



ȘCOALA DOCTORALĂ

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Profil de risc clinic și genetic în preeclampsie

Doctorand Iordache Georgiana Irina (Nemeti)

Conducător științific Prof. Dr. Florin Stamatian

Cluj-Napoca 2016

CUPRINS

INTRODUCERE	19
STADIUL ACTUAL AL CUNOȘTERII	
1. Preeclampsia. Definiție. Clasificare. Teorii etiopatogenice.	19
1.1. Definiție	19
1.2. Clasificarea patologiei hipertensive de sarcină	19
1.3. Teorii etiopatogenetice în preeclampsie	22
1.3.1. Teoria dezechilibrului angiogenic	24
1.3.2. Teoria stresului oxidativ	25
1.3.3. Teoria disfuncției endoteliale	25
1.3.4. The thyroid dysfunction theory	26
1.3.5. Teoria alterării sistemului renină-angiotensină-aldosteron	27
1.3.6. Teoria afectării trombofilice	29
1.3.7. Teoria dezechilibrului imun	29
1.3.8. Teoria infecțioasă/inflamatorie	30
2. Predicția preeclampsiei	31
2.1. Factori de risc clinic	31
2.1.1 Factori constituționali materni	32
2.1.2 Factori de mediu materni	36
2.1.3 Factori gestaționali	36
2.2. Factori de risc genetici	38
2.3.1 Polimorfisme genetice ale sistemului renină-angiotensină-aldosteron implicate în preeclampsie	39
2.3.2 Polimorfisme genetice ale cascadei coagulării implicate în preeclampsie	40
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	
1. Ipoteza de lucru/obiective	45
2. Metodologie generală	49
3. Studiul 1 – Profil de risc clinic în preeclampsie	53
3.1. Introducere	53
3.2. Material și metodă	53
3.3. Rezultate	54
3.4. Discuții	57
3.5. Concluzii	59
4. Studiul 2. Evaluarea riscului de preeclampsie pe criterii clinice și în funcție de polimorfismele sistemului renină-angiotensină-aldosteron	61
4.1. Introducere	61
4.2. Obiective	61

4.3. Material și metodă	61
4.4. Rezultate	63
4.4.1. Parametri clinici și genetici care cresc riscul de preeclampsie	63
4.4.2. Parametri clinici și genetici care cresc riscul de preeclampsie severă	65
4.4.3. Parametri obstetricali	65
4.4.4. Parametri clinici și genetici care alterează prognosticul materno-fetal	66
4.4.4.1. Factori ce influențează prognosticul matern	66
4.4.4.2. Factori ce influențează prognosticul fetal	66
4.5. Discuții	68
4.6. Concluzii	70
5. Studiul 3. Screeningul pentru preeclampsie pe criterii clinice și polimorfisme trombofilice	71
5.1. Introducere	71
5.2. Obiective	72
5.3. Material și metodă	72
5.4. Rezultate	74
5.4.1. Caracteristici ale profilului de risc clinic	75
5.4.2. Caracteristici ale profilului de risc genetic determinat de mutațiile trombofilice	79
5.4.3. Parametri de evaluare a prognosticului sarcinii	80
5.4.3.1. Caracteristici antepartum	80
5.4.3.2. Caracteristici intrapartum	83
5.4.3.3. Caracteristici postpartum	84
5.5. Discuții	86
5.6. Concluzii	89
6. Discuții generale	91
7. Concluzii generale	95
8. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei	99
REFERINȚE	101

Cuvinte cheie: preeclampsie, susceptibilitate, nuliparitate, obezitate, sistem renină-angiotensină-aldosteron, trombofilie

INTRODUCERE

Sănătatea materno-fetală reprezintă o prioritate a politicilor de sănătate publică la nivel mondial, având în vedere că, în ciuda progreselor științifice, zilnic în lume aproximativ 800 de femei mor din cauze prevenibile legate de sarcină și naștere, cu o rată a deceselor materne de 240/100 000 în țările în curs de dezvoltare și de 16/100 000 în țările dezvoltate. Reducerea morbidității și mortalității materne și neonatale reprezintă unul dintre obiectivele mondiale de sănătate publică. Mortalitatea maternă se datorează complicațiilor apărute în cursul și imediat sarcină și naștere. Majoritatea survin pe parcursul sarcinii; altele sunt preexistente și se agravează în sarcină. Preeclampsia reprezintă una dintre cele 4 complicații majore care explică 80% dintre decesele materne alături de hemoragiile severe, infecțiile și avorturile septice.

În ultimii 50 de ani s-a înregistrat o scădere semnificativă a ratelor eclampsiei, mortalității și morbidității materne în țările civilizate. Ratele complicațiilor hipertensive ale sarcinii rămân însă semnificative, chiar și în țările cu acces la sistemele de sănătate, îngrijire perinatală, personal medical specializat și resurse de sănătate, diagnosticul și managementul corespunzător al preecampsiei conducând însă la o rată crescută a complicațiilor neonatale prin prematuritate, dezvoltare fetală discordantă cu vârsta de gestație, fragilitate fetală ante și postpartum. Pentru rezultate mai bune în ceea ce privește managementul preecampsiei/eclampsiei sunt necesare protocoale clare pentru depistarea precoce și abordarea cazurilor cu hipertensiune, precum și imaginarea unui algoritm de identificare a predispoziției către patologia hipertensivă de sarcină.

Este general acceptată originea placentară a preecampsiei, dar mecanismele patogenetice care conduc la disfuncția endotelială sistemică caracteristică acestei patologii este încă în curs de investigare. Printre factorii cheie incriminați în dezvoltarea preecampsiei se numără defectele de maladaptare imună, defectele de placentare, stresul oxidativ, alterări în sistemul renină-angiotensină-aldosteron și tromboza. Factorii genetici influențează fiecare dintre aceste mecanisme patogenetice menționate anterior. Natura ereditară a preecampsiei este un fapt universal cunoscut și acceptat, multe studii cu substrat genetic și molecular având ca țintă această zonă de cercetare. Domeniul geneticii oferă o strategie interesantă în abordarea patogenezei preecampsiei deoarece ocolește aspectele etice sau dificultățile de ordin practic ce se asociază cu cercetarea științifică pe parcursul fazei preclinice a preecampsiei, momentul producerii modificărilor patologice subtile.

Dincolo de diagnosticul precoce, corect și al managementului integrat al preecampsiei, indentificarea pacientelor aflate la risc crescut de a dezvolta preecampsie reprezintă o necesitate și o prioritate. Pornind de la rădăcinile etiopatogenice ale afecțiunii

hipertensive în sarcină ținta cercetătorilor este aceea de a identifica prototipul pacientei cu predispoziție către preeclampsie. În lucrarea de față ne-am propus să izolăm acele trăsături fenotipice și genotipice ale gravidei cu risc de a antrena o patologie hipertensivă și să creăm, prin mijloace statistice un profil de risc care să permită ierarhizarea pe categorii de severitate și alcătuirea unui plan de supraveghere individualizat pentru paciente, în funcție de particularitățile fiecăreia dintre ele. Modelul predictiv imaginat presupune alăturarea caracteristicilor profilului clinic, a polimorfismelor genetice din sistemul renină-angiotensină-aldosteron și a mutațiilor trombofilice.

Pe de altă parte, studiul își propune evaluarea eficienței acestor parametri în ceea ce privește predicția formei severe de preeclampsie. Mutațiile proteinelor sistemului renină-angiotensină-aldosteron și mutațiile trombofilice sunt utile și pentru triajul pacientelor suspecte de preeclampsie, diferențierea patologiei preeclampsice de exacerbări ale unor afecțiuni medicale preexistente, precum și evaluarea riscului la pacientele asimptomatice.

Cercetarea doctorală a fost construită ca și un studiu longitudinal, observational, prospectiv, caz-control efectuat pe paciente gravide cu patologie hipertensivă de sarcină comparativ cu gravide normotensive în lotul martor. Toate pacientele au fost internate în Departamentul de Medicină Materno-Fetală al Clinicii Ginecologie I Cluj-Napoca, România în perioada Ianuarie 2009-iulie 2012. Protocolul de studiu a fost aprobat de Comisia de Etică a Universității de Medicină și Farmacie "Iuliu Hațieganu" Cluj-Napoca.

CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

Studiul I. Profil de risc clinic în preeclampsie

Obiective: Determinarea factorilor de risc clinic implicați în etiologia preeclampsiei, precum și a corelațiilor dintre prezența lor și severitatea afecțiunii.

Material și metodă: Studiu caz martor, în care s-au înrolat 82 de gravide cu preeclampsie și 100 gravide normotensive, la care s-a evaluat prezența parametrilor implicați în determinismul bolii preeclampsice.

Rezultate: S-au observat diferențe statistice semnificative între cele două grupuri în ceea ce privește nuliparitatea: 73.1% paciente în lotul de studiu și 58.4% în lotul martor ($p < 0.05$). Indicele de masă corporală pregestațional și la sfârșitul sarcinii au fost semnificativ crescute în lotul studiat, $p = 0.007$ și respectiv $p = 0.002$, față de lotul martor. Întârzierea de creștere intrauterină a fost corelată semnificativ cu centralizarea circulației ($p < 0.05$) și rezistivitatea ombilicală crescută ($p < 0.05$), dar nu și cu alterarea fluxului venos fetal ($p = 0.12$). Centralizarea circulației s-a corelat statistic semnificativ cu alterarea fluxului venos ($p < 0.05$) și cu prezența notch-ului pe arterele uterine ($p = 0.006$).

Concluzii: Rezultatele studiului nostru confirmă importanța stratificării riscului clinic la pacientele cu preeclampsie pentru aprecierea prognosticului materno-fetal și modularea conduitei obstetricale. Nuliparitatea și obezitatea au fost asociate cu dezvoltarea preeclampsiei la pacientele studiate.

Studiul II. Evaluarea riscului de preeclampsie pe criterii clinice și în funcție de polimorfismele sistemului renină-angiotensină-aldosteron

Scopul studiului. Preeclampsia este o complicație obstetricală ce are ca substrat etiopatogenic disfuncția endotelială cu maladaptare vasculară consecutivă. Polimorfismele proteinelor SRAA au fost incriminate ca posibilă cauză a perfuziei utero-placentare deficiente. Scopul acestui studiu este acela de a stratifica riscul de preeclampsie la un lot de paciente din România pe criterii clinice și ce aparțin de genetica SRAA.

Material și Metodă. Au fost incluse 99 pacientwe cu hipertensiune indusă de sarcină, preeclampsie formă medie și formă severă în lotul de studiu și 100 de gravide normotensive în lotul martor. În cazul profilului de risc clinic au fost analizate vârsta maternă, paritatea, vârsta gestațională, indicele de masă corporală pregestațional, fumatul și consumul de contraceptive. Polimorfismele SRAA studiate au fost determinate la toate cazurile: A235T angiotensinogen, T174M angiotensinogen, I/D și ACE 8 în gena enzimei de conversie a angiotensinei, polimorfismul A1166C al receptorului 1 al angiotensinei II.

Rezultate. La lotul caz, caracteristicile clinice confirmate a crește frecvența preeclampsiei formă severă au fost nuliparitatea OR =5 (95%CI 2.1-28.9) și obezitatea OR=3.1 (95%CI 0.89-26.5). Polimorfismele M235T angiotensinogen, ACE I/D și AGTR-1 A1166C au fost asociate cu preeclampsia formă severă (OR=2.6 (95%CI 1.1 - 18.1), OR=1,8 (95%CI 1 - 15,2), respectiv OR=2,3 (95%CI 1,4 - 12,4)).

Concluzii. Studiul de față demonstrează că nuliparitatea și obezitatea ca parametri clinici, precum și alelele mutante M235T angiotensinogen, ACE I/D și A1166C AGTR-1 ca parametri genetici se asociază cu preeclampsia/preeclampsia cu prognostic sever.

Studiul III. Screeningul pentru preeclampsie pe criterii clinice și polimorfisme trombofilice

Scopul studiului. Stabilirea implicării caracteristicilor profilului clinic și mutațiilor trombofilice în stratificarea riscului de preeclampsie la un lot de gravide din România.

Material și Metodă. Au fost înrolate 111 paciente diagnosticate cu afectare hipertensivă de sarcină (hipertensiune indusă de sarcină, preeclampsie formă medie și formă severă) în lotul de studiu și 100 de paciente normotensive în lotul de control. Caracteristicile profilului clinic luate în studiu au fost vârsta maternă, paritatea, vârsta gestațională, indicele de masă corporală pregestațional, fumatul și consumul de contraceptive orale. Profilul de risc trombofilic a inclus analiza mutațiilor: factor V Leiden,

mutația 20210G-A în gena protrombinei, mutațiile 677C-T și 1298A-C în gena metilene-tetrahidrofolat reductazei și a fost aplicat atât pacienților caz cât și pacienților control.

Rezultate. În grupul pacienților hipertensive am înrolat 35 de paciente cu hipertensiune indusă de sarcină, 45 cu preeclampsie formă ușoară și 20 cu preeclampsie formă severă. Din punct de vedere al caracteristicilor clinice studiul de față confirmă asocierea dintre forma severă de boală și nuliparitate OR = 5 (95%CI 2.1-28.9) și obezitatea identificată prin indicele de masă corporală pregestațional (BMI) >30, OR=3.1 (95%CI 0.89-26.5). Adaptarea fetală hemodinamică a fost înregistrată la cazurile cu preeclampsie formă severă prin creșterea rezistivității pe artera ombilicală OR = 6,5 (95%CI: 1.7 - 24.6), centralizarea circulației OR=5.38 (95%CI 0.39 - 20.78) și reverse flow la nivelul ductului venos OR=6.7 (95%CI 1.16 - 39.13). Mai mult decât atât, pacientele diagnosticate cu preeclampsie formă severă au înregistrat un prognostic fetal rezervat reprezentat de greutatea mică la naștere OR 3.2 (95%CI 2.1 - 18.6) și scor Apgar <7 la 5 minute OR=2.7 (95%CI 1.04 - 7.17). Factorul V Leiden [p<0.001, OR=8.9 (95%CI 2.5 - 30.66)], mutația C677T [$p<0.001$, OR=5.2 (95%CI 2.8 - 9.7)] și respectiv A1298C în gena metilene-tetrahidrofolat reductazei [p=0,01, OR=2 (95%CI 1.1 - 3.6)] au fost asociate cu un risc crescut de a dezvolta o patologie hipertensivă de sarcină. La pacientele pozitive pentru factorul V Leiden și polimorfismul C677T al metilene-tetrahidrofolat reductazei s-a înregistrat un risc crescut de preeclampsie formă severă, p=0,04, OR=2 (95%CI 1,2 - 20.6) și respectiv p=0,04, OR=2,5 (95%CI 1 - 19,7).

Concluzii. În studiul de față nuliparitatea și indicele de masă corporală crescut pregestațional sunt parametri clinici asociați cu creșterea riscului de a dezvolta preeclampsie formă severă corelându-se cu un prognostic rezervat materno-fetal. Factorul V Leiden și mutația C667T a metilene-tetrahidrofolat reductazei dintre parametrii trombofilici se asociază cu un risc crescut de preeclampsie cu prognostic sever.

ORIGINALITATEA ȘI CONTRIBUȚIILE INOVATIVE ALE TEZEI

Preeclampsia reprezintă o patologie care survine în sarcină și postpartumul imediat complicând aproximativ 2-8% dintre sarcini în Occident și până la 10% dintre sarcini în țările în curs de dezvoltare unde accesul la asistența medicală de urgență este inadecvat sau limitat. Astfel ea se menține în fruntea patologiilor responsabile de decesele materne atât în țările civilizate cât și în cele în curs de dezvoltare. Organizația Mondială a Sănătății estimează că preeclampsia este cauza a aproximativ 76 000 de decese anual, adică cel puțin un deces matern la fiecare 7 minute pe glob.

Predicția preeclampsiei reprezintă o prioritate de sănătate publică, astfel că cercetătorii și clinicienii sunt în căutarea unui test ușor de aplicat pe scară largă și accesibil care să permită diagnosticul presimptomatic. Ținta obstetricienilor este să identifice și să monitorizeze pacientele aflate la risc și să asigure cea mai bună asistență prenatală

pacientelor și nou-născuților lor. Un astfel de test ar fi util și pentru confirmarea unor diagnostice clinice incerte sau pentru studiile ce investighează tratamentele profilactice.

În ciuda investigării câtorva markeri promițători pentru preeclampsie, fiabilitatea lor este inconsistentă în diferitele studii efectuate, poate datorită faptului că preeclampsia este o afecțiune cu mai multe fețe; s-a spus frecvent despre ea că ar fi nu una, ci mai multe boli.

Screeningul precoce pentru preeclampsie, înaintea instalării simptomelor clinice constituie o provocare clinică reductabilă. Metodele moderne de screening în preeclampsie și hipertensiunea indusă de sarcină include combinații de istoric al pacientei, markeri biochimici serici, parametri ultrasonografici, caracteristici de profil genetic și markeri AND/ARN fetal în serul matern.

Din punctul de vedere al importanței predicției preeclampsiei/formei severe de boală, teza de față se înscrie în trendul cercetărilor recente, cautând să identifice un instrument aplicabil precoce, minim invaziv pentru selecția pacientelor aflate la risc crescut în intenția prevenirii patologiei cu prognostic nefavorabil.

Rezultatele tezei susțin utilizarea factorilor de risc clinici și genetici pentru selectarea pacientelor la risc de preeclampsie. Încipalul obiectiv al cercetărilor viitoare îl constituie încercarea de a extinde numărul de paciente studiate și de a construi un scor de stratificare a riscului de boală.

PhD SCHOOL

SUMMARY OF THE PhD THESIS

A genetic and clinical risk profile in preeclampsia

PhD Student **Iordache Georgiana Irina (Nemeti)**

PhD Scientific Coordinator **Prof. Dr. Florin Stamatian**

Cluj-Napoca 2016

CONTENTS

INTRODUCTION	19
CURRENT STATE OF THE ART	
1. Preeclampsia. Definition. Classification. Etiopathogenic theories.	19
1.1. Definition	19
1.2. Classification of hypertensive disorders of pregnancy	19
1.3. Etiopathogenic theories in preeclampsia	22
1.3.1. The angiogenic imbalance theory	24
1.3.2. The oxidative stress theory	25
1.3.3. The endothelial dysfunction theory	25
1.3.4. The thyroid dysfunction theory	26
1.3.5. The altered renin-angiotensin-aldosterone system theory	27
1.3.6. The thrombophilia theory	29
1.3.7. The immune imbalance theory	29
1.3.8. The inflammatory / infectious phenomena theory	30
2. Prediction of preeclampsia	31
2. 1. Clinical risk factors	31
2.1.1 Maternal constitutional factors	32
2.1.2 Maternal environmental factors	36
2.1.3 Gestation related factors	36
2.2. Genetic risk factors	38
2.3.1 Renin-angiotensin-aldosterone system genetic variants involved in preeclampsia	39
2.3.2 Coagulation cascade genetic variants involved in preeclampsia	40
PERSONAL CONTRIBUTION	
1. Work hypothesis and objectives	45
2. General methodology	49
3. Study I. A clinical risk profile of preeclamptic patients	53
3.1. Introduction	53
3.2. Material and Method	53
3.3. Results	54
3.4. Discussion	57
3.5. Conclusions	59
4. Study II. Preeclampsia risk evaluation according to clinical features and renin angiotensin system	61

polymorphisms	
4.1. Introduction	61
4.2. Objectives	61
4.3. Material and Method	61
4.4. Results	63
4.4.1. Clinical and genetic parameters which increase the chance of preeclampsia	63
4.4.2. Clinic and genetic features which increase the risk of severe preeclampsia	65
4.4.3. Obstetric parameters	65
4.4.4. Clinical and genetic parameters which alter the fetal-maternal prognosis	66
4.4.4.1. Factors amprenting the maternal outcome	66
4.4.4.2. Factors amprenting the fetal outcome	66
4.5. Discussion	68
4.6. Conclusions	70
5. Study III. Screening for preeclampsia by clinical features and thrombophilic polymorphisms	71
5.1. Introduction	71
5.2. Objectives	72
5.3. Material and Method	72
5.4. Results	74
5.4.1. Clinical profile features	75
5.4.2. Inherited thrombophilia genetic profile features	79
5.4.3. Pregnancy outcome measurement parameters	80
5.4.3.1. Antepartum features	80
5.4.3.2. Intrapartum features	83
5.4.3.3. Postpartum features	84
5.5. Discussion	86
5.6. Conclusions	89
6. General discussions	91
7. General conclusions	95
8. Originality and innovative contribution	99
REFERENCES	101

Key words: preeclampsia, susceptibility, nulliparity, obesity, renin-angiotensin-aldosterone, thrombophilia

INTRODUCTION

Feto-maternal health represents a global public health priority. Despite the scientific progress achieved in the medical clinical and research fields, around 800 women die every day due to preventable causes associated to pregnancy and birth . The maternal deaths rate is 240/100 000 in developing countries and 16/100 000 in developed countries. Lowering maternal and neonatal morbidity/mortality indices is one of the leading targets of worldwide public health strategies. Maternal mortality is the consequence of complications occurring during pregnancy, at birth and along the puerperium. Preeclampsia represents one of the 4 pathologies responsible for 80% of maternal death globally, alongside severe hemorrhage, infections and septic abortions.

Hypertensive complications of pregnancy remain increased, even in areas where patients have easy access to health facilities, perinatal care, specialised medical staff and health resources. On the other hand, regardless the proper diagnosis and management of preeclampsia, this pathology encompasses an increased rate of neonatal complications through prematurity, fetal development discordant to the gestational age, antepartum and postpartum fetal fragility. For better results of preeclampsia/eclampsia management clear protocols are required for the early detection and individualised approach of cases as well as an algorithm for the selection of patients predisposed to develop hypertensive disorders of pregnancy.

The placental origin of preeclampsia is unanimously embraced, however, the intimate pathological mechanisms leading to the endothelial systemic dysfunction characteristic of this disease are still under investigation. Among the key factors incriminated in preeclampsia lie immune adaptation defects, placentation flaws, oxidative stress, thrombophilic pathway alterations, renin-angiotensin-aldosterone system malfunction or thyroid dysfunction issues. Genetic factors come to influence all of the above listed pathogenic links. The hereditary nature of preeclampsia is an universally renowned and accepted fact. The fields of molecular biology and genetics offer an interesting strategy when approaching the pathogenesis of preeclampsia as they avoid ethic issues and practical difficulties brought by scientific research during the preclinical phase of preeclampsia, the time of subtle pathological changes.

Apart from the early, correct diagnosis and integrated management of preeclampsia, identification of the high risk category of patients to develop the disease represents a necessity and a priority. Starting from the etiopathogenic roots of this affliction researchers target to characterise the prototype of the patient susceptible to preeclampsia.

In the present thesis we aimed to isolate those phenotypic and genotypic features of the pregnant patient at risk to develop preeclampsia and to create, by statistical means, a risk score which would allow the hierachisation of risk and design of individualised surveillance protocol for patients according to their particular features. The predictive model imagined is based on the association of clinical features as well as the determination

of genetic polymorphisms of renin-angiotensin-aldosterone system and thrombophilic mutations. Secondly, the study aims to evaluate the performance of these parameters when it come to predicting the severe form of preeclampsia. Renin-angiotensin-aldosterone system and thrombophilic proteins mutations might also be useful in triage of symptomatic patients with suspected preeclampsia, differentiating preeclampsia from exacerbations of preexisting medical conditions and performing risk assessment in asymptomatic women.

The doctoral research was designed as a longitudinal, observational, prospective case-control study conducted on pregnant patients with hypertensive disorders of pregnancy and healthy normotensive pregnant controls. Pregnant patients with hypertensive disorders complicating pregnancy were enrolled in the study groups and normotensive pregnant patients in the control group. All patients were admitted in the Maternal-Fetal Medicine Department of the Gynecology I Clinic Cluj-Napoca, Romania, during the period January 2009 – July 2012. The study protocol was approved by the Ethics Committee of the University of Medicine and Pharmacy “Iuliu Hațieganu” Cluj-Napoca.

PERSONAL CONTRIBUTION

Study I. A clinical risk profile of preeclamptic patients

Study purpose: Identification of clinical risk factors involved in the etiology of preeclampsia, as well as correlations between their presence and severity of the disease.

Material and method: This is a case-control study, which enrolled 82 preeclamptic patients and 100 with normal blood pressure, in which we evaluated the presence of the parameters involved in the preeclamptic process.

Results: Statistical significant differences were noted between the two groups concerning nulliparity: 73.1% patients from the study group and 58.4% in the control group ($p < 0.05$). The body mass index were significantly increased in the study group, both pregestation and at birth, $p = 0.007$ and respectively $p = 0.002$, compared to the control group. Intrauterine growth restriction was significantly correlated to centralisation ($p < 0.05$) and increased umbilical resistivity ($p < 0.05$), but not with the altering of fetal venous flow ($p = 0.12$). Centralisation was significantly correlated to venous flow altering ($p < 0.05$) and the presence of uterine artery notching ($p = 0.006$).

Conclusions: Our study results confirm the importance of risk stratification in preeclamptic patients in order to predict maternal-fetal outcome and adjust obstetrical management. Nulliparity and obesity were associated with preeclampsia in the studied population.

Study II. Preeclampsia risk evaluation according to clinical features and renin angiotensin system polymorphisms

Study purpose: Preeclampsia is a pregnancy associated complication characterized by endothelial dysfunction and consequent vascular maladaptation. Genetic variants of RAS proteins have been proposed as possible cause of the deficient uteroplacental perfusion. This study aimed at risk stratification according to clinical and genetic features related to RAS polymorphisms in a group of preeclamptic Romanian patients.

Materials and Methods: 99 patients were enrolled in the study group, diagnosed with pregnancy induced hypertension, mild and severe preeclampsia and 100 patients with normotensive pregnancies in the control group. The clinical profile parameters analyzed were maternal age, parity, gestational age, pregestational body mass index (BMI), smoking habit and contraceptive use. Genetic evaluation of RAS polymorphisms including A235T angiotensinogen, T174M angiotensinogen, angiotensin converting enzyme (ACE) I/D, ACE 8 and thr A1166C variant of type 1 receptor for angiotensin II AGTR1 were performed in all cases.

Results: The clinical profile of the study group patients confirmed the increased frequency of severe disease in nulliparous OR =5 (95%CI 2.1-28.9) and obese OR=3.1 (95%CI 0.89-26.5) patients. The M235T angiotensinogen, ACE I/D and A1166C AGTR-1 genetic variants associated an increased frequency of the severe form of the disease (OR=2.6 (95%CI 1.1 - 18.1), OR=1,8 (95%CI 1 - 15,2), respectively OR=2,3 (95%CI 1,4 - 12,4)).

Conclusion: The present study shows that nulliparity and increased pregestational BMI as clinical parameters and M235T angiotensinogen, ACE I/D and A1166C AGTR-1 allele as genetic parameters are associated with a severe outcome in preeclampsia.

Study III. Screening for preeclampsia by clinical features and thrombophilic polymorphisms

Study purpose: To establish the extent of involvement of clinical risk profile features and thrombophilic polymorphisms in the stratification of risk for preeclampsia in a group of Romanian pregnant women.

Material and Methods. The study groups comprised 111 patients patients with hypertensive disorders of pregnancy (pregnancy induced hypertension, mild and severe preeclampsia) in the case group and 100 patients with normotensive pregnancies in the control group. The clinical profile investigation recorded maternal age, parity, gestational age, pregestational body mass index (BMI), smoking habit and contraceptive use. The thrombophilic genetic profile including the analysis of the factor V Leiden mutation, 20210G-A mutation in the prothrombin gene, 677C-T and 1298A-C mutations in the metylenetetrahydropholate reductase (MTHFR) gene were performed for both cases and controls.

Results. In the hypertensive disorders group we had 35 patients with pregnancy induced hypertension, 45 with mild preeclampsia and 20 cases of severe disease. From the

point of view of clinical features, our study confirmed the association between the increased frequency of severe disease and nulliparity OR = 5 (95%CI 2.1-28.9), obesity represented by pregestational body mass index (BMI) >30, OR=3.1 (95%CI 0.89-26.5). Fetal haemodynamic adaptation was recorded in severe preeclampsia cases where we noted an increased resistivity on the umbilical artery OR = 6,5 (95%CI: 1.7 – 24.6), brain sparing OR=5.38 (95%CI 0.39 - 20.78) and ductus venous reverse flow OR=6.7 (95%CI 1.16 - 39.13). Moreover, pregnancies with severe preeclampsia had by a poor fetal outcome with low birthweight for the gestational age OR 3.2 (95%CI 2.1 - 18.6) and Apgar score <7 at 5 minutes OR=2.7 (95%CI 1.04 - 7.17). The factor V Leiden [p<0.001, OR=8.9 (95%CI 2.5 - 30.66)], C677T MTHFR [<0.001, OR=5.2 (95%CI 2.8 - 9.7)] and A1298C MTHFR [p=0,01, OR=2 (95%CI 1.1 - 3.6)] mutations were associated with an increased risk of developing hypertensive disorders of pregnancy. Furthermore, the factor V Leiden and C677T MTHFR polymorphism had a somewhat increased risk for the severe form of preeclampsia, p=0,04, OR=2 (95%CI 1,2 - 20.6) and respectively p=0,04, OR=2,5 (95%CI 1 - 19,7).

Conclusion: In the present study nulliparity and increased pregestational BMI are the clinical fetures shown to influence the risk of severe preeclampsia, being correlated with an increased risk for a poor maternal-fetal outcome. The Factor V Leiden and C677T MTHFR polymorphisms as thrombophilic genetic parameters are associated with the risk of preeclampsia with severe outcome.

ORIGINALITY AND INNOVATIVE CONTRIBUTION

Preeclampsia is a pregnancy and immediate postpartum disorder which complicates at least 2–8% of pregnancies in the Occident and up to 10% of pregnancies in the developing countries, where emergency care is often inadequate or lacking. It thus remains one of the two most common causes of maternal death in the Developed and Developing World. The World Health Organization estimates that pre-eclampsia results in over 76 000 maternal deaths per annum representing the death of one woman *at least every seven minutes* worldwide.

Prediction of preeclampsia is an obstetric and public health priority so clinicians and researchers alike are looking for a widely applicable and affordable test that could permit presymptomatic diagnosis. Obstetricians aim to identify and monitor the patients at risk and thus provide the best prenatal care for these women and their neonates. Such a test would also be useful to confirm a confounding clinical diagnosis, for other studies investigating prophylactic treatments.

Despite several promising markers for preeclampsia having been described, their reliability has been inconsistent between different studies, pehaps because preeclampsia is a multi-faceted disorder, it has been said it is not one but several diseases.

Early screening for preeclampsia, prior to the onset of the first symptoms constitutes a considerable clinical challenge. Modern methods of screening for preeclampsia and pregnancy-induced hypertension include combinations of patients history, biochemical serum markers, ultrasonographic findings, maternal genetic profile features and fetal DNA / RNA in maternal serum.

From the point of view of the importance of prediction of preeclampsia/severe preeclampsia, this thesis falls into the current trend of searching for an early, minimally invasive means of selecting the high risk population and preventing evolution towards disease with poor outcome.

According to our results, clinical and genetic features characteristic of preeclampsia may be used for the selection of patients at risk to develop the disease. The attempt to extend the number of patients and to design a score system to stratify risk will be our main concern for future research.