO	hem oksigenaza
IL-6	interleukin 6
IQR	interkvartilni raspon (engl. <i>interquartile range</i>)
IRP	regulacijski protein željeza (engl. <i>iron regulatory protein</i>)
KKS	kompletna krvna slika

MCHC	prosječna koncentracija hemoglobina u eritrocitima (engl. <i>mean corpuscular hemoglobin concentration</i>)
MCV	prosječni volumen eritrocita (engl. <i>mean corpuscular volume</i>)
NCOA4	suaktivator nuklearnog receptora 4 (engl. <i>nuclear receptor coactivator 4</i>)
OR	omjer izgleda (engl. <i>odds ratio</i>)
PCBP	poly(rC) vezni protein (engl. <i>poly(rC)-binding protein</i>)
RBC	eritrociti (engl. <i>red blood cell</i>)
RES	retikuloendotelni sustav
ROS	reaktivni kisikovi spojevi (engl. <i>reactive oxygen species</i>)
SD	standardna devijacija (engl. <i>standard deviation</i>)
SKB	Sveučilišna klinička bolnica
STEAP3	feri reduktaza STEAP3 (engl. <i>six transmembrane prostate protein 3</i>)
sTfR indeks	sTfR/log feritin
sTfR	topljivi transferinski receptori (engl. <i>soluble transferrin receptor</i>)
Tf	transferin
TfR	transferinski receptor (engl. <i>transferrin receptor</i>)
TIBC	ukupni kapacitet vezanja željeza (engl. <i>total iron-binding capacity</i>)
TNF- α	faktor nekroze tumora α (engl. <i>tumor necrosis factor-alpha</i>)
TSAT	saturacija transferina
UIBC	nezasićeni kapacitet vezanja željeza (engl. <i>unsaturated iron-binding capacity</i>)
WHO	Svjetska zdravstvena organizacija (engl. <i>World Health Organization</i>)
β -hCG	β -humani korionski gonadotropin

9. ŽIVOTOPIS I POPIS OBJAVLJENIH RADOVA

Ana Ćuk, rođena je 02. veljače 1990. godine u Mostaru. Osnovnu školu August Šenoa pohađala je u Širokom Brijegu kao i Opću gimnaziju fra. Didak Buntić. 2013. godine diplomirala je Forenzične znanosti na Sveučilištu u Splitu, smjer forenzična kemija i molekularna biologija. Od 2014. godine do danas radi u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku Sveučilišne kliničke bolnice Mostar te od 2018. godine kao asistent sudjeluje u izvođenju nastave na studiju Farmacije, Laboratorijske biomedicine i Kozmetologije Farmaceutskog fakulteta Sveučilišta u Mostaru. Aktivno je sudjelovala na više domaćih i međunarodnih znanstvenih skupova. Autor je i koautor 6 znanstvenih članaka objavljenih u časopisima indeksiranim u Current Contents i Web of Science Core Collection te koautor Priručnika za vježbe iz medicinske kemije i biokemije za studente medicine

1. Ćuk A, Rumora L, Mikulić I, Penava N, Cvetković I, Pušić A, Mikulić V, Ljubić K, Tomić V. Serum concentration of ferroportin in women of reproductive age. *Biochem Med (Zagreb)*. 2024 Oct 15;34(3):030701. doi: 10.11613/BM.2024.030701. Epub 2024 Aug 5.
2. Ćuk A, Rumora L, Mikulic I, Penava N, Cvetkovic I, Mikulic V, Ljubic K, Pusic A, Prce A, Tiric D, Tomic V. Ferroportin and soluble transferrin receptor in women with first-trimester missed abortion. *Biomol Biomed*. 2026 Jun 12. doi: 10.17305/bb.2026.14261.
3. Prce A, Dunđerović Ž, Mikulić I, Mikulić V, Ljubić K, Ćuk A, Bogut A, Petrović J, Volarić M, Čolak T, Raguž F. A case report of biclonal immunoglobulin D lambda/lambda multiple myeloma in patient with liver echinococcosis. *Biochem Med (Zagreb)*. 2024 Jun 15;34(2):020801. doi: 10.11613/BM.2024.020801. Epub 2024 Apr 15.
4. Bošković A, Ćuk A, Mandrapa V, Dugandžić Šimić A, Cvetković I, Orlović Vlaho M, Krešić T, Tomić T, Tomić V. Association of MTHFR polymorphism, folic acid and vitamin B12 with serum homocysteine levels in pregnant women. *Biomol Biomed*. 2024 Jan 3;24(1):138-143. doi: 10.17305/bb.2023.9260.
5. Mikulić V, Rogić D, Mikulić I, Ljubić K, Ćuk A, Tomić V, Radić Mišković H. Urine neutrophil gelatinase-associated lipocalin concentration in healthy newborns during the first three postnatal days. *Biochem Med (Zagreb)*. 2020 Oct 15;30(3):030706. doi: 10.11613/BM.2020.030706.
6. Penava N, Ćuk A, Tirić D, Vasilj O, Tomić V, Stefanovic V. Low-dose prednisone and pregnancy prolongation in threatened preterm birth a randomized pilot study. *J Perinat Med*. 2025 Jul 28;53(8):1038-1047. doi: 10.1515/jpm-2025-0116.

10. PRILOZI

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Doktorski rad

FEROPORTIN I TOPLJIVI TRANSFERINSKI RECEPTORI U ŽENA S RANIM ZADRŽANIM SPONATNIM POBAČAJEM

ANA ČUK

Novija istraživanja također ukazuju na moguću povezanost između poremećaja regulatora homeostaze željeza, osobito hepcidina, i ranog spontanog pobačaja. Iako se u današnje vrijeme laboratorijska dijagnostika statusa željeza oslanja na mjerenje koncentracije željeza, Hb-a i feritina, to nije dovoljno za dobivanje uvida u stvarni status željeza majke, o kojem, posebno u ranoj trudnoći, ali i kasnije, ovisi organogeneza embrija i rast fetusa. Stoga je važno pronaći nove biokemijske biljege za rano prepoznavanje nepovoljnog ishoda trudnoće u prvom tromjesečju.

U ovom istraživanju izmjerene su koncentracije feroportina (Fpn) i topljivih transferinskih receptora (sTfR) te su uspoređene sa rutinskim parametrima statusa željeza koji su trenutno u upotrebi (Fe, UIBC, TIBC, Hb, feritin, transferin, TSAT, sTfR indeks) i omjerima izvedenim iz navedenih parametara. Radi što boljeg razumijevanja homeostaze željeza koncentracije i vrijednosti parametara su uspoređene između ispitanice skupine žena sa zadržanim spontanom pobačajem (N = 52) i žena s urednom trudnoćom (N = 52) u prvom tromjesečju. Parametri statusa željeza uspoređeni su između ispitanice i kontrolne skupine prema gestacijskom tjednu i subkliničkom nedostatku željeza, odnosno koncentraciji feritina. U svrhu ovog istraživanja koristila se isključivo preostala količina seruma nakon provedenih rutinskih laboratorijskih pretraga te je uzorkovanje bilo u jutarnjim satima.

Rezultati ovog istraživanja pokazali su da su sTfR-a i sTfR indeks imaju značajno više koncentracije/vrijednosti u ispitanica sa zadržanim spontanom pobačajem u odnosu na urednu trudnoću. S druge strane Fpn čija koncentracija je po prvi put mjerena u urednoj trudnoći i u zadržanom spontanom pobačaju pokazuje da su statistički značajno niže koncentracije Fpn-a ($p < 0,001$) u ispitanica sa zadržanim spontanom pobačajem u odnosu na žene s urednom trudnoćom što upućuje na moguću ulogu poremećene homeostaze željeza u etiologiji spontanog pobačaja. Također, analizom omjera Fpn/sTfR dobiveni rezultati ukazuju na značajno niže vrijednosti omjera Fpn/sTfR u ispitanica sa zadržanim spontanom pobačajem u odnosu na ispitanice s urednom trudnoćom. Također, najvišu diskriminacijsku sposobnost pokazao je omjer Fpn/sTfR (AUC = 0,797), s dobrom kombinacijom osjetljivosti (82,1 %) i specifičnosti (71,4 %), čime se ističe kao najbolji pojedinačni dijagnostički parametar. Ovo istraživanje pridonosi novim saznanjima o metabolizmu željeza u trudnoći, a daljnjim istraživanjima mogli bi dobiti odgovore na mnoga pitanja, ali i alate u dijagnosticiranju spontanog pobačaja i/ili identificiranju žena s rizikom od spontanog pobačaja u ranoj fazi trudnoće.

Rad je pohranjen u Centralnoj knjižnici Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Rad sadrži: 122 stranice, 15 slika, 13 tablica i 252 literaturna navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: zadržani spontani pobačaj, feroportin, topljivi transferinski receptori, homeostaza željeza

Mentori: izv. prof. dr. sc. Ivanka Mikulić
prof. dr. sc. Lada Rumora

Povjerenstvo:

Rad je prihvaćen:

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Doctoral thesis

FERROPORTIN AND SOLUBLE TRANSFERRIN RECEPTORS IN WOMEN WITH EARLY MISSED ABORTION

ANA ĆUK

Recent studies also indicate a potential link between disorders of iron homeostasis regulators, particularly hepcidin, and early spontaneous miscarriage. Although current laboratory diagnostics of iron status rely on measuring iron concentration, Hb, and ferritin, this is insufficient for gaining insight into the mother's actual iron status, upon which embryo organogenesis and fetal growth depend, especially in early pregnancy and later on. Therefore, it is important to find new biochemical markers for the early identification of adverse pregnancy outcomes in the first trimester.

In this study, concentrations of ferroportin (Fpn) and soluble transferrin receptors (sTfR) were measured and compared with routine iron status parameters currently in use (Fe, UIBC, TIBC, Hb, ferritin, transferrin, TSAT, sTfR index) and ratios derived from these parameters. To better understand iron homeostasis, parameter concentrations and values were compared between the study group of women with missed abortion (N = 52) and women with normal pregnancies (N = 52) in the first trimester. Iron status parameters were compared between the study and control groups according to gestational week and subclinical iron deficiency, i.e., ferritin concentration. For the purpose of this study, only the residual amount of serum after routine laboratory tests was used, and sampling was performed in the morning.

The results of this study showed that sTfR and the sTfR index have significantly higher concentrations/values in participants with missed abortion compared to normal pregnancy. On the other hand, Fpn, whose concentration was measured for the first time in both normal pregnancy and missed abortion, showed statistically significantly lower concentrations ($p < 0.001$) in participants with missed abortion compared to women with normal pregnancies, suggesting a possible role of disrupted iron homeostasis in the etiology of miscarriage.

Additionally, the analysis of the Fpn/sTfR ratio indicated significantly lower values in participants with missed abortion compared to those with normal pregnancies. Furthermore, the Fpn/sTfR ratio demonstrated the highest discriminatory power (AUC = 0.797), with a good combination of sensitivity (82.1%) and specificity (71.4%), highlighting it as the best single diagnostic parameter. This study contributes new knowledge about iron metabolism in pregnancy, and further research could provide answers to many questions, as well as tools for diagnosing miscarriages and/or identifying women at risk of miscarriage in early pregnancy.

Thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 122 pages, 15 figures, 13 tables and 252 references. Original is in Croatian language.

Keywords: missed abortion, ferroportin, soluble transferrin receptors, iron homeostasis

Supervisors: Associate Professor Ivanka Mikulić, Ph.D.
Professor Lada Rumora, Ph.D.

Reviewers:

Accepted:

Serum concentration of ferroportin in women of reproductive age

Ana Ćuk^{*1,2}, Lada Rumora³, Ivanka Mikulić^{1,2}, Nikolina Penava⁴, Ivona Cvetković^{1,2}, Ante Pušić^{1,2}, Vinka Mikulić^{1,2}, Kristina Ljubić^{1,2}, Vajdana Tomić⁴

¹Department of Laboratory Diagnostics, Clinical Hospital Centre Mostar, Mostar, Bosnia and Herzegovina

²School of Medicine, University of Mostar, Mostar, Bosnia and Herzegovina

³Department of Medical Biochemistry and Hematology, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb, Zagreb, Croatia

⁴Department of Obstetrics and Gynecology, Clinical Hospital Centre Mostar, Mostar, Bosnia and Herzegovina

*Corresponding author: anna.cuk90@gmail.com

Highlights

- Serum concentration of ferroportin in 100 women of reproductive age
- Serum ferroportin concentration in relation to ferritin concentration and recommended reference interval for ferroportin for women of reproductive age
- Ferroportin might become a potentially useful parameter in clinical states associated with disturbed iron homeostasis

Abstract

Introduction: Ferroportin (Fpn) is the only known iron exporter and plays an essential role in iron homeostasis. Serum concentrations of Fpn in health and/or diseased states are still mostly unknown. Therefore, the aim of this study was to determine the concentration of Fpn in the serum of women of reproductive age (WRA) for the first time, and to establish whether there is a difference in the concentration of Fpn according to ferritin status.

Materials and methods: This research included 100 WRA (18–45 years, C-reactive protein (CRP) < 5 mg/L, hemoglobin > 120 g/L). Serum Fpn was measured using Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) method on the analyzer EZ Read 800 Plus (Biochrom, Cambridge, UK). Reference interval was calculated using the robust method.

Results: The median concentration of Fpn in the whole study group was 9.74 (5.84–15.69) µg/L. The subgroup with ferritin concentration > 15 µg/L had a median Fpn concentration 15.21 (10.34–21.93) µg/L, which significantly differed from Fpn concentration in the subgroup with ferritin concentration ≤ 15 µg/L (5.93 (4.84–8.36) µg/L, $P < 0.001$). The reference limits for the Fpn were 2.26–29.81 µg/L with 90% confidence intervals (CI) of 1.78 to 2.83 and 25.37 to 34.33, respectively.

Conclusions: The proposed reference interval could help in the future research on iron homeostasis both in physiological conditions and in various disorders, because this is the first study that measured Fpn concentration in a certain gender and age group of a healthy population.

Keywords: ferroportin; ferritin; iron; reference interval

Submitted: October 17, 2023

Accepted: May 6, 2024

Introduction

Ferroportin (Fpn) participates in iron absorption from food, iron recycling and transport of stored iron. Ferroportin is expressed on enterocytes, hepatocytes and macrophages and it is the only

known cellular iron exporter (1–4). In the structure of Fpn, there is a cytoplasmic loop that connects two bundles of transmembrane helices (N-loop and C-loop), and two bundles enclose a cavity

through which iron exits. Ferroportin exports cellular iron by the mechanism of switching between an inward-open conformation that binds intracellular iron and an outward-open conformation that releases iron into the extracellular space (5). In addition, it functions as a hepcidin receptor, whose best-known physiological activity is binding to Fpn (6). Low hepcidin concentrations are associated with high concentrations of Fpn in iron-transporting tissues and rapid export of iron to the extracellular fluid and plasma. Otherwise, high concentrations of hepcidin in the circulation cause the removal of Fpn from the cell membranes, which inhibits the export of iron into the plasma (7). Iron is one of the most important essential elements for the human body, and most of it is consumed to produce erythrocytes. Iron deficiency, with or without anemia, can be absolute and functional and it affects many organ functions in the human body (8-11). Also, iron deficiency precedes anemia, and anemia in women of reproductive age (WRA) is a global public health problem and it is associated with regular blood loss (menstrual cycles), reduced iron stores, as well as increased needs, especially during pregnancy (12-13). The World Health Organization (WHO) has set hemoglobin (Hb) cut-off value for the classification of iron deficiency anemia in non-pregnant women, which is an Hb concentration below 120 g/L (14). The most used analyses for the iron status determination are serum iron (Fe) concentration, unsaturated iron binding capacity (UIBC), ferritin, and soluble transferrin receptors. Serum ferritin (SF) concentration is an indicator of the iron stores, when infection is not present (15). It is considered that the iron stores are depleted when the SF concentration is below 15 µg/L in adults (16). Determination of serum Fpn concentration might also be important as Fpn could be potentially used as indicator of iron status. Also, it could potentially help in the diagnosis, prognosis or treatment of anemias, but also disorders of iron overload such as ferroportin disease or hemochromatosis type 4 resulting from the *FPN1/SLC40A1* gene mutation (17). To date, the serum concentrations of Fpn are not known either in the healthy population, or in various disorders and diseases. Therefore, the aim of this study was to de-

termine the concentration of Fpn in the serum of WRA for the first time and to establish whether there is a difference in the concentration of Fpn according to ferritin status. In addition, we proposed a reference interval for Fpn in the population of WRA in Bosnia and Herzegovina.

Materials and methods

Subjects

The present study was prospective and included 100 WRA (18-45 years). Those women were recruited at the Clinical Hospital Centre Mostar (CHCM), Bosnia and Herzegovina, from October 2022 to February 2023, as part of a regular determination of specialist tests that are not performed by primary health care. The CHCM provides health care for approximately 400,000 insured people, and the Department of Laboratory Diagnostics performs secondary and tertiary health care services, while primary health care is provided by about 10 laboratories in the territory of Herzegovina. The study was approved by the Ethics Committee of the CHCM (Ethical approving number 1036/21 at CHCM) in respecting to the Declaration of Helsinki. Written informed consent was obtained from all subjects after explaining the purpose of the study. The inclusion criteria after clinical examination were as follows: Hb > 120 g/L and C-reactive protein (CRP) < 5 mg/L. Exclusion criteria were anemia, inflammation, hypertension, diabetes, endocrine abnormalities, thyroid dysfunction, urinary infection, oncological diseases, autoimmune diseases, pregnancy, obesity, degenerative diseases and iron supplementation (15,16). We divided the women into two subgroups following the generally accepted WHO guidelines for the cut-off value of serum ferritin concentration: group with ferritin concentration ≤ 15 µg/L and group with ferritin concentration > 15 µg/L.

Methods

In this study, the remains of serum and whole blood samples taken for routine laboratory tests at the Department of Laboratory Diagnostics of the CHCM were used. The blood samples were taken

in the morning after overnight fasting. Venous blood samples were collected in a blood collection tube without anticoagulant (7.5 mL) and a K3-ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA, 2.6 mL) tube (Sarstedt, Nümbrecht, Germany) with 21 G needles (Sarstedt, Nümbrecht, Germany). Serum samples for biochemical analyses were obtained by centrifuging whole blood without anticoagulants at 2320xg for 10 minutes, and the remaining part of serum after routine tests was stored at - 80 °C until determination of Fpn. C-reactive protein, Fe and UIBC concentrations (CRP Latex, Iron, UIBC; Beckman Coulter, Co. Clare, Ireland) were determined from serum on a Beckman Coulter DxC AU 700 chemistry analyzer (Beckman Coulter, Brea, USA) on the day of sample collection, as well as Hb concentration (Sulfolyser, Sysmex Europe GmbH, Norderstedt, Germany) which was determined from whole blood with EDTA on a Sysmex XN 1000 hematology counter (Wakinohama-Kaigandori Chuo-ku, Kobe, Japan). Total iron binding capacity (TIBC) was calculated, $TIBC = Fe (\mu\text{mol/L}) + UIBC (\mu\text{mol/L})$. Ferritin concentration (Vitros Ferritin Reagent Test, Ortho-Clinical Diagnostics, UK) was determined from a serum sample using the chemiluminescence method on a Vitros 3600 analyzer (Ortho-Clinical Diagnostics, Buckinghamshire, UK). The concentration of Fpn in serum was determined using the Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) sandwich method (within 3 months from the day of storage at - 80 °C) on the EZ Read 800 Plus analyzer (Biochrom, Cambridge, UK). The Human Fpn Elisa Kit (AssayGenie, Cat.code HUES03226, Dublin 2, Ireland) was used to determine the concentration of Fpn. Standards or samples are added to the appropriate microplate wells and combined with the specific antibody. The absorbance is measured spectrophotometrically at $450 \text{ nm} \pm 2 \text{ nm}$. The concentration of human Fpn in samples can be calculated by comparing the absorbance of the samples to the standard curve. The calibration curve was obtained by serial dilution of the working solutions. The recommended dilution gradient is as follows: 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.63, 0.31, and 0 $\mu\text{g/L}$ (the last tube is regarded as a blank). This ELISA kit has no special quality control other than defined calibrator con-

centrations to obtain a calibration curve. The sensitivity of this test was 0.19 $\mu\text{g/L}$ and inter and intra assay coefficients of variation (CV) for three samples (low, mid-range and high level) were 5.43, 5.19, 3.14% and 6.12, 4.50, 4.35%, respectively, provided by the manufacturer of the ELISA test. Detection range for this test was 0.31-20 $\mu\text{g/L}$. Each standard and sample was measured in duplicate. The recovery of Fpn in serum samples was in range 85-96%. Samples whose concentration was above 20 $\mu\text{g/L}$ were diluted in a ratio of 1:2. The concentration of diluted samples was calculated from the standard curve, multiplied by the dilution factor. Assay linearities for 1:2 dilutions were in the range 88-100%.

Statistical analysis

The results of the measurements are presented with appropriate measures of central tendency and dispersion, depending on the sample size and distribution. Shapiro-Wilk test was used to test the normality of data distribution. Data that followed a normal distribution are presented with the arithmetic mean and standard deviation (SD), and those that followed a non-normal distribution are presented with the median and interquartile range (IQR) (from first to the third quartile), except for age that is presented as the median and minimum-maximum. The Mann-Whitney U-test was used to compare two groups that did not follow a normal distribution. For the Fpn reference interval robust method was used as recommended by Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI) C28-A3c approved guideline when sample sizes are small, with less than 120 data. The robust method has the appeal of the parametric method because it does not require as many observations as the nonparametric procedure. With robust method, confidence intervals (CI) for reference limits are estimated using bootstrapping (percentile interval method) (18,19). In bootstrapping, sample data is used to create a large set of new "bootstrap" samples, simply by randomly taking data from the original sample (in this case 10,000 iterations). Data distribution histograms were visually inspected and the Tukey test was used for the identification of outliers. All differences with $P <$

0.05 are considered statistically significant. Data analysis was performed using MedCalc Statistical Software version 22.006 (MedCalc Software Ltd, Ostend, Belgium).

Results

The research included 100 WRA. The respective median age was 24 (18-44) years. Table 1 shows concentrations of iron status parameters (Fe, UIBC, TIBC and ferritin) as well as concentrations of Fpn, Hb and CRP in our study population. However, circulating concentration of Fpn differed statistically significantly when we subdivided our participants according to the concentration of ferritin that suggests if the iron stores are depleted or not. The median concentration of ferritin in the subgroup with concentration $\leq 15 \mu\text{g/L}$ was 11.1 (7.12-12.8) $\mu\text{g/L}$, and in the subgroup $> 15 \mu\text{g/L}$ it was 21.2 (18.2-29.8) $\mu\text{g/L}$. Next, the median concentration of Fpn in the subgroup with ferritin concentration $> 15 \mu\text{g/L}$ (N = 52) was 15.21 (10.34-21.93) $\mu\text{g/L}$ and in the subgroup with ferritin concentration $\leq 15 \mu\text{g/L}$ (N = 48) it was 5.93 (4.84-8.36) $\mu\text{g/L}$ ($P < 0.001$) (Figure 1). To define the reference interval with a robust method, we found that the lower limit with 90% CI was 2.26 (1.78 to 2.83), while the upper limit with 90% CI was 29.81 (25.37 to 34.33) (Figure 2).

TABLE 1. Concentrations of iron status parameters, Fpn, Hb and CRP

Parameter	Result (N = 100)
Fe ($\mu\text{mol/L}$)	15 (10-19)
UIBC ($\mu\text{mol/L}$)	49 $\pm$ 11
TIBC ($\mu\text{mol/L}$)	64 (58-70)
Ferritin ($\mu\text{g/L}$)	15.2 (11.1-21.5)
Fpn ($\mu\text{g/L}$)	9.74 (5.84-15.69)
Hb (g/L)	131 (126-136)
CRP (mg/L)	2.1 (0.9-2.8)

Results are expressed as mean $\pm$ standard deviation or median (interquartile range). Fe - iron. UIBC - unsaturated iron binding capacity. TIBC - total iron binding capacity. Fpn - ferroportin. Hb - hemoglobin. CRP - C-reactive protein.

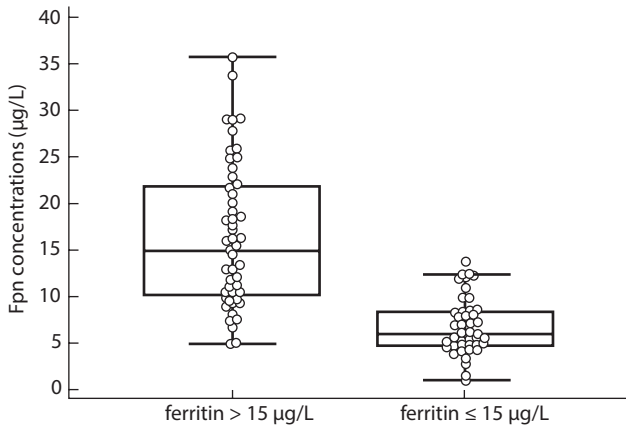


FIGURE 1. Serum ferroportin (Fpn) concentration in women of reproductive age with ferritin concentration $> 15 \mu\text{g/L}$ and in women with ferritin concentration $\leq 15 \mu\text{g/L}$.

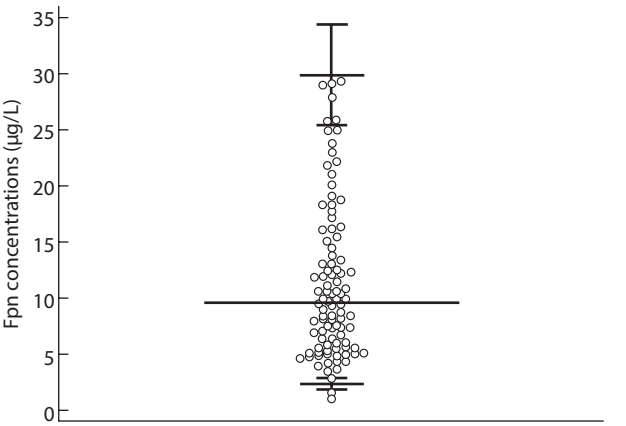


FIGURE 2. Graph of ferroportin (Fpn) concentration in women of reproductive age. Reference interval was determined by the robust method. The middle line represents the median.

Discussion

To the best of our knowledge, the results of this study are the first to present the concentration of ferroportin only in women of reproductive age. One study measured the concentration of Fpn in 60 women with breast cancer and 30 control women, between the ages of 30 and 70. Their results showed statistically significantly higher concentrations of Fpn ($4.44 \pm 1.20 \text{ ng/mL}$) in the control group compared to the tested group ($2.47 \pm$

1.59 ng/mL) (20). This study does not list other possible diseases and disorders, as well as the analytical specifications of the test, so it is difficult to compare it with our study (20). Also, another study so far measured the serum concentration of Fpn in patients with schizophrenia and bipolar disorder and in healthy subjects (21). The control group consisted of only 42 people, both women ($N = 23$) and men ($N = 19$). They showed that the group of patients with schizophrenia had significantly higher concentrations of Fpn in serum (0.46 ± 0.22 ng/mL) than healthy subjects (0.26 ± 0.18 ng/mL) and patients with bipolar disorder (0.30 ± 0.20 ng/mL) (21). In all three groups, serum concentrations of Fpn are lower compared to ours and their lower standard deviation is below the detection limit of our test.

We also demonstrated there is a statistically significant difference in the concentration of serum Fpn in women with ferritin concentration below 15 µg/L compared to those with ferritin concentration above 15 µg/L. Bosnia and Herzegovina does not have established data on the cut-off values of SF for its population. However, we would like to emphasize that the manufacturer of the reagents used in our research for SF specifically recommends reference values for women up to 45 years of age to be 7-133 µg/L, and for women over 45 years of age to be 14-295 µg/L. Therefore, according to the recommended reference values of the reagent manufacturer, all women who participated in this study have SF concentration within the reference interval. Also, the results of the study that compared two ferritin assays showed that Ortho-Clinical Diagnostics assay, that we used in this study, measures lower SF concentrations compared to assay of Abbott Architect, which shows that there is no standardization for immunochemical tests (22).

Previous researches measured parameters of iron status in women of reproductive age, mostly for the purpose of making a decision on iron supplementation, and they determined the cut-off value for SF in different populations and regions all around the world (23,24). The importance of interpreting iron status and iron homeostasis in preg-

nancy is particularly emphasized. More recent studies also include, in addition to the determination of routine iron parameters such as iron, Hb and ferritin, other parameters such as soluble transferrin receptors and hepcidin (25). Recently, in the focus of interest of many studies is the mechanism of action of the hepcidin-Fpn axis, which is the main regulator of iron homeostasis in the healthy population and in various diseases (26). In addition, different genetic errors can be the cause of iron homeostasis disorders, such as the iron overload or the development of anemia due to insufficient iron intake (27). Many studies have been devoted to the detection of Fpn gene/protein expression in different conditions such as adiposity, Alzheimer's disease or breast cancer (28-30).

Our study is the first to include a larger number of women, and the first to determine the concentration of Fpn only in WRA. Also, for the first time, we proposed a reference interval in general for Fpn concentration. However, further research is needed on even larger number of subjects in order to determine the reference values in healthy population of both male and female as well as of different age groups. Today, only ELISA kits are available on the market for determining the concentration of Fpn from serum or plasma, and standardization of the method and verification of the test according to the CLSI EP15-A3 protocol for medical laboratory tests is required. Due to the role of iron in many functions in the body, it is important to know the concentration of Fpn in serum/plasma for better understanding of various disorders of iron homeostasis.

A limitation of this study is the possible latent iron deficiency in almost half of the women included in the study who have a ferritin concentration ≤ 15 µg/L.

Author contributions

A Ćuk: Conceptualization, Methodology, Writing - review & editing. L. Rumora, I. Mikulić: Investigation, Visualization, Writing - original draft. N. Penava, V. Tomić: Investigation. I. Cvetković, A. Pušić, V. Mikulić, K. Ljubić: Formal analysis, Investigation.

Potential conflict of interest

None declared.

Data availability statement

The data generated and analyzed in the presented study are available from the corresponding author on request.

References

- Drakesmith H, Nemeth E, Ganz T. Ironing out ferroportin. *Cell Metab.* 2015;22:777-87. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.09.006>
- Abboud S, Haile DJ. A novel mammalian iron-regulated protein involved in intracellular iron metabolism. *J Biol Chem.* 2000;275:19906-12. <https://doi.org/10.1074/jbc.M000713200>
- Donovan A, Brownlie A, Zhou Y, Shepard J, Pratt SJ, Moynihan J, et al. Positional cloning of zebrafish ferroportin1 identifies a conserved vertebrate iron exporter. *Nature.* 2000;403:776-81. <https://doi.org/10.1038/35001596>
- McKie AT, Marciani P, Rolfs A, Brennan K, Wehr K, Barrow D, et al. A novel duodenal iron-regulated transporter, IREG1, implicated in the basolateral transfer of iron to the circulation. *Mol Cell.* 2000;5:299-309. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)80425-6](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80425-6)
- Nemeth E, Ganz T. Hepcidin-Ferroportin Interaction Controls Systemic Iron Homeostasis. *Int J Mol Sci.* 2021;22:6493. <https://doi.org/10.3390/ijms22126493>
- Nemeth E, Tuttle MS, Powelson J, Vaughn MB, Donovan A, Ward DM, et al. Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science.* 2004;306:2090-3. <https://doi.org/10.1126/science.1104742>
- Drakesmith H, Nemeth E, Ganz T. Ironing out Ferroportin. *Cell Metab.* 2015;22:777-87. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.09.006>
- Muckenthaler MU, Rivella S, Hentze MW, Galy B. A Red Carpet for Iron Metabolism. *Cell.* 2017;168:344-61. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.12.034>
- Pasricha SR, Tye-Din J, Muckenthaler MU, Swinkels DW. Iron deficiency. *Lancet.* 2021;397:233-48. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)32594-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)32594-0)
- Camaschella C. Iron-deficiency anemia. *N. Engl. J. Med.* 2015;372:1832-43. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1401038>
- Lopez A, Cacoub P, Macdougall IC, Peyrin-Biroulet L. Iron deficiency anaemia. *Lancet.* 2016;387:907-16. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)60865-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)60865-0)
- McLean E, Cogswell M, Egli I, Wojdyla D, De Benoist B. Worldwide Prevalence of Anaemia, WHO Vitamin and Mineral Nutrition Information System, 1993-2005. *Public Health Nutr.* 2009;12:444-54. <https://doi.org/10.1017/S1368980008002401>
- Safiri S, Kolahi AA, Noori M, Nejadghaderi SA, Karamzad N, Bragazzi NL, et al. Burden of Anemia and Its Underlying Causes in 204 Countries and Territories, 1990-2019: Results from the Global Burden of Disease Study 2019. *J. Hematol. Oncol.* 2021;14:185. <https://doi.org/10.1186/s13045-021-01202-2>
- World Health Organization. Haemoglobin concentrations for the diagnosis of anaemia and assessment of severity. WHO, 2011. Nutritional anaemias: tools for effective prevention and control. Geneva: World Health Organization; 2017. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- Assessing the iron status of populations. Second edition including literature reviews. Report of a Joint World Health Organization/Centers for Disease Control and Prevention technical consultation on the assessment of iron status at the population level, Geneva, Switzerland, 6-8 April 2004. Geneva: World Health Organization; 2007
- United Nations Children's Fund, United Nations University, World Health Organization. Iron-deficiency anaemia. Assessment, prevention, and control: a guide for programme managers. Geneva: World Health Organization; 2001.
- Vlasveld LT, Janssen R, Bardou-Jacquet E, Venselaar H, Hamdi-Roze H, Drakesmith H, et al. Twenty Years of Ferroportin Disease: A Review or An Update of Published Clinical, Biochemical, Molecular, and Functional Features. *Pharmaceuticals (Basel).* 2019;12:132. <https://doi.org/10.3390/ph12030132>
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Defining, establishing, and verifying reference intervals in the clinical laboratory; Approved Guideline - third Edition. CLSI document C28-A3c. Wayne: CLSI; 2008.
- Efron B, Tibshirani RJ eds. An introduction to the Bootstrap. 1st ed. London: Chapman & Hal; 1993. https://doi.org/10.1007/978-1-4899-4541-9_1
- Aziz Z, Sarhat E, Zaidan Z. Estimation of serum ferroportin and liver enzymes in breast cancer patients. *Georgian Med News.* 2023;339:37-41.
- Keleş Altun İ, Atagün Mİ, Erdoğan A, Oymak Yenilmez D, Yusifova A, Şenat A, et al. Serum hepcidin / ferroportin levels in bipolar disorder and schizophrenia. *J Trace Elem Med Biol.* 2021;68:126843. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2021.126843>
- Majoni SW, Nelson J, Graham J, Abeyaratne A, Fernandes DK, Cherian S, et al. Comparison of two ferritin assay platforms to assess their level of agreement in measuring serum and plasma ferritin levels in patients with chronic kidney disease. *BMC Nephrol.* 2023;24:198. <https://doi.org/10.1186/s12882-023-03255-6>
- Milman N, Taylor CL, Merkel J, Brannon PM. Iron status in pregnant women and women of reproductive age in Eu-

- rope. *Am J Clin Nutr.* 2017;106:1655S–62S. <https://doi.org/10.3945/ajcn.117.156000>
24. Pita-Rodríguez GM, Basabe-Tuero B, Díaz-Sánchez ME, Alfonso-Sagué K, Gómez Álvarez AM, Montero-Díaz M, et al. Prevalence of Anemia and Iron Deficiency in Women of Reproductive Age in Cuba and Associated Factors. *Int J Environ Res Public Health.* 2023;20:5110. <https://doi.org/10.3390/ijerph20065110>
25. Chibanda Y, Brookes M, Churchill D, Al-Hassi H. The Ferritin, Hepcidin and Cytokines Link in the Diagnoses of Iron Deficiency Anaemia during Pregnancy: A Review. *Int J Mol Sci.* 2023;24:13323. <https://doi.org/10.3390/ijms241713323>
26. Ganz T, Nemeth E. Hepcidin and disorders of iron metabolism. *Annu Rev Med.* 2011;62:347–60. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-050109-142444>
27. Ganz T. Hepcidin and iron regulation, 10 years later. *Blood.* 2011;117:4425–33. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-01-258467>
28. Pinnix ZK, Miller LD, Wang W, D'Agostino R Jr, Kute T, Willingham MC, et al. Ferroportin and iron regulation in breast cancer progression and prognosis. *Sci Transl Med.* 2010;2:43ra56. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3001127>
29. Björklund G, Peana M, Pivina L, Dosa A, Aaseth J, Semanova Y, et al. Iron Deficiency in Obesity and after Bariatric Surgery. *Biomolecules.* 2021;11:613. <https://doi.org/10.3390/biom11050613>
30. Peng Y, Chang X, Lang M. Iron Homeostasis Disorder and Alzheimer's Disease. *Int J Mol Sci.* 2021;22:12442. <https://doi.org/10.3390/ijms222212442>

RESEARCH ARTICLE

Ferroportin and soluble transferrin receptor in women with first-trimester missed abortion

Ana Cuk ^{1,2*}, Lada Rumora ³, Ivanka Mikulic ^{1,2}, Nikolina Penava ⁴, Ivona Cvetkovic ¹, Vinka Mikulic ^{1,2}, Kristina Ljubic^{1,2}, Ante Pusic ¹, Andrea Prce ¹, Dejan Tiric ⁴, and Vajdana Tomic ⁴

Laboratory diagnostics of iron homeostasis during pregnancy typically rely on routine parameters, which often inadequately reflect the actual maternal iron status. This study aimed to evaluate the investigative and diagnostic utility of soluble transferrin receptor (sTfR) and ferroportin (Fpn) concentrations as key indicators of iron dysregulation in women with normal early pregnancy and those experiencing missed abortion. These primary biomarkers were assessed in conjunction with standard laboratory parameters of iron status across the study groups. Notably, Fpn concentration had not previously been determined in women with either normal or abnormal pregnancies. The study enrolled 45 women with missed abortion and 45 women with normal first-trimester pregnancies. Peripheral blood concentrations of iron (Fe), unsaturated iron-binding capacity (UIBC), ferritin, hemoglobin (Hb), transferrin, and sTfR were measured using automated analyzers, while hepcidin and Fpn were quantified using ELISA kits. Transferrin saturation (TSAT), the sTfR/log ferritin index (sTfR-F index), and the ferroportin to soluble transferrin receptor ratio (Fpn/sTfR) were calculated. In the missed abortion group, Fpn ($P < 0.001$), Fe ($P = 0.008$), TSAT ($P = 0.018$), and Fpn/sTfR ($P < 0.001$) were significantly decreased, whereas sTfR ($P = 0.001$) and the sTfR-F index ($P = 0.003$) were significantly increased compared to women with normal pregnancies. Proposed multiparameter models incorporating sTfR and Fpn, or sTfR, hepcidin, and Fpn, accurately classified over 80% of cases and demonstrated excellent area under the curve (AUC) values of approximately 0.9. These findings indicate that Fpn and sTfR may serve as valuable investigative biomarkers for identifying dysregulation of iron homeostasis in early pregnancy.

Keywords: Iron homeostasis, ferroportin, soluble transferrin receptor, hepcidin, missed abortion, pregnancy.

Introduction

A significant number of pregnancies conclude in unexplained spontaneous abortion. The majority of miscarriages occur in early pregnancy, with an 11%–22% risk up to the 20th week of gestation, peaking before the 14th week [1, 2]. Missed abortion is a unique form of spontaneous abortion, characterized by the asymptomatic death of the embryo or fetus (absence of cardiac activity) without sufficient uterine contractions for expulsion, distinguishing it from other types that involve heavy bleeding [3, 4].

During a normal pregnancy, maternal iron homeostasis undergoes substantial physiological adaptations to support fetal development. In healthy pregnancies, serum iron (Fe), ferritin, and transferrin saturation (TSAT) typically decrease due to plasma volume expansion and increased fetal demand. Current laboratory diagnostics for iron homeostasis in pregnancy rely on measuring Fe, hemoglobin (Hb), and ferritin concentrations. However, these parameters alone are insufficient for a comprehensive assessment of maternal iron status, which critically influences embryonic organogenesis and fetal growth, particularly in early pregnancy and throughout its later stages [5].

Maternal iron deficiency during pregnancy poses a risk for insufficient iron supply to the embryo, given that placental iron transfer is crucial for early embryonic development [6].

Iron absorption and tissue distribution are primarily regulated by the interaction of hepcidin and ferroportin (Fpn). Hepcidin, a liver hormone, plays a central role in iron homeostasis. Iron and hepcidin form a classical endocrine feedback loop: iron excess increases hepcidin levels, which inhibits further iron absorption and release from stores. Conversely, iron deficiency leads to lower hepcidin concentrations, thereby increasing plasma iron availability. Hepcidin has also been shown to be important in regulating placental iron transport [6–10]. Recent research further suggests a potential link between dysregulation of iron homeostasis regulators, particularly hepcidin, and early spontaneous abortion [11, 12].

The hepcidin receptor is Fpn, which is also the sole known cellular iron exporter. Recent studies have elucidated the structural and functional insights of hepcidin-bound Fpn [13]. Fpn has been identified and expressed in iron-storing and transporting tissues, including the placenta [14, 15].

¹Department of Laboratory Diagnostics, University Clinical Hospital Mostar, Mostar, Bosnia and Herzegovina; ²Faculty of Pharmacy, University of Mostar, Mostar, Bosnia and Herzegovina; ³Department of Medical Biochemistry and Hematology, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry, Zagreb, Croatia; ⁴Department of Obstetrics and Gynaecology, Clinical Hospital Centre Mostar, Mostar, Bosnia and Herzegovina.

*Correspondence to Ana Cuk: anna.cuk90@gmail.com

DOI: 10.17305/bb.2026.14261

© 2026 Cuk et al. This article is available under a Creative Commons License (Attribution 4.0 International, as described at <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Its localization on the basal/fetal side of the syncytiotrophoblast underscores its critical role in transplacental iron transfer [16–19].

Iron homeostasis is a dynamic regulatory process involving transferrin to transport iron between sites of absorption, recycling, and storage to sites of utilization. Transferrin is the primary iron transporter in plasma [19]. Iron from the maternal circulation, bound to transferrin, is taken up by transferrin receptor 1 (TfR1), located on the apical/maternal side of the syncytiotrophoblast. Following endocytosis, iron is released from transferrin and transported to the cytoplasm. Within the cytoplasm, iron can be stored in ferritin, associated with heme, incorporated into the labile iron pool, or transported to the fetal circulation via Fpn. Simultaneously, TfR1 and transferrin are recycled back to the apical membrane of the syncytiotrophoblast, with transferrin subsequently released into the maternal circulation [20].

Soluble transferrin receptor (sTfR) is a truncated monomer of its tissue counterpart, lacking the first 100 amino acids. Serum sTfR concentrations have been demonstrated to be proportional to cellular/tissue TfR1 levels [21, 22]. sTfR concentrations remain stable until iron stores are depleted. While ferritin and TSAT are primary markers for diagnosing iron deficiency, sTfR offers valuable supplementary information about iron status. Although not universally available and requiring careful interpretation, an increase in sTfR can precede a significant drop in Hb levels. Therefore, unlike serum ferritin, which provides limited information on iron stores, sTfR can accurately assess iron status.

Currently, it is unclear whether abnormal changes in iron metabolism contribute to adverse pregnancy outcomes or if, conversely, abnormal pregnancy causes dysregulation in iron-related parameters. Thus, future studies are needed to clarify this causal relationship. Sangkhae et al. [6, 23] proposed a possible mechanism of transplacental iron transport in mouse and human placenta models, emphasizing the importance of key iron transporters: TfR1 for iron import and Fpn for iron export. The authors found that during iron deficiency, the placenta downregulates Fpn and upregulates TfR1 to maintain its own iron homeostasis, leading to reduced iron availability for fetal transfer. This placental response, which prioritizes placental iron retention despite fetal iron deficiency, is of critical importance, leading to the designation of the placenta as “selfish” [24].

Our hypothesis posits that decreased serum concentrations of Fpn and increased serum concentrations of sTfR serve as early indicators of iron homeostasis disorders and could be crucial for understanding early missed abortion. The primary aim of this study was to evaluate the investigative and diagnostic potential of sTfR and Fpn concentrations—as key molecular components regulating trans-placental iron transfer and central indicators of iron dysregulation—in women with normal early pregnancies and those experiencing missed abortion. Our secondary aim was to propose a model incorporating various iron-related parameters to assess the combined diagnostic potential of these markers in first-trimester missed spontaneous abortion.

Materials and methods

Study population

Participants were categorized into a normal pregnancy (control) group and a missed spontaneous abortion group. The sample size was estimated using MedCalc software. To align with the research objective and planned statistical analyses, a pilot study was conducted to determine the standard deviation of the differences in mean Fpn between the two groups. Strict criteria for sample size calculation included an assumed $\alpha = 0.05$ and a research power of 90%.

For the missed abortion group, blood samples were collected at the Clinic for Gynecology and Obstetrics following ultrasound confirmation of an early-retained spontaneous abortion. For the control group, blood samples were collected at the Transfusion Clinic Centre of the University Clinical Hospital (UCH) Mostar (Bosnia and Herzegovina). Samples for both groups were collected in the morning. In the missed abortion group, blood was drawn after ultrasound confirmation of missed abortion and prior to the induction of abortion with mifepristone or misoprostol. All control group subjects were contacted two months after consenting to participate to confirm a normal course of pregnancy and the absence of subsequent first-trimester spontaneous abortion. Inclusion criteria for both groups were age 18–45 years, gestational week < 14, singleton pregnancy, and Hb > 11 g/dL. Additional inclusion criteria for the control group included normal pregnancy with ultrasound-confirmed normal embryonic or fetal development and a history of previous normal pregnancies without spontaneous abortions. For the missed abortion group, inclusion criteria were retained spontaneous abortion with ultrasound-confirmed termination of embryonic or fetal development (absence of cardiac activity) and induction of abortion with mifepristone or misoprostol. Exclusion criteria for both groups encompassed bleeding, anemia, inflammation, hypertension, diabetes, ultrasound-visible fetal anomalies, thyroid dysfunction, urinary infection, uterine malformations, malignant diseases, acquired and hereditary thrombophilia, autoimmune diseases, artificial insemination, and iron supplementation, as well as CRP > 5 mg/L. Based on these criteria, participants had no relevant pregnancy history.

Methods for determination of iron status parameters

We determined the concentrations of Fe, unsaturated iron-binding capacity (UIBC), ferritin, and Hb, which are routinely used in clinical practice for assessing iron in pregnancy. Additionally, transferrin and sTfR, also used in clinical practice but not typically in pregnancy, were measured, along with hepcidin and Fpn concentrations, which are not routinely used clinically. We also calculated total iron-binding capacity (TIBC), TSAT, soluble transferrin receptor/log ferritin index (sTfR-F index), and the ferroportin to soluble transferrin receptor (Fpn/sTfR) ratio. The following parameters were calculated: TIBC = Fe ($\mu\text{mol/L}$) + UIBC ($\mu\text{mol/L}$); TSAT (%) = $[\text{Fe} (\mu\text{mol/L}) / \text{TIBC} (\mu\text{mol/L})] \times 100$; sTfR-F index = sTfR concentration / log ferritin concentration. The Fpn/sTfR ratio was calculated directly from measured Fpn and sTfR concentrations without harmonization of measurement units. This ratio was used as an exploratory research-derived

parameter for comparative analyses between groups, not as a validated clinical biomarker. Most parameters were determined at the Department of Laboratory Diagnostics, UCH Mostar, while Fpn and hepcidin were measured at the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry. Hb concentration was determined from whole blood with K3-ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) on a Sysmex XN 1000 hematology counter (Wakihama-Kaigandori Chuo-ku, Kobe 651-0073, Japan) on the day of sample collection. Serum samples for biochemical markers were obtained by centrifugation of whole blood without anticoagulant for 10 min at 3500 rpm, then stored at -80°C until analysis (performed within 6 months). Serum concentrations of Fe, UIBC (photometric method), and CRP (CRP Latex reagent kit) were determined using a Beckman Coulter DxC 700 AU automatic analyzer (Beckman Coulter, Brea, USA). Transferrin concentration was determined by the immunoturbidimetric method on an Alinity ci automatic analyzer (Abbott, Germany). Serum sTfR concentration was determined nephelometrically on a BN II System automatic analyzer (Siemens, Erlangen, Germany), and ferritin concentration using the chemiluminescence method on a Vitros 3600 analyzer (Ortho-Clinical Diagnostics, Buckinghamshire, UK). Concentrations of Fpn and hepcidin in serum were determined using the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) sandwich method (comprehensive technical details and protocol for Fpn and hepcidin measurement are provided in the Supplemental data).

Ethical statement

The study received ethical approval from the Ethics Committee of UCH Mostar and the Ethics Committee for Experimentation of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry (Zagreb, Croatia), under protocol numbers 1036/21 and 251-62-03-22-19, respectively. All methodologies adhered to relevant guidelines and regulations, including the Declarations of Helsinki. Informed consent was obtained from each participant after verbal explanation and review of an information letter.

Statistical analysis

Continuous variables were summarized as mean $\pm$ standard deviation (SD) or median with interquartile range (IQR), contingent on distribution characteristics. Given the moderate sample size, formal normality testing was interpreted cautiously and not used as the sole criterion for statistical inference. Group comparisons were conducted using Student's *t*-test and the Mann-Whitney *U* test. Effect sizes, accompanied by 95% confidence intervals (CIs), were reported to highlight the magnitude and precision of observed differences. To address multiple testing, *P*-values were adjusted using the Benjamini-Hochberg false discovery rate (FDR) procedure, and corresponding *q*-values were reported.

Univariate and multivariate logistic regression analyses were performed. All continuous variables were standardized to *z*-scores, and Odds Ratios (OR) with their 95% CIs are reported per one SD increment for both univariate and multivariable logistic regression analyses. To mitigate optimism

and control for overfitting, internal validation was systematically performed for all developed multiparameter models using non-parametric bootstrap resampling with 1000 replications. Bias-corrected and accelerated 95% CIs were calculated for all Area Under the Receiver Operating Characteristic Curve (AUC) values. For each model, the optimal classification cut-off point was determined using the Youden index, and overall classification accuracy, sensitivity, and specificity were calculated based on these bootstrap-validated optimal thresholds.

In multivariate logistic regression, the analysis was adjusted for maternal age (maternal age-adjusted multivariate logistic regression). This involved performing analyses both with and without the maternal age parameter to assess the independent effect of other covariates on the outcome. Model 1 included only routine biochemical parameters of iron status that demonstrated significance in the univariate analysis. Model 2 encompassed parameters that reached significance in the univariate analysis, irrespective of their standard use in laboratory practice. To avoid omitting variables that might be non-significant individually but crucial within a multivariate logistic regression [25], Model 3 combined all examined parameters regardless of their univariate significance. Additionally, a sensitivity analysis was performed using multivariable logistic regression to evaluate the independent prognostic value of the Fpn/sTfR ratio relative to its individual components. All differences with a *P*-value (or *q*-value) < 0.05 were considered statistically significant. Data analysis was performed using MedCalc® Statistical Software version 22.006 (MedCalc Software Ltd, Ostend, Belgium).

Results

This research revealed statistically significant differences in the concentrations of sTfR and Fpn between the examined groups. The median serum sTfR concentration in women with a normal pregnancy was 0.84 (0.62–1.08) mg/L, compared to 1.02 (0.86–1.20) mg/L in women experiencing missed abortion ($P = 0.001$, $q = 0.012$) (Figure 1). Conversely, the median serum Fpn concentration was 11.05 (7.42–21.35) $\mu\text{g/L}$ in normal pregnancies, significantly higher than the 6.66 (4.44–8.99) $\mu\text{g/L}$ observed in women with missed abortion ($P < 0.001$, $q = 0.001$) (Figure 1).

Further comparison between the control and study groups demonstrated statistically significant differences in serum concentrations of Fe, TSAT, sTfR-F index, and Fpn/sTfR. No other parameters exhibited statistically significant differences (Table 1).

A statistically significant age difference was observed between the study groups. The median age for the control group was 29 (range: 25–41) years, while the missed abortion group had a median age of 35 (range: 20–43) years ($P < 0.001$, $q = 0.001$). Additionally, a statistically significant difference in Body Mass Index (BMI) was found (control group: 23.85 ± 1.93 ; study group: 22.81 ± 2.04 ; $P = 0.029$). However, after applying FDR analysis to all variables, BMI no longer showed a statistically significant difference between groups ($q = 0.058$). No statistically significant difference in gestational week was

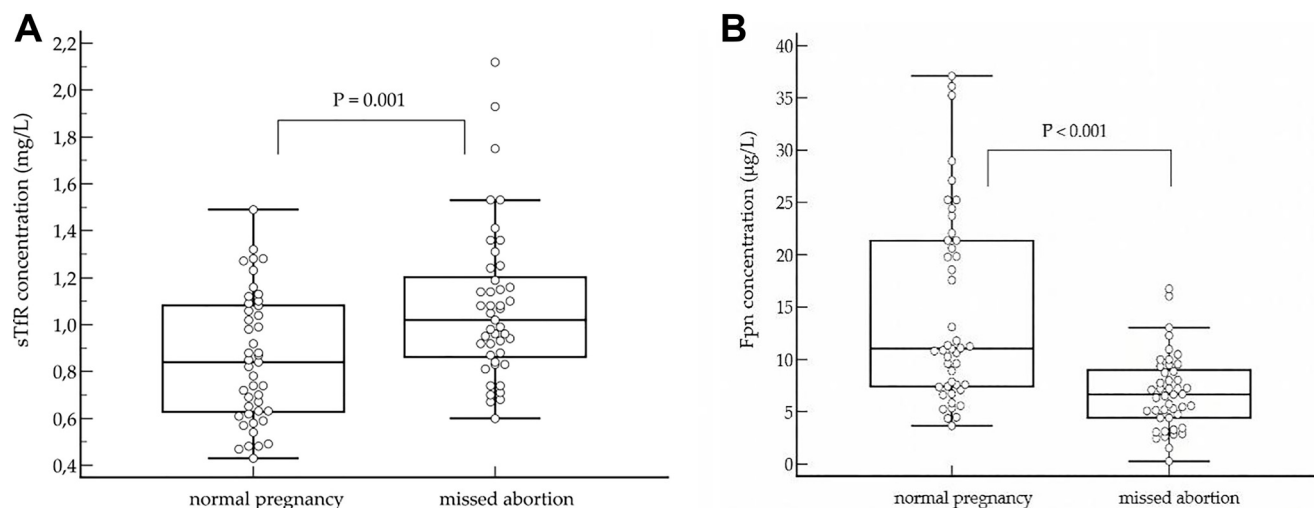


Figure 1. Missed abortion is associated with increased serum sTfR and decreased serum Fpn concentrations. Serum concentrations of (A) sTfR and (B) Fpn in women with normal first-trimester pregnancy and women with missed abortion before 14 gestational weeks ($n = 45$ per group). Groups were compared using the Mann–Whitney U test. Median sTfR concentrations were 0.84 (0.62–1.08) mg/L in normal pregnancy and 1.02 (0.86–1.20) mg/L in missed abortion ($P = 0.001$; $q = 0.012$). Median Fpn concentrations were 11.05 (7.42–21.35) μ g/L in normal pregnancy and 6.66 (4.44–8.99) μ g/L in missed abortion ($P < 0.001$; $q = 0.001$). q values were calculated using the Benjamini–Hochberg false discovery rate procedure. **Abbreviations:** Fpn, ferroportin; IQR, interquartile range; sTfR, soluble transferrin receptor.

Table 1. Biochemical parameters in women with normal pregnancy and missed abortion

Parameter	Normal pregnancy $n = 45$	Missed abortion $n = 45$	Difference (95 % CI)	P-value	q-value*
Fe (μ mol/L)	17.6 (13.2–24.0)	12.2 (8.5–19.3)	−4.30 (−7.60 to −1.30)	0.008	0.024
UIBC (μ mol/L)	45.1 $\pm$ 11.7	49.4 $\pm$ 12.8	4.26 (−0.77 to 9.29)	0.095	0.162
TIBC (μ mol/L)	63.8 $\pm$ 8.9	63.8 $\pm$ 8.8	−0.02 (−3.75 to 3.69)	0.987	0.987
ferritin (μ g/L)	18.6 (11.3–29.3)	15.1 (10.3–22.6)	−3.40 (−8.30 to 0.70)	0.103	0.154
Hb (g/dL)	12.7 $\pm$ 0.7	12.5 $\pm$ 1.0	−2.66 (−6.43 to 1.14)	0.169	0.225
transferrin (mg/dL)	285.4 $\pm$ 46.7	293.3 $\pm$ 47.7	7.86 (−12.78 to 28.51)	0.446	0.486
TSAT (%)	26 (19–38)	19 (12–33)	−6.65 (−11.66 to −1.28)	0.018	0.043
sTfR-F index	0.69 (0.44–0.83)	0.82 (0.67–1.14)	0.20 (0.07 to 0.34)	0.003	0.012
hepcidin (μ g/L)	3.86 (2.04–5.35)	4.69 (2.56–7.32)	0.91 (−0.33 to 2.26)	0.180	0.216
Fpn/sTfR	15.31 (10.14–22.70)	6.88 (4.09–8.50)	−8.81 (−11.82 to −6.10)	< 0.001	0.001

Data are presented as mean $\pm$ SD and IQR. Group differences are reported as effect size estimates with 95% CI. Comparisons between groups were performed using Student’s t -test or Mann–Whitney U test, as appropriate. **Abbreviations:** CI, confidence interval; Fe, iron; Fpn, ferroportin; Fpn/sTfR, ferroportin to soluble transferrin receptor ratio; Hb, hemoglobin; IQR, interquartile range; q-value, false discovery rate-adjusted P -value; SD, standard deviation; sTfR, soluble transferrin receptor; sTfR-F index, soluble transferrin receptor/log ferritin index; TIBC, total iron-binding capacity; TSAT, transferrin saturation; UIBC, unsaturated iron-binding capacity. *False Discovery Rate (FDR) adjusted q -values were calculated for multiple comparisons using the Benjamini–Hochberg procedure.

observed between the groups; the median and interquartile range for the control group was 10 (7–12) weeks, and for the study group was 10 (9–11) weeks ($P = 0.180$, $q = 0.216$).

Univariate logistic regression analysis was conducted to assess the predictive value of the investigated biochemical parameters (Table 2). sTfR and sTfR-F index emerged as the strongest predictors of missed abortion risk. Conversely, Fe, ferritin, TSAT, and particularly Fpn and Fpn/sTfR, demonstrated a protective effect.

The diagnostic potential of the proposed multiparameter models was evaluated using multivariate logistic regression

analysis, with results summarized in Table 3. All reported statistical parameters, including AUC values and classification accuracy, represent outcomes obtained after bootstrap validation and adjustment for maternal age. Model 1 exhibited an unadjusted AUC of 0.691 with an accuracy of 71.11%, and an adjusted AUC of 0.786 with an accuracy of 75.55%. Model 2 demonstrated an unadjusted AUC of 0.851 with an accuracy of 81.11%, and an adjusted AUC of 0.880 with an accuracy of 81.11%. Model 3 achieved an unadjusted AUC of 0.888 with an accuracy of 85.56%, and an adjusted AUC of 0.923 with an accuracy of 88.89%.

Table 2. Univariate logistic regression analysis of parameters of iron homeostasis

Parameter	OR*	95 % CI*	P-value
Fe ($\mu\text{mol/L}$)	0.97	0.95–0.99	0.011
UIBC ($\mu\text{mol/L}$)	1.42	0.92–2.19	0.106
TIBC ($\mu\text{mol/L}$)	0.99	0.65–1.50	0.987
ferritin ($\mu\text{g/L}$)	0.58	0.36–0.93	0.025
Hb (g/dL)	0.73	0.47–1.13	0.171
transferrin (mg/dL)	1.18	0.77–1.80	0.426
TSAT (%)	0.59	0.38–0.93	0.023
sTfR (mg/L)	2.32	1.36–3.97	0.001
sTfR-F index	2.93	1.40–6.12	0.004
hepcidin ($\mu\text{g/L}$)	1.34	0.85–2.13	0.202
Fpn ($\mu\text{g/L}$)	0.17	0.07–0.43	<0.001
Fpn/sTfR	0.04	0.01–0.17	<0.001

Abbreviations: CI, confidence interval; Fe, iron; Fpn, ferroportin; Fpn/sTfR, ferroportin to soluble transferrin receptor ratio; Hb, hemoglobin; OR, odds ratio; SD, standard deviation; sTfR, soluble transferrin receptor; sTfR-F index, soluble transferrin receptor/log ferritin index; TIBC, total iron-binding capacity; TSAT, transferrin saturation; UIBC, unsaturated iron-binding capacity. * ORs and 95 % CIs are expressed per one SD increment.

Table 3. Multiparameter models assessed via multivariate logistic regression analysis

		Unadjusted			Adjusted*		
Model	Parameter	OR	95 % CI	P-value	OR	95 % CI	P-value
1	Fe (μmol/L)	0.93	0.86–1.00	0.059	0.93	0.86–1.01	0.103
	ferritin (μg/L)	0.57	0.32–1.02	0.061	0.60	0.32–1.11	0.105
	TSAT (%)	3.67	0.62–21.52	0.149	3.71	0.48–28.19	0.205
	The analysis yielded an AUC 0.691 (95% CI: 0.579–0.799) and an accuracy: 71.11% (S:88.89%, Sp:53.33%)**			The analysis yielded an AUC 0.786 (95% CI: 0.683–0.867) and an accuracy: 75.55% (S:71.11%, Sp:80.00%)**			
2	sTfR (mg/L)	2.90	1.39–6.05	0.004	2.58	1.20–5.55	0.014
	Fpn (μg/L)	0.15	0.06–0.41	< 0.001	0.14	0.05–0.42	< 0.001
	The analysis yielded an AUC 0.851 (95% CI: 0.757–0.920) and an accuracy: 81.11% (S:91.11%, Sp:71.11%)**			The analysis yielded an AUC 0.880 (95% CI: 0.797–0.937) and an accuracy: 81.11% (S:95.56%, Sp:66.67%)**			
3	sTfR (mg/L)	2.82	1.30–6.12	0.008	2.29	1.03–5.09	0.042
	hepcidin (μg/L)	3.45	1.31–9.07	0.012	4.55	1.44–14.38	0.009
	Fpn (μg/L)	0.07	0.02–0.27	< 0.001	0.05	0.01–0.27	< 0.001
	The analysis yielded an AUC 0.888 (95% CI: 0.803–0.947) and an accuracy: 85.56% (S:95.56%, Sp:75.56%)			The analysis yielded an AUC 0.923 (95% CI: 0.847–0.965) and an accuracy: 88.89% (S:91.11%, Sp:86.67%)			

Abbreviations: AUC, area under the receiver operating characteristic curve; CI, confidence interval; OR, odds ratio; S, sensitivity; Sp, specificity. ORs and 95% CIs are expressed per one SD increment. * Adjusted for maternal age. ** AUC, CI, S, Sp, and accuracy were calculated following internal validation via non-parametric bootstrap resampling with 1000 replications to correct for model optimism. The optimal cut-off value was determined using the Youden index.

A sensitivity analysis employing multivariable logistic regression confirmed that the Fpn/sTfR ratio effectively captured the joint predictive variance of its underlying components without introducing spurious associations. When modeled together, both Fpn and sTfR lost statistical significance ($P = 0.269$ and $P = 0.668$, respectively), whereas the Fpn/sTfR ratio remained a highly significant independent predictor ($P < 0.001$). Furthermore, this combined model yielded a nearly identical area under the receiver operating characteristic (ROC) curve (AUC: 0.852, 95% CI: 0.763–0.921; accuracy: 80.00%) compared to the model with individual components alone (AUC: 0.851, 95% CI: 0.757–0.920; accuracy: 81.11%), demonstrating that the ratio effectively maintains full discriminative capacity.

Discussion

Recent literature underscores the critical importance of understanding iron homeostasis during pregnancy and its impact on adverse pregnancy outcomes [26]. This study assessed hepcidin concentrations in women with both normal and abnormal pregnancies. Additionally, it comprehensively evaluated various iron homeostasis parameters in women experiencing early (before the 14th gestational week) missed abortion, a specific type of spontaneous abortion characterized by the absence of vaginal bleeding.

Our results indicate that Fe and TSAT as well as Fpn and the Fpn/sTfR ratio, were significantly decreased in the missed abortion group compared to women with normal pregnancies in the first trimester. Conversely, sTfR and the sTfR-F index were significantly increased in the missed abortion group. The Fpn parameter and the Fpn/sTfR ratio should be interpreted cautiously, as they represent exploratory research variables rather than established clinical tools. Currently, only ELISA kits are available for determining Fpn concentration from serum or plasma. Standardization of the method and verification of the test according to the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) EP15-A3 protocol for medical laboratory tests are essential. Given iron's multifaceted roles in physiological functions, understanding serum/plasma Fpn concentrations is crucial for elucidating various disorders of iron homeostasis, particularly in the context of pregnancy. While Fpn has not previously been expressed as a ratio with sTfR, we propose that the Fpn to sTfR ratio may hold significance in evaluating the intensity of iron homeostasis disruption. However, further studies with larger participant cohorts and/or designs amenable to ROC analysis, including sensitivity, specificity, and cut-off point data, are necessary to properly evaluate the Fpn/sTfR ratio's clinical utility.

To the best of our knowledge, only two papers by the same authors have determined iron status parameters in women with spontaneous abortion, though the specific type of abortion was not specified [11, 12]. These studies enrolled Chinese non-pregnant women, pregnant women in the first trimester, women who experienced spontaneous abortion in the first trimester [11, 12], and pregnant women in the second trimester [11]. Iron levels in the first [11, 12] and second trimesters [12] were comparable to those in

non-pregnant women but significantly increased in women with spontaneous abortion. Hepcidin concentration was similar [12] or elevated [11] in the first trimester and decreased in the second trimester [11] compared to non-pregnant women, yet it was increased in the spontaneous abortion group [11, 12]. Furthermore, TIBC was decreased, while TSAT and ferritin were increased in women with spontaneous abortion compared to pregnant women in the first trimester [11]. Data regarding iron supplementation were unavailable for one of these studies [11], and in the other, only a small number of women received vitamin supplementation, with no specific indication of whether iron was included, although it could be presumed [12].

Two additional studies investigated indicators of iron status during normal pregnancy in European and African cohorts [27, 28]. However, these studies primarily focused on changes across all three trimesters or the postpartum period, which limits direct comparisons with our first-trimester data. Moreover, while the European study [27] lacked information on iron supplementation, the African cohort [28] exclusively recruited women receiving iron supplements. Discrepancies in results between previous research involving women with normal pregnancy [27, 28] and/or spontaneous abortion [11, 12] and our findings may be attributed, at least in part, to variations in study group size, ethnic background (e.g., Caucasian vs. African), iron supplementation practices, presence of iron deficiency anemia, and the specific type of spontaneous abortion. Our study exclusively included women with missed abortion from an Eastern European Caucasian population, and both anemia and iron supplementation were among our exclusion criteria.

In the current research, univariate logistic regression analysis was performed to evaluate the diagnostic potential of the examined parameters. This analysis revealed increased odds of missed abortion for sTfR and sTfR-F index, while Fe, ferritin, TSAT, Fpn, and Fpn/sTfR exhibited an odds ratio less than 1, with Fpn and Fpn/sTfR demonstrating the most protective effect.

Subsequently, multivariate logistic regression analysis was conducted to propose a model for identifying the best predictive parameters for missed spontaneous abortion. In Model 1, parameters lost their predictive values and exhibited the lowest predictive performance, confirming that standard iron indicators alone are insufficient for accurately identifying missed abortion. The diagnostic potential of our proposed multiparameter models underscores the benefit of combining routine parameters with novel biomarkers such as Fpn and sTfR.

Secondly, we proposed Model 2, which exclusively included Fpn and sTfR. These markers were selected due to their statistical significance in univariate analysis and their established critical roles in placental iron transport. Notably, this study represents the first report on Fpn concentrations during pregnancy, encompassing both early normal pregnancies and spontaneous abortions. While sTfR concentrations are routinely measured in clinical settings, their application is predominantly in the diagnosis and differentiation of anemias in adults. By integrating these novel potential biomarkers into our

model, we demonstrated a substantial enhancement in diagnostic potential compared to relying solely on routine laboratory practices.

To mitigate the risk of omitting variables that might lack individual significance but prove crucial within a multivariate logistic regression framework, we subsequently developed Model 3. This model incorporated all examined parameters, irrespective of their univariate significance. By integrating emerging biomarkers such as Fpn and hepcidin with conventional iron indicators, Model 3 maximized its diagnostic utility, achieving an exceptional age-adjusted AUC of 0.923 and an accuracy of 88.89%.

Although Model 3 exhibited marginally superior characteristics compared to Model 2, particularly concerning the percentage of correctly classified cases and AUC values, Model 2 also demonstrated robust performance. A key distinction is that Model 2 incorporates only one parameter (Fpn) not routinely included in everyday laboratory analysis, whereas Model 3 includes two such parameters (hepcidin and Fpn). Consequently, the presented models should be considered exploratory rather than definitive clinically applicable prediction tools. Their primary objective is to identify potentially relevant biomarker associations that warrant further rigorous investigation prior to any clinical implementation. Given the pivotal roles of Fpn and sTfR in placental iron transport, this research contributes to a deeper understanding of iron homeostasis and its availability to the embryo/fetus during early pregnancy.

Limitations

The limitations of this research include its cross-sectional study design and the moderate sample size, which was constrained by the limited availability of women presenting with this specific subtype of missed abortion.

Conclusion

The novel findings from our study regarding the differential concentrations of these two primary transporters highlight Fpn and sTfR (which is proportional to TfR1) as potential indicators of maternal iron bioavailability. Further research with a larger cohort is imperative to comprehensively evaluate these exploratory associations before considering any potential clinical application.

Acknowledgments

We extend our gratitude to all personnel involved in this research.

Conflicts of interest: Authors declare no conflicts of interest.

Funding: Authors received no specific funding for this work.

Data availability: The original contributions presented in this study are included in the article/supplementary material. Further inquiries can be directed to the corresponding author.

AI declaration statement: AI and AI-assisted technologies were not used to prepare this paper.

Submitted: 10 April 2026

Accepted: 06 June 2026

Published online: 12 June 2026

References

- [1] Ammon Avalos L, Galindo C, Li DK. A systematic review to calculate background miscarriage rates using life table analysis. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2012;94(6):417–23. <https://doi.org/10.1002/bdra.23014>
- [2] Savitz DA, Hertz-Picciotto I, Poole C, Olshan AF. Epidemiologic measures of the course and outcome of pregnancy. *Epidemiol Rev.* 2002;24(2):91–101. <https://doi.org/10.1093/epirev/mxf006>
- [3] Wu HL, Marwah S, Wang P, Wang QM, Chen XW. Misoprostol for medical treatment of missed abortion: a systematic review and network meta-analysis. *Sci Rep.* 2017;7(1):1664. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01892-0>
- [4] Griebel CP, Halvorsen J, Golemon TB, Day AA. Management of spontaneous abortion. *Am Fam Physician.* 2005;72(7):1243–50.
- [5] Mégier C, Peoc'h K, Puy V, Cordier AG. Iron metabolism in normal and pathological pregnancies and fetal consequences. *Metabolites.* 2022;12(2):129. <https://doi.org/10.3390/metabo12020129>
- [6] Sangkhae V, Fisher AL, Ganz T, Nemeth E. Iron homeostasis during pregnancy: maternal, placental, and fetal regulatory mechanisms. *Annu Rev Nutr.* 2023;43:279–300. <https://doi.org/10.1146/annurev-nutr-061021-030404>
- [7] Pritchard JA. Changes in the blood volume during pregnancy and delivery. *Anesthesiology.* 1965;26:393–9. <https://doi.org/10.1097/00005542-196507000-00004>
- [8] McDonald EA, Gundogan F, Olveda RM, Bartnikas TB, Kurtis JD, Friedman JF. Iron transport across the human placenta is regulated by hepcidin. *Pediatr Res.* 2022;92(2):396–402. <https://doi.org/10.1038/s41390-020-01201-y>
- [9] Lakhal-Littleton S. Advances in understanding the crosstalk between mother and fetus on iron utilization. *Semin Hematol.* 2021;58(3):153–60. <https://doi.org/10.1053/j.seminhematol.2021.06.003>
- [10] Fisher AL, Nemeth E. Iron homeostasis during pregnancy. *Am J Clin Nutr.* 2017;106(Suppl 6):1567S–1574S. <https://doi.org/10.3945/ajcn.117.155812>
- [11] Guo Y, Zhang N, Zhang D, Ren Q, Ganz T, Liu S, et al. Iron homeostasis in pregnancy and spontaneous abortion. *Am J Hematol.* 2019;94(2):184–8. <https://doi.org/10.1002/ajh.25341>
- [12] Wei S, Liu W, Qi Y, Guo Y, Zhang S, Wang L, et al. Disordered serum erythroferrone and hepcidin levels as indicators of the spontaneous abortion occurrence during early pregnancy in humans. *Br J Haematol.* 2021;192(3):643–51. <https://doi.org/10.1111/bjh.17049>
- [13] Billesbølle CB, Azumaya CM, Kretsch RC, Powers AS, Gonen S, Schneider S, et al. Structure of hepcidin-bound ferroportin reveals iron homeostatic mechanisms. *Nature.* 2020;586(7831):807–11. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2668-z>
- [14] Nemeth E, Ganz T. Hepcidin-ferroportin interaction controls systemic iron homeostasis. *Int J Mol Sci.* 2021;22(12):6493. <https://doi.org/10.3390/ijms22126493>
- [15] Nemeth E, Tuttle MS, Powelson J, Vaughn MB, Donovan A, Ward DM, et al. Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science.* 2004;306(5704):2090–3. <https://doi.org/10.1126/science.1104742>
- [16] Bastin J, Drakesmith H, Rees M, Sargent I, Townsend A. Localisation of proteins of iron metabolism in the human placenta and liver. *Br J Haematol.* 2006;134(5):532–43. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2006.06216.x>
- [17] Donovan A, Lima CA, Pinkus JL, Pinkus GS, Zon LI, Robine S, et al. The iron exporter ferroportin/Slc40a1 is essential for iron homeostasis. *Cell Metab.* 2005;1(3):191–200. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2005.01.003>
- [18] Bradley J, Leibold EA, Harris ZL, Wobken JD, Clarke S, Zumbrennen KB, et al. Influence of gestational age and fetal iron status on IRP activity and iron transporter protein expression in third-trimester human placenta. *Am J Physiol Regul Integr Comp*

- Physiol. 2004;287(4):R894–901. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00525.2003>
- [19] Ginzburg YZ. Hepcidin–ferroportin axis in health and disease. *Vitam Horm.* 2019;110:17–45. <https://doi.org/10.1016/bs.vh.2019.01.002>
- [20] Duck KA, Connor JR. Iron uptake and transport across physiological barriers. *Biomaterials.* 2016;29(4):573–91. <https://doi.org/10.1007/s10534-016-9952-2>
- [21] Beguin Y. Soluble transferrin receptor for the evaluation of erythropoiesis and iron status. *Clin Chim Acta.* 2003;329(1–2):9–22. [https://doi.org/10.1016/S0009-8981\(03\)00005-6](https://doi.org/10.1016/S0009-8981(03)00005-6)
- [22] R'zik S, Loo M, Beguin Y. Reticulocyte transferrin receptor (TfR) expression and contribution to soluble TfR levels. *Haematologica.* 2001;86(3):244–51.
- [23] Sangkhue V, Fisher AL, Wong S, Koenig MD, Tussing-Humphreys L, Chu A, et al. Effects of maternal iron status on placental and fetal iron homeostasis. *J Clin Invest.* 2020;130(2):625–40. <https://doi.org/10.1172/JCI127341>
- [24] Parrow NL, Fleming RE. The selfishly selfless placenta. *J Clin Invest.* 2020;130(2):590–2. <https://doi.org/10.1172/JCI134272>
- [25] Wang H, Peng J, Wang B, Lu X, Zheng JZ, Wang K, Tu XM, Feng C. Inconsistency between univariate and multiple logistic regressions. *Shanghai Arch Psychiatry.* 2017;29(2):124–8.
- [26] Sangkhue V, Nemeth E. Iron and pregnancy. *Adv Exp Med Biol.* 2025;1480:327–43. https://doi.org/10.1007/978-3-031-92033-2_21
- [27] van Santen S, Kroot JJ, Zijderfeld G, Wiegerinck ET, Spaanderman ME, Swinkels DW. The iron regulatory hormone hepcidin is decreased in pregnancy: a prospective longitudinal study. *Clin Chem Lab Med.* 2013;51(7):1395–401. <https://doi.org/10.1515/cclm-2012-0576>
- [28] Bah A, Pasricha SR, Jallow MW, Sise EA, Wegmuller R, Armitage AE, et al. Serum hepcidin concentrations decline during pregnancy and may identify iron deficiency: analysis of a longitudinal pregnancy cohort in The Gambia. *J Nutr.* 2017;147(6):1131–7. <https://doi.org/10.3945/jn.116.245373>

Related article

1. Preventive effects of sodium hyaluronate combined with pelvic floor neuromuscular electrical stimulation on the intrauterine adhesions in women after abortion

Yanan Sun et al., *Biomol Biomed*, 2023

Supplemental data

The Human Fpn ELISA Kit (AssayGenie, Cat. Code HUES03226, Dublin 2, Ireland) was employed to quantify Fpn concentrations. Standards or samples were added to microplate wells and incubated with a specific antibody. Absorbance was then measured spectrophotometrically at 450 nm $\pm$ 2 nm. A calibration curve was generated through serial dilutions of working solutions, with recommended concentrations of 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.63, 0.31, and 0 μ g/L (the latter serving as a blank). The assay demonstrated a sensitivity of 0.19 μ g/L. Inter-assay coefficients of variation (CV) for low, mid-range, and high-level samples were 5.43%, 5.19%, and 3.14%, respectively, while intra-assay CVs were 6.12%, 4.50%, and 4.35%, respectively. Samples exceeding 20 μ g/L were diluted 1:2, and their concentrations were determined from the standard curve, adjusted by the dilution factor. Hepcidin concentrations were measured using the Hepcidin 25 (bioactive) HS ELISA Kit (DRG, Ref. EIA-5782, Germany). Absorbance was measured spectrophotometrically at 450 nm $\pm$ 10 nm. The calibration curve was established using five standard concentrations: 0, 1, 3, 9, 27, and 81 μ g/L. The assay range was 0.153–81 μ g/L. Analytical sensitivity, determined by subtracting two standard deviations from the mean of 20 replicate analyses of the zero standard, was 0.153 μ g/L. Inter-assay CVs for four samples were 14.4%, 10.5%, 9.5%, and 11.2%, respectively, and intra-assay CVs were 3.8%, 4.1%, 2.2%, and 0.8%, respectively.

Only residual serum aliquots from routine diagnostic tests were utilized in this study. All serum parameters were measured within six months of collection.