

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE „IULIU HAȚIEGANU” CLUJ NAPOCA

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

# Factori predictivi ai Preeclampsiei

---

**Doctorand: Mihaela Daniela Oancea**

---

**Conducător de doctorat : Prof. Dr. Nicolae Costin**



**UMF**  
UNIVERSITATEA DE  
MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
**IULIU HAȚIEGANU**  
CLUJ-NAPOCA

2015

# CUPRINS

<b>INTRODUCERE .....</b>	<b>13</b>
<b>STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII.....</b>	<b>17</b>
<b>1. Preeclampsia – Generalități .....</b>	<b>19</b>
1.1. Terminologie. Clasificare.....	19
1.2. Incidență. Factori de risc .....	20
1.3. Etiopatogeneză.....	22
1.3.1 Etiologie.....	23
1.3.2 Patogeneză.....	27
1.4 Fiziopatologie.....	29
<b>2. Predicția și prevenția preeclampsiei .....</b>	<b>33</b>
2.1 Predicția preeclampsiei .....	33
2.1.1 Introducere .....	33
2.1.2 Principiile testelor de predicție.....	33
2.1.3 Teste asociate cu disfuncția perfuziei placentare/ rezistența vasculară .....	35
2.1.4 Teste asociate cu disfuncția endocrină a unității feto-placentare.....	37
2.1.5 Teste asociate disfuncției renale .....	39
2.1.6 Teste care evaluează disfuncția endotelială și stresul oxidativ.....	40
2.1.7 Teste asociate cu producții derivați de la făt.....	42
2.1.8 Teste combinate .....	42
2.2 Prevenția preeclampsiei.....	43
2.2.1 Dieta saracă în sare .....	43
2.2.2 Suplimentele de calciu.....	43
2.2.3 Suplimentarea cu ulei de pește .....	44
2.2.4 Medicamentele antihipertensive.....	44
2.2.5 Antioxidanții.....	44
2.2.6 Agenții antitrombotici .....	44
<b>CONTRIBUȚIA PERSONALĂ.....</b>	<b>47</b>
<b>1. Ipoteza de lucru/Obiective .....</b>	<b>49</b>
<b>2. Metodologie generală .....</b>	<b>51</b>
<b>3. Studiul 1-Evaluarea circulației utero-placentare prin ecografie Doppler la gravidele cu risc, pentru predicția preeclampsiei .....</b>	<b>55</b>
3.1. Introducere .....	55
3.2. Ipoteza de lucru/Obiective.....	57
3.3. Material și metodă.....	57

3.4	Rezultate.....	61
3.5	Discuții.....	79
3.6	Concluzii .....	83
<b>4.</b>	<b>Studiul 2-Evaluarea valorilor serice ale <math>\beta</math>-hCG și PAPP-A la gravidele cu risc, pentru predicția preeclampsiei.....</b>	<b>85</b>
4.1.	Introducere .....	85
4.2	Ipoteza de lucru/Obiective.....	86
4.3	Material și metodă.....	87
4.4	Rezultate.....	89
4.5	Discuții .....	95
4.6	Concluzii .....	97
<b>5.</b>	<b>Studiul 3-Evaluarea markerilor inflamatori la gravidele cu risc, pentru predicția preeclampsiei.....</b>	<b>99</b>
5.1.	Introducere .....	99
5.2	Ipoteza de lucru/Obiective.....	100
5.3	Material și metodă.....	101
5.4	Rezultate.....	103
5.2	Discuții.....	112
5.3	Concluzii .....	114
<b>6.</b>	<b>Studiul 4-Evaluarea markerilor stresului oxidativ la gravidele cu risc, pentru predicția preeclampsiei.....</b>	<b>1215</b>
6.1	Introducere .....	115
6.2	Ipoteza de lucru/Obiective.....	115
6.3	Material și metodă.....	116
6.4	Rezultate.....	118
6.5	Discuții.....	128
6.6	Concluzii .....	131
<b>7.</b>	<b>Concluzii generale.....</b>	<b>133</b>
<b>8.</b>	<b>Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei.....</b>	<b>135</b>
<b>REFERINȚE</b>	<b>.....</b>	<b>137</b>

Cuvinte cheie: Preeclampsie, predicție, ecografie Doppler, artera uterină,  $\beta$ hCG, PAPP-A, malondialdehida, superoxidismutaza, interleukina 6, hsPCR.

## INTRODUCERE

Recunoscută din timpul lui Hipocrate, preeclampsia a primit peste 100 de denumiri de-a lungul timpului (disgravidie tardivă, gestoză, nefropatie gravidică, sindrom vasculo-renal gravidic). Indiferent de terminologia adoptată, este o afecțiune multisistemică, ce se dezvoltă după săptămâna a 20-a de sarcină, recunoscută clinic prin HTA, cu valori ale TAD > 90 mmHg, asociată cu proteinurie și/sau edeme. Apare de obicei la primipare, gravide cu afecțiuni vasculare sau renale preexistente (HTA cronică, diabet zaharat, afecțiuni renale cronice), antecedente personale sau familiale de preeclampsie, vârsta tânără, obezitate.

Preeclampsia este una dintre cele mai severe complicații ale sarcinii și rămâne la nivel mondial o cauză principală de mortalitate și morbiditate materno-fetală. Prevalența bolii este apreciată la 5-10% din totalul gravidelor, reprezentând cea mai frecventă complicație medicală din cursul sarcinii.

Complicațiile materne determinate de preeclampsie includ: HTA severă, insuficiență renală și hepatică, coagulopatie, sindrom HELLP, eclampsie. Frecvent, preeclampsia coexistă cu RCIU, DPPNI și necesitatea unei nașteri premature declanșată iatrogen, entități ce sunt cauze majore pentru apariția complicațiilor fetale.

În ciuda progreselor înregistrate în înțelegerea patogenezei acestei afecțiuni, abilitatea noastră de a o prezice și preveni, a rămas insuficientă.

În decursul timpului au fost propuse numeroase teste pentru evaluarea riscului de apariție a preeclampsiei, utilizând markeri non-biochimici și biochimici. Până acum, abilitatea acestor teste de a prezice preeclampsia s-a dovedit a fi modestă. Dezavantajele acestora sunt în principal valoarea predictivă scăzută, și în cel de-al doilea rând, evaluarea într-un stadiu când tratamentul preventiv nu mai poate modifica urmările acestei boli.

Din considerentele amintite, studiul nostru a abordat acest domeniu controversat și incomplet elucidat, încercând să aprecieze rolul unor markeri biochimici sau non-biochimici analizați în dinamică, individual sau corobați în predicția dezvoltării preeclampsiei.

## STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

În partea generală se regăsesc două capitole și sub-capitolele aferente, care descriu stadiul actual al cunoașterii în ceea ce privește preeclampsia. Datele furnizate sunt de mare actualitate, regăsite în studii recente cu rezultate promițătoare.

Această parte de generalități a tezei clarifică aspecte legate de terminologie, clasificare, incidență, factori de risc, etiopatogenie și fiziopatologia preeclampsiei. Sub-capitolul de etiopatogenie susține contribuția mai multor factori care conduc la apariția preeclampsiei, cum sunt invazia trofoblastică, factori imunologici, activarea celulelor endoteliale, factori nutritivi și factori genetici. În ceea ce privește patogeneza preeclampsiei, incomplet elucidată până în prezent, sunt incriminate mai multe mecanisme ce vor determina reducerea fluxului sangvin placentar și creșterea presiunii arteriale, cum sunt vasospasmul, activarea celulelor endoteliale, răspunsul presor crescut și eliberarea de prostaglandine, oxid nitric, endoteline și a unor proteine angiogene și antiangiogene. Inițial, acestea reprezintă mecanisme compensatorii, urmând ca apoi să determine manifestări sistemice materne de amploare, cu implicare multiorganică și un spectru ce

variază de la deteriorari clinice neglijabile până la modificări cataclismice, care pot pune în pericol atât viața mamei cât și a fătului.

Cel de-al doilea capitol din partea generală, intitulat „*Predicția și prevenția preeclampsiei*”, aduce în primul rând informații privind predicția preeclampsiei prin utilizarea unor teste asociate cu disfuncția perfuziei placentare, teste asociate cu disfuncția endocrină a unității feto-placentare, teste asociate disfuncției renale, teste care evaluează disfuncția endotelială și stresul oxidativ, teste asociate cu producția derivați de la făt și teste combinate. În al doilea rând, sunt prezentate metode utilizate în prevenția preeclampsiei cum sunt cele igienico-dietetice bazate pe restricții sau suplimentări a unor produși din alimentația gravidei, sau administrarea unui tratament antihipertensiv, antitrombotic sau antioxidant.

Toate aceste elemente incluse în partea generală reprezintă fundamentul teoretic al cercetării științifice efectuate.

## CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

### 1. Ipoteza de lucru/Obiective

Cercetarea propusă în studiul de față, efectuată la gravidele cu risc, în trimestrele I și II de sarcină a fost orientată pe următoarele direcții principale:

- Evaluarea circulației utero-placentare prin ecografie Doppler
- Evaluarea valorilor serice ale  $\beta$  hCG-ului și PAPP-A
- Evaluarea markerilor inflamatori (hs PCR și IL-6)
- Evaluarea markerilor stresului oxidativ (MDA și SOD)

Studiile efectuate se încadrează în principal în domeniul cercetării fundamentale, deoarece am urmărit dobândirea unor cunoștințe noi, precum și verificarea unor ipoteze, modele conceptuale și teorii în ceea ce privește predicția și profilaxia preeclampsiei.

### 2. Metodologia generală

Studiul s-a desfășurat în perioada ianuarie 2011- iulie 2013, în Clinica Obstetrica Ginecologie „DOMINIC STANCA”, b-dul 21 Decembrie 1989, nr.53-55, Cluj Napoca.

Design-ul studiului a fost de tip prospectiv longitudinal, fiind incluse 120 gravide, rasa caucaziană, care prezentau factori de risc pentru apariția preeclampsiei.

**Criteriile de includere** în studiu au fost prezența a cel puțin unul dintre următorii factori de risc: primiparitate; istoric de preeclampsie la sarcinile anterioare; istoric familial de preeclampsie; hipertensiune arterială cronică; afecțiuni renale; diabet zaharat; lupus eritematos sistemic; sindrom antifosfolipidic; trombofilie; antecedente obstetricale (hipotrofie fetală, oligoamionis, mortalitate perinatală, dezlipire prematură de placentă normal inserată); obezitate (IMC > 30 kg/m<sup>2</sup>); vârsta maternă (<18 ani sau >40 ani);

**Criteriile de excludere** stabilite au fost: gravide cu infecții clinic manifeste; tratament recent cu antiinflamatoare nesteroidiene și corticosteroizi (în ultimele 14 zile); boli inflamatorii cronice; sarcină multiplă; anomalii fetale.

Toate pacientele incluse în studiu au semnat consimțământul informat, după care s-a realizat o fișă de lucru (buletin standardizat) care a cuprins următorii parametri: datele antropometrice; antecedente heredo-colaterale; antecedente personale fiziologice și patologice; parametrii obstetricali (gestația, paritatea, data ultimei menstruații, primele mișcări fetale, data probabilă a nașterii, evoluția sarcinilor și nașterilor anterioare); parametri ecografici în trimestrul I (măsurarea lungimii cranio-caudale –CRL, prezența activității

cardiace embrionare, examinarea Doppler la nivelul arterei uterine) și trimestrul II (biometrie fetală -DBP, LF, CC, CA; morfologia fetală; placenta -localizare, grad de maturare Grannum; lichidul amniotic apreciat după criterii cantitative -indice amniotic și calitative; valorile parametrilor Doppler determinați la nivelul următoarelor vase: ambele artere uterine la nivelul crossei; artera ombilicală; artera cerebrală medie); date legate de momentul nașterii (vârsta gestațională la naștere; modalitatea nașterii: spontană sau indusă, operație cezariană; evoluția nașterii: durată, semne de suferință în travaliu); parametri postnatali (greutatea nou-născutului, scor APGAR, aspect clinic de malnutriție fetală, independent de greutatea nou-născutului).

La fiecare pacientă inclusă în studiu s-a recoltat sânge venos atât în trimestrul I cât și în trimestrul II. Sângele a fost centrifugat, iar serul obținut a fost stocat la -20 grade pentru dozările markerilor studiați. Aceste rezultate au fost introduse într-o bază de date care s-a prelucrat statistic.

Toate informațiile referitoare la datele personale ale pacientelor sunt confidențiale și conforme cu normele deontologice în vigoare. Proiectul de studiu a primit aprobarea Comisiei de Etică a Universității de Medicină și Farmacie "Iuliu Hatieganu", Cluj-Napoca.

În cadrul studiului au fost determinați următorii parametri:

- IP și notch-ul protodiastolic la nivelul arterei uterine prin ecografie Doppler efectuată în trimestrul I (11-14 SA) și în trimestrul II de sarcină (20-23 SA)
- IR pe artera ombilicală în trimestrul II de sarcină
- Concentrația serică a  $\beta$ hCG (trimestrul I și II) și PAPP-A (trimestrul I)
- Concentrația serică a hsPCR și IL-6 în trimestrul I și II de sarcină
- Evaluarea markerilor stresului oxidativ (MDA și SOD) în trimestrul I și II de sarcină

Pentru diagnosticul de preeclampsie am utilizat sistemul de clasificare propus de U.S. NMBPEP Working Group 2000 și precedat de AGOC: valori tensionale de cel puțin 140/90 mm Hg (la 2 examinări repetate la interval de minim 6 h și maxim 7 zile), proteinurie mai mare de 30 mg /dl (în 2 probe de urină recoltate la interval de 4-6 h), HTA și proteinuria au apărut după 20 de săptămâni de sarcină la o gravidă normotensivă anterior sarcinii și s-au normalizat până la 12 săptămâni postpartum.

La sfârșitul studiului, pacientele au fost împărțite în două loturi în funcție de evoluția sarcinii:

**Lotul I** - 26 gravide care au dezvoltat preeclampsie: 9 forma severă și 17 forma medie. Dintre cele 9 gravide cu forma severă de preeclampsie, 4 au prezentat și retard de creștere intrauterină a fătului (RCIU).

**Lotul II** - 94 gravide care nu au dezvoltat preeclampsie și au avut o evoluție fiziologică a sarcinii.

#### **Analiza statistică**

S-a utilizat testul t pentru compararea valorilor medii în lotul cu preeclampsie față de lotul martor la variabilele normal distribuite (ex: IP, IR). A fost utilizat testul Mann-Whitney pentru compararea valorilor medii în lotul cu preeclampsie față de lotul martor acolo unde testul t este inadecvat, la variabilele care nu au o distribuție normală (ex: MDA, SOD, bHCG, IL-6, PCR, etc). Modelul logit binar s-a utilizat pentru a aprecia dacă diverse variabile (MDA, SOD, bHCG, IL-6, PCR, MDA, SOD, IP, etc) sunt corelate cu probabilitatea de apariție a preeclampsiei. Notăm  $Y=1$  dacă pacienta are preeclampsie și  $Y=0$  dacă nu. Testul t este folosit pentru studiul semnificativității statistice a coeficienților. Considerăm semnificativ statistic o variabilă dacă valoarea  $p < 0.05$ . Puterea predictivă a funcțiilor utilizate este apreciată prin curba ROC (Receiver Operating Characteristics). Sunt calculate sensibilitatea și specificitatea în punctul de cut-off corespunzător celor mai apropiate valori între sensibilitate și specificitate. Toate prelucrările sunt realizate cu soft-ware-ul STATA 9.1 (StataCorp, 4905 Lakeway Drive, College Station, Texas 77845 USA).

### 3. Studiul 1 - Evaluarea circulației utero-placentare prin ecografie Doppler la gravidele cu risc, pentru predicția preeclampsiei

#### Ipoteza de lucru/Obiective

În studiul de față am încercat să evaluăm rolul examinării circulației utero-placentare prin metoda ecografiei Doppler în predicția apariției preeclampsiei, a complicațiilor acesteia și a afectării fetale.

Obiectivele acestei cercetări au fost evaluarea parametrilor Doppler la nivelul arterei uterine (IP, notch-ul și combinațiile acestora) la gravidele cu risc, în trimestrul I și II de sarcină, cu scopul de a realiza o predicție cât mai precoce a preeclampsiei. Am analizat de asemenea indicii Doppler la nivelul arterei ombilicale și cerebrale medii (IR) în trimestrul II de sarcină pentru aprecierea statusului fetal.

#### Material și metodă

Studiul de față a urmărit caracteristicile circulației placentare prin ecografie Doppler la nivelul arterei uterine în trimestrul I (11-14 SA) și II de sarcină (20-23 SA), moment la care se consideră că al doilea val de invazie trofoblastică s-a încheiat și placenta are caracteristici hemodinamice mature. Parametrul de bază urmărit, a fost indicele de pulsilitate ( $IP=S-D/Medie$ ) și prezența notch-ului bilateral la nivelul arterei uterine. Evaluarea în trimestrul II a fost completată cu examinarea arterelor ombilicală și cerebrală medie, pentru aprecierea stării fetale. La acest nivel s-au analizat parametrii calitativi (flux diastolic nul și „reverse flow”) și cantitativi (indicele de rezistență Pourcelot  $IR=S-D/S$ ).

#### Rezultate

Din lotul total de 120 de gravide luate în studiu, 26 (21.6%) au dezvoltat preeclampsie în evoluția sarcinii. Remarcăm faptul că existența unei patologii vasculare anterioară sarcinii sau a unor accidente obstetricale neexplicate la momentul producerii lor, crește riscul apariției preeclampsiei.

În prima etapă am analizat puterea predictivă a modificărilor Doppler pe artera uterină în trimestrul I de sarcină (11-14 SA).

Din totalul gravidelor luate în studiu, la examinarea Doppler a arterei uterine efectuată în trimestrul I de sarcină, 16.6% (20/120) au avut IP patologic ( $>2,6$ ). Dintre acestea, 26.9% (7/26) au aparținut lotului I, dezvoltând ulterior preeclampsie și 13.8% (13/94) au fost încadrate în lotul II, nedezvoltând această patologie.

Puterea predictivă a valorilor IP în trimestrul I este medie (AUROC=0,6786).

Un alt parametru Doppler examinat la nivelul arterei uterine a fost prezența notch-ului bilateral. La examinarea ecografică din trimestrul I de sarcină, 45.8% (55/120) dintre pacientele din lotul studiat au prezentat această modificare. Dintre acestea, 61.5% (16/26) au dezvoltat preeclampsie în evoluția sarcinii, fiind incluse în lotul I, iar 41.5% (39/94) nu au dezvoltat această patologie și au fost incluse în lotul II.

Analizând modificările globale ale parametrilor Doppler studiați în trimestrul I (IP patologic și notch), remarcăm că din cele 120 de gravide luate în studiu, 63 (52.5%) au prezentat Doppler-ul alterat. Dintre acestea, 17 paciente au aparținut lotului I, reprezentând 65.4% din acesta.

Puterea predictivă a valorilor IP și prezența notch-ului în trimestrul I este ușor mai ridicată (AUROC=0.6825) decât dacă predicția se realizează doar pe baza IP în trimestrul I.

Examinarea Doppler a arterei uterine în trimestrul II de sarcină a evidențiat 22.5% (27/120) paciente cu IP patologic ( $>$  Percentila 95 considerată în acest interval 1.54). Dintre acestea, 53.8% (14/26) gravide au dezvoltat preeclampsie în evoluția sarcinii și au fost incluse în lotul I, iar 13.8% (13/94) nu au dezvoltat această patologie, fiind incluse în lotul II.

Puterea predictivă a valorilor IP în trimestrul II este sensibil mai ridicată decât a celor din trimestrul I (AUROC=0.7641 fata de 0,6786 în trimestrul I).

Al doilea parametru analizat la examinarea Doppler din trimestrul II de sarcină a fost prezența notch-ului bilateral. Din lotul global de gravide examinate, 15.8% (19/120) au prezentat notch bilateral. În evoluția sarcinii 34.6% (9/26) dintre acestea au dezvoltat preeclampsie și au fost incluse în lotul I, iar 10.6% (10/94) nu au dezvoltat această patologie, fiind incluse în lotul II.

Analiza globală a parametrilor Doppler modificați în trimestrul II (IP patologic, notch sau asocierea acestora) a evidențiat că 34.16% (41/120) gravide au prezentat modificările menționate. Dintre acestea, 73.1% (19/26) au dezvoltat preeclampsie și au fost incluse în lotul I, iar 23.4 % (22/94) nu au dezvoltat această patologie.

Puterea predictivă a valorilor conjugate ale IP și notch-ului în trimestrul II este sensibil mai ridicată (AUROC=0.8128) decât cea a valorilor din trimestrul I (AUROC=0.6825).

Corelarea parametrilor Doppler analizați în cele 2 intervale (11-14 SA respectiv 20-23 SA), permite creșterea puterii de predicție a preeclampsiei pe baza modificărilor secvențiale ale acestora.

Examinarea sectorului feto-placentar (artera ombilicală) nu a permis obținerea unei corelații semnificative cu apariția preeclampsiei în sarcină.

Cu toate acestea, examinarea arterei ombilicale și cerebrale medii a fost utilă, fiind aplicată în diagnosticarea și cuantificarea suferinței fetale.

Am analizat în continuare corelarea parametrilor Doppler ombilicali și uterini cu starea nou-născutului cuantificată în scorul APGAR și greutatea la naștere.

Indicii Doppler utilizați au fost cantitativi și calitativi. Parametrii calitativi la nivelul arterei ombilicale au fost patologici în 6 cazuri: am decelat 4 cazuri cu diastolă nulă și 2 situații de "reverse flow". Aceste modificări severe au apărut la sarcini sub 34 SA fiind urmate de o stare fetală perinataă inadecvată.

Parametrul cantitativ analizat a fost indicele de rezistență ( $IR=S-D/S$ ), ale cărui valori au fost raportate la curba Pourcelot.

Caracteristicile circulației ombilicale reprezentate prin IR, se corelează cu starea nou-născutului, putând explica izolat 46.4% din variabilitatea scorului APGAR.

În ceea ce privește greutatea la naștere a feților din sarcinile cu preeclampsie, rezultatele evidențiază o corelație semnificativă statistic a examinării Doppler cu aceasta. Coeficientul de determinare  $R^2$  este 0.4, astfel încât valoarea IR explică, în sarcinile cu preeclampsie, 40% din variabilitatea greutății fetale.

În continuare am analizat modul în care modificările hemodinamice la nivelul versantului matern al circulației placentare influențează starea nou-născutului. Analiza IP măsurat la nivelul arterei uterine arată că în preeclampsie, acesta explică numai 17.1% din variabilitatea scorului APGAR.

Analizând corelația IP uterin cu greutatea la naștere, se constată o dependență cu un  $R^2 = 0.132$ . Deci în acest lot, parametrii hemodinamici sunt responsabili pentru 13.2 % din variabilitatea greutății la naștere.

### **Concluzii**

- Examinarea Doppler a arterei uterine constituie un test de screening non-invaziv eficient pentru apariția preeclampsiei la sarcinile cu risc
- Modificarea secvențială a Dopplerului arterei uterine între trimestrul I și trimestrul II de sarcină poate fi utilă în monitorizarea sarcinilor cu risc de a dezvolta preeclampsie. Pe baza acesteia se poate stratifica și cuantifica riscul apariției preeclampsiei, îmbunătățind valoarea predictivă a evaluării transversale din trimestrul II
- Persistența notch-ului bilateral și constatarea unei valori anormale a IP din primul în al II-lea trimestru au identificat grupul de paciente cu riscul cel mai mare de a dezvolta preeclampsie



- Pacientele la care media IP s-a normalizat între cele 2 trimestre de sarcină și cele la care aceasta s-a alterat, au prezentat un risc intermediar al complicațiilor hipertensive
- Screeningul preeclampsiei prin examinarea Doppler la nivelul arterei uterine este mai eficient în trimestrul II comparativ cu trimestrul I
- Parametrii vasculari uterini sunt cei care se corelează semnificativ cu apariția preeclampsiei, pe când cei fetalii (ombilicali și cerebrali) se modifică mai târziu, când preeclampsie este deja constituită și reflectă răsunetul fetal al modificărilor vasculare
- Examinarea sectorului vascular fetal nu are rol prognostic pentru preeclampsie. Examinarea Doppler a arterei ombilicale permite diagnosticarea suferinței fetale și se corelează semnificativ cu starea fătului la naștere
- Evaluarea Doppler în sarcinile cu preeclampsie permite monitorizarea adecvată a acestora, cu alegerea judicioasă a momentului și căii de naștere, scăderea numărului operațiilor cezariene de urgență pentru suferință fetală și ameliorarea rezultatelor perinatale.

#### **4. Studiul 2 - Evaluarea valorilor serice ale $\beta$ -hCG și PAPP-A la gravidele cu risc, pentru predicția preeclampsiei**

##### **Ipoteza de lucru/obiective**

Scopul acestui studiu a fost determinarea valorilor serice ale PAPP-A și a  $\beta$ -hCG în primul trimestru de sarcină și apoi a  $\beta$ -hCG în trimestrul II, la gravidele care prezentau factori de risc de preeclampsie, pentru evaluarea relevanței lor în predicția aceastei afecțiuni.

Un alt obiectiv al studiului a fost investigarea unei posibile relații între valorile markerilor studiați și severitatea preeclampsiei, evaluată prin valorile TA. De asemenea ne-am propus să evaluăm relația dintre nivelul seric al  $\beta$ -hCG dozat în trimestrul II de sarcină, greutatea și starea fătului la naștere.

Prin intermediul acestui studiu s-ar putea aduce informații suplimentare cu privire la implicarea  $\beta$ -hCG și PAPP-A în etiopatogenia preeclampsiei și s-ar putea deschide oportunități de includere a acestor markeri în protocoalele de screening precoce.

##### **Material și metodă**

Studiul a investigat valorile serice ale  $\beta$ -hCG și PAPP-A în trimestrul I de sarcină (săptămâna 11-14) și ulterior valorile serice ale  $\beta$ -hCG în trimestrul II de sarcină (săptămâna 20-23).

##### **Rezultate**

- Determinarea  $\beta$ -HCG în primul trimestru a prezentat o diferență semnificativă statistic între lotul I și lotul II ( $p=0.029$ )
- Determinarea  $\beta$ -HCG în trimestrul II a arătat o diferență semnificativă statistic între lotul I și lotul II ( $p=0.046$ )
- Determinarea PAPP-A în trimestrul I a evidențiat valori mai mici la pacientele din lotul I (preeclampsie) decât la cele din lotul II (fără preeclampsie), fiind însă semnificative doar la pragul de 10%

Puterea predictivă a valorilor  $\beta$ -hCG din trimestrul I este scăzută (AUROC=0,6671) și nu se poate prezice apariția preeclampsiei doar pe baza acestor valori.

Valoarea  $\beta$ -HCG din trimestrul II nu este semnificativă statistic la prag de 5%, iar coeficientul are semnul așteptat, pozitiv.

Puterea predictivă a valorilor  $\beta$ -HCG în trimestrul II este mai mare (AUROC=0,6978) decât a valorilor din trimestrul I. Totuși, nu se poate prezice apariția preeclampsiei doar pe baza valorilor  $\beta$ -HCG din trimestrul II deoarece predictibilitatea este destul de redusă.

Puterea predictivă a valorilor PAPP-A dozată în trimestrul I de sarcină este medie (AUROC=0,6563).

Puterea predictivă pe baza valorilor conjugate ale  $\beta$ -HCG și PAPP-A în trimestrul I de sarcină (AUROC=0,6894) este mai bună decât a oricărui marker analizat separat.

Încercând să realizăm o corelație între valoarea  $\beta$ hCG determinat în trimestrul II de sarcină și severitatea preeclampsiei, apreciată prin valorile TA, calculul indicelui de regresie  $R^2$  evidențiază că valori mai mari ale  $\beta$ -HCG sunt asociate unor valori mai mari ale TA, fără a fi însă semnificative statistic.

Corelația între valoarea  $\beta$ hCG dozat în trimestrul II de sarcină la pacinetele cu preeclampsie și starea fătului la naștere apreciată prin scor APGAR și greutate fetală ne arată că, în general, valori mai mari ale  $\beta$ -HCG sunt asociate unor valori mai mici ale scorului APGAR și ale greutății, fără a fi însă semnificative statistic.

### **Concluzii**

- Nivelul crescut al  $\beta$ -HCG în trimestrele I și II de sarcină se asociază cu un risc mai mare de a dezvolta preeclampsie;
- Puterea predictivă a valorilor  $\beta$ -HCG în trimestrul II de sarcină este mai mare decât a valorilor din trimestrul I;
- Nivelul scăzut al PAPP-A în trimestrul I de sarcină se asociază cu un risc mai mare de a dezvolta preeclampsie;
- Valoarea conjugată a  $\beta$ -HCG și PAPP-A determinate în trimestrul I de sarcină cresc puterea de predicție a preeclampsiei, studiul oferind doar o eficiență modestă a capacității de predicție;
- Investigații ulterioare ale unor factori adiționali, ce ar putea îmbunătăți rata de predicție, sunt justificate în scopul dezvoltării unor metode mai precise de identificare a unei populații cu risc și inițierea unui protocol de supraveghere adecvat.

## **5. Studiul 3 - Evaluarea markerilor inflamatori la gravidele cu risc, pentru predicția preeclampsiei.**

### **Ipoteza de lucru/Obiective**

Scopul studiului a fost determinarea valorilor serice ale hsPCR și IL 6 în trimestrul I și II de sarcină la gravide ce prezentau factori de risc pentru apariția preeclampsiei și evaluarea relevanței lor în predicția acestei afecțiuni.

Un alt obiectiv al studiului a fost investigarea unei posibile relații între valorile markerilor dozați în trimestrul II și severitatea preeclampsiei, evaluată prin măsurarea TA. De asemenea, ne-am propus să evaluăm relația dintre nivelul seric al IL-6 și hsPCR în trimestrul II, greutatea și starea fătului la naștere.

### **Material și metodă**

Studiul a investigat valorile serice ale hsPCR și IL6 în trimestrul I de sarcină (săptămâna 11-14) și în trimestrul II de sarcină (săptămâna 20-23).

### **Rezultate**

Pacientele cu preeclampsie au prezentat valorile medii și mediane mai mari, atât pentru IL6, cât și pentru hsPCR. Diferențele sunt mai semnificative pentru hsPCR. În trimestrul II valorile sunt semnificativ mai crescute decât în trimestrul I, atât pentru IL6, cât și pentru hsPCR.

Valorile ușor crescute ale IL6 din trimestrul I nu sunt semnificative statistic. Puterea predictivă a valorilor IL6 în trimestrul I este scăzută (AUROC=0,6277).

Valoarea IL6 din trimestrul II este semnificativă statistic la prag de 5%. Puterea predictivă a valorilor IL6 din trimestrul II este doar cu puțin mai mare (AUROC=0,6978) decât a valorilor IL6 din trimestrul I.

Valoarea hsPCR din trimestrul I nu este semnificativă statistic. Puterea predictivă a valorilor hsPCR în trimestrul I este medie (AUROC=0,6998).

Valoarea hsPCR din trimestrul II este semnificativă statistic la prag de 5%. Puterea predictivă a valorilor hsPCR în trimestrul II este ridicată (AUROC=0,7746).

În regresia multiplă, coeficienții pentru IL6- trimestrul I și hsPCR- trimestrul I rămân ne semnificativi statistic. Predictibilitatea preeclampsiei pe baza IL6- trimestrul I și hsPCR în trimestrul I nu este foarte precisă, ceea ce confirmă concluziile stabilite din regresie (AUROC =0.6570).

În regresia multiplă, coeficienții pentru IL6- trimestrul II și hsPCR trimestrul II își păstrează semnificativitatea statistică la prag de 5% și respectiv 10%. Predictibilitatea preeclampsiei pe baza IL6 în trimestrul II și hsPCR în trimestrul II este mai bună decât pe baza acelorași indicatori din trimestrul I (AUROC=0.7123).

În preeclampsie s-a constatat o corelație pozitivă, semnificativă statistic la pragul de 5% atât între concentrația serică a IL-6 și TAS, cât și între concentrația serică a IL-6 și TAD.

Pentru lotul I (preeclampsie) s-a constatat o corelație negativă semnificativă statistic la pragul de 5% între concentrația serică IL-6 și scorul APGAR la naștere și ne semnificativă statistic cu greutatea fetală la naștere.

În preeclampsie s-a constatat o corelație pozitivă semnificativă statistic atât între concentrația serică a hsPCR și TAS ( $p=0.04$ ) cât și între hsPCR și TAD ( $p=0.009$ )

Pentru lotul I (preeclampsie) s-a constatat o corelație negativă ne semnificativă statistic între concentrația serică a hs PCR, indicele APGAR și greutatea fătului la naștere.

### Concluzii

- Preeclampsia reprezintă o exacerbare a unui răspuns inflamator generalizat, prezent încă din trimestrul I de sarcină;
- Rezultatele studiului nostru indică o creștere a nivelului IL-6 în preeclampsie comparativ cu sarcină normală, valori mai mari obținându-se în trimestrul II;
- Concentrația serică a IL-6 reprezintă un marker al severității sindromului preeclamptic, fiind în același timp un predictor de acuratețe al stării fetale la naștere;
- Datele obținute susțin asocierea nivelului crescut al hsPCR cu apariția preeclampsiei, puterea predictivă mai mare având-o valoarea din trimestrul II;
- Concentrația serică a hsPCR dozată în trimestrul II reprezintă un marker al severității sindromului preeclamptic;
- Asocierea celor doi markeri inflamatori studiați are o putere predictivă mai bună pentru preeclampsie în trimestrul II de sarcină;
- Evaluarea markerilor inflamatori în sarcina are implicații complexe în ceea ce privește predicția, screeningul și profilaxia preeclampsiei.

## 6. Studiul 4 - Evaluarea markerilor stresului oxidativ la gravidele cu risc, pentru predicția preeclampsiei

### Ipoteza de lucru/Obiective

Scopul studiului a fost determinarea valorilor serice ale markerilor stresului oxidativ - malondialdehida (MDA) și ale antioxidanților - superoxid dismutaza (SOD) în trimestrele I și II de sarcină la gravidele care prezentau factori de risc pentru apariția preeclampsiei și evaluarea relevanței lor în predicția acestei afecțiuni. Un alt obiectiv al studiului a fost investigarea unei posibile relații între markerii stresului oxidativ și severitatea preeclampsiei, evaluată prin valorile TA. De asemenea ne-am propus să evaluăm relația dintre nivelul seric al MDA și SOD – greutatea și starea fătului la naștere.

Tema propusă încearcă să aducă contribuții cu privire la implicarea stresului oxidativ în patogenia preeclampsiei și să evalueze utilizarea markerilor (MDA și SOD) în predicția preeclampsiei, cu mult înainte de debutul bolii.

### Material și metodă

Studiul a investigat valorile serice ale MDA și SOD în trimestrul I de sarcină (săptămâna 11-14) și în trimestrul II de sarcină (săptămâna 20-23).

### Rezultate

Pacientele care au dezvoltat preeclampsie au prezentat valorile medii și mediane ale MDA mai mari, atât în trimestrul I, cât și în trimestrul II. În trimestrul II însă, valorile sunt mult mai mari, cu valori medii și mediane în jur de 3.50. Valorile SOD sunt semnificativ mai scăzute la pacientele care au dezvoltat preeclampsie, atât în trimestrul I, cât și în trimestrul II.

Valorile ușor crescute ale MDA din trimestrul I sunt semnificative statistic. Semnul pozitiv al coeficientului este cel așteptat. Puterea predictivă a valorilor MDA în trimestrul I este relativ scăzută (AUROC=0,6786).

Valorile ridicate ale MDA din trimestrul II sunt foarte semnificative statistic. Puterea predictivă a valorilor MDA în trimestrul II este ridicată (AUROC=0,8531).

Valorile scăzute ale SOD în trimestrul I sunt semnificative statistic. Puterea predictivă a valorilor SOD în trimestrul I este medie (AUROC=0,7402).

Valoarea SOD din trimestrul II este semnificativă statistic la prag de 5%. Puterea predictivă a valorilor SOD în trimestrul II este ridicată (AUROC=0,8231).

Predictibilitatea preeclampsiei pe baza MDA în trimestrul I și SOD în trimestrul I este bună, dar nu suficient de precisă, AUROC=0.8410.

În regresia multiplă, coeficienții pentru MDA în trimestrul II și SOD în trimestrul II își păstrează semnul coeficienților și rămân foarte semnificativi statistic. Este o premisă bună pentru a încerca o predicție de apariție a preeclampsiei pe baza valorilor lor conjugate.

Corelând valorile serice ale MDA dozată în trimestrul II de sarcină cu severitatea sindromului preeclampsic apreciată prin măsurarea TA, obținem semnul așteptat, pozitiv. În general, valori mai mari ale MDA, sunt asociate unor valori mai mari ale TA, fără a fi semnificative statistic.

Analzând valorile serice ale MDA dozată în trimestrul II de sarcină și parametrii fetalii, obținem o corelație negativă, în general, valori mai mari ale MDA, fiind asociate unor valori mai mici ale scorului APGAR și greutății fetale, fără a fi însă semnificative statistic.

Corelând valorile serice ale SOD dozată în trimestrul II de sarcină cu severitatea sindromului preeclampsic apreciată prin măsurarea TA, obținem semnul așteptat, negativ. În general, valori mai mici ale SOD, sunt asociate unor valori mai mari ale TA, fără a fi semnificative statistic.

Analizând valorile serice ale SOD dozată în trimestrul II de sarcină și parametrii fetalii, obținem o corelație pozitivă, în general valori mai mici ale SOD fiind asociate unor valori mai mici ale scorului APGAR și ale greutății fătului. Aceste corelații nu sunt însă semnificative statistic.

### Concluzii

- Alterarea balanței oxidanți-antioxidanți la pacientele cu risc de a dezvolta preeclampsie indică faptul că stresul oxidativ poate reprezenta un punct de convergență în fiziopatologia acesteia;
- Nivelul crescut al MDA în trimestrul I și mai ales în trimestrul II de sarcină se asociază cu un risc crescut de a dezvolta preeclampsie;
- Nivelul scăzut al SOD în trimestrele I și II de sarcină se corelează cu apariția preeclampsiei, puterea predictivă mai mare având-o valorile din trimestrul II;
- Analiza globală a markerilor stresului oxidativ studiați crește puterea de predicție a preeclampsiei, mai ales în trimestrul II;
- Efectul contrareglator (de diminuare a TA) al antioxidanților, evidențiat la gravidele normotensive, este anihilat de excesul circulant al MDA la pacientele cu preeclampsie.

## 7. Concluzii generale

În urma studiilor efectuate am formulat 11 concluzii generale care sintetizează cele mai importante și relevante rezultate ale cercetării.

## 8. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei

Tematica abordată în cardul prezentei teze de doctorat reprezintă un subiect de mare actualitate pe plan național și internațional, având implicații deosebite privind elucidarea unor concepte legate de aspectele fiziopatologice ale preeclampsiei și elaborarea unor algoritmi de predicție și prevenție a acesteia.

Originalitatea studiului constă în analiza unor parametri variați, care au la bază conceptele existente la ora actuală în etiopatogenia preeclampsiei. Acești biomarkeri sunt analizați individual sau asociat, în trimestrul I și trimestrul II de sarcină, urmărind evoluția lor dinamică. Corelarea parametrilor evaluați în cele 4 studii cu severitatea preeclampsiei sau starea fătului la naștere, este alt element important de originalitate. Rezultatele obținute aduc contribuții valoroase la aprofundarea unor cunoștințe în ceea ce privește etiopatogenia incomplet elucidată a preeclampsiei, indicând modele de cercetare în predicția și prevenția acestei afecțiuni.

Studiul de față deschide oportunitatea combinării mai multor teste, bazate pe concepte fiziopatologice diferite în scopul îmbunătățirii abilității predictive a testelor unice. În acest sens, în vizorul cercetărilor ulterioare este asocierea dintre parametrii Doppler cu markeri biochimici. Această abordare multiparametru este justificată de natura multifactorială a preeclampsiei și complicațiilor acesteia.

De asemenea, pentru a realiza o detecție cât mai precoce a gravidelor cu risc de a dezvolta preeclampsie, care să permită inițierea tratamentului profilactic, ne-am propus să analizăm puterea predictivă globală a markerilor dozați în trimestrul I de sarcină. Implementarea și aprofundarea rezultatelor obținute ar putea conduce la ameliorarea monitorizării sarcinilor cu risc de a dezvolta preeclampsie, și ar putea îmbunătăți prognosticul materno-fetal.

**"IULIU HAȚIEGANU" UNIVERSITY OF MEDICINE AND PHARMACY CLUJ-NAPOCA**

ABSTRACT OF THE DOCTORAL THESIS

# **Predictive factors of preeclampsia**

---

**Doctoral candidate: Mihaela Daniela Oancea**

---

**Doctoral supervisor: Prof. Dr. Nicolae Costin**



**UMF**  
UNIVERSITATEA DE  
MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
IULIU HAȚIEGANU  
CLUJ-NAPOCA

# CONTENTS

<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>13</b>
<b>CURRENT STAGE OF KNOWLEDGE .....</b>	<b>17</b>
1. Preeclampsia – General aspects.....	19
1.1 Terminology. Classification.....	19
1.2 Incidence. Risk factors.....	20
1.3 Etiopathogenesis.....	21
1.3.1 Etiology.....	23
1.3.2 Pathogenesis.....	27
1.4 Pathophysiology.....	29
2. Prediction and prevention of preeclampsia.....	33
2.1 Prediction of preeclampsia.....	33
2.1.1 Introduction.....	33
2.1.2 Principles of predictive tests.....	33
2.1.3 Tests related to placental perfusion dysfunction/vascular resistance.....	35
2.1.4 Tests related to fetoplacental endocrine dysfunction.....	37
2.1.5 Tests related to renal dysfunction.....	39
2.1.6 Tests evaluating endothelial dysfunction and oxidative stress.....	40
2.1.7 Tests related to fetus derived products .....	42
2.1.8 Combined tests.....	42
2.2 Prevention of preeclampsia .....	43
2.2.1 Low salt diet .....	43
2.2.2 Calcium supplements.....	43
2.2.3 Fish oil supplementation.....	44
2.2.4 Antihypertensive drugs .....	44
2.2.5 Antioxidants .....	44
2.2.6 Antithrombotic agents.....	44
2.2.6.1 Low dose aspirin .....	44
2.2.6.2 Low dose aspirin plus heparin .....	44
<b>PERSONAL CONTRIBUTION.....</b>	<b>47</b>
1. Working hypothesis/objectives.....	49
2. General methodology .....	51
3. Evaluation of uteroplacental circulation by Doppler ultrasound in pregnant women at risk, for the prediction of preeclampsia.....	55
3.1. Introduction.....	55

3.2. Working hypothesis/Objectives .....	57
3.3. Material and method .....	57
3.4. Results .....	61
3.5. Discussions.....	79
3.6. Conclusions .....	83
<b>4. Evaluation of serum <math>\beta</math>-hCG and PAPP-A values in pregnant women at risk, for the prediction of preeclampsia.....</b>	<b>85</b>
4.1. Introduction.....	85
4.2. Working hypothesis/Objectives .....	86
4.3. Material and method .....	87
4.4. Results .....	89
4.6. Conclusions .....	97
<b>5. Evaluation of inflammatory markers in pregnant women at risk, for the prediction of preeclampsia.....</b>	<b>99</b>
5.1. Introduction.....	99
5.2. Working hypothesis/Objectives .....	100
5.3. Material and method .....	101
5.4. Results .....	103
5.5. Discussions.....	113
5.6. Conclusions .....	115
<b>6. Evaluation of oxidative stress markers in pregnant women at risk, for the prediction of preeclampsia.....</b>	<b>127</b>
6.1. Introduction.....	117
6.2. Working hypothesis/Objectives .....	117
6.3. Material and method .....	118
6.4. Results .....	120
6.5. Discussions.....	130
6.6. Conclusions .....	132
<b>7. General conclusions .....</b>	<b>135</b>

Key words: preeclampsia, prediction, Doppler ultrasound, uterine artery,  $\beta$ -hCG, PAPP-A, malondialdehyde, superoxide dismutase, interleukin-6, hs-CRP



## INTRODUCTION

Recognized since the time of Hippocrates, preeclampsia has been given more than 100 names during the course of time (late pregnancy disorder, gestosis, nephropathy of pregnancy, vasculorenal syndrome of pregnancy). Regardless of the terminology used, it is a multisystem disorder that develops after 20 weeks of pregnancy, clinically recognized by AHT, with DBP values > 90 mmHg, associated with proteinuria and/or edema. It usually develops in primiparous women, pregnant women with preexisting vascular or renal disorders (chronic AHT, diabetes mellitus, chronic kidney disease), a personal or family history of preeclampsia, young age, obesity.

Preeclampsia is one of the most severe complications of pregnancy and remains a main cause of materno-fetal mortality and morbidity worldwide. The prevalence of the disease is estimated at 5-10% of all pregnant women, representing the most frequent medical complication during pregnancy.

Maternal complications caused by preeclampsia include: severe AHT, kidney and liver failure, coagulopathy, HELLP syndrome, eclampsia. Preeclampsia frequently coexists with IUGR, PDNIP and iatrogenic preterm delivery, which are major causes of fetal complications.

Despite the progress achieved in understanding the pathogenesis of this disorder, our ability to predict and prevent it has remained insufficient.

During the course of time, many tests for the evaluation of the risk of preeclampsia using non-biochemical and biochemical markers have been proposed. So far, the ability of these tests to predict preeclampsia has proved to be modest. Their main disadvantages are a low predictive value, followed by the fact that evaluation is performed at a stage when preventive treatment can no longer influence the consequences of this disease.

For these reasons, our study approached this controversial and incompletely understood area, attempting to dynamically assess the role of some biochemical and non-biochemical markers, alone or correlated with the prediction of the development of preeclampsia.

## CURRENT STAGE OF KNOWLEDGE

The general part includes two chapters with their attendant subchapters, which describe the current stage of knowledge regarding preeclampsia. The data provided are of high current interest and are reported in recent studies with promising results.

This general part of the thesis clarifies aspects related to the terminology, classification, incidence, risk factors, etiopathogenesis and pathophysiology of preeclampsia. The etiopathogenesis subchapter supports the contribution of several factors to the development of preeclampsia, such as trophoblast invasion, immunological factors, endothelial cell activation, nutritional factors and genetic factors. Regarding the incompletely elucidated pathogenesis of preeclampsia, several mechanisms causing a reduction of placental blood flow and an increase of blood pressure are involved, such as vasospasm, endothelial cell activation, increased pressor response, and the release of prostaglandins, nitric oxide, endothelins, as well as angiogenic and anti-angiogenic proteins. Initially, these represent compensatory mechanisms, but they will subsequently induce extensive maternal systemic manifestations, with multiple organ involvement and a spectrum varying from negligible clinical impairments to cataclysmic changes, which can threaten the life of both the mother and the fetus.

The second chapter of the general part, entitled "Prediction and prevention of preeclampsia", provides, in the first place, information regarding the prediction of preeclampsia by using tests related to placental perfusion dysfunction, tests related to fetoplacental endocrine dysfunction, tests related to renal dysfunction, tests evaluating endothelial dysfunction and oxidative stress, tests related to fetus derived

products, and combined tests. Secondly, this chapter presents methods used for the prevention of preeclampsia, such as hygienic-dietary methods based on the restriction or supplementation of some products in the diet of pregnant women, or the administration of antihypertensive, antithrombotic or antioxidant treatment.

All these elements included in the general part are the theoretical basis of the scientific research carried out.

## PERSONAL CONTRIBUTION

### 7. Working hypothesis/Objectives

The research proposed in this thesis, carried out in pregnant women at risk in the first and second trimesters of pregnancy, focused on the following main directions:

- Evaluation of uteroplacental circulation by Doppler ultrasound
- Evaluation of serum  $\beta$ -hCG and PAPP-A values
- Evaluation of inflammatory markers (hs-CRP and IL-6)
- Evaluation of oxidative stress markers (MDA and SOD)

The studies performed by us fall under the fundamental research area, because we aimed to acquire new knowledge, as well as to verify some hypotheses, conceptual models and theories regarding the prediction and prevention of preeclampsia.

### 8. General methodology

The study was carried out in the period January 2011 – July 2013, at the "DOMINIC STANCA" Clinic of Obstetrics and Gynecology, Blvd. 21 Decembrie 1989 no. 53-55, Cluj-Napoca.

This was a prospective longitudinal study, which included 120 Caucasian pregnant women with risk factors for the development of preeclampsia.

**The inclusion criteria** of the study were the presence of at least one of the following risk factors: primiparity; a history of preeclampsia in previous pregnancies; a family history of preeclampsia; chronic arterial hypertension; renal disease; diabetes mellitus; systemic lupus erythematosus; antiphospholipid syndrome; thrombophilia; a history of obstetric disorders (fetal hypotrophy, oligohydramnios, perinatal mortality, premature detachment of the normally inserted placenta); obesity (BMI > 30 kg/m<sup>2</sup>); maternal age (<18 years or >40 years).

**The exclusion criteria** were: pregnant women with clinically manifest infections; recent treatment with nonsteroidal antiinflammatory drugs and corticosteroids (over the past 14 days); chronic inflammatory diseases; multiple pregnancy; fetal abnormalities.

All patients included in the study signed an informed consent, after which a standardized record was developed, which included the following parameters: anthropometric data; family history; personal physiological and pathological history; obstetric parameters (gestation, parity, date of the last menstruation, first fetal movements, probable date of delivery, evolution of previous pregnancies and deliveries); ultrasound parameters in the first trimester (measurement of the cranio-caudal length – CCL, presence of embryonic cardiac activity, uterine artery Doppler examination) and in the second trimester (fetal biometry – DBP, FL, CC, AC; fetal morphology; placenta - location, Grannum grade of placental maturity; amniotic fluid assessed based on quantitative criteria – amniotic index, and qualitative criteria; Doppler parameter values determined in: both uterine arteries at the level of the arch; umbilical artery; middle cerebral artery); data related to delivery (gestational age at delivery; modality of delivery: spontaneous or induced, cesarean section; evolution of delivery: duration, signs of distress during labor); postnatal parameters (weight of the newborn, APGAR score, clinical fetal malnutrition appearance, independent of the weight of the newborn).

Venous blood was collected from each patient included in the study, both in the first trimester and the second trimester. The blood was centrifuged and the serum obtained was stored at -20 degrees for the determination of the studied markers. These results were introduced in a data base that was statistically processed.

All information regarding the patients' personal data is confidential, according to deontological norms in force. The study project was approved by the Ethics Committee of the "Iuliu Hatieganu" University of Medicine and Pharmacy Cluj-Napoca.

The following parameters were determined:

- PI and protodiastolic notch in the uterine artery by Doppler ultrasound performed in the first trimester (11-14 WA) and in the second trimester of pregnancy (20-23 WA)
- RI in the umbilical artery in the second trimester of pregnancy
- Serum  $\beta$ -hCG concentration (first and second trimesters) and PAPP-A concentration (first trimester)
- Serum hs-CRP and IL-6 concentration in the first and second trimesters of pregnancy
- Evaluation of oxidative stress markers (MDA and SOD) in the first and second trimesters of pregnancy

For the diagnosis of preeclampsia, we used the classification system proposed by U.S. NMBPEP Working Group 2000, preceded by AGOC: blood pressure values of at least 140/90 mmHg (on 2 examinations minimum 6 hours and maximum 7 days apart), proteinuria higher than 30 mg/dl (in 2 urine samples collected 4-6 hours apart). AHT and proteinuria occurred after 20 weeks of pregnancy in pregnant women who were normotensive prior to pregnancy and normalized until 12 weeks postpartum.

At the end of the study, the patients were assigned to two groups depending on the pregnancy evolution:

**Group I** - 26 pregnant women who developed preeclampsia: 9 the severe form and 17 the moderate form. Of the 9 pregnant women with severe preeclampsia, 4 also had intrauterine growth restriction (IUGR).

**Group II** - 94 pregnant women who did not develop preeclampsia and had a physiological evolution of pregnancy.

### Statistical analysis

The t test was used to compare the mean values between the preeclamptic group and the control group, for normally distributed variables (e.g.: PI, RI). The Mann-Whitney test was used for the comparison of the mean values between the preeclamptic group and the control group where the t test was inadequate, for variables without a normal distribution (e.g.: MDA, SOD, b-HCG, IL-6, CRP, etc). The binary logit model was used to assess whether different variables (MDA, SOD, b-HCG, IL-6, CRP, MDA, SOD, PI, etc) were correlated with the probability of preeclampsia. We noted  $Y=1$  if the patient had preeclampsia, and  $Y=0$  if the patient did not have preeclampsia. The t test was used to study the statistical significance of coefficients. We considered a variable as statistically significant if  $p$  value  $< 0.05$ . The predictive power of the functions used was evaluated based on the ROC (Receiver Operating Characteristics) curve. Sensitivity and specificity in the cut-off point corresponding to the closest values between sensitivity and specificity were calculated. All processing was performed with the STATA 9.1 software (StataCorp, 4905 Lakeway Drive, College Station, Texas 77845 USA).

## 9. Evaluation of uteroplacental circulation by Doppler ultrasound in pregnant women at risk, for the prediction of preeclampsia

### Working hypothesis/objectives

In this study, we aimed to evaluate the role of the examination of uteroplacental circulation by Doppler ultrasound in the prediction of preeclampsia, its complications and fetal involvement.

The objective of the research was to evaluate Doppler parameters in the uterine artery (PI, notch and their combinations) in pregnant women at risk, in the first and second trimesters of pregnancy, for an early prediction of preeclampsia. We also analyzed Doppler indices in the umbilical artery and the mean cerebral artery (RI) in the second trimester of pregnancy, for the assessment of fetal status.

### Material and method

This study monitored the characteristics of placental circulation by uterine artery Doppler ultrasound in the first trimester (11-14 WA) and in the second trimester of pregnancy (20-23 WA), when the second trophoblast invasion is considered to be completed and the placenta has mature hemodynamic characteristics. The basic parameter monitored was the pulsatility index ( $PI=S-D/\text{mean}$ ) and the presence of bilateral notch in the uterine artery. Evaluation in the second trimester was complemented by the examination of the umbilical and middle cerebral arteries for the assessment of fetal status. At this level, qualitative (absent diastolic flow and reverse flow) and quantitative parameters (Pourcelot resistance index  $RI=S-D/S$ ) were analyzed.

### Results

Of all 120 pregnant women included in the study, 26 (21.6%) developed preeclampsia during pregnancy. It should be mentioned that the presence of vascular pathology prior to pregnancy or the presence of obstetric accidents unexplained at the time of their occurrence increases the risk of preeclampsia.

In the first stage, we analyzed the predictive power of Doppler changes in the uterine artery in the first trimester of pregnancy (11-14 WA).

Of all pregnant women included in the study, on uterine artery Doppler examination in the first trimester of pregnancy, 16.6% (20/120) had a pathological PI ( $>2.6$ ). Of these, 26.9% (7/26) belonged to group I and subsequently developed preeclampsia, and 13.8% (13/94) were assigned to group II and did not develop this pathology.

The predictive power of PI values in the first trimester was moderate (AUROC=0.6786).

Another Doppler parameter examined in the uterine artery was bilateral notch. On ultrasound examination in the first trimester of pregnancy, 45.8% (55/120) of the patients in the studied group had this change. Of these, 61.5% (16/26) developed preeclampsia during the course of pregnancy, being included in group I, and 41.5% (39/94) did not develop this disease and were included in group II.

By analyzing the global changes in Doppler parameters monitored in the first trimester (pathological PI and notch), it was found that of the 120 pregnant women included in the study, 63 (52.5%) had altered Doppler parameters. Of these, 17 patients belonged to group I, representing 65.4% of this group.

The predictive power of PI and notch values in the first trimester was slightly higher (AUROC=0.6825) compared to prediction based on PI alone in the first trimester.

Uterine artery Doppler examination in the second trimester of pregnancy evidenced 22.5% (27/120) patients with a pathological PI ( $>$  the 95th percentile considered in this interval 1.54). Of these, 53.8% (14/26) pregnant women developed preeclampsia during the course of pregnancy and were included in group I, and 13.8% (13/94) did not develop this disease, being included in group II.

The predictive power of PI values in the second trimester was significantly higher compared to those in the first trimester (AUROC=0.7641 compared to 0.6786 in the first trimester).

The second parameter analyzed on Doppler examination in the second trimester of pregnancy was the presence of bilateral notch. Of all examined pregnant women, 15.8% (19/120) had bilateral notch. During the course of pregnancy, 34.6% (9/26) of these developed preeclampsia and were included in group I, and 10.6% (10/94) did not develop this disorder, being included in group II.

The global analysis of altered Doppler parameters in the second trimester (pathological PI, notch or their association) showed that 34.16% (41/120) of the pregnant women had the mentioned alterations. Of these, 73.1% (19/26) developed preeclampsia and were included in group I, and 23.4 % (22/94) did not develop this disorder.

The predictive power of the combined PI and notch values in the second trimester was significantly higher (AUROC=0.8128) compared to values in the first trimester (AUROC=0.6825).

The correlation of Doppler parameters analyzed in the two periods (11-14 WA and 20-23 WA) allowed for an increased ability to predict preeclampsia based on their sequential changes.

The examination of feto-placental circulation (umbilical artery) did not allow to obtain a significant correlation with the development of preeclampsia in pregnancy.

However, the examination of the umbilical and middle cerebral arteries was useful, being applied in the diagnosis and quantification of fetal distress.

Next, we analyzed the correlation of umbilical and uterine Doppler parameters with the status of the newborn, quantified by the APGAR score and birth weight.

The Doppler indices used were quantitative and qualitative. Qualitative parameters at the level of the umbilical artery were pathological in 6 cases: we detected 4 cases with absent diastole and 2 cases with reverse flow. These severe changes occurred in pregnancies less than 34 WA, being followed by an inadequate perinatal fetal status.

The quantitative parameter analyzed was the resistance index ( $RI=S-D/S$ ), whose values were compared to the Pourcelot curve.

The characteristics of umbilical circulation represented by RI were correlated with the status of the newborn and could explain 46.4% of the variability of the APGAR score.

Regarding the birth weight of fetuses of preeclamptic pregnancies, the results evidenced a statistically significant correlation of Doppler examination with this parameter. The coefficient of determination  $R^2$  was 0.4, so that the RI value explained, in preeclamptic pregnancies, 40% of the variability of fetal weight.

Subsequently, we analyzed the way in which hemodynamic changes in maternal placental circulation influenced the status of the newborn. The analysis of PI measured in the uterine artery showed that in preeclampsia, this explained only 17.1% of the variability of the APGAR score.

By analyzing the correlation of the uterine PI with the birth weight, a dependence with an  $R^2 = 0.132$  was found. So, in this group, hemodynamic parameters were responsible for 13.2% of the variability of birth weight.

## Conclusions

- Uterine artery Doppler examination is an effective non-invasive screening test for preeclampsia in pregnancies at risk.
- The sequential change of uterine artery Doppler between the first and second trimester of pregnancy can be useful in the monitoring of pregnancies at risk for developing preeclampsia. Based on it, the risk of preeclampsia can be stratified and quantified, and the predictive value of transversal evaluation in the second trimester of pregnancy can be improved.

- The persistence of bilateral notch and the finding of an abnormal PI value between the first and the second trimester identified the group of patients with the highest risk for preeclampsia.
- Patients in whom the mean PI normalized between the two trimesters of pregnancies and those in whom this was altered had an intermediate risk of hypertensive complications.
- The screening of preeclampsia by uterine artery Doppler examination is more effective in the second trimester compared to the first trimester.
- Uterine vascular parameters significantly correlate with the development of preeclampsia, while fetal (umbilical and cerebral) parameters change later, when preeclampsia is already established, and reflect the fetal vascular alterations.
- The examination of fetal vascular circulation does not have a prognostic role for preeclampsia. Umbilical artery Doppler examination allows the diagnosis of fetal distress and significantly correlates with fetal status at birth.
- Doppler evaluation in preeclamptic pregnancies allows for their adequate monitoring, with the judicious choice of the time and modalities of delivery, the decrease in the number of emergency cesarean sections for fetal distress, and the improvement of perinatal outcomes.

## **10. Evaluation of serum $\beta$ -hCG and PAPP-A values in pregnant women at risk, for the prediction of preeclampsia**

### **Working hypothesis/objectives**

The aim of this study was to determine serum PAPP-A and  $\beta$ -hCG values in the first trimester, and  $\beta$ -hCG values in the second trimester of pregnancy, in pregnant women with risk factors for preeclampsia, for the assessment of their relevance in predicting this disorder.

Another objective of the study was to investigate a potential relationship between the values of the studied markers and the severity of preeclampsia, evaluated based on BP values. We also aimed to assess the correlation of serum  $\beta$ -hCG levels measured in the second trimester of pregnancy with fetal weight and status at birth.

This study might provide additional information about the implication of  $\beta$ -hCG and PAPP-A in the etiopathogenesis of preeclampsia and might open opportunities for including these markers in early screening protocols.

### **Material and method**

The study investigated serum  $\beta$ -hCG and PAPP-A values in the first trimester of pregnancy (weeks 11-14) and subsequently, serum  $\beta$ -hCG values in the second trimester of pregnancy (weeks 20-23).

### **Results**

- The determination of  $\beta$ -hCG in the first trimester evidenced a statistically significant difference between group I and group II ( $p=0.029$ ).
- The determination of  $\beta$ -hCG in the second trimester showed a statistically significant difference between group I and group II ( $p=0.046$ ).
- The determination of PAPP-A in the first trimester evidenced lower values in patients of group I (preeclampsia) compared to those of group II (no preeclampsia), which were significant only at the threshold of 10%.

The predictive power of  $\beta$ -hCG values in the first trimester was low (AUROC=0.6671) and preeclampsia could not be predicted based on these values alone.

The  $\beta$ -hCG value in the second trimester was not statistically significant at the threshold of 5%, and the coefficient had the expected positive sign.

The predictive power of  $\beta$ -hCG values in the second trimester was higher (AUROC=0.6978) than that of values in the first trimester. However, preeclampsia could not be predicted only based on  $\beta$ -hCG values in the second trimester, because predictability was quite reduced.

The predictive power of PAPP-A values measured in the first trimester of pregnancy was moderate (AUROC=0.6563).

The predictive power based on the combined  $\beta$ -hCG and PAPP-A values in the first trimester of pregnancy (AUROC=0.6894) was better compared to any marker analyzed separately.

When trying to establish a correlation between the  $\beta$ -hCG value determined in the second trimester of pregnancy and the severity of preeclampsia, assessed based on BP values, the calculation of the regression index  $R^2$  evidenced the fact that higher  $\beta$ -hCG values were associated with higher BP values, without being statistically significant.

The correlation between the  $\beta$ -hCG value measured in the second trimester of pregnancy in patients with preeclampsia and fetal status at birth evaluated based on the APGAR score and fetal weight showed that higher  $\beta$ -hCG values were generally associated with lower APGAR score and weight values, without being statistically significant.

### Conclusions

- The increased  $\beta$ -hCG levels in the first and second trimesters of pregnancy are associated with a higher risk to develop preeclampsia;
- The predictive power of  $\beta$ -hCG values in the second trimester of pregnancy is higher compared to values in the first trimester;
- The low PAPP-A levels in the first trimester of pregnancy are associated with a higher risk to develop preeclampsia;
- The combined  $\beta$ -hCG and PAPP-A values determined in the first trimester of pregnancy increase the power to predict preeclampsia, the study providing only a modest efficiency of the prediction ability;
- Further investigations of additional factors that might improve the prediction rate are justified in order to develop more accurate methods for the identification of a population at risk and to initiate an adequate monitoring protocol.

## 11. Evaluation of inflammatory markers in pregnant women at risk, for the prediction of preeclampsia

### Working hypothesis/objectives

The aim of the study was to determine serum hs-CRP and IL-6 values in the first and second trimesters of pregnancy in women with risk factors for the development of preeclampsia, and to assess their relevance in predicting this disorder.

Another objective of the study was to investigate a potential relationship between the values of markers determined in the second trimester and the severity of preeclampsia, evaluated based on BP measurement. We also aimed to assess the correlation of serum IL-6 and hs-CRP values in the second trimester with fetal weight and status at birth.

## Material and method

The study investigated serum hs-CRP and IL-6 values in the first trimester of pregnancy (weeks 11-14) and in the second trimester of pregnancy (weeks 20-23).

## Results

Patients with preeclampsia had higher mean and median IL-6 as well as hs-CRP values. The differences were more significant for hs-CRP. In the second trimester, both IL-6 and hs-CRP values were significantly higher than in the first trimester.

The slightly increased IL-6 values in the first trimester were not statistically significant. The predictive power of IL-6 values in the first trimester was low (AUROC=0.6277).

The IL-6 value in the second trimester was statistically significant at the threshold of 5%. The predictive power of IL-6 values in the second trimester was only slightly higher (AUROC=0.6978) than that of IL-6 values in the first trimester of pregnancy.

The hs-CRP value in the first trimester was not statistically significant. The predictive power of hs-CRP values in the first trimester was moderate (AUROC=0.6998).

The hs-CRP value in the second trimester was statistically significant at the threshold of 5%. The predictive power of hs-CRP values in the second trimester was high (AUROC=0.7746).

In multiple regression, the coefficients for first trimester IL-6 and first trimester hs-CRP remained statistically insignificant. The predictability of preeclampsia based on first trimester IL-6 and first trimester hs-CRP was not very accurate, which confirmed the conclusions drawn from regression (AUROC=0.6570).

In multiple regression, the coefficients for second trimester IL-6 and second trimester hs-CRP maintained their statistical significance at the threshold of 5% and 10%, respectively. The predictability of preeclampsia based on IL-6 in the second trimester and hs-CRP in the second trimester was better than based on the same indicators in the first trimester (AUROC=0.7123).

In preeclampsia, a positive, statistically significant correlation at the threshold of 5% was found both between serum IL-6 concentrations and SBP and between serum IL-6 concentrations and DBP.

For group I (preeclamptic), there was a negative, statistically significant correlation at the threshold of 5% between serum IL-6 concentrations and the APGAR score at birth, and a statistically insignificant correlation between serum IL-6 concentrations and fetal weight at birth.

In preeclampsia, a positive, statistically significant correlation was found both between serum hs-CRP concentrations and SBP ( $p=0.04$ ) and between hs-CRP and DBP ( $p=0.009$ ).

For group I (preeclamptic), there was a negative, statistically insignificant correlation of serum hs-CRP concentrations with the APGAR index and fetal weight at birth.

## Conclusions

- Preeclampsia is an exacerbation of a generalized inflammatory response, present as early as the first trimester of pregnancy;
- The results of our study indicate an increase of IL-6 levels in preeclampsia compared to normal pregnancy, higher values being obtained in the second trimester;
- Serum IL-6 concentration is a marker of the severity of preeclampsia syndrome, being at the same time an accurate predictor of fetal status at birth;
- The obtained data support the association of increased hs-CRP values with the development of preeclampsia, second trimester values having a higher predictive power;
- Serum hs-CRP concentrations measured in the second trimester are a marker of the severity of preeclampsia syndrome;



- The association of the two studied inflammatory markers has a better predictive power for preeclampsia in the second trimester of pregnancy;
- The evaluation of inflammatory markers in pregnancy has complex implications for the prediction, screening and prevention of preeclampsia.

## **12. Evaluation of oxidative stress markers in pregnant women at risk, for the prediction of preeclampsia**

### **Working hypothesis/objectives**

The aim of this study was to determine the serum values of oxidative stress markers – malondialdehyde (MDA), and of antioxidants – superoxide dismutase (SOD) in the first and second trimesters of pregnancy in pregnant women with risk factors for preeclampsia, and to assess their relevance in predicting this disorder. Another objective of the study was to investigate a potential relationship between the analyzed oxidative stress markers and the severity of preeclampsia, evaluated based on BP values. We also attempted to assess the correlation of serum MDA and SOD levels with fetal weight and status at birth.

The proposed topic is aimed at contributing to the study of the implication of oxidative stress in the pathogenesis of preeclampsia and at evaluating the use of markers (MDA and SOD) for the prediction of preeclampsia long before the onset of the disease.

### **Material and method**

The study investigated serum MDA and SOD values in the first trimester of pregnancy (weeks 11-14) and in the second trimester of pregnancy (weeks 20-23).

### **Results**

Patients who developed preeclampsia had higher mean and median MDA values both in the first trimester and in the second trimester. However, in the second trimester, the mean and median values were much higher, around 3.50. SOD values were significantly lower in patients who developed preeclampsia, both in the first trimester and in the second trimester.

The slightly increased MDA values in the first trimester were statistically significant. The positive sign of the coefficient was as expected. The predictive power of MDA values in the first trimester was relatively low (AUROC=0.6786).

The high MDA values in the second trimester were highly statistically significant. The predictive power of MDA values in the second trimester was high (AUROC=0.8531).

The low SOD values in the first trimester were statistically significant. The predictive power of SOD values in the first trimester was moderate (AUROC=0.7402).

SOD values in the second trimester were statistically significant at the threshold of 5%. The predictive power of SOD values in the second trimester was high (AUROC=0.8231).

The predictability of preeclampsia based on first trimester MDA and on first trimester SOD was good, but not sufficiently accurate, AUROC=0.8410.

In multiple regression, the coefficients for second trimester MDA and second trimester SOD maintained their sign and remained highly statistically significant. This is a good premise to attempt a prediction of preeclampsia based on their combined values.

By correlating serum MDA values determined in the second trimester of pregnancy with the severity of preeclampsia syndrome assessed based on BP measurement, the expected positive sign was obtained. In general, higher MDA values were associated with higher BP values, without being statistically significant.

By analyzing serum MDA values measured in the second trimester of pregnancy and fetal parameters, a negative correlation was obtained, higher MDA values being generally associated with lower APGAR score and fetal weight values, without being statistically significant.

By correlating serum SOD values determined in the second trimester of pregnancy with the severity of preeclampsia syndrome evaluated based on BP measurement, the expected negative sign was obtained. In general, lower SOD values were associated with higher BP values, without being statistically significant.

By analyzing serum SOD values measured in the second trimester of pregnancy and fetal parameters, a positive correlation was obtained, lower SOD values being generally associated with lower APGAR score and fetal weight values. However, these correlations were not statistically significant.

### **Conclusions**

- The alteration of the oxidant-antioxidant balance in patients at risk for developing preeclampsia indicates the fact that oxidative stress can represent a point of convergence in its pathophysiology;
- The increased MDA level in the first trimester and particularly, in the second trimester of pregnancy is associated with an increased risk to develop preeclampsia;
- The low SOD level in the first and second trimesters of pregnancy is correlated with the development of preeclampsia, second trimester values having a higher predictive power;
- The global analysis of the studied oxidative stress markers increases the power to predict preeclampsia, particularly in the second trimester;
- The counter-regulatory effect (diminution of BP) of antioxidants, evidenced in normotensive pregnant women, is annihilated by the circulating MDA excess in patients with preeclampsia.

## **13. Originality and innovative contributions of the thesis**

The topic approached in this doctoral thesis is a subject of high current interest at national and international level, with special implications for the clarification of concepts related to the pathophysiological aspects of preeclampsia and the development of algorithms for its prediction and prevention.

The originality of this study resides in the analysis of various parameters, based on concepts that currently exist in the etiopathogenesis of preeclampsia. These biomarkers are analyzed individually or in association in the first trimester and the second trimester of pregnancy, and their evolution is dynamically monitored. The correlation of the parameters evaluated in the 4 studies with the severity of preeclampsia or fetal status at birth is another important original element. The results obtained bring valuable contributions to the extension of knowledge regarding the incompletely understood etiopathogenesis of preeclampsia, indicating research models in the prediction and prevention of this disorder.

This study opens the opportunity to combine several tests, based on different pathophysiological concepts, in order to improve the predictive ability of single tests. In this sense, further studies will focus on the association between Doppler parameters and biochemical markers. This multiparametric approach is justified by the multifactorial nature of preeclampsia and its complications.

Also, for an early detection of pregnant women at risk for developing preeclampsia, which could allow the initiation of prophylactic treatment, we aimed to analyze the overall predictive power of markers determined in the first trimester of pregnancy. The implementation and development of the results obtained might lead to improvements in the monitoring of pregnancies at risk for developing preeclampsia, as well as to the amelioration of materno-fetal prognosis.