

Summary

Samenvatting

SUMMARY

The overall aim of this thesis is to investigate already known and new laboratory biomarkers for pre-eclampsia (PE). A second aim is to study brain involvement during pregnancy and PE. In order to achieve this goals relatively experimental and novel techniques are used: *proteomics*, *epigenetics* and *neurophysiological* methods.

Chapter 1 gives an general introduction to this thesis and describes the aims and main topics of the thesis. This theses consists of two main parts: 1) experimental biomarkers for PE and 2) brain involvement during pregnancy and PE.

In **chapter 2** a literature study is performed. In a systematic review and meta-analyses we give an overview of all currently described laboratory biomarkers for PE. We found that the predictive value of most laboratory biomarkers for PE is still low. Placental growth factor (PLGF) is best at predicting early-onset PE as a single biomarker, but a combination model including clinical and uterine artery Doppler assessments, performed better than single biomarkers if studying PE as a single entity. Many laboratory biomarkers rise as a result of the pathophysiological process, when the disease is already clinically present, for example due to oxidative stress. This is often in the third trimester of pregnancy, which makes it difficult to find predictive markers very early in pregnancy, during the first or second trimester.

In **chapter 3** calcyclin (S100A6) and heat-shock protein 90 (HSP90) serum levels are studied in PE compared to normotensive controls. This is done in the first, second and third trimester of pregnancy. Serum levels of *S100A6* are significantly lower in patients with pre-eclampsia in the second trimester of pregnancy as compared to controls, while serum levels of *HSP90* are significantly higher in patients with pre-eclampsia in the third trimester of pregnancy. Immunofluorescence staining results shows that *S100A6* and *HSP90* are partially expressed in an overlapping way.

Chapter 4 and 5 are both epigenetic studies in which we investigate DNA methylation levels of placental tissue, umbilical cord blood leukocytes (UCB) and human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) of patients with PE compared to uncomplicated and complicated normotensive controls (foetal growth restriction and preterm birth). In the first study (**chapter 4**) we investigate the circadian clock (related) genes. The circadian clock significantly impacts health during the life course and is important in the regulation of the metabolic and hormonal state during reproduction and pregnancy. We found altered DNA methylation levels in patients with early-onset PE compared to all study groups, but mainly compared to a control group with the same gestational age at birth and without any hypertensive disorder (PTB). In the second study (**chapter 5**) several CpGs of 15 of the 25 investigated candidate genes for PE show altered DNA methylation in early-onset PE. The most important significantly different genes are insulin-like growth factor 2 (IGF2) and cadherin 13 (CDH13). There were no differences between late-onset PE and all control groups. The fact that these DNA methylation alterations are only present in early-onset

PE versus PTB may be explained by a longer exposure to placental oxidative stress than in LOPE. For future research it would be interesting to study whether these DNA methylation alterations affect long-term health in the offspring.

The aim of the study described in **chapter 6** is to investigate cerebrospinal fluid (CSF) of patients with (severe) PE compared to normotensive controls, in order to investigate the effect of PE on the mother's brain. CSF was obtained during the spinal puncture procedure before a caesarean section. This study shows a clear difference between the protein profiles of CSF from patients with PE and normotensive pregnant controls. Protein AMBP (alpha-1-microglobulin/bikunin precursor) is the most significantly different protein. This protein is higher abundant in PE. Protein AMBP is a precursor of protein A1M (alpha-1-microglobulin). A1M is a role in scavenging toxic free haemoglobin, which may play a role in the pathophysiological process during PE. Free haemoglobin is present in CSF of both normotensive and hypertensive pregnant women, which is a quite remarkable finding. This may be explained by a different blood-brain barrier (BBB) permeability during pregnancy and suggests that pregnancy itself makes the brain more vulnerable to cerebral complications, which is then aggravated in PE when protective proteins such as A1M are upregulated. However, the function of the BBB is complex and how this exactly functions during human pregnancy and PE needs to be further elucidated.

In **Chapter 7** we also investigate the effect of PE on the brain. A neurophysiological study is conducted in which visual evoked potentials (VEPs) of pregnant women with and without hypertensive complications are measured. Studying neurophysiological parameters is helpful to understand how pregnancy and hypertensive disorders of pregnancy affect the brain. Visual symptoms are present in approximately 25% of pre-eclamptic women. VEPs measure the function of the visual pathway from retina to the occipital cortex of the brain. Reference values in normotensive pregnancy and postpartum are determined. This study showed that a higher percentage of women with severe PE had VEP latencies above the normal values during pregnancy. Normotensive pregnant women have significantly shorter latencies during pregnancy compared to their postpartum measurements. From these findings we suggest that normotensive pregnant women experience physiological adaptation in pregnancy, while this adaptation fails in women with hypertensive disorders of pregnancy.

Chapter 8 is the general discussion of this thesis in which we reflect on the conducted studies. We stress the point that during pregnancy adaption of the mother's vascular system occurs and may fail in pregnancies complicated by PE. We give recommendations for future research in this field, in order to optimize research that is focused on prediction of PE and/or on unravelling the exact pathophysiological process.

SAMENVATTING

Het doel van dit proefschrift is om reeds bekende en nieuwe biomarkers voor pre-eclampsie (PE) te onderzoeken. Een tweede doel is om het effect van zwangerschap en PE op de hersenen van moeder te onderzoeken. Om deze doelen te realiseren worden relatief experimentele en nieuwe technieken gebruikt: *proteomics*, *epigenetica* en *neurofysiologie*.

Hoofdstuk 1 geeft een algemene inleiding op het proefschrift en beschrijft de belangrijkste doelstellingen en onderwerpen. Dit proefschrift bestaat uit twee verschillende delen: 1) experimentele biomarkers voor PE en 2) het effect van de zwangerschap op de hersenen en hoe dit verandert tijdens PE.

In **hoofdstuk 2** wordt een literatuurstudie uitgevoerd. Deze systematische review en meta-analyse laten een overzicht zien van alle op dit moment beschreven laboratoriumbiomarkers voor PE. De voorspellende waarde van de meeste laboratorium biomarkers voor PE is nog steeds erg laag. Uit deze studie blijkt dat *placental growth factor* (PIGF) de beste biomarker is in het voorspellen van vroeg ontstane PE. Echter, een combinatiemodel met inbegrip van klinische kenmerken en echografische dopplermetingen, presteert beter dan één enkele laboratorium biomarker. Biomarkers stijgen in het bloed van moeder als gevolg van het ziekmakende proces. Echter, wanneer deze markers in het bloed van moeder afwijkend zijn is de klinische ziekte meestal reeds aanwezig en kan de ziekte dus niet meer goed voorspeld worden door deze biomarker. Alleen secundaire preventie is dan nog mogelijk. Voorbeelden hiervan zijn biomarkers die te maken hebben met oxidatieve stress als gevolg van PE. Tijdens de zwangerschap zijn deze vaak pas in het derde trimester verhoogd. Het is moeilijk voorspellende markers voor PE te vinden die al zeer vroeg in de zwangerschap afwijkend zijn (tijdens het eerste of tweede trimester).

In **hoofdstuk 3** bestuderen we bloedwaarden van de eiwitten *calcyline* (S100A6) en *heat-shock protein 90* (HSP90). Dit doen we in patiënten met PE en vergelijken dit met de waarden van zwangere vrouwen met een normale bloeddruk. We doen dit in het eerste, tweede en derde trimester van de zwangerschap. Serumwaarden van S100A6 zijn significant lager in het tweede trimester van de zwangerschap, terwijl serumwaarden van HSP90 significant hoger zijn in het derde trimester van de zwangerschap, bij patiënten met pre-eclampsie vergeleken met controles. Kleuring via immunofluorescentie toont dat de expressie van S100A6 en HSP90 overlapt.

Hoofdstuk 4 en 5 zijn beide epigenetische studies, waarin de DNA methylering van placentaweefsel, witte bloedcellen in navelstrengbloed (UCB) en humane endotheelcellen van de navelstreng (HUVEC) wordt onderzocht. Dit doen we in patiënten met vroeg en laat ontstane PE en vergelijken deze met drie groepen: 1. ongecompliceerde zwangerschappen, 2. zwangerschappen gecompliceerd door foetale groeivertraging en 3. zwangerschappen gecompliceerd door spontane vroeggeboorte.

In de eerste epigenetische studie (**hoofdstuk 4**) onderzoeken we genen van de circadiane klok of genen die daaraan gerelateerd zijn. De circadiane klok speelt een belangrijke rol voor de gezondheid tijdens de levensloop. Deze klok is ook belangrijk voor het reguleren van metabole en hormonale processen tijdens voortplanting en zwangerschap. We vinden veranderde waarden van DNA methylering bij patiënten met een vroeg ontstane PE in vergelijking met alle studiegroepen. Dit verschil is het duidelijkst wanneer we de groep met vroeg ontstane PE vergelijken met een controlegroep met spontane vroeggeboorte (vergelijkbare zwangerschapsduur). In de tweede epigenetische studie (**hoofdstuk 5**) laten een aantal CpGs van 15 van de 25 onderzochte kandidaatgenen een veranderde DNA methylering in vroeg ontstane PE zien. De belangrijkste genen die wij vinden zijn *insulin-like growth factor 2* (IGF2) en *cadherine 13* (CDH13). Er zijn geen verschillen in DNA methylering tussen laat ontstane PE en de controlegroepen. Het feit dat we dit verschil alleen in vroeg ontstane PE vinden, kan verklaard worden door het feit dat er een langere blootstelling is geweest aan oxidatieve stress door de ziekte. Vroeg ontstane PE presenteert zich meestal ernstiger dan laat ontstane PE. Voor toekomstig onderzoek is het interessant te onderzoeken of deze veranderingen in DNA methylering van invloed zijn op de gezondheid van het nageslacht.

Het doel van de in **hoofdstuk 6** beschreven studie is het eiwitprofiel in ruggenmergvloeistof van patiënten met (ernstige) PE te vergelijken met zwangere controles zonder PE. Ruggenmergvloeistof werd verkregen tijdens de het zetten van de ruggenprik voordat een keizersnede werd verricht. We vinden een duidelijk verschil in het eiwitprofiel tussen PE en controles. Het eiwit AMBP (alfa-1-microglobuline/bikunine precursor) is het meest significant verschillende eiwit in deze studie. Dit eiwit is meer aanwezig in ruggenmergvloeistof van patiënten met PE dan in controles. AMBP is een voorlopereiwit van A1M (alfa-1-microglobuline). Het speelt een rol bij het wegvangen van schadelijk hemoglobine. Dit proces speelt mogelijk een rol bij het ziekmakende proces van PE. In de ruggenmergvloeistof is ook vrij hemoglobine aanwezig, zowel bij patiënten met PE als bij controles. Dit is een opmerkelijke bevinding omdat je hemoglobine in ruggenmergvloeistof van niet-zwangeren meestal niet vindt. De bloed-hersenbarrière heeft mogelijk een veranderde permeabiliteit tijdens de zwangerschap. Tijdens de zwangerschap zijn de hersenen ook kwetsbaarder voor complicaties, zoals insulten en bloedingen. Dit proces wordt verergerd tijdens PE en het zou hierdoor kunnen komen dat het eiwit AMBP verhoogd aanwezig is tijdens de ziekte. De functie van de bloed-hersenbarrière is erg complex en hoe dit proces exact functioneert tijdens de zwangerschap en PE moet verder worden opgehelderd.

Ook in **hoofdstuk 7** wordt het effect van PE op de hersenen onderzocht. In een neurofysiologische studie worden zogenaamde *visual evoked potentials* (VEPs) gemeten bij zwangere vrouwen met hypertensieve aandoeningen zoals PE, en controles. Het bestuderen van neurofysiologische parameters is nuttig om beter te begrijpen wat het effect is van zwangerschap en hypertensieve aandoeningen op de hersenen. Ongeveer 25% van de zwangeren met PE rapporteert visuele symptomen. De VEP meet de functie van de gezichtsbaan vanaf

het netvlies tot de occipitale cortex van de hersenen (het gebied waar het zicht is gelokaliseerd). Van deze VEPs worden in een groep gezonde zwangere controles referentiewaarden tijdens de zwangerschap en na de bevalling bepaald. Wij tonen in deze studie aan dat een hoger percentage vrouwen met ernstige PE een latentietijd boven de normaalgrens heeft. Zwangeren zonder een hypertensieve aandoening hebben significant kortere latentietijden tijdens de zwangerschap in vergelijking met hun waarde na de bevalling. Dit suggereert dat zwangeren zonder een hypertensieve aandoening een fysiologische adaptatie van het brein ondervinden tijdens de zwangerschap, terwijl dit ontbreekt bij vrouwen met een hypertensieve aandoening.

Hoofdstuk 8 is de algemene discussie van dit proefschrift. Hierin wordt gereflecteerd op de uitgevoerde studies. In dit hoofdstuk wordt benadrukt dat er tijdens de zwangerschap aanpassingen in het vasculaire systeem van de moeder optreden die falen in zwangerschappen die worden gecompliceerd door PE. Daarnaast worden aanbevelingen gegeven voor toekomstig onderzoek gericht op voorspellende markers voor PE en het verder ontrafelen van de exacte oorzaak van deze zwangerschapsaandoening.