

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE DIN CRAIOVA

ȘCOALA DOCTORALĂ

TEZĂ DE DOCTORAT

REZUMAT

**ASPECTE CLINICE, HISTOPATOLOGICE, IMUNOHISTOCHEMICE ȘI
IMAGISTICE ALE GRAVIDELOR CU ȘI FĂRĂ TROMBOFILIE EREDITARĂ**

CONDUCĂTOR ȘTIINȚIFIC:

Prof. Univ. Dr. Nicolae CERNEA

STUDENT DOCTORAND:

Janina-Georgiana NACEA

CRAIOVA

2019

CUPRINS

I. STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	3
I.1. Introducere.....	3
I.2. Trombofilia ereditară.....	3
I.3. Caracteristici histopatologice și imunohistochimice placentare	3
I.4. Ultrasonografia Doppler.....	4
I.5. Tratatamentul trombofiliilor.....	4
II. CONTRIBUȚII PERSONALE.....	5
II.1. Obiectivele studiului.....	5
II.2. Metodologie.....	5
III. REZULTATE.	6
IV. DISCUȚII.....	10
V. CONCLUZII.....	10
VI. BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ.....	11

Cuvinte cheie: trombofilie, histopatologie, imunohistochimie, heparină, preeclampsie.

I. STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

I.1. Introducere

Trombofilia (TPh) este definită ca predispoziția inadecvată în a forma cheaguri. Prevalența acestei condiții este în continuă creștere, peste 50% dintre persoanele cu un episod trombotic de cauză necunoscută prezintă modificări ale factorilor de coagulare [Varga EA, 2012]. Hemostaza prezintă clasic o cale intrinsecă și o cale extrinsecă, ce au ca moment comun generarea factorului X și a unui complex enzimatic (protrombinaza) cu rol în activarea protrombinei și formarea trombinei [Handin RI 2004; Cucuianu M 1994]. În timpul sarcinii, gravida suferă schimbări semnificative fiziologice și anatomice ce ajută la găzduirea și hrănirea fătului, modificări declanșate imediat după concepție. Acestea au ca rezultat schimbări apărute la nivelul tuturor sistemelor și organelor materne, reversibile la scurt timp după naștere [Soma-Pillay P, 2016]. Apare starea de hipercoagulabilitate, hemodiluție, creșterea volumului plasmatic, scăderea hemoglobinei, hematocritului și a eritrocitelor, a numărului de trombocite (sub 150.000/mm³) în special în al II-lea și al III-lea trimestru de sarcină [Barini R, 2013].

I.2. Trombofilia ereditară

Persoanele cu TPh ereditară au fie o incapacitate a organismului de a produce cantități adecvate de proteine normale, fie au capacitatea de a produce proteine anormale. Cele mai comune trombofilii ereditare sunt [Kupferminc MJ, 1999]: mutația G20210A a genei protrombinei (PII), mutația factorului V Leiden (FVL), deficitul de antitrombină (AT III), mutația C677T sau A1298T a genei metiltetrahidrofolat reductaza (MTHFR), deficitul de proteină C (PC) și S (PS), mutația genei inhibitorului activatorului plasminogenului (PAI-1). Atât în TPh dobândită cât și în cea ereditară, echilibrul dintre activitatea procoagulantă și anticoagulantă a factorilor plasmatici este perturbat [Armstrong EM, 2014]. Riscul de tromboză în timpul sarcinii poate fi crescut la femeile cu trombofilie moștenită sau dobândită [Folkeringa N, 2007], fiind și mai mare la cele cu defecte multiple ale factorilor de coagulare [Varga EA, 2008]. Nu toate trombofiliile conferă un risc de tromboză în timpul sarcinii.

Preeclampsia (PE) severă, dezlîpirea prematură de placentă normal inserată (DPPNI), restricția de creștere intrauterină (RCIU) și decesul fetal intrauterin, reprezintă cele mai de temut complicații apărute în timpul sarcinii, cu un risc adițional de morbiditate și mortalitate materno fetale în cazul preexistenței TPh. Cauzele acestora rămân de multe ori incomplet elucidate. Toate aceste condiții pot fi asociate cu o vascularizație placentară anormală sau cu tulburări ale hemostazei ce pot duce la o circulație placentară inadecvată [Sohlberg S, 2014; Ariel I, 2004].

I.3. Caracteristici histopatologice și imunohistochimice placentare

Fiziologic, aspectul microscopic al placentei mature, este reprezentat de o masă bogată în vilozități coriale de dimensiuni diferite, ce conțin stromă și multiple vase de sânge. În condiții patologice, precum RCIU sau PE, se descriu la examenul histologic leziuni placentare precum: infarctul placentar unic sau multiplu, necroza fibrinoidă, nodulii sincițiali, vilozități avasculare, vilozități stem dilatate acompaniate de stază, degenerescența trofoblastică, calcificări, hemoragii intervilitare. Poate să apară o dezvoltare anormală a placentei, putând influența circulația materno fetală prin hipoperfuzie, cu reducerea fluxului sanguin la nivelul arterelor uterine și cu repercusiuni importante asupra fătului [Dekker GA, 1998].

Testarea imunohistochimică a cunoscut o dezvoltare la nivel global, reprezentând unul dintre testele importante utilizate în depistarea mult mai specifică a anumitor caracteristici clinice sau histologice. Cele mai importante modificări placentare țin de vascularizație. În identificarea tulburărilor de perfuzie placentară intră anticorpii monoclonali anti CD34. Odată cu instalarea ischemiei se instalează și stresul oxidativ identificat cel mai specific cu ajutorul anticorpilor monoclonali anti- Factor inductor de hipoxie-1 (HIF-1) alfa și anti sintetaza oxidului nitric endotelial (eNOS) și nu numai [Siemerink MJ, 2012; Zimna A, 2015; Förstermann U, 2011].

I.4. Ultrasonografia Doppler

Metoda noninvazivă cel mai des folosită pentru a obține informații importante pe parcursul sarcinii. Reprezintă un instrument util pentru monitorizarea și depistarea complicațiilor perinatale precum PE, RCIU, MIUF, dar și a malformațiilor fetale [Salomon LJ, 2010] și pentru depistarea insuficienței uteroplacentare [Khong ŞL, 2015]. Indicații pentru utilizarea acestui tip de examinare sunt [Bhide A, 2013]: mișcări fetale reduse, antecedente de RCIU sau prematuritate, MIUF, PE, fumatul matern sau consumul ilicit de droguri, diabetul gestațional, DPPNI. Indicii Doppler (IP, IR) de la nivelul arterelor uterine sunt astfel calculați pentru a depista precoce eventuale complicații obstetricale.

I.5. Tratamentul trombofiliei

Până în prezent, există multe recomandări privind utilizarea anticoagulantelor în timpul sarcinii, dar nu toate sunt corecte și documentate. Heparinele (enoxaparină, dalteparină, tinzaparină sau molecule anti-factor Xa - danaparoid) sunt cele mai utilizate anticoagulante datorită imposibilității de a traversa placentă. Heparina nefracționată, fiind și cea care produce cele mai multe complicații [Christiansen OB, 2005]. Antivitaminele k, nu sunt recomandate în timpul sarcinii din cauza pasajului placentar și a efectelor teratogene.

II. CONTRIBUȚII PERSONALE

II.1. Obiectiv

Obiectivul principal al acestei cercetări, a fost acela de a stabili o corelație între TPh ereditară (risc ridicat sau scăzut de tromboză) și modificările histopatologice și/sau imunohistochimice întâlnite la nivelul țesutului placentar, prin studiul clinic, genetic, histologic, imunohistochimic și ecografic la gravidele purtătoare ale unei mutații a factorilor de coagulare.

II.2. Metodologie

Am efectuat inițial un studiu retrospectiv, pentru alegerea grupului de studiu, prin analiza foilor de observație, registrelor de naștere și bazelor de date electronice ale celor două clinici, în perioada ianuarie 2013 - decembrie 2016. Ne-am propus ulterior un studiu prospectiv pe acest lot de pacienți, în perioada ianuarie 2017 - decembrie 2018, ce a inclus pacientele din Clinicile de Obstetrică și Ginecologie ale Spitalului Filantropia și Spitalul Județean de Urgență din Craiova. Studiul a fost aprobat de Comisia de etică a Universității de Medicină și Farmacie din Craiova.

Cercetarea a fost împărțită în 4 studii: **Studiul clinico-demografic**, ce are ca scop identificarea factorilor de risc pentru fiecare pacientă în parte; **Studiul genetic**, util în identificarea mutațiilor factorilor de coagulare specifice fiecărei paciente și corelarea acestora cu factorii de risc preexistenți; **Studiul histopatologic și imunohistochimic**, studiul cel mai important ce a avut la bază depistarea unor leziuni placentare specifice fiecărui tip de TPh; **Studiul ultrasonografic**, ce are ca scop urmărirea în dinamică a fiecărei paciente și evaluarea răspunsului la terapia anticoagulantă și identificarea precoce a unor complicații obstetricale.

Lotul de studiu a fost alcătuit din 90 de femei cauziene, nefumătoare, cu istoric de antecedente obstetricale sau trombotice și care nu au beneficiat de testarea pentru mutațiile genetice ale factorilor de coagulare și al căror țesut placentar de la prima sarcină să fie disponibil. Dintr-un total de 18.000 de nașteri, 1.562 nu au îndeplinit criteriile de selecție, un număr de paciente 1.128 fiind deja testate genetic pentru depistarea mutațiilor factorilor de coagulare. 120 de paciente au obținut o nouă sarcină în perioada ianuarie 2017 și decembrie 2018. În final, după consilierea corespunzătoare, 30 de paciente au refuzat să participe la studiu. Prin urmare, lotul final de studiu a inclus 90 de paciente.

După naștere, țesutul placentar obținut a fost fixat imediat în soluție de formol neutru 10% pentru o perioadă de 24 de ore, prelucrat și inclus în parafină în Clinica de anatomie patologică a Spitalului Municipal Filantropia Craiova și a Spitalului Clinic Județean de

Urgentă. Acesta au fost ulterior prelucrat în ‘Centrul pentru studii de morfologie microscopică și imunologie’ al UMF, Craiova, prin tehnici suplimentare de colorare, după ce a fost obținut acordul informat al tuturor femeilor incluse în studiu. Au fost folosite: colorația clasică morfologică Hematoxilină eozină (HE), colorația tricromic Goldner - Szeckeli, pentru a identifica specific fibrele de colagen, colorate în verde și Periodic acid Schiff -hematoxilină (PAS) pentru a identifica glicozaminoglicanii, colorați în roz.

Ulterior țesuturile placentare au fost investigate prin analiza IHC: anticorpul monoclonal anti- CD34 ce ne-a permis să identificăm vasele de sânge din țesutul placentar. Anticorpul anti oxid nitric endotelial (eNOS) și Anticorpul anti factor inductor de hipoxie (HIF-1) alfa, cu rol important în hipoxie.

Gravidele au fost investigate imagistic și urmărite în dinamică în TI, TII și TIII până la naștere, sau mai des în funcție de modificările apărute. Ca și repere de referință au fost luate în calcul: IP, IR, NOTCH-ul protodiastolic, percentilele specifice pentru greutate și vârstă gestațională.

III. REZULTATE

Studiului clinico-demografic

Toate cele 90 de paciente din eșantionul studiat, au prezentat un istoric personal de cel puțin o complicație obstetricală sau trombotică: PE, RCIU, pierderi recurente de sarcină precoce sau tardive, MIUF, DPPNI, antecedente personale de tromboză precum IMA, TEV sau AVC. S-a evidențiat o incidență relativ crescută a avorturilor spontane în primul trimestru atât în cazul pacientelor cu TPh (65%) cât și la cele fără o mutație a factorilor de coagulare (70%), fără a se nota o semnificație statistică ($P=0,709$), respectiv ($P=0,299$).

Studiul genetic

Din punct de vedere al caracteristicilor genetice, lotul de studiu a fost împărțit în **grupul A**, alcătuit din 5 paciente cu trombofilie cu risc crescut (5,5%) și 35 de paciente cu TPh cu risc scăzut (39%) și în **grupul B**, alcătuit din 50 de gravide ale căror teste de trombofilie au fost negative (55,5%). Se observă o prevalență relativ scăzută a TPh cu risc crescut, 5,5% (5 cazuri din 90) dintre paciente au prezentat mutație homozigotă a FVL sau dublu heterozigotă FVL/PII. În grupul cu TPh cu risc scăzut, 23 de paciente au prezentat mutații ale genelor MTHFR și PAI-1 atât ca status dublu heterozigot, homozigot sau hetero/homozigot. 10 paciente prezentând mutație a FVL ca status heterozigot și 2 cazuri din cele 90, mutație heterozigotă a PII.

Studiului histopatologic

A putut evidenția, diferențe importante între placentele paciențele cu TPh cu risc crescut și ale pacientelor cu TPh cu risc scăzut sau TPh-. La toate pacientele cu TPh cu risc crescut au predominat infarctele placentare multiple (Figura I) și noduli sincițiali (+++). În cazul pacientelor cu TPh cu risc scăzut, modificările placentare patologice au putut fi evidențiate la 40% dintre acestea, cu intensitate mai scăzută sau au fost întâlnite strict focal. Au fost descoperite tot la acest grup și necroza fibrinoidă (+), infarctul placentar unic, nodulii sincițiali (+++) cu caracter localizat, la nivelul zonelor ischemice. Aceste leziuni au fost descrise la mai puțin de 30% dintre pacientele TPh- (grupul B). La 60% din cazuri, examenul HP convențional a relevat aspecte compatibile cu placentă normală.

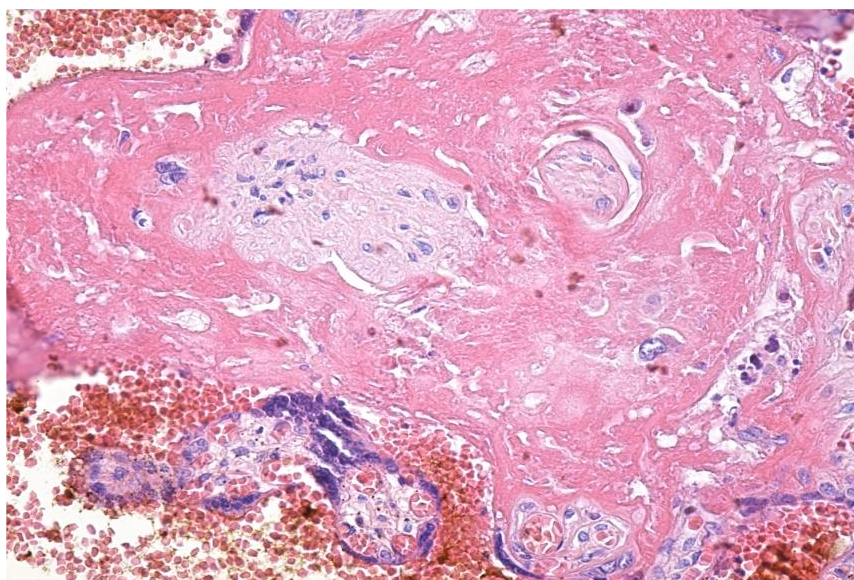


Figura I. Examen histopatologic; Infarct placentar multiplu la o pacientă cu trombofilie cu risc crescut.

Studiul imunohistochimic

Imunohistochimia a fost utilizată pentru a evidenția mai specific leziunile întâlnite la examenul histologic și pentru a stabili un tipar între acestea și testele pentru trombofilie.

O expresie CD34 (+) și chiar CD34 (-) cu zone mari de necroză fibrinoidă (+++) a fost observată la 100% din pacientele cu TPh cu risc crescut, la sub 40% din pacientele cu TPh cu risc scăzut și cu TPh-. Imunoreactivitatea CD34 (+++) în schimb a fost notată la 3 paciente (60%) cu TPh cu risc crescut, la 6 paciente (17,1%) cu TPh cu risc scăzut și la 7 paciente (14%) cu TPh-.

O imunoexpresie crescută a factorului indus de hipoxie 1 (HIF-1) alfa (+++) (Figura II) a fost întâlnită la 100% din cazurile cu TPh cu risc crescut, la 14% dintre pacientele cu TPh cu risc scăzut și la 12% dintre pacientele cu TPh-.

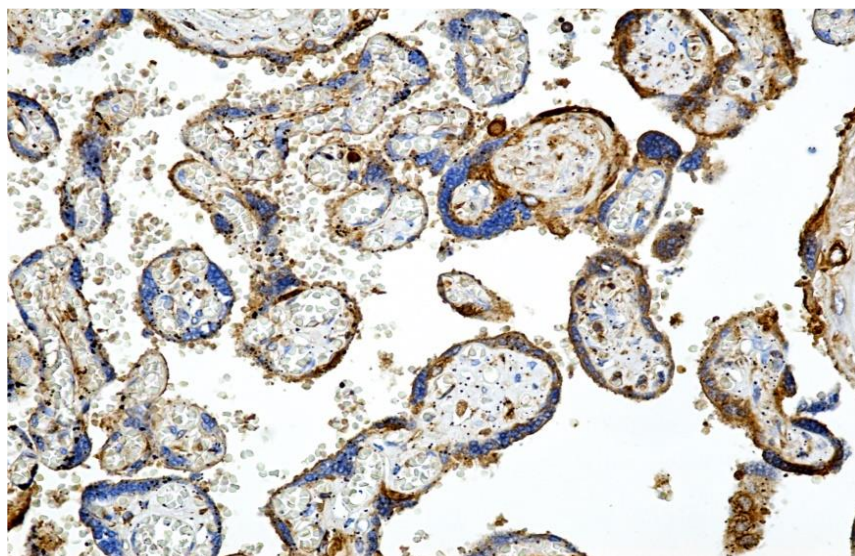


Figura II. Examen imunohistochimic; Imunoexpresie HIF crescută la o pacientă cu trombofilie cu risc crescut.

Prin corelarea expresiei markerilor imunohistochimici și testele genetice, o semnificație statistică se poate observa în cazul imunoexpresiei HIF (+++), eNOS (+++) dar și CD34 (-)/(+) cu $p < 0,05$. Nu s-a putut evidenția o semnificație statistică în cazul corelării dintre testele genetice și imunoexpresia markerilor HIF (-), eNOS (-) dar și CD 34 (+++) cu $p > 0,05$.

Studiului ultrasonografic

Evoluția ultrasonografică a pacientelor cu TPh cu risc crescut în tratament cu LMWH a fost una favorabilă, fără modificări pe parcursul gestației, la naștere sau postpartum. O singură pacientă din acest grup a prezentat o formă ușoară de PE. La 5 paciente cu TPh cu risc scăzut, ultrasonografia Doppler a putut evidenția în special în TIII o menținere crescută a valorilor IR și IP și prezența incizurii protodiastolice (notch-ului). Modificările Doppler au fost raportate la nomogramele specifice, evidențiind o percentilă sub 10% la o pacientă cu mutație heterozigotă a FVL și sub 5% la o pacientă cu mutație heterozigotă a PII. Restul de 3 paciente au dezvoltat preeclampsie severă TA 160/90mmhg respectiv 170/100/mm3. În rândul pacientelor fără TPh, 4 au prezentat RCIU, cu percentile sub 10% pentru vârsta gestațională și 2 PE severă.

Evoluția sarcinii în prezența sau absența terapiei cu LMWH.

În cazul pacientelor cu risc crescut, în tratament anticoagulant, riscul de a dezvolta PE este de 0,29 (OR 4; CI 95% 0,374-42,801), mult mai mic față de pacientele TPh- unde riscul este de 1,5 ori mai mare (OR 0,64; CI 95% 0,123-3,400) și de 0,66 (OR 1,545; CI 95% 0,294-8,121) la pacientele cu TPh cu risc scăzut.

	Risc relativ	Coeficientul de încredere 95%		
		OR	min	Max
TPh cu risc crescut	,294	4,000	,374	42,801
TPh cu risc scăzut	,667	1,545	,294	8,121
TPh-	1,500	,647	,123	3,400
N valid de cazuri	90			

Tabel I: Riscul relativ și rata de probabilitate de a dezvolta preeclampsie (PE) la o nouă sarcină; OR- odds ratio/raportul cotelor; TPh –trombofilie.

Riscul de a dezvolta RCIU este de 1,33 ori mai mare (OR 0,735; CI 95% 0,127-4,241) la pacientele cu trombofilie cu risc scăzut și de 0.75 (OR 1,360; CI 95% 0,236-7,845) la cele fără TPh. Analizând evoluția sarcinilor, se pare că nu există diferențe majore între pacientele purtătoare ale unei trombofilii cu risc scăzut și pacientele fără TPh, astfel că ponderea complicațiilor obstetricale dezvoltate a fost asemănătoare între aceste două grupe de paciente. Evoluția următoarei sarcinii este una favorabilă astfel din totalitatea pacientelor incluse în studiu doar 6 paciente au dezvoltat RCIU cu greutate la naștere sub 2500 de grame, comparativ cu restul cazurilor al căror făt a prezentat greutate la naștere peste 2500 de grame.

IV. DISCUȚII

Rezultatele acestui studiu pot explica parțial fiziopatologia trombofiliei asociată cu leziunilor placentare. Astfel o mutație genetică severă a factorilor de coagulare produce un efect trombogen la nivelul vaselor placentare, cu o incidență ridicată a infarctului multiplu și necrozei fibrinoide. Mai mult decât atât, există de asemenea, tulburări de perfuzie placentară cu instalarea stresului oxidativ. Acest lucru favorizează stimularea factorilor antiangiogenici, cu vasoconstricție locală și hipoxie, producând o tulburare a dezvoltării fetale normale. După instalarea hipoxiei și vasoconstricției, se produce reflex o eliberare de oxid nitric la nivelul vasului afectat. Secundar are loc o vasodilatație urmată de relaxarea celulelor musculare netede. Aceste mecanisme au fost de

asemenea citate recent la pacientele cu complicații obstetricale [Aouache R, 2018; Förstermann U, 2011; Kay HH, 2006; Sultana Z, 2017; Marinoni E, 1997]. Nu au fost evidențiate în prezent sau în trecut publicații care să încerce să demonstreze o asociere între trombofilie și IHC la nivel placentar, motiv pentru care este nevoie de studii suplimentare pe loturi mari de paciente.

V. CONCLUZII

Obiectivele studiului au fost atinse prin analiza datelor clinico demografice, genetice, HP, IHC și prin monitorizarea atentă ultrasonografică a evoluției sarcinii în prezența sau în absența unei terapii anticoagulante. Conform rezultatelor noastre preliminare, TPh cu risc scăzut nu prezintă modificări clinice, HP sau IHC în plus față de cele observate la pacientele fără TPh, cel mai probabil deoarece acestea apar ca urmare a altor cauze și nu datorită trombofiliei. Ca puncte forte menționăm, un protocol strict standardizat în analiza țesuturilor placentare și în managementul sarcinii. În opinia noastră, la pacienții cu complicații anterioare obstetricale și/sau trombotice, ar trebui investigate inițial placentele prin intermediul tehnicilor HP și IHC. Putem specula că această abordare ar fi mai eficientă din punct de vedere al costurilor și nu numai, în comparație cu testarea TPh extinsă la populațiile mari. Următorul pas ar fi testarea pacientelor selectiv, pentru mutațiile factorilor de coagulare, doar în momentul în care la examenele HP și IHC au fost întâlnite: infarcte placentare multiple, necroza fibrinoidă (+++), nodulii sincițiali (+++) în asociere cu o imunoexpresie CD34 (-)/(+), HIF-1 (+++) și eNOS (+++). În acest fel o proporție mult mai mare de pacienți va fi găsită ca având TPh cu risc crescut.

VI. BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ:

1. Aouache R, Biquard L, Vaiman D, Miralles F. Oxidative Stress in Preeclampsia and Placental Diseases. *Int J Mol Sci.* 2018, 19(5) pii: E1496.
2. Ariel I, Anteby E, Hamani Y, Redline, RW. Placental pathology in fetal thrombophilia. *Hum Pathol.* 2004; 35, 729-733.
3. Armstrong EM, Bellone JM, Hornsby LB, Treadway S, Phillippe HM. Acquired Thrombophilia. *J Pharm Pract.* 2014 Jun; 27(3):234-42.
4. Barini R, Bizzache J-A, Couto E, Nomura ML, Soligo AG, Nelly IM. Main Types of Clinical Appearance of Thrombophilic States During Pregnancy – Target Groups for Thrombophilia Testing. *Intechopen.* In: Petar Ivanov (Eds), *Pregnancy Thrombophilia.* InTech. London. 2013, 39-66.

5. Bhide A, Acharya G, Bilardo CM, Brezinka C, Cafici D, Hernandez-Andrade E, Kalache K, Kingdom J, Kiserud T, Lee W, Lees C, Leung KY, Malinger G, Mari G, Prefumo F, Sepulveda W, Trudinger B. SUOG Practice Guidelines: use of Doppler ultrasonography in obstetrics. *Ultrasound. Obstet Gynecol* 2013; 41: 233–239.
6. Christiansen OB, Nybo Andersen AM, Bosch E, Daya S, Delves PJ, Hviid TV, Kuttah WH, Laird SM, Li TC, van der Ven K. Evidence-based investigations and treatments of recurrent pregnancy loss. *Fertil Steril.* 2005; 83(4):821-39.
7. Cucuianu M. Trif I. Cucuianu A. Hemostaza-biochimie, fiziopatologie, clinică. Ed. Dacia, Cluj Napoca. 1994; 15-24; 129-190.
8. Dekker GA, Sibai BM: Etiology and pathophysiology of preeclampsia Current concepts. *AJOG Review. Am J Obstet Gynecol.* 1998, 179: 1359-1375.
9. Folkeringa N, Brouwer JL, Korteweg FJ, et al. High risk of pregnancy-related venous thromboembolism in women with multiple thrombophilic defects. *Br J Haematol* 2007; 138:110.
10. Förstermann U, Sessa WC. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J.* 2011; 33(7):829–837.
11. Handin RI. Tulburări ale hemostazei. In *Harrison: Principiile medicinei interne.* Ed. Teora, București. 2004; 802-821.
12. Kay HH, Tsoi S, Grindle K, Magness RR. Markers of oxidative stress în placental villi exposed to ethanol. *J. Șoc Gynecol Investig.* 2006; 13 (2):118–121.
13. Khong ŞL, Kane SC, Brennecke SP, da Silva Costa F. Dis Markers. First-trimester uterine artery Doppler analysis in the prediction of later pregnancy complications. 2015; 679730.
14. Kupferminc MJ, Eldor A, Steinman N, Many A, Bar-Am A, Jaffa A, Fait G, Lessing JB. Increased frequency of genetic thrombophilia in women with complications of pregnancy. *N Engl J Med.* 1999; 340(1):9-13.
15. Marinoni E, Di Iorio R, Scucchi L, Cosmi EV. Immunohistochemical localization of nitric oxide synthase in human fetal membranes. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 1997; 76(8):725-7.
16. Salomon LJ, Alfirevic Z, Berghella V, Bilardo C, Hernandez-Andrade E, Johnsen ŞL, Kalache K, Leung KY, Malinger G, Munoz H, Prefumo F, Toi A, Lee W. Practice guidelines for performance of the routine mid-trimester fetal ultrasound scan. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2010; 37 (1): 116–126.

17. Siemerink MJ, Klaassen I, Vogels IM, Griffioen AW, Van Noorden CJ, Schlingemann RO. CD34 marks angiogenic tip cells in human vascular endothelial cell cultures. *Angiogenesis*. 2012; 15(1):151-63.
18. Sohlberg S, Mulic-Lutvica A, Lindgren P, Ortiz-Nieto F, Wikstrom AK, Wikstrom J. Placental perfusion in normal pregnancy and early and late preeclampsia: a magnetic resonance imaging study. *Placenta*. 2014; 35(3):202–206.
19. Soma-Pillay P, Nelson-Piercy C, Tolppanen H, Mebazaa A. Physiological changes in pregnancy. *Cardiovasc J Afr*. 2016; 27(2):89-94.
20. Sultana Z, Maiti K, Aitken J, Morris J, Dedman L, Smith R. Oxidative stress, placental ageing-related pathologies and adverse pregnancy outcomes. *Am J Reprod Immunol*. 2017; 77(5).
21. Varga EA, Kerlin BA, Wurster MW. Social and ethical controversies in thrombophilia testing and update on genetic risk factors for venous thromboembolism. *Semin Thromb Hemost*. 2008 Sep; 34(6):549-61.
22. Zimna A and Kurpisz M. Hypoxia-inducible factor-1 in physiological and pathophysiological angiogenesis: applications and therapies. *BioMed Research International*. 2015; 549412.