

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE CRAIOVA

ȘCOALA DOCTORALĂ

TEZĂ DE DOCTORAT

REZUMAT

**POTENȚIALI BIOMARKERI ANGIOGENICI PENTRU
PREDICȚIA PREECLAMPSIEI ÎN SARCINILE CU RISC
CRESCUT**

CONDUCĂTOR DE DOCTORAT:

Prof.univ.dr. NOVAC LILIANA

STUDENT-DOCTORAND:

SAID K AMIRA LIVIA (MOLDOVEANU)

CRAIOVA – 2019

CUPRINS

INTRODUCERE.....	2
I. STADIUL CUNOAȘTERII.....	2
CAPITOLUL I. Date de epidemiologie ale preeclampsiei.....	2
CAPITOLUL II. Rolul placentei în fiziopatologia preeclampsiei.....	3
CAPITOLUL III. Factori pro-angiogenici și anti-angiogenici în preeclampsie.....	5
CAPITOLUL IV. Utilizarea biomarkerilor angiogenici în predicția și managementul preeclampsiei.....	8
II. CONTRIBUȚII PERSONALE.....	9
Studiul clinico-statistic. Analiza biostatistică a loturilor de studiu.....	10
1. Caracteristici socio-demografice si factori de risc.....	10
2. Comorbidități materne.....	11
3. Examinarea ecografică în trimestrul II de sarcină.....	11
4. Examinarea ecografică în trimestrul III de sarcină.....	13
5. Nașterea si nou-nascutul.....	14
6. Studiul imunologic. Biomarkeri ai angiogenezei în PE.....	15
Concluzii generale.....	16
Referințe selective.....	18

Cuvinte cheie: PE, velocimetrie Doppler, biomerkeri angiogeneză

INTRODUCERE

Depistarea precoce a preeclampsiei este foarte importantă pentru obstetricieni, deoarece această patologie obstetricală este asociată cu o morbiditate și o mortalitate perinatală semnificativă.

Dovezile de până acum sugerează un dezechilibru între factorii proangiogenici [factorul de creștere endotelial vascular (VEGF) și factorul de creștere placentar (PIGF)] și factorii antiangiogenici [receptorul VEGF solubil-1 (sVEGFR-1, denumit de asemenea sFlt1)] care participă la fiziopatologia PE. Într-adevăr, pacientele cu PE au concentrații plasmatice mai mari ale sFlt1 și concentrații plasmatice mai scăzute de PIGF decât pacientele cu sarcini normale. Aceste diferențe au fost observate înainte de manifestarea clinică a PE²⁵.

Descoperirea și investigarea acestor factori angiogenici ar putea caracteriza mediatorii patogenici importanți ai preeclampsiei sau chiar cauza disfuncțiilor placentare.

STADIUL CUNOAȘTERII

CAPITOLUL I

DATE DE EPIDEMIOLOGIE ALE PREECLAMPSIEI

Preeclampsia este o complicație apărută în timpul sarcinii și este, de asemenea, o cauză pentru aproximativ 10% -15% din cazurile de morbiditate și mortalitate maternă, cum ar fi cele care implică bolile cardiovasculare și cerebrovasculare, insuficiența hepatică și renală, abrupție placentară, coagularea intravasculară diseminată și hemoliza, nivelurile ridicate ale enzimelor hepatice și un nivel scăzut al trombocitelor, în cadrul sindromului HELLP²⁶.

Preeclampsia reprezintă o problemă globală de sănătate având o importanță tot mai mare în cadrul sanatații materno-fetale^{5,25}. Preeclampsia complică 2% -8% din toate sarcinile, contribuie la 15% din nașterile premature și contribuie la 9% și 26% din decesele materne la nivel mondial²⁸. În cea mai recentă anchetă privind mortalitatea maternă din Marea Britanie, 22 din 107 decese directe materne din 2006 până în 2008 au fost legate de preeclampsie și eclampsie³.

Tulburările hipertensive din sarcina determina aproape 18% din totalul deceselor materne la nivel mondial, cu aproximativ 62.000 până la 77.000 de decese pe an¹⁴.

Se estimează că aproximativ 50.000 de femei mor anual în lume din cauza preeclampsiei. Majoritatea deceselor în țările în curs de dezvoltare se produc datorita eclampsiei, în timp ce în țările dezvoltate, cauzele cele mai frecvente sunt complicațiile preeclampsiei⁵.

În plus, morbiditatea și mortalitatea neonatală sunt crescute în această afecțiune, deoarece pot determina o restricție a creșterii fetale cu oligohidramnios, naștere prematură, greutate mică la naștere, asfixie severă la naștere, nașterea unui făt mort și moarte fetală intrapartum. Fiziopatologia nu este încă cunoscută¹⁵.

Aproximativ 12-25% din restricția de creștere a fătului, precum și 15-20% din toate nașterile premature sunt atribuite preeclampsiei, complicațiile asociate prematurității fiind substanțiale, inclusiv decesele neonatale și morbiditatea neonatală gravă pe termen lung⁵. În ciuda progreselor medicale majore, singurul remediu cunoscut pentru preeclampsie rămâne nașterea fătului și evacuarea placentei.

CAPITOLUL II

ROLUL PLACENTEI ÎN FIZIOPATOLOGIA PREECLAMPSIEI

În ultimul deceniu, definiția preeclampsiei a fost revizuită deoarece mecanismele care stau la baza acestei boli au evoluat spectaculos. În ceea ce privește definiția, mai multe grupuri au contestat definiția clasică a preeclampsiei de acum o jumătate de secol și anume: hipertensiunea de novo, debutul proteinuriei și disfuncția hepatică după jumătatea sarcinii, motivată de descoperirea biomarkerilor adiționali ai preeclampsiei. În acest context, mai multe studii au sugerat modernizarea definiției prin încorporarea biomarkerilor-cheie, de origine placentară sau vasculară, incluzând factorul de creștere al placentei (placental growth factor - PIGF) și factorii antiangiogenici cum ar fi tirozin kinaza-1 asemanatoare FMS solubilă (soluble fms-like tyrosine kinase-1-sFLT1) sau endoglina solubilă (soluble endoglin-sENG) în diagnosticul preeclampsiei și riscul de apariție a bolii și chiar în predicția complicațiilor^{2,23}.

Factori de risc pentru preeclampsie. Factorii de risc pentru preeclampsie includ, de asemenea, preeclampsia din antecedente, prima sarcină, obezitatea, hipertensiunea pregestatională, vârsta înaintată și diabetul zaharat. Este, de asemenea, mai frecventă în sarcina

multifetală, unde incidența preeclampsiei este crescută la sarcinile gemelare în comparație cu sarcinile cu un singur fat, cu o creștere a procentelor de la 6 la 31%¹.

În ciuda asocierii dintre acești factori de risc și preeclampsie, mecanismele prin care acești factori cresc acest risc sunt în mare măsură necunoscuți. Cu toate acestea, dezechilibrul factorilor angiogenetici și coagulării pot explica de ce anumite populații sunt expuse riscului. Cu toate acestea, în majoritatea cazurilor, preeclampsia este imprevizibilă¹².

Preeclampsia apare adesea la femei tinere la prima lor sarcină. Această observație a fost atribuită unui mecanism imunitar, deoarece sistemul imunitar matern dezvoltă toleranță la alloantigenii paterni după expunerea la lichidul seminal și/sau la sperma.

Rolul placentei. Ischemia placentară în PE. Este cunoscut acum faptul că preeclampsia cu debut precoce și cea cu debut tardiv prezintă fiziopatologii diferite, avansând astfel înțelegerea sindromului. La debutul precoce, denumit și preeclampsie placentară (<34 săptămâni), există dovezi clare privind reducerea conversiei arterei spiralate la începutul sarcinii. Acest lucru este asociat cu malperfuzia placentară și patologia moleculară și gravă a țesuturilor placentare.

În preeclampsia cu debut tardiv (>34 săptămâni), numită și preeclampsia maternă, există puține dovezi că conversia arterială redusă și perfuzia placentară sunt menținute sau chiar crescute²⁷. Astfel, există un minim de stres placentar, astfel încât secreția de sFLT și de factor de creștere placentară (PIGF) de către placentă să fie aproape de intervalul normal. Aceste cazuri, care reprezintă aproape 80% din preeclampsie, se consideră că se datorează unei predispoziții materne genetice la boala cardiovasculară, care se manifestă ca preeclampsie în timpul testului de stres al sarcinii.

Ar trebui să se țină cont de faptul că eșecul transformării fiziologice a arterelor spiralate nu este specific pentru preeclampsie și nici suficient pentru a o induce, deoarece un astfel de eșec a fost observat și în alte sindroame obstetricale, inclusiv avortul spontan, restricția de creștere fetală intrauterină (RCIU), moartea fetală, travaliul prematur și ruptura prematură a membranelor. Mecanismele responsabile de eșecul transformării fiziologice a arterelor spiralate nu au fost pe deplin elucidate⁴.

Stresul oxidativ. Se știe de mult timp că sarcina este o stare de stres oxidativ și că aceasta este în continuare crescută în primul, al doilea și al treilea trimestru de sarcină, rezultând complicații, cum ar fi PE și nașterea prematură, diabetul zaharat, nașterea cu fat mort, mai ales la

gravidele cu obezitate²⁰. Cu toate acestea, o relație cauză-efect între stresul oxidativ crescut și rezultatele adverse ale sarcinii rămâne încă să fie dovedită definitiv.

Factori imunologici și inflamatori în PE. Una dintre cele mai vechi și mai persistente teorii despre originea preeclampsiei este că preeclampsia este o tulburare a imunității și a inflamației. Trofoblastul fetal este considerat ca un alloantigen și mama reacționează la acesta și implementează un răspuns inflamator sistemic, de grad scăzut²⁸.

Răspunsul inflamator inițial în timpul primului trimestru ar putea fi datorat unei interacțiuni între celulele imunitare deciduale și celulele trofoblastice, iar un răspuns inflamator secundar în timpul celui de-al doilea și al treilea trimestru ar putea fi datorat microparticulelor de sincitiotrofoblast eliberate în sistemul vascular al mamei³⁰.

Factorii imunitari de reglementare contrabalansează un răspuns imunitar hiperactiv pentru a preveni inflamația cronică și răspunsurile mediate de anticorpi care au ca rezultat injurii și daune. În PE, acest echilibru este compromis, ducând la activarea cronică a imunității, inflamației și producției de autoanticorpi.

Preeclampsia este asociată cu activarea imunității cronice, caracterizată prin niveluri persistente mai ridicate de citokine proinflamatorii și factori imunoregulatori diminuați. Acest dezechilibru imunitar promovează o stare inflamatorie în timpul PE.

CAPITOLUL III

FACTORI PRO-ANGIOGENICI ȘI ANTI-ANGIOGENICI ÎN PREECLAMPSIE

Angiogeneza defectuoasă a fost mult timp considerată o cale către preeclampsie, iar cercetările riguroase au arătat că o stare anti-angiogenică este implicată în patogenia preeclampsiei.

Pentru a realiza remodelarea spiralată în timpul sarcinii normale, multe molecule incluzând substanțe vasoactive, factori de creștere, molecule de adeziune și proteaze sunt secretate de placentă și vase^{17,24}. Printre cele mai cunoscute substanțe reprezentative în acest context se numără factorul de creștere vasculară endotelial (VEGF), sFlt1, PlGF și endoglină.

sFlt-1 acționează ca un receptor capcană pentru VEGF și PlGF, determinând scăderea proteinei VEGF biodisponibile. Acest lucru duce la disfuncții endoteliale vasculare materne, provocând vasoconstricție aberantă, modificări ale funcției renale și, în cele din urmă, hipertensiune⁶.

Factorii angiogenici. sFlt-1. O varietate de molecule sunt eliberate, dar printre ele, factorii antiangiogeni și autoimuni / inflamatori au cea mai mare importanță.

Studiile privind reglarea sFlt-1 în culturi celulare și în țesutul placentar in vitro au demonstrat că sFlt-1 este eliberat din vilozitățile placentare și celulele trofoblastice, ca răspuns la presiuni de oxigen reduse, similare celor observate la o placentă ischemică^{9,21}. sFlt-1 este un receptor solubil în circulație atât pentru VEGF, cât și pentru PlGF, care, atunci când este crescută în plasma maternă, conduce la un VEGF mai puțin circulant și la PlGF liber, împiedicând astfel disponibilitatea lor de a stimula angiogeneza și de a menține integritatea endoteliului^{21,32}.

Factorii angiogenici. Endotelina. Există dovezi tot mai mari care sugerează un rol important pentru endotelina-1 (ET-1) în patofiziologia preeclampsiei. În primul rând, caracterizat acum douăzeci de ani, ET-1 a fost identificată ca un vasoconstrictor puternic derivat din endoteliu, cel mai puternic vasoconstrictor cunoscut⁸.

Factorii angiogenici. Oxidul nitric. S-a afirmat că deficitul de NO în timpul preeclampsiei ar putea fi implicat în procesul bolii. Dar reducerea producției de NO în timpul preeclampsiei, este controversată. O mare parte din incertitudine provine din dificultatea evaluării directe a activității sistemului NO într-un cadru clinic .

Factori pro-angiogenici. Familia VEGF. Factorul de creștere endotelial vascular (Vascular endothelial growth factor - VEGF) și factorul de creștere a plachetelor (platelet growth factor - PlGF) joacă un rol-cheie în angiogeneza placentară și se crede că sunt secretați de celulele trofoblastice. Atât valorile crescute, cât și cele reduse ale VEGF în circulația maternă au fost raportate în PE⁷.

VEGF este o familie de proteine dimerice înrudite structural ai căror membri includ VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D și PlGF. Funcția VEGF este de a promova supraviețuirea, migrarea și diferențierea celulelor endoteliale, precum și medierea permeabilității vasculare. VEGF joacă un rol foarte important în patogenia preeclampsiei. Deși VEGF total s-a dovedit a fi modest crescut în preeclampsie, VEGF este legat de sFlt-1 în preeclampsie. Similar cu PlGF, aceasta conduce la niveluri scăzute în circulație a VEGF liber sau bioactiv în timpul preeclampsiei active³¹.

Factori pro-angiogenici. PlGF. S-a demonstrat că PlGF este diminuat în serul preeclamptic. Acest lucru este cel mai probabil datorită legării sale cu nivele ridicate de sFlt-1 circulante, mai degrabă decât scăderea producției de PlGF de către placenta preeclamptică¹⁹.

Într-un studiu mare, randomizat, controlat¹⁶, nivelurile serice ale PIGF la 21-32 săptămâni de gestație au fost mai mici în preeclampsia cu debut precoce (<37 săptămâni) față de cea cu debut tardiv, în preeclampsia severă față de cea ușoară și în preeclampsie asociată cu un fat SGA mai degrabă decât un copil cu vârsta adecvată pentru vârsta de gestație (appropriate-size-for-gestational-age - AGA).

Factori anti-angiogenici. sFlt-1. Receptorul solubil, sFlt1, acționează ca un antagonist al VEGF și al PIGF, prin legarea și sechestrarea acestor factori de creștere în interacțiunea cu receptorii Flt1 și Flk1¹⁹. Ulterior, s-a constatat că sFlt1 a fost crescut cu săptămâni înainte de preeclampsia evidentă din punct de vedere clinic, susținând un rol în patogenie și redând speranța pentru un predictor al preeclampsiei.

sFlt-1 este capabil să blocheze efectele VEGF prin inhibarea interacțiunii cu receptorii săi. În mod similar, sFlt-1 inhibă, de asemenea, factorul de creștere placentar (PIGF), membru al familiei de factori de creștere VEGF, care este produs în principal de placentă.

Ceea ce rămâne neclar, totuși, sunt mecanismele specifice care conduc la producția excesivă de sFlt-1 de către placentă, rolul jucat de sFlt-1 în dezvoltarea placentară normală și pseudovasculogeneza și relația dintre sFlt-1, PIGF și VEGF și factorii de risc cunoscuți pentru preeclampsie. La femeile cu preeclampsie, concentrațiile sFlt-1 sunt mai mari la cazurile cu debut precoce (înainte de 37 de săptămâni de gestație), boală mai severă și nou-nascuți mici pentru vârsta gestațională¹⁶.

Dezechilibrul dintre starea pro-angiogenă și anti-angiogenă în PE. Există din ce în ce mai multe dovezi care sugerează că un dezechilibru între factorii pro-angiogeni și anti-angiogeni sunt responsabili pentru efectele patofiziologice observate în PE și că acestea apar înainte ca semnele clinice să devină aparente¹⁸. sFlt1 antagonizează atât VEGF cât și PIGF prin legarea lor în circulație și prevenirea interacțiunii cu receptorii lor endogeni¹³.

Prin urmare, supraexpresia sFlt1 este o caracteristică cheie care leagă disfuncția placentară și boala endotelială. PIGF este, de asemenea, un important factor care contribuie la disfuncția endotelială, deși rolul său fiziologic este mai puțin înțeles.

CAPITOLUL IV

UTILIZAREA BIOMARKERILOR ANGIOGENICI ÎN PREDICȚIA ȘI MANAGEMENTUL PREECLAMPSIEI

În ultimii ani, un număr mare de dovezi susțin că starea insuficienței placentare declanșează un dezechilibru al eliberării placentare a factorilor de reglare a angiogenezei în circulația maternă, caracterizată prin concentrații crescute de factori anti-angiogenici cum ar fi tirozin kinaza 1 (sFlt-1, denumit și sVEGFR-1) și concentrații scăzute de factori pro-angiogenici, cum ar fi factorul de creștere placentară (PIGF), care sunt implicați direct într-o proporție substanțială a manifestărilor clinice asociate cu disfuncția placentară, spectrul formelor cele mai severe și precoce¹⁰.

În mod normal, sFlt-1 începe să crească după 30-32 săptămâni de sarcină și PIGF începe să scadă după 30 săptămâni de sarcină¹¹.

Modificările ambilor markeri, sFlt-1 și PIGF, sunt observate încă din trimestrul II al sarcinii. Acest lucru permite utilizarea raportului sFlt-1/PIGF pentru diagnosticarea și predicția PE. De fapt, creșterea raportului sFlt-1/PIGF a fost detectat în a doua jumătate a sarcinii la femeile diagnosticate cu PE, iar dovezile limitate arată că acesta este ridicat la femeile care dezvoltă alte afecțiuni legate de placentă, cum ar fi RCIU și nașterea cu fat mort. Mai mult, aceste modificări sunt mai pronunțate în boala cu debut precoce și se corelează bine cu severitatea afecțiunii²⁹.

Cu toate acestea, starea anti-angiogenă nu duce întotdeauna la dezvoltarea sindromului matern al PE. Motivele pentru acest lucru sunt încă neclare, dar este posibil ca PE să se dezvolte odată ce se atinge un prag individual de dezechilibru angiogenic. Este necesară o combinație de insulte endoteliale suficient de mari și prelungite, împreună cu o sensibilitate maternă constituțională individual la acest efect.

Astfel, raportul crescut al sFlt-1/PIGF se pare că reflectă îndeaproape patologia de bază a placentei ineficiente și a ischemiei placentare și este considerată a fi un biomarker promițător pentru predicția, diagnosticul și prognosticul bolii.

Analiza raportului sFlt-1/PIGF este în prezent disponibilă pentru utilizare clinică și a fost de asemenea recomandată recent (în 2016) de către National Institute for Clinical Excellence (NICE) pentru a exclude PE la pacientele care prezintă suspiciunea de boală²².

CONTRIBUȚII PERSONALE

ANALIZA BIOSTATISTICĂ A LOTURILOR DE STUDIU

Studiul prospectiv efectuat a cuprins un lot de 106 gravide studiate în perioada octombrie 2016 –martie 2019. Studiul s-a desfășurat în cadrul Spitalului Clinic Obstetrica-Ginecologie Polizu - INSMC, București, iar probele au fost prelucate în cadrul Laboratorului Medical Cytogenomic.

Cele 106 gravide selectionate din totalul gravidelor internate, au reprezentat 82 gravide cu preeclampsie internate în clinicile menționate și un lot de 24 gravide cu o evoluție normală a sarcinii, considerat ca lot martor, care au îndeplinit aceleași criterii de includere ca și gravidele cu preeclampsie. Sarcinile normale nu au avut complicații medicale sau obstetricale și au născut un copil de peste 2500 g la termen.

Preeclampsia am definit-o în conformitate cu criteriile Societății Internaționale pentru Studiul Hipertensiunii Arteriale în timpul sarcinii (ISSHP- International Society for the Study of Hypertension in Pregnancy) ca: tensiunea arterială sistolică și diastolică mai mare de 140 și 90 mmHg, respectiv, la minim două măsurători consecutive, cu un decalaj de cel puțin 6 ore, valori care apar după a 20-a săptămână de gestație.

Notiunea de hipertensiunea arterială gestațională (HTAG) am folosit-o pentru a descrie cazurile care prezentau o $TAs > 140$ mmHg, o $TAd > 90$ mmHg, fără proteinurie, care a apărut după a 20-a săptămână de gestație, la o femeie anterior normotensivă.

Măsurătorile TA au fost efectuate conform unui protocol standard și TAM (în mmHg) a fost calculată folosind ecuația:

$$TAM = (TAs + 2 \times TAd)/3$$

Proteinuria a fost definită ca o excreție de 300 mg de proteine într-o colecție de urină de 24 de ore sau două rezultate ale testelor dipstick 2+ (100 mg pe decilitru), valorile înregistrate la distanță de cel puțin 4 ore, fără dovezi ale infecției de tract urinar.

1. Caracteristicile socio-demografice

Vârsta maternă. Vârsta femeilor incluse în studiu s-a distribuit non-gaussian ($p=0,002$). Atât gravidele care fac parte din lotul cu preeclampsie, cât și cele din lotul martor au avut vârstă medie de 31 ani, cu o minimă de 18 ani și o maximă de 41 ani. Vârsta femeilor care au participat la studiu nu a diferit semnificativ între cele două loturi (test Mann Whitney $U=960,50$; $p=0,859$).

Nivelul socio-economic. Nivelul socio-economic scăzut matern este un factor puternic de risc pentru preeclampsie. 19,51% dintre femeile cu PE au avut un status socio-economic scăzut, 9,76% mediu și 70,73% ridicat. Dintre femeile fără PE, 83,33% au avut un nivel socio-economic mediu și 16,67% un nivel socio-economic ridicat. Riscul de apariție al PE la femeile cu nivel socio-economic mediu a fost semnificativ mai mic față de femeile cu nivel socio-economic ridicat și scăzut ($OR=0,02$; $p<0,001$). Frecvența apariției PE a fost semnificativ statistic mai mare ($p=0,020$) la femeile cu status socio-economic scăzut.

Distribuția participantelor la studiu în funcție de statusul socio-economic și prezența HTAG a fost semnificativ diferită ($p=0,010$). Frecvența apariției HTAG nu a diferit semnificativ ($p=0,386$) la femeile cu status socio-economic scăzut față de femeile cu nivel socio-economic ridicat și mediu.

Statusul educațional. Distribuția participantelor la studiu în funcție de statusul educațional și prezența PE a fost diferită semnificativ statistic ($p=0,008$). Riscul de apariție al PE la femeile cu nivel educațional ridicat a fost de 0,35 ori mai mic față de celelalte participante la studiu ($OR=0,35$; $p=0,039$). Riscul de apariție al PE la femeile cu nivel educațional mediu a fost nesemnificativ mai scăzut față de celelalte participante la studiu ($OR=0,67$; $p=0,468$). Frecvența apariției PE este semnificativ statistic mai mare ($p=0,001$) la femeile cu nivel educațional scăzut. Concluzionăm că un nivel relativ scăzut al educației este asociat cu un risc mai mare de PE.

Distribuția participantelor la studiu în funcție de statusul educațional și prezența HTAG nu a diferit semnificativ statistic ($p=0,605$).

Factori de risc

Numărul de avorturi anterioare. Indiferent de tipul de avort prezent în antecedente, distribuția participantelor la studiu nu a fost semnificativ statistic diferită ($p=0,358$) în funcție de numărul avorturilor din antecedente la cele două loturi studiate (cu/fără pre-eclampsie).

Numărul de nașteri anterioare. Frecvența numărului de nașteri în rândul participantelor la studiu a fost semnificativ statistic diferită ($p=0,048$) în funcție de prezența preeclampsiei.

PE la sarcinile anterioare. In studiul nostru, frecvența de apariție a PE la sarcinile anterioare nu a fost semnificativ diferită între cele două loturi studiate ($p=0,112$), ceea ce este în concordanță cu studiile din literatura de specialitate care arata procente diferite de recurență. Dintre cele 43 de gravide cu nașteri în antecedente, 8 au avut PE la sarcinile anterioare, toate aparținând lotului cu PE în prezent. Frecvența de apariție a PE în sarcinile anterioare a fost semnificativ diferită între cele două loturi studiate ($\chi^2=5,265$; $p=0,021$).

HTA cronică în antecedente. Distribuția participantelor la studiu în funcție de prezența HTA cronică nu a fost semnificativ diferită ($p=0,020$) la lotul cu PE comparativ cu lotul martor. Rata de preeclampsie suprapusă de 19,51% observată în studiul nostru este în concordanță cu cea raportată în alte studii, variind de la 17% la 34,9%.

2. Comorbidități materne

Diabet zaharat. Distribuția participantelor la studiu în funcție de prezența diabetului zaharat a fost semnificativ diferită ($p=0,001$) la lotul cu PE comparativ cu lotul martor, ceea ce este în concordanță cu studiile din literatura.

Statusul ponderal pre-sarcină. In studiul nostru, IMC-ul înainte de sarcină a avut o distribuție non-gaussiană ($p<0,001$). IMC-ul pre-sarcină la femeile cu preeclampsie a fost semnificativ statistic (test Mann Whitney $U=167,50$; $p<0,001$), mai mare comparativ cu cele din lotul martor. Mediana IMC-ului pre-sarcină la lotul cu preeclampsie a fost de 26,5, minima de 22,30, maxima de 50,00, percentila 25 este la 23,4, iar percentila 75 la 32,62 kg/mp. Frecvența HTAG la femeile supraponderale și obeze a fost semnificativ statistic mai mare ($p<0,001$) comparativ cu femeile cu status ponderal normal. IMC-ul în sarcină la femeile cu preeclampsie a fost semnificativ statistic (test Mann Whitney $U=308,00$; $p<0,001$) mai mare comparativ cu cele din lotul martor.

Accesarea serviciilor medicale (Consultații prenatale). 65,85% dintre gravidele cu preeclampsie au făcut cel puțin un consult prenatal, pondere nesemnificativ ($p=0,762$) mai mare față de a gravidelor din lotul martor (62,5%). Din acest motiv, avem o semnificație statistică nesemnificativă, ceea ce arata ca în studiul nostru, numărul consultațiilor prenatale, sau supravegherea sarcinii, nu a influențat prezența PE.

Examinare trimestrul III de sarcină

TA la înrolare. TAM la participantele la studiu care au fost diagnosticate cu PE ($102,14\pm 7,40$ mmHg) a fost la înrolare semnificativ statistic mai mare ($p<0,001$) față de lotul

martor ($86,99 \pm 7,76$ mmHg). 8,54% dintre gravidele cu PE au avut la înrolare TAM peste 110 mmHg. Distribuția participantelor la studiu în funcție de TAM nu a înregistrat diferențe semnificative statistic ($p=0,156$) între lotul cu PE și lotul martor. TAM în trimestrul III se corelează semnificativ statistic cu gravitatea HTAG/PE în trimestrul III ($p<0,001$) și cu gravitatea HTAG/PE tardiva înainte de naștere ($p<0,001$).

3. Examinarea ecografică în trimestrul II de sarcină

Biometria fetală. Biometria fetală la înrolare a evidențiat diferențe semnificative statistic în ceea ce privește principalii parametri între lotul gravidelor cu PE și cel al gravidelor fără PE. Mediile DBP (diametrul biparietal), CC (circumferința craniană), CA (circumferința abdominală) și LF (lungimea femurului) au fost semnificativ statistic ($p<0,001$) mai mari la lotul cu PE. Rezultatele noastre sugerează că diagnosticul de preeclampsie este semnificativ asociat cu RCIU. Interesant este că dezvoltarea RCIU la femeile cu preeclampsie poate fi disparată.

Markeri Doppler artera uterină. În studiul efectuat, indicele de rezistență este cel care a avut o semnificație statistică, față de studiile de specialitate care implică mai mult IP mediu. Distribuția participantelor la studiu în funcție de Notch + și prezența HTAG/PE în trimestrul III este semnificativ statistic diferită ($p<0,001$). Orice Doppler anormal la examinarea Doppler AUt din trimestrul II s-a corelat pozitiv semnificativ statistic cu apariția HTAG/PE în trimestrul III ($p=0,002$).

Markeri Doppler artera ombilicală. Indicele de pulsilitate și raportul S/D au fost semnificativ statistic ($p<0,001$) mai mari la lotul cu PE ulterioară (Tabel 21). De asemenea, media $IP>95$ percentile a fost semnificativ statistic mai mare la lotul cu PE ulterioară ($p<0,001$). Nici una dintre participantele la studiu nu a avut IP peste percentila 95 la evaluarea din trimestrul II de sarcină. De asemenea, nici una dintre gravidele incluse în studiu nu a prezentat Doppler anormal la înrolare.

Examinare trimestrul III de sarcină

HTA. TAM la participantele la studiu care au fost diagnosticate cu PE ($116,48 \pm 13,09$ mmHg) a fost în trimestrul III semnificativ statistic mai mare ($p<0,001$) față de lotul martor ($96,22 \pm 3,16$ mmHg). Cu o valoare medie de $116,48 \pm 13,09$ mmHg evaluarea făcută într-o populație heterogenă compusă din nulipare și multipare, rata de predicție a TAM în cazurile de preeclampsie precoce și tardivă este de 77,35%.

4. *Examinarea ecografică în trimestrul III de sarcină*

Biometria fetală. Distribuția gravidelor incluse în studiu în funcție de percentilele GFE este semnificativ diferită în funcție de prezența PE ($p < 0,001$).

Markeri Doppler artera uterină. În studiul nostru, IR, IP mediu și S/D pentru Doppler AUt din trimestrul III diferă semnificativ în funcție de prezența PE și HTAG în trimestrul III de sarcină ($p < 0,001$). Distribuția participantelor la studiu în funcție de Notch + și prezența HTAG/PE în trimestrul III a fost semnificativ statistic diferită ($p < 0,001$). În studiul nostru, IP mediu la Doppler AUt în trimestrul III s-a corelat pozitiv semnificativ statistic cu HTAG înainte de naștere ($p = 0,025$) și cu PE înainte de naștere ($p = 0,003$), adică un IP mediu mare crește probabilitatea de apariție a HTAG și PE

Markeri Doppler artera ombilicală. IR pentru artera ombilicală în trimestrul III de sarcină, IP, S/D și $IP > 95$ percentile diferă semnificativ statistic ($p < 0,001$) în funcție de prezența HTAG/PE tardiva și lotul martor înainte de naștere. Un examen Doppler anormal pentru artera ombilicala în trimestrul III, s-a corelat pozitiv semnificativ statistic cu gravitatea HTAG/PE în trimestrul III ($p = 0,008$) și tardiv, înainte de naștere ($p < 0,001$). În studiul efectuat, fluxul diastolic inversat s-a corelat pozitiv semnificativ statistic (Tabel 34) cu gravitatea HTAG/PE înainte de naștere ($p = 0,003$). Indicele de pulsilitate > 95 percentile s-a corelat semnificativ statistic cu gravitatea HTAG/PE în trimestrul III ($p = 0,004$) și tardiv înainte de naștere ($p = 0,003$), precum și cu evoluția nefavorabilă a nou-născutului ($p = 0,002$) și internarea acestuia în ATI ($p < 0,001$).

Markeri Doppler artera cerebrală medie. Valorile medii ale IR și S/D la Doppler ACM în trimestrul III nu au diferit semnificativ în funcție de prezența PE și HTAG în trimestrul III ($p = 0,029$, respectiv $p = 0,003$). ACM-IP mediu nu a diferit semnificativ statistic ($p = 0,970$) în funcție de prezența PE și HTAG în trimestrul III. Absența fluxului diastolic final la examenul Doppler al arterei cerebrale medii din trimestrul III de sarcină, s-a corelat pozitiv semnificativ statistic cu gravitatea HTAG/PE în trimestrul III ($p = 0,004$) și gravitatea HTAG/PE tardiva înainte de naștere ($p = 0,022$). De asemenea, inversarea fluxului diastolic la examenul Doppler al arterei cerebrale medii din trimestrul III de sarcină s-a corelat pozitiv semnificativ statistic cu gravitatea HTAG/PE în trimestrul III ($p = 0,010$) și gravitatea HTAG/PE tardiva înainte de naștere ($p = 0,024$). Examenul Doppler anormal al arterei cerebrale medii din trimestrul III de sarcină s-a corelat pozitiv semnificativ statistic cu gravitatea HTAG/PE în trimestrul III ($p < 0,001$),

gravitatea HTAG/PE tardiva înainte de naștere ($p < 0,001$) și cu internarea nou-născutului în ATI ($p = 0,008$).

Markeri Doppler-raportul cerebro-placentar (RCP). RCP s-a corelat pozitiv semnificativ statistic ($p = 0,011$) cu vârsta gestațională la naștere, adică cu cât RCP este mai mare cu atât vârsta gestațională crește, și invers. Aceasta, deoarece un RCP > 1 arata o bunăstare fetala care permite prelungirea sarcinii cat mai mult catre termen.

5. Nașterea

Tipul nașterii. In studiul nostru, nașterea spontană a fost semnificativ statistic ($p = 0,001$) mai frecventă la lotul martor (75%) comparativ cu lotul cu PE (36,59%). Deci, 63,41% dintre femeile cu PE au născut prin operatie cezariană, față de 25% din lotul martor.

Vârsta gestațională la naștere. Vârsta gestațională (VG) la naștere a fost semnificativ statistic ($p < 0,001$) mai mică, nastere prematura, la lotul PE ($34,70 \pm 2,47$ săptăm) față de lotul martor ($39,02 \pm 1,03$ săptăm).

Greutatea nou-născutului la naștere. Am constatat ca greutatea la naștere a nou-născuților din mame cu PE a fost semnificativ ($p < 0,001$) mai mică ($1927,79 \pm 678,39$ grame) comparativ cu a celor din mame fără PE ($3372,08 \pm 436,17$ grame). De asemenea, media percentilelor greutateii nou-născuților din mame cu PE ($13,52 \pm 16,67$) a fost semnificativ ($p < 0,001$) mai mică față de media percentilelor greutateii ($51,91 \pm 24,99$) celor din mame fără PE. SGA și AGA s-a corelat semnificativ statistic ($p < 0,001$) cu gravitatea HTAG/PE.

Evoluția nou-născutului. Evoluția nefavorabilă a nou-născutului am întâlnit-o la 14 din cei 22 nou-născuți ai gravidelor cu HTAG (66,7%) și la 31 nou-născuți din cei 60 ai gravidelor cu PE (50,8%), diferența nefiind semnificativă statistic ($p = 0,208$). Conform celui de al doilea criteriu, internarea in Departamentul de Terapie Intensiva Neonatala, am remarcat ca 4 cazuri din cele 24 (16,7%) ale nou-născuților proveniti din lotul martor, 14 cazuri din cei 22 (66,7%) nou-nascuti proveniti din sarcini cu HTAG și 34 cazuri din cei 60 (55,7%) nou-nascuti proveniti din sarcini cu PE, au fost internați în Departamentul de Terapie Intensiva Neonatala, diferența fiind semnificativă statistic ($p = 0,001$). Am mai remarcat ca evoluția nefavorabilă a nou-născutului se corelează semnificativ statistic ($p < 0,001$) cu fetii SGA (< 10 percentile).

6. Biomarkeri ai angiogenezei în PE

Preeclampsia este asociată cu un model maternal modificat de circulație a proteinelor derivate placentare care reglează angiogeneza, cum ar fi sFlt-1 și PIGF.

sFlt-1 și PIGF. Modificări ale ambilor markeri, sFlt-1 și PIGF, au fost remarcate încă din trimestrul II de sarcină, de aceea probele de sânge de la mamă au fost obținute de la toate participantele între 22 și 27 de săptămâni de gestație, în timpul screening-ului prenatal de rutina. Am considerat ca o valoare sFlt-1 > 95 percentile și o valoare PIGF < 5 percentile, sunt valori care ne pot orienta în predicția PE.

Nu s-a evidențiat o diferență semnificativă statistic ($p=0,911$) în funcție de distribuția percentilelor sFlt-1 și gravitatea HTAG/PE. Deși în studiile de specialitate, valoarea prag sFlt-1 este predictivă pentru apariția PE, în studiul nostru, această valoare nu a fost predictivă pentru apariția PE, deoarece AUC (area under the curve) pentru sFlt-1 a fost de 0,513, ceea ce înseamnă o acuratețe foarte slabă a testului. AUC pentru PIGF a fost de 0,199, ceea ce semnifică o performanță aleatorie a testului.

Deci valorile sFlt-1 și PIGF luate individual, nu ar putea fi predictive în mod absolut pentru predicția PE, chiar dacă ar putea fi sugestive prin valorile absolute exprimate.

Raportul sFlt-1/PIGF. Obiectivul principal al studiului nostru a fost evaluarea concentrațiilor de sFlt-1 și PIGF, precum și raportul acestora (sFlt-1 / PIGF) în sângele femeilor însărcinate în trimestrul II de sarcină pentru a detecta precoce a hipertensiunii gestaționale și a preeclampsiei înainte de debutul simptomelor clinice tipice.

AUC pentru raportul sFlt-1/PIGF a fost de 0,982, ceea ce înseamnă o acuratețe excelentă a testului. Această afirmație este concordantă cu studiile din literatura de specialitate.

La valori ale raportului sFlt-1/PIGF peste 22,5, sensibilitatea este de 98,8% și specificitatea de 62,5%. Valorile de peste 27 ale raportului sFlt-1/PIGF conduc la o sensibilitate este de 96,3% și o specificitate de 95,8%. Dacă ridicăm pragul raportului sFlt-1/PIGF la 30,5%, sensibilitatea devine 95,1%, iar specificitatea 100%, deci cel mai bun cut-off obținut în studiul nostru a fost de 30,5.

Performanța predictivă a sFlt-1 și PIGF, utilizate separat, nu a fost superioară performanței predictive a raportului sFlt-1/ PIGF.

CONCLUZII GENERALE

- Vârsta femeilor care au participat la studiu nu a diferit semnificativ între cele două loturi (test Mann Whitney $U=960,50$; $p=0,859$).
- Frecvența apariției PE este semnificativ statistic mai mare ($p=0,020$) la femeile cu un status socio-economic scăzut.
- Frecvența apariției HTAG nu diferă semnificativ ($p=0,386$) la femeile cu status socio-economic scăzut față de femeilele cu nivel socio-economic ridicat și mediu.
- Frecvența apariției PE este semnificativ statistic mai mare ($p=0,001$) la femeile cu nivel educațional scăzut.
- In studiul nostru, frecvența de apariție a PE la sarcinile anterioare nu este semnificativ diferită între cele două loturi studiate ($p=0,112$), ceea ce este în concordanță cu studiile din literatura de specialitate care arată procente diferite de recurență.
- Distribuția participantelor la studiu în funcție de prezența diabetului zaharat a fost semnificativ diferită ($p=0,001$) la lotul cu PE comparativ cu lotul martor, ceea ce este în concordanță cu studiile din literatura.
- IMC-ul pre-sarcină la femeile cu preeclampsie a fost semnificativ statistic (test Mann Whitney $U=167,50$; $p<0,001$), mai mare în PE comparativ cu lotul martor.
- Frecvența HTAG la femeile supraponderale și obeze este semnificativ statistic mai mare ($p<0,001$) comparativ cu femeile cu status ponderal normal.
- IMC-ul în sarcină la femeile cu preeclampsie a fost semnificativ statistic (test Mann Whitney $U=308,00$; $p<0,001$) mai mare comparativ cu cele din lotul martor.
- In trimestrul II, TAM la participantele la studiu care au fost diagnosticate cu PE ($102,14\pm 7,40$ mmHg) a fost la înrolare semnificativ statistic mai mare ($p<0,001$) față de lotul martor ($86,99\pm 7,76$ mmHg).
- Distribuția participantelor la studiu în funcție de Doppler AUt anormal și prezența HTAG/PE în trimestrul III a fost semnificativ statistic diferită ($p<0,001$).
- AO-IP, AO-S/D și AO-IP >95 percentile diferă semnificativ statistic ($p<0,001$) în funcție de prezența HTAG/PE tardivă, apărută înainte de naștere și lotul martor.

- Am constatat ca vârsta gestațională la naștere se corelează negativ semnificativ statistic ($r=-0,264$; $p=0,006$) cu AO-IR și cu AO-IP din trimestrul II, adică cu cât acestea sunt mai mari, cu atât vârsta gestațională la naștere va fi mai mică și invers.
- TAM în trimestrul III se corelează semnificativ statistic cu gravitatea HTAG/PE în trimestrul III ($p<0,001$) și cu gravitatea HTAG/PE tardiva înainte de naștere ($p<0,001$).
- GFE a fost semnificativ statistic mai mică la lotul cu PE ($p<0,001$).
- Distribuția gravidelor incluse în studiu în funcție de percentilele GFE este semnificativ diferită în funcție de prezența PE ($p<0,001$).
- În studiul nostru, IR, IP mediu și S/D pentru Doppler AUt din trimestrul III diferă semnificativ în funcție de prezența PE și HTAG în trimestrul III de sarcina ($p<0,001$).
- În studiul nostru, IR pentru artera ombilicală, IP, S/D și $IP>95$ percentile diferă semnificativ statistic ($p<0,001$) în funcție de prezența HTAG/PE și lotul martor în trimestrul III.
- Un examen Doppler anormal pentru artera ombilicală în trimestrul III, se corelează pozitiv semnificativ statistic cu gravitatea HTAG/PE în trimestrul III ($p=0,008$) și tardiv, înainte de naștere ($p<0,001$).
- Examenul Doppler anormal al arterei cerebrale medii din trimestrul III de sarcină se corelează pozitiv semnificativ statistic cu gravitatea HTAG/PE în trimestrul III ($p<0,001$), gravitatea HTAG/PE tardiva înainte de naștere ($p<0,001$) și cu internarea nou-născutului în ATI ($p=0,008$).
- RCP se corelează pozitiv semnificativ statistic ($p=0,011$) cu vârsta gestațională la naștere, adică cu cât RCP este mai mare cu atât vârsta gestațională crește, și invers.
- Nu s-a evidențiat o diferență semnificativă statistic ($p=0,911$) în funcție de distribuția percentilelor sFlt-1 și gravitatea HTAG/PE. Prezența sFlt-1 > 95 percentile este un parametru cu o precizie moderată pentru predicția PE, deoarece se cunoaște ca o metodă de testare este declarată a fi corectă atunci când valoarea testului se apropie de absolut (100%).

- AUC pentru PIGF a fost de 0,199, ceea ce semnifică o performanță aleatorie a testului, dar prezenta PIGF <5 percentile este un parametru cu o precizie ridicată pentru predicția PE.
- AUC pentru raportul s-Flt-1/PIGF a fost de 0,982, ceea ce înseamnă o acuratețe excelentă a testului. Aceasta afirmație este concordantă cu studiile din literatura de specialitate.
- Raportul sFlt-1/PIGF <30.5 este un parametru cu o precizie moderată pentru predicția PE, cu o valoare predictivă pozitivă de 30 și o valoare predictivă negativă de 27,27.
- Raportul sFlt-1/PIGF >85 este un parametru cu o precizie crescută pentru predicția PE, cu o valoare predictivă pozitivă de 75 și o valoare predictivă negativă de 48,78.
- Performanța predictivă a sFlt-1 și PIGF, utilizate separat, nu a fost superioară performanței predictive a raportului sFlt-1/ PIGF.

REFERINȚE SELECTIVE

1. Al-Jameil N, Aziz Khan F, Fareed Khan M, Tabassum H. A brief overview of preeclampsia. *J. Clin. Med. Res.* 2014;6:1–7.
2. Baltajian K, Bajracharya S, Salahuddin S, Berg AH, Geahchan C, Wenger JB, Thadhani R, Karumanchi SA, Rana S. Sequential plasma angiogenic factors levels in women with suspected preeclampsia. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2016; 215(1):89.e1-89.e10.
3. Cantwell R, Clutton-Brock T, Cooper G, Dawson A, Drife J, Garrod D, Harper A, Hulbert D, Lucas S, McClure J, Millward-Sadler H, Neilson J, Nelson-Piercy C, Norman J, O'Herlihy C, Oates M, Shakespeare J, de Swiet M, Williamson C, Beale V, Knight M, Lennox C, Miller A, Parmar D, Rogers J, Springett A. Saving Mothers' Lives: Reviewing maternal deaths to make motherhood safer: 2006–2008. The Eighth Report of the Confidential Enquiries into Maternal Deaths in the United Kingdom. *BJOG*.
4. Chaiworapongsa T, Chaemsaihong P, Yeo L, Romero R. Pre-eclampsia part 1: current understanding of its pathophysiology. *Nat Rev Nephrol.* 2014;10(8):466-480.
5. Duley L. The global impact of pre-eclampsia and eclampsia. *Semin Perinatol.* 2009;33(3):130–137.

6. Eddy AC, Bidwell GL, George EM. Pro-angiogenic therapeutics for preeclampsia. *Biol Sex Differ*. 2018; 9: 36
7. Gathiram P, Moodley J. Pre-eclampsia: its pathogenesis and pathophysiology. *Cardiovasc J Afr*. 2016; 27(2):71–78.
8. George EM, Granger JP. Endothelin: key mediator of hypertension in preeclampsia. *Am J Hypertens*. 2011;24:964–969.
9. Gilbert JS, Ryan MJ, Lamarca BB, Sedeek M, Murphy SR, Granger JP. Pathophysiology of hypertension during preeclampsia: linking placental ischemia with endothelial dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008;294:H541–50
10. Hagmann H, Thadhani R, Benzing T, Karumanchi SA, Stepan H. The promise of angiogenic markers for the early diagnosis and prediction of preeclampsia. *Clin. Chem*. 2012;58:837–845.
11. Huhn EA, Kreienbühl A, Hoffmann I, Schoetzau A, Lange S, Martinez de Tejada B, Hund, Hoesli I, Lapaire O. Diagnostic Accuracy of Different Soluble fms-Like Tyrosine Kinase 1 and Placental Growth Factor Cut-Off Values in the Assessment of Preterm and Term Preeclampsia: A Gestational Age Matched Case-Control Study. *Front Med (Lausanne)*. 2018;5:325.
12. Jim B, Karumanchi SA. Preeclampsia: pathogenesis, prevention, and long-term complications. *Semin. Nephrol*. 2017;37: 386–397
13. Karumanchi SA, Epstein FH. Placental ischemia and soluble fms-like tyrosine kinase 1: cause or consequence of preeclampsia? *Kidney Int* 2007;71:959-961.
14. Khan KS, Wojdyla D, Say L, Gulmezoglu AM, Van Look PF. WHO analysis of causes of maternal death: a systematic review. *Lancet* 2006;367:1066–74.
15. Kongwattanakul K, Saksiriwuttho P, Chaiyarach S, Thepsuthammarat K. Incidence, characteristics, maternal complications, and perinatal outcomes associated with preeclampsia with severe features and HELLP syndrome. *Int J Womens Health*. 2018;10:371-377
16. Levine RJ, Maynard SE, Qian C, Lim KH, England LJ, Yu KF, Schisterman EF, Thadhani R, Sachs BP, Epstein FH, Sibai BM, Sukhatme VP, Karumanchi SA. Circulating angiogenic factors and the risk of preeclampsia. *N Engl J Med*. 2004; 350: 672–683.

17. Lyall F. Priming and remodelling of human placental bed spiral arteries during pregnancy—a review. *Placenta*. 2005; 26(Suppl. A):S31–S36.
18. Maynard SE, Karumanchi SA. Angiogenic factors and preeclampsia. *Seminars Nephrol*. 2011;31(1):33–46
19. Maynard SE, Min JY, Merchan J, Lim KH, Li J, Mondal S, Libermann TA, Morgan JP, Sellke FW, Stillman IE, Epstein FH, Sukhatme VP, Karumanchi SA. Excess placental soluble fmslike tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *J Clin Invest*. 2003b;111(5):649–658
20. Menon R. Oxidative stress damage as a detrimental factor in preterm birth pathology. *Front Immunol*. 2014;5:567
21. Mutter WP, Karumanchi SA. Molecular mechanisms of preeclampsia. *Microvasc Res*. 2008;75:1–8.
22. NICE. PIGF-based testing to help diagnose suspected pre-eclampsia (Triage PIGF test, Elecsys immunoassay sFlt-1/PIGF ratio, DELFIA Xpress PIGF 1-2-3 test, and BRAHMS sFlt-1 Kryptor/BRAHMS PIGF plus Kryptor PE ratio). *Diagnostics Guidance*. 23. 2016
23. Palomaki GE, Haddow JE, Haddow HR, Salahuddin S, Geahchan C, Cerdeira AS, Verlohren S, Perschel FH, Horowitz G, Thadhani R, Karumanchi SA, Rana S. Modeling risk for severe adverse outcomes using angiogenic factor measurements in women with suspected preterm preeclampsia. *Prenat. Diagn*. 2015;35:386–393.
24. Pijnenborg R, Vercruyse L, Hanssens M. The uterine spiral arteries in human pregnancy: facts and controversies. *Placenta*. 2006;27(9–10):939–958.
25. Romero R, Chaiworapongsa T. Preeclampsia: a link between trophoblast dysregulation and an antiangiogenic state. *J Clin Invest*. 2013;123(7):2775–2777.
26. Say L, Chou D, Gemmill A, Tunçalp Ö, Moller AB, Daniels J, Gülmezoglu AM, Temmerman M, Alkema L. Global causes of maternal death: a WHO systematic analysis. *Lancet Glob Health*. 2014;2(6):e323–e333
27. 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; 35:202–206

28. Staff AC, Benton SJ, von Dadelszen P, Roberts JM, Taylor RN, Powers RW, Charnock-Jones DS, Redman CW. Redefining preeclampsia using placenta-derived biomarkers. *Hypertension*. 2013;61(5):932–942
29. Stepan H, Herraiz I, Schlembach D, Verlohren S, Brennecke S, Chantraine F, Klein E, Lapaire O, Llurba E, Ramoni A, Vatish M, Wertaschnigg D, Galindo A. Implementation of the sFlt-1/PlGF ratio for prediction and diagnosis of pre-eclampsia in singleton pregnancy: implications for clinical practice. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2015;45(3):241-246.
30. Tannetta DS, Dragovic RA, Gardiner C, Redman CW, Sargent IL. Characterisation of syncytiotrophoblast vesicles in normal pregnancy and pre-eclampsia: expression of Flt-1 and endoglin. *PLoS One*. 2013;8(2):e56754.
31. Tsatsaris V, Goffin F, Munaut C, Brichant JF, Pignon MR, Noel A, Schaaps JP, Cabrol D, Franckne F, Foidart JM. Overexpression of the soluble vascular endothelial growth factor receptor in preeclamptic patients: pathophysiological consequences. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003; 88: 5555–5563.
32. Wang A, Rana S, Karumanchi SA. Preeclampsia: the role of angiogenic factors in its pathogenesis. *Physiology (Bethesda)* 2009;24:147–158
33. World Health Organisation. *The World Health Report 2005: Make Every Mother and Child Count*. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2005