
TEZĂ DE DOCTORAT

Factori predictivi ai sarcinii oprite în evoluție

Doctorand **Carmen-Elena Bucuri**

Conducător de doctorat Prof.dr. **Dan Mihu**

CLUJ-NAPOCA 2019



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

LISTA DE PUBLICAȚII

Articole publicate *in extenso* ca rezultat al cercetării doctorale

1. Bucuri Carmen Elena, Ciortea Răzvan, Diculescu Doru, Măluțan Andrei, Mocan-Hognogi Radu, Berceanu Costin, Nicula Renata, Rada Maria, Mișu Dan. Yolk sac-embryo distance in correlation with soluble form of vascular endothelial growth factor levels in pregnancy with potentially reserved evolutivity. *Med Ultrason* 2018; 20(4): 487-492. *ISI Factor de impact -1.674 (Studiu cuprins în capitolul 3)*
2. Bucuri Carmen Elena, Ciortea Răzvan, Măluțan Andrei, Nicula Renata, Mișu Carmen, Istrate Mihnea, Mișu Dan. Predictive factors of early pregnancy failure. A literature review. *Gineco.eu* 2016; 12: 95-98. *CNCSIS (Studiu cuprins în capitolul 2)*
3. Bucuri Carmen Elena, Diculescu Doru, Ciortea Răzvan, Măluțan Andrei, Iuhas Cristian, Brătila Elvira, Berceanu Costin, Rada Maria, Mișu Dan. Ultrasound assessment of evolutionary outcome of first trimester pregnancy. *Congresul Societății Române de Ultrasonografie în Obstetrică-Ginecologie. Târgu-Mureș 2017; 145-149. ISI PROCEEDINGS (Studiu cuprins în capitolul 2)*
4. Bucuri Carmen Elena, Ciortea Răzvan, Diculescu Doru, Măluțan Andrei Mihai, Oancea Mihaela Daniela, Nicula Renata Lăcrămioara, Mocan-Hognogi Radu, Rada Maria Patricia, Mișu Dan. New Ultrasonographic Markers in Correlation with Serological Factors – Prognostic Factors in the First Trimester of Pregnancy. 6th Congress of the ultrasound society in obstetrics and gynaecology, 34th fetus as a patient international congress 2018, 70-75. *ISI PROCEEDINGS (Studiu cuprins în capitolul 4)*
5. Bucuri Carmen, Diculescu Doru, Ciortea Răzvan, Măluțan Andrei, Berceanu Costin, Mocan-Hognogi Radu, Oancea Mihaela, Iuhas Cristian, Rada Maria, Mișu Dan. Can an Unfavorable Outcome of the First Trimester of Pregnancy Be Anticipated? *Congresul Societății Române de Ultrasonografie în Obstetrică-Ginecologie, Târgu-Mureș 2019, 19-25. ISI PROCEEDINGS (Studiu cuprins în capitolul 4)*
6. Bucuri Carmen Elena, Ciortea Răzvan, Măluțan Andrei Mihai, Iuhas Cristian Ioan, Rada Maria Patricia, Mișu Dan. The distance between the embryo and yolk sac associated with inhibin A in the first trimester pregnancy- which is the novelty? *Obstetrica și Ginecologia* 2019; 13-17. DOI:10.26416/OBSGIN.67.1.2019 *CNCSIS (Studiu cuprins în capitolul 4)*

7. Bucuri Carmen Elena, Ciortea Răzvan, Măluțan Andrei Mihai, Costin Berceanu, Rada Maria Patricia, Miha Dan. Progesterone's serum level and a new ultrasonographic parameter in the first trimester pregnancy- prognostic factors for embryonic demise. Rev Bras Ginecol Obstet 2019; 41:525-530. DOI [https://doi.org/ 10.1055/s-0039-1696948](https://doi.org/10.1055/s-0039-1696948). *ISI Factor de impact - 0.52 (Studiu cuprins în capitolul 4)*

CUPRINS

INTRODUCERE	14
1. Sarcina oprită în evoluție	18
1.1 Introducere	18
1.2 Etiopatogenia sarcinii oprite în evoluție	19
1.3 Rolul ultrasonografiei în diagnosticul sarcinii oprite în evoluție	21
2. sFlt-1 marker de prognostic în sarcina oprită în evoluție	33
2.1 Aspecte generale	33
2.2 sFlt-1-un factor cu rol în etiopatogenia sarcinii oprite în evoluție	34
3. Rolul markerilor serologici în patologia sarcinii oprite în evoluție	38
3.1 Ipoteza de lucru/obiective	48
3.2 Motivația algerii temei de cercetare	48
2. Studiul 1. Utilitatea aprecierii prin ultrasonografie a distanței dintre vezicula vitelină și embrion în sarcina cu potențial evolutiv rezervat	50
2.1 Introducere	50
2.2 Obiective	51
2.3 Material și metodă	51
2.4 Rezultate	53
2.5 Discuții	60
2.6 Concluzii	61
3. Studiul 2. Corelația dintre sFlt-1 și distanța dintre vezicula vitelină și embrion în sarcina oprită în evoluție	62
3.1 Introducere	62
3.2 Obiective	62
3.3 Material și metodă	62
3.4 Rezultate	66
3.5 Discuții	70
3.6 Concluzii	71
4. Studiul 3. Corelația dintre markerii serologici specifici și distanța dintre vezicula vitelină și embrion în sarcina oprită în evoluție	72
4.1 Introducere	72
4.2 Obiective	72
4.3 Material și metodă	73
4.4 Rezultate	81
<i>STUDIUL A Corelația dintre DVVE și nivelul seric al β Hcg în sarcina cu potential evolutiv rezervat</i>	81
<i>STUDIUL B Corelația dintre DVVE și nivelul seric al progesteronului în sarcina cu potential evolutiv rezervat</i>	84

<i>STUDIUL C Corelația dintre DVVE și nivelul seric al Human Inhibina A în sarcina cu potential evolutiv rezervat</i>	86
<i>STUDIUL D Corelația dintre DVVE și nivelul seric al Placental Growth Factor în sarcina cu potential evolutiv rezervat</i>	88
<i>STUDIUL E Corelația dintre DVVE și nivelul seric al Human pregnancy Specific β1 Glycoprotein în sarcina cu potential evolutiv rezervat</i>	90
4.5 Discuții	94
4.6 Concluzii	100
5. Concluzii generale	102
6. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei	104
REFERINȚE	106

Cuvinte cheie: sarcina de trimestrul I, ultrasonografie, sarcină oprită în evoluție

INTRODUCERE

Nivelul actual al cunoașterii din domeniul sarcinii de prim trimestru cât și complicațiile acesteia, cu referire îndeosebi la sarcina oprită în evoluție vor fi definite și descrise cu ajutorul noțiunilor privind modalitățile de diagnostic clinic și paraclinic, factorilor de risc, noțiunilor de implantare și biologie a trofoblastului în sarcina incipientă, noțiunii de eșec al implantării din punct de vedere embriologic, factorilor predictivi ai sarcinii oprite în evoluție, complicațiilor care pot să apară în timpul sarcinii de prim trimestru .

Identificarea femeilor cu sarcină de prim trimestru, care prezintă risc de apariție a unor complicații permite alocarea de resurse importante pentru a monitoriza intens evoluția sarcinii și a interveni atunci când este cazul. Se depun eforturi susținute în vederea stabilirii valorii predictive a diferiților biomarkeri de prim trimestru.

Conform studiilor recente, incidența sarcinii oprite în evoluție este de 25%. Complicațiile sarcinii de prim trimestru reprezintă o problemă actuală de sănătate a cărei etiologie este incomplet elucidată (1).

Identificarea unui nivel scăzut de sFlt-1 înainte să se producă pierderea de sarcină sugerează o vascularizație necorespunzătoare la nivelul spațiului intervilos și se asociază cu modificări metabolice la nivelul zonei de implantare, iar aceste modificări constau în creșterea nivelului de oxigen, știindu-se că nivelul seric de sFlt-1 este invers corelat cu cantitatea de oxigen. Pe lângă sFlt-1 există numeroși biomarkeri serici cunoscuți a fi implicați în patologia sarcinii de prim trimestru, dar care nu au fost corelați cu un parametru ultrasonografic anterior (2).

Studiile efectuate în cercetare își propun evaluarea unui parametru nou ecografic și anume distanța aflată între embrion și vezicula vitelină (DVVE), existența unei corelații între acest parametru ecografic și nivelul seric al β HCG-ului (gonadotropina corionică umană), progesteronului (P), Human Inhibina A (INHA), Placental Growth Factor (PLGF) și Human pregnancy Specific β 1 Glycoprotein (PSG- β 1). De asemenea, un alt obiectiv este identificarea potențialelor complicații ale sarcinii de prim trimestru prin utilizarea factorilor angiogenici, precum și determinarea serică a formei solubile a receptorului VEGF (sFlt-1). Stabilirea asocierii acestui marker cu un stres oxidativ la nivelul interfeței utero-placentare precum și utilizarea acestuia ca un potențial marker sensibil în primul trimestru de sarcină constituie un obiectiv secundar.

STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

1. Sarcina oprită în evoluție

Sarcina cu potențial evolutiv rezervat este o entitate incomplet definită, care presupune existența unor markeri de prognostic nefavorabili, utili în aprecierea evolutivității sarcinii de prim trimestru. Sarcinile de prim trimestru cu caracter problematic constituie o parte importantă a urgențelor obstetricale. Apariția ecografiei endovaginale de înaltă rezoluție coroborată cu un acces larg la investigațiile paraclinice serologice, cum sunt monitorizarea hCG, P, INHA, PLGF, PSG-β1, a permis îmbunătățirea serviciilor medicale prin furnizarea rapidă și eficientă a unui diagnostic precoce.

Sarcina oprită în evoluție înainte de 12 săptămâni de amenoree este un eveniment frecvent întâlnit, cunoscut fiind faptul că una din patru sarcini va evolua nefavorabil, reprezentând astfel o problemă de sănătate publică importantă (1).

Parametri ultrasonografici utilizați în asociere cu nivelele serice materne ale diversilor hormoni, cu vârsta maternă, cu fumatul, cu istoricul obstetrical au fost frecvent analizați și au condus la rezultate contradictorii (3-6). Se poate concluziona că marea majoritate a pacientelor cu sarcini de prim trimestru, în care viabilitatea sau prognosticul acesteia sunt nesigure, vor necesita o consiliere atentă și o urmărire riguroasă. Astfel de factori predictorii oferă un instrument cu ajutorul căruia să se poată determina într-un mod obiectiv și precoce aspectul evolutiv al sarcinii și să se efectueze o consiliere adecvată în ceea ce privește prognosticul pe termen scurt și lung.

Cauzele de deces embrionar nu sunt încă pe deplin înțelese. Acest lucru este surprinzător având în vedere cât de frecvent este evenimentul. Există mulți factori de risc pentru sarcina oprită în evoluție în primul trimestru, însă această lucrare va lua în discuție factori biologici, sociali și de stil de viață, factori care se suprapun frecvent cu cei pentru patologia avortului spontan.

Aprecierea ecografică a prognosticului evolutiv al sarcinii de prim trimestru este posibilă prin urmărirea unor parametri specifici, precum sacul gestational (SG), vezicula vitelină (VV), embrionul și activitatea sa cardiacă, distanța dintre vezicula vitelină și embrion (DVVE).

Utilizarea ecografiei în timpul sarcinii este considerată a fi o metodă sigură atât pentru mamă, cât și pentru embrion/făt. Este bine cunoscut faptul că și în perioadele critice de dezvoltare este permisă utilizarea transductoarelor endovaginale de înaltă

frecvență, neexistând dovezi că acestea ar avea efecte negative asupra sarcinii (7, 8). Cu ajutorul ecografiei este posibilă confirmarea evolutivității unei sarcini, efectuarea unor diagrame care să conțină etapele dezvoltării fiziologice embrionare și nu în ultimul rând, identificarea femeilor cu sarcini cu potențial evolutiv rezervat (9). Analizele biochimice sensibile coroborate cu ultrasonografia cu rezoluție înaltă permit un diagnostic pozitiv de sarcină extrem de sensibil și de specific (10). Mai mult, introducerea recentă a ecografiei endovaginale 3D și 4D, a generat informații mai obiective și mai precise privind dezvoltarea embrionară și fetală precoce și a făcut posibilă vizualizarea aspectelor fascinante ale diferențierii embrionare. Posibilitatea de a observa morfologia volumetrică a embrionului încă de la începutul sarcinii are în mod clar o importanță deosebită în înțelegerea evenimentelor care au loc în această perioadă cheie a dezvoltării umane (11-13).

2. sFlt-1- un factor cu rol în etiopatogenia sarcinii oprite în evoluție

Oprirea evolutivității embrionului este considerată unul dintre "marile sindroame obstetricale" (14). Astfel, ne putem aștepta ca această entitate să prezinte multiple și variate etiologii, etape seriate, respectiv una preclinică și una clinică, precum și o serie de factori predispozanți genetici și de mediu care, singuri sau în combinație, pot modifica riscul apariției decesului embrionar (14).

Sarcina este o stare unică în care atât vasculogeneza cât și angiogeneza extinsă sunt necesare pentru dezvoltarea adecvată fetală și placentară (117, 118). Echilibrul dintre angiogeneză și antiangiogeneză este important pentru ca procesul complex de reproducere să fie un succes (15-17).

Placentația umană se caracterizează prin natura extrem de invazivă a embrionului care se nidează complet în endometrul uterin matern și în miometrul superficial prin remodelarea arterelor spiralate materne (18). În sarcinile fiziologice, cele mai precoce stadii de dezvoltare au loc într-un mediu cu un nivel scăzut de oxigen (O₂) (19, 20). Această hipoxie fiziologică a SG protejează embrionul aflat în curs de dezvoltare împotriva efectelor nocive și teratogene ale radicalilor liberi de O₂. Un gradient stabil de O₂ între decidua uterină maternă și țesutul feto-placentar este, de asemenea, un factor important în diferențierea și migrația trofoblastului, dezvoltarea normală viloză și angiogeneza (21, 22). Acest mecanism de protecție este esențial pentru dezvoltarea normală, deoarece, în tot acest timp, celulele placentare și embrionare suferă o diviziune semnificativă, expunându-și ADN-ul la efecte potențial dăunătoare ale stresului oxidativ.

Caracteristicile clinice suprapuse, precum și patologia placentară care pot conduce la oprirea evolutivității sarcinii de prim trimestru, preeclampsie și restricție de creștere fetală (23-28) sugerează că sarcinile în care embrionul se oprește precoce

în evoluție pot avea o stare antiangiogenică, reflectată de profilurile anormale ale concentrațiilor plasmatiche materne de factori angiogenici și antiangiogenici. Un studiu transversal a demonstrat, de asemenea, o concentrație plasmatică medie mai mare a sFlt-1 în rândul pacientelor care prezintă o sarcină oprită în evoluție comparativ cu pacientele care au sarcini fiziologice (29).

3. Rolul markerilor serologici specifici în patologia sarcinii oprite în evoluție

Ultrasonografia este, probabil, cea mai fiabilă metodă de diagnostic și de prognostic pentru depistarea precoce a sarcinii cu viabilitate incertă. Totuși, se consideră că există anumite situații în care atât dovada ultrasonografică cât și constatările clinice sunt imprecise. Întrucât această tehnică este dependentă de examinarea și prin urmare, rezultatele nu sunt întotdeauna în mod consecvent reproductibile, sunt necesari biomarkeri foarte sensibili și specifici pentru a evalua viabilitatea sarcinii în vederea stabilirii unei conduite terapeutice într-un stadiu precoce (30). Aceștia sunt reprezentați de β Hcg, Progesteron, Inhibina A, Proteina specifică sarcinii β 1 glicoproteina, Factorul de creștere placentar.

CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

1. Studiul 1. Utilitatea aprecierii prin ultrasonografie a distanței dintre vezicula vitelină și embrion în sarcina cu potențial evolutiv rezervat

Obiective

-Diagnosticul de sarcină intrauterină pentru ambele loturi de paciente, cu divizarea loturilor în paciente cu sarcină evolutivă, fiziologică și paciente cu semne ultrasonografice de potențial evolutiv rezervat.

-Identificarea embrionului cu activitate cardiacă în ambele loturi și măsurarea lungimii cranio-caudale a embrionului.

-Identificarea prezenței VV în ambele loturi, dimensiunea și aspectul acesteia.

-Măsurarea DVVE în ambele loturi.

Material și metodă

Studiul reprezintă o analiză prospectivă de tip caz-control care include 170 paciente aflate în trimestrul I de sarcină, fără patologii asociată. Pacientele au fost urmarite pe o perioadă de 2 ani, în intervalul 2016-2017, în Clinica Obstetrică Ginecologie "Dominic Stanca", Cluj-Napoca. Pacientele au fost grupate în 2 loturi –lotul martor ce a inclus 81 paciente cu sarcină de prim trimestru în evoluție și lotul caz ce a inclus 95 de paciente cu sarcină de trimestrul I cu potențial evolutiv rezervat, cu amenoree cuprinsă între 6-11 săptămâni. Explorarea ultrasonografică a fost efectuată cu sonda endovaginală de către același examinator (o sondă cu o frecvență nominală de 6,5 MHz) cu un dispozitiv Toshiba Aplio 300, pacientele fiind poziționate în decubit dorsal cu genunchii flectați. Pentru a evalua DVVE, a fost necesar să se evalueze separat parametri incluși: lungimea cranio-caudală (CRL), aspectul și dimensiunea VV. Au fost în medie 2-3 examinări seriate, efectuate la intervale regulate de 3-5 zile, de asemenea de către același examinator, până la diagnosticul final de sarcină oprită în evoluție. Măsurătorile DVVE au fost efectuate utilizând secțiunea sagitală și evaluând 3 distanțe diferite față de polul inferior al embrionului și VV, fiind luată în considerare cea mai mică dintre cele 3 distanțe apreciate.

Rezultate

La analiza statistică a valorilor distanței veziculă vitelină-embriion (DVVE) au fost observate diferențe statistic intens semnificative între cele două loturi ($p < 0,001$). La analiza statistică a valorilor lungimii cranio-caudale a embrionului (CRL) nu au fost observate diferențe statistic semnificative între cele două loturi ($p > 0,05$). S-a observat că există o corelație liniară, intens pozitivă între CRL și DVVE, respectiv cu cât lungimea embrionului este mai mare, cu atât DVVE este mai mare. De asemenea, s-a constatat o corelație liniară, intens pozitivă între valorile DVVE și SA, respectiv cu cât sarcina este mai avansată din punct de vedere al vârstei gestaționale, cu atât DVVE este mai mare. În ambele loturi a existat o corelație liniară, pozitivă între valorile CRL -ului și SA, respectiv cu cât lungimea embrionului este mai mare cu atât vârsta gestațională e mai avansată.

Concluzii

DVVE are o valoare predictivă pozitivă înaltă în a identifica sarcinile cu potențial evolutiv rezervat. În acest studiu s-a demonstrat că o DVVE <3 mm poate semnifica o evoluție nefavorabilă a sarcinii.

2. Studiul 2. Corelația dintre sFlt-1 și distanța dintre vezicula vitelină și embrion în sarcina oprită în evoluție

Obiectiv

Scopul acestui studiu este de a evalua corelația dintre un biomarker seric (sFlt-1) și un parametru ultrasonografic (DVVE) în aprecierea prognosticului evolutiv al sarcinii în primul trimestru.

Material și metodă

Studiul reprezintă o analiză prospectivă de tip caz-control care include 170 paciente aflate în trimestrul I de sarcină, fără patologii asociată. Pacientele au fost urmărite pe o perioadă de 2 ani, în intervalul 2016-2017, în Clinica Obstetrică Ginecologie "Dominic Stanca", Cluj-Napoca. Pacientele au fost grupate în 2 loturi –lotul martor ce a inclus 81 paciente cu sarcină de prim trimestru în evoluție și lotul caz ce a inclus 95 de paciente cu sarcină de trimestrul I cu potențial evolutiv rezervat, cu amenoree cuprinsă între 6-11 săptămâni. De la fiecare subiect inclus în studiu s-au recoltat prin puncție venoasă 20 ml de sânge în eprubete fără anticoagulant pentru efectuarea dozărilor sFlt-1. Serul obținut prin centrifugare a fost împărțit și depozitat în tuburi de congelare a 600 μ l la o temperatură de -60° C până la prelucrarea probelor în scopul evitării ciclurilor repetate de îngheț-dezgheț.

Rezultate

În analiza statistică a valorilor sFlt-1 s-au observat diferențe semnificative statistic între cele două grupuri ($p < 0,001$). Am identificat faptul că o DVVE ≤ 3 mm se corelează cu un nivel scăzut de sFlt-1 ($p < 0,05$) și o DVVE > 3 mm se corelează cu un nivel crescut de sFlt-1 ($p < 0,05$). Astfel, s-a demonstrat că există o corelație între DVVE și sFlt-1 în 100% din cazuri și semnificativă din punct de vedere statistic. A fost identificată o corelație pozitivă între nivelul sFlt-1 și DVVE în cazul lotului martor, respectiv cu cât sFlt-1 este mai mare cu atât DVVE este mai mare și deci, sarcina are un prognostic net favorabil. Invers, cu cât nivelul seric de sFlt-1 este mai

redus, cu atât DVVE este mai mică, existând deci o corelație negativă în lotul sarcinilor cu evoluție nefavorabilă.

Concluzii

Corelarea acestui parametru ecografic cu unul serologic, respectiv cu nivelul de sFlt-1, aduce informații valoroase despre viabilitatea sarcinii în primul trimestru. Nivelul seric scăzut de s-Flt1 se asociază cu o rată crescută de embrioni neviabili.

3. Studiul 3. Corelația dintre markerii serologici specifici și distanța dintre vezicula vitelină și embrion în sarcina oprită în evoluție

Obiective

Scopul acestui studiu este de a evalua corelația dintre biomarkerii serici: β hCG, progesteron, Human Inhibina A, Human Pregnancy Specific β 1 Glicoprotein, Placental Growth Factor și un parametru ultrasonografic (DVVE) în aprecierea prognosticului evolutiv al sarcinii în primul trimestru.

Material și metodă

Studiul reprezintă o analiză prospectivă de tip caz-control care include 170 paciente aflate în trimestrul I de sarcină, fără patologii asociată. Pacientele au fost urmărite pe o perioadă de 2 ani, în intervalul 2016-2017, în Clinica Obstetrică și Ginecologie "Dominic Stanca", Cluj-Napoca. Pacientele au fost grupate în 2 loturi –lotul martor ce a inclus 81 paciente cu sarcină de prim trimestru în evoluție și lotul caz ce a inclus 95 de paciente cu sarcină de trimestrul unu cu potențial evolutiv rezervat, cu amenoree cuprinsă între 6-11 săptămâni. De la fiecare subiect inclus în studiu s-au recoltat prin puncție venoasă 20 ml de sânge în eprubete fără anticoagulant pentru efectuarea dozărilor markerilor serici urmăriți.

Rezultate

La analiza statistică a valorilor gonadotropinei corionice umane (β -hCG) au fost observate diferențe statistic semnificative între cele două loturi ($p < 0,05$). A fost identificată o corelație pozitivă între DVVE și nivelul seric al β hCG-ului, respectiv cu cât nivelul seric al acestuia este mai redus cu atât DVVE este mai mică, atrăgând după sine o evoluție nefavorabilă a sarcinii.

La analiza statistică a valorilor progesteronului (P) au fost observate diferențe statistic intens semnificative între cele două loturi ($p < 0,001$) în săptămânile de amenoree S9 și S10, diferențe statistic foarte semnificative între cele două loturi ($p < 0,01$) în săptămâna de amenoree S8 și diferențe statistic semnificative între cele două loturi ($p < 0,05$) în săptămâna de amenoree S11. Corelația dintre DVVE și nivelul seric al P nu a fost identificată constant în niciunul dintre loturi, urmând a se identifica prezența acesteia în studii cu număr mai mare de paciente.

La analiza statistică a valorilor inhibinei A (INHA) au fost observate diferențe statistic intens semnificative între cele două loturi ($p < 0,001$). Analiza statistică de corelație între valorile indicatorilor studiați a arătat: la lotul I o corelație slabă/nulă între DVVE și INHA iar la lotul II o corelație foarte bună și de același sens între DVVE – INHA.

La analiza statistică a valorilor factorului de creștere placentară (PLGF) au fost observate diferențe statistic intens semnificative între cele două loturi ($p < 0,001$). Analiza statistică de corelație între valorile indicatorilor studiați a arătat: la lotul I o corelație slabă/nulă între DVVE și PLGF iar la lotul II o corelație foarte bună și de același sens între DVVE – PLGF.

La analiza statistică a valorilor glicoproteinei umane specifice de sarcină beta 1 (PSG- β 1) au fost observate diferențe statistic intens semnificative între cele două loturi ($p < 0,001$). Analiza statistică de corelație între valorile indicatorilor studiați a arătat: la lotul I o corelație slabă/nulă între DVVE și PSG- β 1 ($p > 0,05$) iar la lotul II o corelație bună dar de sens opus între DVVE – PSG- β 1 ($p < 0,001$).

Concluzii

Existența unei corelații direct proporționale între nivelul seric al β hCG-ului și DVVE poate fi considerată un marker al viabilității sarcinii de prim trimestru.

P seric este un marker valoros pentru sarcina oprită în evoluție iar o singură determinare a nivelului seric a P poate diferenția o sarcină viabilă de cea neviabilă.

INHA determinată la debutul sarcinii poate fi un predictor puternic al prognosticului sarcinii în cazul concepțiilor spontane.

Etapele precoce ale sarcinii sunt sensibile la deficitul de INHA, nivelurile de INHA în cazul sarcinilor oprite în evoluție fiind semnificativ mai scăzute comparativ cu cele ale sarcinilor fiziologice.

Sarcinile de trimestrul I în care se constată o concentrație serică scăzută de PLGF pot evolua nefavorabil.

Există o corelație invers proporțională între nivelul seric al PSG- β 1 și DVVE la sarcinile de trimestrul I cu potențial evolutiv rezervat.

Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei

Sarcina oprită în evoluție reprezintă o entitate cu care se confruntă 25% din populația feminină în secolul XXI. În țările dezvoltate prevalența sarcinii oprite în evoluție continuă să fie crescută, afectând persoanele aflate la vârsta reproductivă. Studiile epidemiologice evidențiază anomaliile cromozomiale ca fiind cauza cea mai frecvent întâlnită în patologia sarcinii oprite în evoluție, aproximativ 40% din cazuri (1).

Prin această temă de cercetare am contribuit la o mai bună înțelegere a fenomenelor fiziologice și patologice ale sarcinii de prim trimestru. De asemenea, alte contribuții potențiale propuse în cadrul acestor studii s-au referit la perfecționarea metodelor de diagnostic precoce ale sarcinii oprite în evoluție pornind de la ideea că nu este descrisă încă o corelație între nivelul seric al P, β HCG-ului, INHA, PLGF, PSG- β 1 și distanța dintre vezicula vitelină și embrion.

Tema de cercetare și-a propus să stabilească existența acestei corelații în evaluarea viabilității sarcinii de prim trimestru precum și determinarea nivelului seric al sFlt-1, un marker sensibil de identificare a modificărilor metabolice de la nivelul zonei de implantare, datele noastre întărind ideea din literatură potrivit căreia un nivel seric scăzut de sFlt-1 se asociază cu o rată crescută de embrioni neviabili.

Originalitatea proiectului este determinată de efectuarea unui studiu care se adresează unui segment populațional important în România care a utilizat mijloace moderne, neinvazive sau minim invazive pentru evaluarea unor parametri cu aplicabilitate practică de stabilire cu certitudine a sarcinilor problematice.

De asemenea, au fost identificate noi perspective privind utilizarea unor parametri ecografici sau biologici cunoscuți dar care nu au fost utilizați în această asociere în vederea aprofundării mecanismelor implicate în sarcina de trimestrul I în condiții fiziologice sau patologice.

Referințe

1. Farquharson RG, Stephenson MD. Early pregnancy. Ed. Cambridge University Press. 2010.
2. Jauniaux E, Watson AL, Hempstock J, Bao YP, Skepper JN, Burton GJ. Onset of maternal arterial blood flow and placental oxidative stress – a possible factor in human early pregnancy failure. *Am J Pathol.* 2000; 157: 2111–2122.
3. Makrydimas G, Sebire N, Lolis D, Vlassis N, Nicolaidis KH. Fetal loss following ultrasound diagnosis of a live fetus at 6–10 weeks of gestation. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2003; 22: 368–372.
4. Oh JS, Wright G, Coulam CB. Gestational sac diameter in very early pregnancy as a predictor of fetal outcome. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2002; 20: 267.
5. Pregnancies and births resulting from in vitro fertilization: French national registry, analysis of data 1986 to 1990. FIVNAT (French In Vitro National). *Fertil Steril.* 1995; 64: 746–756.
6. Choong S, Rombauts L, Ugoni A, Meagher S. Ultrasound prediction of risk of spontaneous miscarriage in live embryos from assisted conception. Society for Assisted Reproductive Technology. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2003; 22: 571–577.
7. American College of Obstetricians and Gynecologists. Ultrasonography in pregnancy. ACOG Practice Bulletin No 58. *Obstet Gynecol.* 2004; 104:1449-1458.
8. Lausin I, Kurjak A, Pooh R, Azumendi G, Maeda K. Advances in visualization the human embryo development. *Donald School Journal of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology.* 2009; 3(3):25-38.
9. Sawyer E, Jurkovic D. Ultrasonography in the diagnosis and management of abnormal early pregnancy. *Clin Obstet Gynecol.* 2007; 50:31-54.
10. Cohen L. Diagnostic ultrasound in the first trimester of pregnancy. In *Gynecology and Obstetrics: Lippincott, Williams and Wilkins.* 2004; 2: 4.
11. Kurjak A, Pooh RK, Merce LT, Carrera JM, Salihagic-Kadic A, Andonotopo W. Structural and functional early human development assessed by three-dimensional and four-dimensional sonography. *Fertil Steril.* 2005; 84:1285-99.
12. Andonopoto W, Kurjak A. Early normal pregnancy. In: Carrera JM, Kurjak A (Eds): *Donald School Atlas of Clinical Application of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology.* India: Jaypee Brothers Medical Publishers. 2006; 3:25-50.
13. Lopez RM, Cortes LM, Salazar JC, Lopez LC. Contributions of 3D ultrasonography to the study of embryonic development. In: Kurjak A (Eds): *Textbook of Perinatal Medicine.* India: Jaypee Brothers Medical Publishers. 2006; 12:1307-14.
14. Laurence AC. Implantation and Pregnancy Failure. *Biology of Life.* 2016.
15. Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeyt S, Kieckens L, Gertsenstein M, Fahrig M et al. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature.* 1996; 380:435–439.
16. Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H, Dowd M, Lu L, O’Shea KS, Powell-Braxton L, Hillan KJ, Moore MW. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature.* 1996; 380:439–442.
17. Fong GH, Rossant J, Gertsenstein M, Breitman ML. Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature.* 1995; 376:66–70.

18. Jauniaux E, Poston L, Burton GJ. Placental-related diseases of pregnancy: Involvement of oxidative stress and implications in human evolution. *Hum Reprod Update*. 2006; 12: 747–755.
19. Plaisier M, Rodrigues S, Willems F, Koolwijk P, van Hinsbergh VW, et al. Different degrees of vascularization and their relationship to the expression of vascular endothelial growth factor, placental growth factor, angiopoietins, and their receptors in first-trimester decidual tissues. *Fertil Steril*. 2007; 88: 176–187.
20. Jauniaux E, Gulbis B, Burton GJ. The human first trimester gestational sac limits rather than facilitates oxygen transfer to the foetus: A review. *Placenta Trophoblast Res*. 2003; 24: 86–93.
21. Red-Horse K, Zhou Y, Genbacev O, Prakobphol A, Foulk R, et al. Trophoblast differentiation during embryo implantation and formation of the maternal-fetal interface. *J Clin Invest*. 2004; 114: 744–754.
22. Burton GJ. Oxygen, the Janus gas; its effects on human placental development and function. *J Anat*. 2009; 215: 27–35.
23. Cnattingius S, Haglund B, Kramer MS. Differences in late fetal death rates in association with determinants of small for gestational age fetuses: population based cohort study. *BMJ*. 1998; 316:1483–1487.
24. Espinoza J, Chaiworapongsa T, Romero R, Kim YM, Kim GJ, Nien JK, Kusanovic JP, Erez O, Bujold E, Goncalves LF, Gomez R, Edwin S. Unexplained fetal death: another anti-angiogenic state. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2007; 20:495–507.
25. Osol G, and Mandala M. Maternal uterine vascular remodeling during pregnancy. *Physiology*. 2009; 24: 58-71.
26. Reynolds LP, Borowicz PP, Caton JS, Vonnahme KA, Luther JS, Hammer CJ, Maddock Carlin KR, Grazul-Bilska AT, Redmer DA. Developmental programming: the concept, large animal models, and the key role of uteroplacental vascular development. *Journal of animal science*. 2010; 88: 61-72.
27. Josko J, and Mazurek M. Transcription factors having impact on vascular endothelial growth factor (VEGF) gene expression in angiogenesis. *Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research*. 2010; 10: 89-98.
28. Adamson SL, Lu Y, Whiteley KJ, Holmyard D, Hemberger M, Pfarrer C, Cross JC. Interactions between trophoblast cells and the maternal and fetal circulation in the mouse placenta. *Developmental biology*. 2002; 250: 358-373.
29. Andraweera PH, Dekker GA, Laurence JA, and Roberts CT. Placental expression of VEGF family mRNA in adverse pregnancy outcomes. *Placenta*. 2012; 33: 467-472.
30. Jauniaux E1, Johns J, Burton GJ. The role of ultrasound imaging in diagnosing and investigating early pregnancy failure. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2005; 25(6):613-24.

PHD THESIS SUMMARY

Predictive factors for embryonic demise

PhD Student **Carmen-Elena Bucuri**

PhD Supervisor Prof.dr. **Dan Mihu**

Cluj-Napoca 2019



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

Publications

1. Bucuri Carmen Elena, Ciortea Răzvan, Diculescu Doru, Măluțan Andrei, Mocan-Hognogi Radu, Berceanu Costin, Nicula Renata, Rada Maria, Mihiu Dan. Yolk sac-embryo distance in correlation with soluble form of vascular endothelial growth factor levels in pregnancy with potentially reserved evolutivity. *Med Ultrason* 2018; 20(4): 487-492. *ISI Factor de impact -1.674 (Study contained in the 3rd chapter)*
2. Bucuri Carmen Elena, Ciortea Răzvan, Măluțan Andrei, Nicula Renata, Mihiu Carmen, Istrate Mihnea, Mihiu Dan. Predictive factors of early pregnancy failure. A literature review. *Gineco.eu* 2016; 12: 95-98. *CNCSIS (Study contained in the 2nd chapter)*
3. Bucuri Carmen Elena, Diculescu Doru, Ciortea Răzvan, Măluțan Andrei, Iuhas Cristian, Brătila Elvira, Berceanu Costin, Rada Maria, Mihiu Dan. Ultrasound assessment of evolutionary outcome of first trimester pregnancy. *Congresul Societății Române de Ultrasonografie în Obstetrică-Ginecologie. Târgu-Mureș* 2017; 145-149. *ISI PROCEEDINGS (Study contained in the 2nd chapter)*
4. Bucuri Carmen Elena, Ciortea Răzvan, Diculescu Doru, Măluțan Andrei Mihai, Oancea Mihaela Daniela, Nicula Renata Lăcrămioara, Mocan-Hognogi Radu, Rada Maria Patricia, Mihiu Dan. New Ultrasonographic Markers in Correlation with Serological Factors – Prognostic Factors in the First Trimester of Pregnancy. 6th Congress of the ultrasound society in obstetrics and gynaecology, 34th fetus as a patient international congress 2018, 70-75. *ISI PROCEEDINGS (Study contained in the 4th chapter)*
5. Bucuri Carmen, Diculescu Doru, Ciortea Răzvan, Măluțan Andrei, Berceanu Costin, Mocan-Hognogi Radu, Oancea Mihaela, Iuhas Cristian, Rada Maria, Mihiu Dan. Can an Unfavorable Outcome of the First Trimester of Pregnancy Be Anticipated? *Congresul Societății Române de Ultrasonografie în Obstetrică-Ginecologie, Târgu-Mureș* 2019, 19-25. *ISI PROCEEDINGS (Study contained in the 4th chapter)*
6. Bucuri Carmen Elena, Ciortea Răzvan, Măluțan Andrei Mihai, Iuhas Cristian Ioan, Rada Maria Patricia, Mihiu Dan. The distance between the embryo and yolk sac associated with inhibin A in the first trimester pregnancy- which is the novelty? *Obstetrica și Ginecologia* 2019; 13-17. DOI:10.26416/OBSGIN.67.1.2019 *CNCSIS (Study contained in the 4th chapter)*

7. Bucuri Carmen Elena, Ciortea Răzvan, Măluțan Andrei Mihai, Costin Berceanu, Rada Maria Patricia, Miha Dan. Progesterone's serum level and a new ultrasonographic parameter in the first trimester pregnancy- prognostic factors for embryonic demise. Rev Bras Ginecol Obstet 2019; 41:525-530. DOI [https://doi.org/ 10.1055/s-0039-1696948](https://doi.org/10.1055/s-0039-1696948). *ISI Factor de impact - 0.52 (Study contained in the 4th chapter)*

INTRODUCTION

The current level of knowledge in the field of first trimester pregnancy as well as its complications, especially with reference to the embryonic demise, will be defined and described with the help of the notions regarding the clinical and paraclinical diagnosis modalities, risk factors, implantation concepts and trophoblast biology in the incipient pregnancy, the notion of failure of the implantation from the embryological point of view, the predictive factors of the embryonic demise, the complications that may occur during the pregnancy of the first trimester.

The identification of women with first trimester pregnancy, who are at risk of developing complications, allows the allocation of important resources to intensively monitor the evolution of pregnancy and intervene when appropriate. Efforts are being made to establish the predictive value of the different first trimester biomarkers.

According to recent studies, the incidence of embryonic demise is 25%. Complications of first trimester pregnancy are a current health problem whose etiology is incompletely elucidated (1).

The identification of a low level of sFlt-1 before the loss of pregnancy suggests an improper vascularization at the level of the intervillous space and is associated with metabolic changes at the implantation zone, and these changes consist in the increase of the oxygen level, knowing that the serum level of sFlt-1 is inversely correlated with the amount of oxygen. In addition to sFlt-1, there are numerous serum biomarkers known to be involved in first trimester pregnancy pathology, but which have not been correlated with a previous ultrasonographic parameter (2).

The studies carried out in the research aim to evaluate a new ultrasound parameter, namely the distance between the embryo and the yolk sac (DYSE), the existence of a correlation between this ultrasound parameter and the serum level of β HCG (human chorionic gonadotropin), progesterone (P), Human Inhibin A (INHA), Placental Growth Factor (PLGF) and Human pregnancy Specific β 1 Glycoprotein (PSG- β 1). Also, another objective is to identify the potential complications of the first trimester pregnancy by using angiogenic factors, as well as the serum determination of the soluble form of the VEGF receptor (sFlt-1). Establishing the association of this marker with oxidative stress at the level of the utero-placental interface and its use as a potential sensitive marker in the first trimester of pregnancy is a secondary objective.

CURRENT STATE OF KNOWLEDGE

1. Embryonic demise

The first trimester pregnancy with a potentially reserved outcome is an incompletely defined entity, which implies the existence of unfavorable prognostic markers, useful in assessing the evolution of the first trimester pregnancy. Problematic first-trimester pregnancies are an important part of obstetric emergencies. The emergence of high-resolution endovaginal ultrasound, coupled with wide access to paraclinical serological investigations, such as hCG, P, INHA, PLGF, PSG- β 1 monitoring, has allowed the improvement of medical services by providing a rapid and efficient early diagnosis.

Embryonic demise before 12 weeks of amenorrhea is a common occurrence, as it is known that one in four pregnancies will evolve unfavorably, thus representing an important public health problem (1).

Ultrasonographic parameters used in combination with maternal serum levels of various hormones, maternal age, smoking, and obstetric history were frequently analyzed and led to conflicting results (3-6). It can be concluded that the vast majority of patients with first trimester pregnancies, where its viability or prognosis are uncertain, will require careful counseling and careful follow-up. Such predictive factors provide an instrument with which to be able to determine in an objective and precocious way the outcome of the pregnancy and to make an adequate advice regarding the short and long term prognosis.

The causes of embryonic demise are not yet fully understood. This is surprising given how frequent the event is. There are many risk factors for embryonic demise in the first trimester, but this paper will take into account biological, social and lifestyle factors, factors that frequently overlap with those for spontaneous abortion pathology. Ultrasound assessment of the prognosis of the first trimester pregnancy is possible by following specific parameters, such as the gestational sac (GS), the yolk sac (YS), the embryo and its cardiac activity, the distance between the yolk sac and the embryo (DYSE).

The use of ultrasound during pregnancy is considered to be a safe method for both mother and embryo / fetus. It is well known that the use of high endovaginal transducers is also allowed during critical development periods frequency, with no evidence that they would have a negative effect on pregnancy (7, 8). With the help of ultrasound, it is possible to confirm the evolution of a pregnancy, to perform diagrams

that contain the stages of embryonic physiological development and, last but not least, the identification of women with pregnancy with potentially reserved outcome (9).

Sensitive biochemical analyzes in conjunction with high-resolution ultrasonography allow a positive diagnosis of highly sensitive and specific pregnancy (10). Moreover, the recent introduction of 3D and 4D endovaginal ultrasound has generated more objective and accurate information on early embryonic and fetal development and made it possible to visualize the fascinating aspects of embryonic differentiation. The possibility of observing the volumetric morphology of the embryo from the beginning of pregnancy is clearly of particular importance in understanding the events that take place during this key period of human development (11-13).

2. sFlt-1- a factor with a role in the etiopathogenesis of the embryonic demise

Embryonic demise is considered one of the "major obstetrical syndromes" (14). Thus, we can expect this entity to present multiple and varied etiologies, serial stages, respectively a preclinical and a clinical one, as well as a series of genetic and environmental predisposing factors that, alone or in combination, can change the risk of embryo death (14).

Pregnancy is a unique state in which both vasculogenesis and extended angiogenesis are necessary for adequate fetal and placental development (117, 118).

The balance between angiogenesis and antiangiogenesis is important for the complex reproduction process to be successful (15-17).

Human placenta is characterized by the extremely invasive nature of the embryo, which nests completely in the maternal uterine endometrium and in the superficial myometrium by remodeling maternal spiral arteries (18). In physiological pregnancies, the earliest developmental stages occur in a low oxygen (O₂) environment (19, 20). This physiological hypoxia of GS protects the developing embryo against the harmful and teratogenic effects of O₂ free radicals. A stable O₂ gradient between maternal uterine decidua and fetal-placental tissue is also an important factor in trophoblast differentiation and migration, normal villous development and angiogenesis (21, 22). This protective mechanism is essential for normal development because, all the while, the placental and embryonic cells undergo significant division, exposing their DNA to the potentially deleterious effects of oxidative stress.

The overlapping clinical features, as well as placental pathology that may lead to stopping the evolution of first-trimester pregnancy, preeclampsia, and fetal growth restriction (23-28), suggest that the pregnancies in which the embryo stops early in evolution they may have an antiangiogenic status, reflected by the abnormal profiles of maternal plasma concentrations of angiogenic and antiangiogenic factors. A cross-sectional study also demonstrated a higher mean plasma concentration of sFlt-1

among patients with an embryonic demise compared with patients with physiological pregnancies (29).

3. The role of specific serological markers in the pathology of pregnancy stopped in evolution

Ultrasonography is probably the most reliable diagnostic and prognostic method for early detection of pregnancy with uncertain viability. However, it is considered that there are certain situations where both ultrasonographic evidence and clinical findings are inaccurate. As this technique is dependent on the examiner and therefore the results are not always consistently reproducible, highly sensitive and specific biomarkers are needed to evaluate the viability of pregnancy in order to establish therapeutic behavior at an early stage (30). They are represented by β Hcg, Progesterone, Inhibin A, Protein specific for β 1 glycoprotein, Placental growth factor.

PERSONAL CONTRIBUTION

1. First study. Usefulness of ultrasonography assessment of the distance between the yolk sac and the embryo in pregnancy with potentially reserved outcome

Objectives

- Diagnosis of intrauterine pregnancy for both groups of patients, with the division of the patients into patients with physiological first trimester pregnancies and patients with ultrasonographic signs of potentially reserved outcome.
- Identification of the embryo with cardiac activity in both groups and measurement of the crown-rump length of the embryo.
- Identification of the presence of YS in both groups, its size and appearance.
- DYSE measurement in both groups.

Material and method

The study represents a prospective case-control analysis that includes 170 patients in the first trimester of pregnancy, without associated pathology. Patients were followed for a period of 2 years, between 2016-2017, in the Obstetric Gynecology Clinic "Dominic Stanca", Cluj-Napoca. Patients were split into 2 groups - the control group that included 81 patients with evolving first trimester pregnancy and the case group that included 95 patients with first trimester pregnancy with

potentially reserved outcome, with amenorrhea ranging from 6-11 weeks. The ultrasonographic examination was performed with the endovaginal probe by the same examiner (a probe with a nominal frequency of 6.5 MHz) with a Toshiba Aplio 300 device, the patients being positioned in the dorsal decubitus with the knees flexed. In order to evaluate DYSE, it was necessary to evaluate separately the included parameters: crown-rump length (CRL), appearance and size of YS. There were on average 2-3 serial examinations, performed at regular intervals of 3-5 days, also by the same examiner, until the final diagnosis of pregnancy was embryonic demise. The DYSE measurements were performed using the sagittal section and evaluating 3 different distances from the lower pole of the embryo and YS, taking into account the smallest of the 3 distances appreciated.

Results

In the statistical analysis of the values of the DYSE, statistically significant differences were observed between the two groups ($p < 0.001$). No statistical differences were observed between the two groups ($p > 0.05$) in the statistical analysis of the CRL values. It was observed that there is a linear, intensely positive correlation between CRL and DYSE, respectively the larger the embryo length, the larger the DYSE. Also, there was a linear correlation, intensely positive between the values of DYSE and weeks of amenorrhea (WA), respectively the higher the pregnancy may be in terms of gestational age, the higher the DYSE. In both groups, there was a linear, positive correlation between the values of the CRL and WA, respectively the longer the embryo length is, the more the gestational age is more advanced.

Conclusions

DYSE has a high positive predictive value in identifying pregnancies with potentially reserved outcome. In this study it was shown that a DYSE < 3 mm can mean an unfavorable pregnancy development.

2. The second study. The correlation between sFlt-1 and the distance between the vitelline vesicle and the embryo in the pregnancy stopped in evolution

Objective

The purpose of this study is to evaluate the correlation between a serum biomarker (sFlt-1) and an ultrasonographic parameter (DYSE) in assessing the outcome of pregnancy in the first trimester.

Material and method

The study represents a prospective case-control analysis that includes 170 patients in the first trimester of pregnancy, without associated pathology. Patients were followed for a period of 2 years, between 2016-2017, in the Obstetric Gynecology Clinic "Dominic Stanca", Cluj-Napoca. Patients were split into 2 groups - the control group that included 81 patients with evolving first trimester pregnancy and the case group that included 95 patients with first trimester pregnancy with potentially reserved outcome, with amenorrhea ranging from 6-11 weeks. From each subject included in the study, 20 ml of blood was collected by venous puncture in tubes without anticoagulant for sFlt-1 dosing. The serum obtained by centrifugation was divided and stored in freezing tubes of 600 μ l at a temperature of - 600 C until processing of the samples in order to avoid repeated cycles of freeze-thaw.

Results

In the analysis of sFlt-1 values, statistically significant differences were observed between the two groups ($p < 0.001$). We identified that a DYSE ≤ 3 mm correlates with a low level of sFlt-1 ($p < 0.05$) and a DYSE > 3 mm correlates with an increased level of sFlt-1 ($p < 0.05$). Thus, it has been shown that there is a correlation between DYSE and sFlt-1 in 100% of cases and statistically significant. A positive correlation was identified between the level of sFlt-1 and DYSE in the case of the control group, respectively, the higher the sFlt-1, the higher the DYSE and, therefore, the pregnancy has a obvious favorable prognosis. Conversely, the lower the serum level of sFlt-1, the lower the DYSE, so there is a negative correlation in the group of pregnancies with unfavorable evolution.

Conclusions

The correlation of this ultrasound parameter with a serological one, respectively with the level of sFlt-1, brings valuable information about the viability of the pregnancy in the first trimester.

The low serum level of s-Flt1 is associated with an increased rate of nonviable embryos.

3. The third study. Correlation between the specific serological markers and the distance between the yolk sac and the embryo in pregnancies with embryonic demise

Objectives

The purpose of this study is to evaluate the correlation between serum biomarkers: β hCG, progesterone, Human Inhibin A, Human Pregnancy Specific β 1 Glycoprotein, Placental Growth Factor and an ultrasonographic parameter (DYSE) in assessing the outcome of pregnancy in the first trimester.

Material and method

The study represents a prospective case-control analysis that includes 170 patients in the first trimester of pregnancy, without associated pathology. The patients

were followed for a period of 2 years, in the period 2016-2017, in the Obstetrics and Gynecology Clinic "Dominic Stanca", Cluj-Napoca. Patients were split into 2 groups - the control group that included 81 patients with evolving first trimester pregnancy and the case group that included 95 patients with first trimester pregnancy with potentially reserved outcome, with amenorrhea ranging from 6-11 weeks. From each subject included in the study, 20 ml of blood was collected by venous puncture in tubes without anticoagulant for dosing of the serum markers followed.

Results

Statistically significant differences were observed between the two groups ($p < 0.05$) in the statistical analysis of human chorionic gonadotropin (β -hCG) values. A positive correlation between DYSE and the serum level of β hCG was identified, respectively, the lower the serum level, the lower the DYSE, leading to an unfavorable pregnancy evolution.

In the statistical analysis of progesterone (P) values, statistically significant differences were observed between the two groups ($p < 0.001$) in the amenorrhea weeks 9 and 10, very statistically significant differences between the two groups ($p < 0.01$) in the 8th week of amenorrhea and statistically significant differences between the two groups ($p < 0.05$) in the 11th week of amenorrhea. The correlation between DYSE and serum level of P was not consistently identified in any of the groups, and its presence will be identified in studies with higher number of patients.

Statistically significant differences between the two groups were observed in the statistical analysis of inhibin A (INHA) values ($p < 0.001$). The statistical analysis of correlation between the values of the studied indicators showed: in group I a weak / null correlation between DYSE and INHA and in group II a very good and similar correlation between DYSE - INHA.

In the statistical analysis of placental growth factor (PLGF) values, statistically significant differences were observed between the two groups ($p < 0.001$). The statistical analysis of the correlation between the values of the studied indicators showed: in group I a weak / null correlation between DYSE and PLGF and in group II a very good and similar correlation between DYSE - PLGF.

Statistically significant differences were observed between the two groups ($p < 0.001$) in the statistical analysis of the specific human glycoprotein beta 1 (PSG- β 1) values. Statistical correlation analysis between the values of the studied indicators showed: in group I a weak / null correlation between DYSE and PSG- β 1 ($p > 0.05$) and in group II a good but opposite correlation between DYSE - PSG- β 1 ($p < 0.001$).

Conclusions

The existence of a directly proportional correlation between the serum level of β hCG and DYSE can be considered a marker of first trimester pregnancy viability.

Serum P is a valuable marker for embryonic demise and a single determination of the serum level of P can differentiate between a viable and a non-viable one.

INHA determined at the onset of pregnancy can be a strong predictor of pregnancy outcome in spontaneous conceptions.

Early stages of pregnancy are sensitive to INHA deficiency, INHA levels in the case of embryonic demise being significantly lower compared to those of physiological pregnancies.

Pregnancy during the first trimester in which a low serum concentration of PLGF can be detected may be unfavorable.

There is an inversely proportional correlation between the serum level of PSG- β 1 and DYSE in the 1st trimester pregnancies with potentially reserved outcome.

Originality and innovative contributions of the thesis

Embryonic demise is an entity facing 25% of the female population in the 21st century. In the developed countries the prevalence of embryonic demise continues to increase, affecting the women of reproductive age. Epidemiological studies show that chromosomal abnormalities are the most common cause of embryonic demise, approximately 40% of cases (1).

Through this research topic I contributed to a better understanding of the physiological and pathological phenomena of the first trimester pregnancy. Also, other potential contributions proposed in these studies have referred to the improvement of the early diagnosis methods of the embryonic demise starting from the idea that there is not yet described a correlation between the serum level of P, β HCG, INHA, PLGF, PSG- β 1 and the distance between the yolk sac and the embryo.

The research topic aimed to establish the existence of this correlation in assessing the viability of the first trimester pregnancy as well as determining the serum level of sFlt-1, a sensitive marker for identifying the metabolic changes at the implantation zone, our data reinforcing the idea from the literature. according to which a low serum level of sFlt-1 is associated with an increased rate of nonviable embryos.

The originality of the project is determined by conducting a study that addresses an important population segment in Romania that used modern, non-invasive or minimally invasive means for evaluating parameters with practical applicability for establishing problematic pregnancies with certainty.

Also, new perspectives were identified regarding the use of known ultrasound or biological parameters but which were not used in this association in order to deepen the mechanisms involved in the pregnancies of the first trimester in physiological or pathological conditions.

References

31. Farquharson RG, Stephenson MD. Early pregnancy. Ed. Cambridge University Press. 2010.
32. Jauniaux E, Watson AL, Hempstock J, Bao YP, Skepper JN, Burton GJ. Onset of maternal arterial blood flow and placental oxidative stress – a possible factor in human early pregnancy failure. *Am J Pathol.* 2000; 157: 2111–2122.
33. Makrydimas G, Sebire N, Lolis D, Vlassis N, Nicolaides KH. Fetal loss following ultrasound diagnosis of a live fetus at 6–10 weeks of gestation. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2003; 22: 368–372.
34. Oh JS, Wright G, Coulam CB. Gestational sac diameter in very early pregnancy as a predictor of fetal outcome. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2002; 20: 267.
35. Pregnancies and births resulting from in vitro fertilization: French national registry, analysis of data 1986 to 1990. FIVNAT (French In Vitro National). *Fertil Steril.* 1995; 64: 746–756.
36. Choong S, Rombauts L, Ugoni A, Meagher S. Ultrasound prediction of risk of spontaneous miscarriage in live embryos from assisted conception. Society for Assisted Reproductive Technology. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2003; 22: 571–577.
37. American College of Obstetricians and Gynecologists. Ultrasonography in pregnancy. ACOG Practice Bulletin No 58. *Obstet Gynecol.* 2004; 104:1449-1458.
38. Lausin I, Kurjak A, Pooh R, Azumendi G, Maeda K. Advances in visualization the human embryo development. *Donald School Journal of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology.* 2009; 3(3):25-38.
39. Sawyer E, Jurkovic D. Ultrasonography in the diagnosis and management of abnormal early pregnancy. *Clin Obstet Gynecol.* 2007; 50:31-54.
40. Cohen L. Diagnostic ultrasound in the first trimester of pregnancy. In *Gynecology and Obstetrics: Lippincott, Williams and Wilkins.* 2004; 2: 4.
41. Kurjak A, Pooh RK, Merce LT, Carrera JM, Salihagic-Kadic A, Andonotopo W. Structural and functional early human development assessed by three-dimensional and four- dimensional sonography. *Fertil Steril.* 2005; 84:1285-99.
42. Andonopoto W, Kurjak A. Early normal pregnancy. In: Carrera JM, Kurjak A (Eds): *Donald School Atlas of Clinical Application of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology.* India: Jaypee Brothers Medical Publishers. 2006; 3:25-50.
43. Lopez RM, Cortes LM, Salazar JC, Lopez LC. Contributions of 3D ultrasonography to the study of embryonic development. In: Kurjak A (Eds): *Textbook of Perinatal Medicine.* India: Jaypee Brothers Medical Publishers. 2006; 12:1307-14.
44. Laurence AC. Implantation and Pregnancy Failure. *Biology of Life.* 2016.
45. Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeyt S, Kieckens L, Gertsenstein M, Fahrig M et al. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature.* 1996; 380:435–439.
46. Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H, Dowd M, Lu L, O’Shea KS, Powell-Braxton L, Hillan KJ, Moore MW. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature.* 1996; 380:439–442.
47. Fong GH, Rossant J, Gertsenstein M, Breitman ML. Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature.* 1995; 376:66–70.
48. Jauniaux E, Poston L, Burton GJ. Placental-related diseases of pregnancy: Involvement of oxidative stress and implications in human evolution. *Hum Reprod Update.* 2006; 12: 747–755.

49. Plaisier M, Rodrigues S, Willems F, Koolwijk P, van Hinsbergh VW, et al. Different degrees of vascularization and their relationship to the expression of vascular endothelial growth factor, placental growth factor, angiopoietins, and their receptors in first-trimester decidual tissues. *Fertil Steril*. 2007; 88: 176–187.
50. Jauniaux E, Gulbis B, Burton GJ. The human first trimester gestational sac limits rather than facilitates oxygen transfer to the foetus: A review. *PlacentaTrophoblast Res*. 2003; 24: 86–93.
51. Red-Horse K, Zhou Y, Genbacev O, Prakobphol A, Foulk R, et al. Trophoblast differentiation during embryo implantation and formation of the maternal-fetal interface. *J Clin Invest*. 2004; 114: 744–754.
52. Burton GJ. Oxygen, the Janus gas; its effects on human placental development and function. *J Anat*. 2009; 215: 27–35.
53. Cnattingius S, Haglund B, Kramer MS. Differences in late fetal death rates in association with determinants of small for gestational age fetuses: population based cohort study. *BMJ*. 1998; 316:1483–1487.
54. Espinoza J, Chaiworapongsa T, Romero R, Kim YM, Kim GJ, Nien JK, Kusanovic JP, Erez O, Bujold E, Goncalves LF, Gomez R, Edwin S. Unexplained fetal death: another anti-angiogenic state. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2007; 20:495–507.
55. Osol G, and Mandala M. Maternal uterine vascular remodeling during pregnancy. *Physiology*. 2009; 24: 58-71.
56. Reynolds LP, Borowicz PP, Caton JS, Vonnahme KA, Luther JS, Hammer CJ, Maddock Carlin KR, Grazul-Bilska AT, Redmer DA. Developmental programming: the concept, large animal models, and the key role of uteroplacental vascular development. *Journal of animal science*. 2010; 88: 61-72.
57. Josko J, and Mazurek M. Transcription factors having impact on vascular endothelial growth factor (VEGF) gene expression in angiogenesis. *Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research*. 2010; 10: 89-98.
58. Adamson SL, Lu Y, Whiteley KJ, Holmyard D, Hemberger M, Pfarrer C, Cross JC. Interactions between trophoblast cells and the maternal and fetal circulation in the mouse placenta. *Developmental biology*. 2002; 250: 358-373.
59. Andraweera PH, Dekker GA, Laurence JA, and Roberts CT. Placental expression of VEGF family mRNA in adverse pregnancy outcomes. *Placenta*. 2012; 33: 467-472.
60. Jauniaux E1, Johns J, Burton GJ. The role of ultrasound imaging in diagnosing and investigating early pregnancy failure. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2005; 25(6):613-24.

