

## ASSESSMENT OF OXIDATIVE STRESS IN EARLY AND LATE ONSET PRE-ECLAMPSIA AMONG GHANAIAN WOMEN

### EVALUATION DU STRESS OXIDATIF CHEZ LES FEMMES PRESENTANT LA PRE-ECLAMPSIE PRECOCE ET LA PRE-ECLAMPSIE TARDIVE AU GHANA

TETTEH PW<sup>1,4</sup>, \*ADU-BONSAFFOH K<sup>1,2</sup>, ANTWI-BOASIAKO C<sup>1</sup>, ANTWI DA<sup>1</sup>, GYAN B<sup>3</sup>, OBED SA<sup>1</sup>

#### Abstract

**Background:** Pre-eclampsia is a multisystem pregnancy-related disorder with multiple theories regarding its aetiology resulting in lack of reliable screening tests and well-established measures for primary prevention. However, oxidative stress is increasingly being implicated in the pathogenesis of pre-eclampsia although conflicting findings have been reported.

**Aim:** To determine and compare the levels of oxidative stress in early and late onset pre-eclampsia by measuring urinary excretion of isoprostane and total antioxidant power (TAP) in a cohort of pre-eclamptic women at Korle Bu Teaching Hospital.

**Methodology:** This was a cross-sectional study conducted at Korle-Bu Teaching Hospital, Accra, Ghana involving pre-eclamptic women between the ages 18 and 45 years who gave written informed consent. Urinary isoprostane levels were determined using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit whereas the Total Anti-oxidant Power in urine samples was determined using Total Antioxidant Power Colorimetric Microplate Assay kit. The data obtained were analyzed using MEGASTAT statistical software package.

**Results:** We included 102 pre-eclamptic women comprising 68 (66.7%) and 34 (33.3%) with early-onset and late-onset pre-eclampsia respectively. There were no statistically significant differences between the mean maternal age, haematological indices, serum ALT, AST, albumin, urea, creatinine, uric acid and total protein at the time of diagnosis. The mean gestational age at diagnosis of early and late onset pre-eclampsia were  $31.65 \pm 0.41$  and  $38.03 \pm 0.21$  respectively ( $p < 0.001$ ). Also, there were statistically significant differences between the diastolic blood pressure (BP), systolic BP and mean arterial pressure (MAP) at diagnosis of pre-eclampsia in the two categories. The mean urinary isoprostane excretion was significantly higher in the early onset pre-eclamptic group ( $3.04 \pm 0.34$  ng/mg Cr) compared to that of the late onset pre-eclamptic group ( $2.36 \pm 0.45$  ng/mg Cr), ( $p=0.019$ ). Urinary total antioxidant power (TAP) in early onset PE ( $1.64 \pm 0.06$ ) was lower but not significantly different from that of late onset PE ( $1.74 \pm 0.09$ ) with  $p=0.369$ .

**Conclusion:** Significantly increased urinary isoprostane excretion was detected in early onset pre-eclampsia compared to late onset pre-eclampsia, suggestive of increased oxidative stress in the former. However, there was no significant difference in total anti-oxidant power between the two categories of pre-eclampsia women although there was a tendency of reduced total antioxidant power in the women with early onset pre-eclampsia.

**Key words:** Pre-eclampsia, oxidative stress, isoprostane, total anti-oxidant power

#### Résumé

**Historique:** la pré-éclampsie est un trouble multi-système lié à la grossesse ayant de diverses théories étiologiques. Cette multiplicité des théories a pour conséquence l'absence de tests de dépistage fiables et de mesures de prévention primaires acceptées. Toutefois, le stress oxydatif est de plus en plus associé aux pathogénèses de la pré-éclampsie même si les conclusions constatées ne font pas l'objet d'unanimité.

**Objectif:** Cette étude a pour objectif d'évaluer et comparer les niveaux de stress oxydatif dans la pré-éclampsie précoce et la pré-éclampsie tardive en mesurant l'excrétion urinaire de l'isoprostane et le pouvoir d'oxydant total chez une cohorte de femmes présentant la pré-éclampsie au centre hospitalier universitaire de Korle Bu à Accra.

**Méthodologie :** C'est une étude transversale menée au centre hospitalier universitaire de Korle Bu à Accra avec la participation des femmes présentant l'éclampsie âgées entre 18 et 45 ans ayant donné leur consentement éclairé par écrit. Les teneurs en isoprostane urinaire ont été évalués à l'aide d'une trousse ELISA qui a permis d'évaluer le pouvoir total antioxydant dans des échantillons d'urines. Les données recueillies ont été analysées à l'aide du logiciel MEGASTAT.

**Résultats:** 102 femmes pré-éclampsiques ont participé dans l'étude dont 68 (66,7%) et 34 (33,3%) respectivement présentent la pré-éclampsie précoce et la pré-éclampsie tardive. Aucune différence statistiquement significative n'a été constatée entre la moyenne de l'âge maternelle, les indices hématologiques, le sérum ALT, AST, l'albumine, l'urée, l'acide urique de créatinine et le protéine total au moment de diagnostic. L'âge de gestation moyenne au moment de diagnostiquer la pré-éclampsie précoce et la pré-éclampsie tardive est de  $31,65 \pm 0,41$  et  $38,03 \pm 0,21$  respectivement ( $p < 0,001$ ). Par ailleurs, des différences statistiquement significatives ont été

constatées entre la tension artérielle diastolique, la tension artérielle systolique et la tension artérielle moyenne au moment de diagnostiquer la pré-éclampsie chez les deux groupes. L'excrétion urinaire de l'isoprostane moyenne était significativement plus élevée chez le groupe de femmes présentant la pré-éclampsie précoce ( $3,04 \pm 0,45$  ng/mg Cr), que chez le groupe de femmes présentant la pré-éclampsie tardive ( $2,36 \pm 0,45$  ng/mg Cr), ( $p=0,019$ ). Le pouvoir antioxydant total urinaire dans la PE précoce ( $1.64 \pm 0.06$ ) était inférieur sans pour autant être nettement différent de celui de la PE tardive ( $1.79 \pm 0.09$ ) avec  $p=0.369$ .

**Conclusion:** une augmentation importante de la sécrétion urinaire de l'isoprostane a été constatée dans la pré-éclampsie précoce par rapport à la pré-éclampsie tardive, ce qui est indicatif du stress oxydatif accru chez les femmes présentant la PE précoce. Toutefois, aucune différence significative n'a été constatée par rapport au pouvoir antioxydant total entre les deux groupes de femmes présentant la pré-éclampsie même si en générale le pouvoir antioxydant total était moins élevé chez les femmes présentant la PE précoce.

**Mots clés:** Pré-éclampsie, Stress oxydatif, Isoprostane, Pouvoir antioxydant total

## Introduction

Pre-eclampsia is a complex multisystem disorder and a leading cause of maternal and fetal morbidity and mortality worldwide and more especially in low resource settings<sup>1</sup>. In Ghana hypertensive disorders in pregnancy including pre-eclampsia are the leading cause of institutional maternal mortality due to severe complications such as acute renal failure, intra-cerebral haemorrhage and pulmonary edema<sup>2,3</sup>. At Korle Bu Teaching Hospital in Accra, Ghana where the current study was conducted, significant adverse maternal outcomes of pre-eclampsia /eclampsia have recently been reported and most of these complications are preventable<sup>3</sup>. Characterized as early- and late onset disease<sup>5</sup>, oxidative stress is considered pivotal in the pathophysiology of this syndrome<sup>6</sup>. Early onset pre-eclampsia is considered as a severe form of the disease with different underlying pathophysiology and worse

## Introduction

La pré-éclampsie est un trouble multi-système complexe et cause majeure de morbidité et de mortalité maternelle et fœtale à travers le monde surtout dans les environnements à faibles ressources. Au Ghana, les troubles hypertensifs liés à la grossesse dont la pré-éclampsie constituent la principale cause de la mortalité maternelle institutionnelle en raison des complications graves telles que l'insuffisance rénale sévère, l'hémorragie intracérébrale et l'œdème pulmonaire. Au centre hospitalier universitaire de Korle Bu à Accra, Ghana, où la présente étude a été menée, d'importantes conséquences adverses de la pré-éclampsie ont été signalées récemment dont la plupart sont évitables. Classifiée comme l'étape précoce et l'étape tardive de la maladie, le stress oxydatif est considéré comme un élément clé de la pathophysiology de ce syndrome. La pré-éclampsie précoce est considérée comme une forme grave de la maladie avec une pathophysiology différente et dont les conséquences périnatales et maternelle sont plus graves que celles de la PE tardive. La défaillance vasculaire apparaît comme la principale étiologie du stress oxydatif étant donné que la pré-éclampsie précoce est associée à la transformation inachevée de l'artère spirale des segments myométriaux d'artères le plus souvent.

Tetteh PW<sup>1,4</sup>, \*Adu-Bonsaffoh K<sup>1,2</sup>, Antwi-Boasiako C<sup>1</sup>, Antwi DA<sup>1</sup>, Gyan B<sup>3</sup>, Obed SA<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Department of Physiology, School of Biomedical and Allied Sciences, University of Ghana

<sup>2</sup>Department of Obstetrics and Gynecology, Korle Bu Teaching Hospital, Accra, Ghana; <sup>3</sup>Department of Immunology, Noguchi Memorial Institute for Medical Research, University of Ghana

<sup>4</sup>Dept. of Medical Oncology, Dana Farber Cancer Institute, Harvard Institute of Medicine, Boston, USA

<sup>5</sup>Department of Obstetrics and Gynecology, School of Medicine and Dentistry, University of Ghana

\*Correspondence

Grant support: None  
Subvention: Aucun

Conflict of interest: None  
Conflit d'intérêts: Aucun

perinatal and maternal outcomes compared with late onset type<sup>7,8</sup>. Vascular defect is thought to represent the main aetiology of oxidative stress because early onset pre-eclampsia is associated with incomplete transformation of the spiral arteries of the myometrial segments of the arteries mainly<sup>9</sup>.

Until recently the primary problem in pre-eclampsia was thought to be mainly due to poorly perfused placenta. The inability of the spiral arteries to remodel in pre-eclampsia results in their ability to retain their vaso-reactivity to vaso-active substances in the plasma. Inadequate conversion of the highly contractile myometrial segments of the spiral arteries results in intermittent perfusion of the placenta, and a low grade ischaemia-reperfusion type of injury leading to generation of reactive oxygen species (ROS) within the trophoblast and endothelial cells<sup>10</sup>.

It is currently suggested that there is intermittent perfusion of the intervillous space instead of the original notion of chronically hypoxic placental blood supply<sup>11</sup>. This leads to a fluctuating level of oxygenation to the placenta often described as hypoxia-reoxygenation or ischaemia-reperfusion injury. Increased oxidative stress has been demonstrated in placentas exposed to hypoxia-reoxygenation from in vitro studies in contrast to placentas exposed to chronic hypoxia which did not show an increase in oxidative stress<sup>12</sup>. The hypoxia-reoxygenation theory has also been demonstrated to be associated with an increase in placental apoptosis resulting in increased oxidative stress levels<sup>11</sup>. Late onset pre-eclampsia is thought to have a minimal influence on placental villous and vascular morphology compared with early-onset pre-eclampsia which is associated with placental dysfunction marked by a reduction in placental weights, volume or the intervillous space, terminal villous volumes and surface area<sup>13</sup>.

Jusqu'à récemment le principal problème de la PE était le plus souvent attribué à un placenta mal perfusé. L'incapacité des artères spirales à remodeler en présence de la pré-éclampsie favorise leur capacité à retenir/maintenir la vaso-réactivité par rapport à des substances plasmatiques. La conversion insuffisante des segments myométriaux hautement contractile des artères spirales entraîne la perfusion intermittente du placenta, et une petite lésion de type ischémie-perfusion entraînant ainsi la génération d'une espèce d'oxygène réactif au niveau du trophoblaste and des cellules endothéliales.

Selon certains experts, il s'agit plutôt de la perfusion intermittente des espaces intervilleux et non de la notion originale d'hypoxie chronique de l'apport sanguin au placenta. Cela provoque une fluctuation de l'alimentation en oxygène en direction du placenta, une condition dite hypoxie-ré-oxygénation ou lésion ischémie-réperfusion. Des études in vitro ont identifié le stress oxydatif accru dans des placentas atteints d'hypoxie-ré-soxygénation contrairement aux placentas atteints d'hypoxie chronique qui n'ont montré aucune augmentation du stress oxydatif. Par ailleurs, il a été démontré que la théorie d'hypoxie-re-oxygénation est associée à l'augmentation de l'apoptose du placenta, ce qui entraîne l'augmentation des niveaux de stress oxydatif. Selon certains chercheurs, la pré-éclampsie tardive a une influence minimale sur la morphologie du placenta villos et vasculaire par rapport à la pré-éclampsie précoce associée aux dysfonctionnements du placenta caractérisés par une réduction de poids, de volume ou de l'espace intervilleux, des volumes villos terminaux et de superficie.

Le stress oxydatif provoqué par une lésion liée à l'ischémie-reperfusion du placenta est de plus en plus impliqué dans la pathogenèse de la pré-éclampsie par voie de peroxydation lipidique et de dysfonctionnement des cellules endothéliales.

Oxidative stress resulting from placental ischemia reperfusion injury is increasingly implicated in the pathogenesis of pre-eclampsia via lipid peroxidation and endothelial cell dysfunction. However, causal relationship between increased lipid peroxidation and the pathogenesis of pre-eclampsia is not universally supported as a result of conflicting findings in previous studies.

In Ghana, data on oxidative stress in early and late onset pre-eclampsia is limited although such information may be very useful in clinical management and scientific discourse. In this study, we set out to determine and compare the level of oxidative stress in early and late onset pre-eclampsia by measuring urinary excretion of isoprostane in a cohort of pre-eclamptic women at Korle Bu Teaching Hospital.

#### **MATERIALS AND METHODS**

This was a cross-sectional study conducted between December 2006 and May 2007 at maternity unit of Korle-Bu Teaching Hospital in Accra Ghana. Korle-Bu Teaching Hospital is the largest teaching hospital in Ghana with about 11,000 deliveries annually and pre-eclampsia is the leading cause of maternal death in the facility<sup>2</sup>. The hospital provides 24-hour maternity services and the National health insurance free delivery scheme covers all the pregnant women delivering at the facility.

In this study, pre-eclamptic women between the ages 18 and 45 years, and who gave written informed consent were included in the study after the diagnosis of pre-eclampsia had been made. This cohort of women were selected based on simple random sampling following the initial diagnosis and their blood samples were taken at the time of diagnosis, prior to commencement of treatment. Specific exclusion criteria consisted of women with chronic hypertension, diabetes mellitus, sickle cell disease, seizure disorders, alcohol abuse or any other chronic medical disorders. The Ethical and Protocol Review committee of the University of Ghana Medical School approved the study and a written informed consent

Toutefois, le rapport de causalité entre l'oxydation lipidique accrue et la pathogénèse de la pré-éclampsie ne fait pas l'unanimité en raison des conclusions contradictoires de études précédentes. Au Ghana, il n'existe quedes données limitées sur le stress oxydatif dans la pré-éclampsie précoce et la pré-éclampsie tardive bien que de telles informations puissent se révéler très utiles des fins de prise en charge clinique et de discours scientifique. Cette étude se propose d'évaluer et comparer les niveaux de stress oxydatif dans la pré-éclampsie précoce et la pré-éclampsie tardive en mesurant la teneur en isoprostane de l'urine dans une cohorte de femmes présentant la pré-éclampsie au centre hospitalier universitaire de Korle Bu.

#### **MATERIELS ET METHODES**

La présente est une étude transversale menée entre décembre 2006 et mai 2007 à la maternité du centre hospitalier universitaire d'Accra dite Korle Bu Teaching Hospital. Korle Bu Teaching Hospital est le plus grand hôpital au Ghana avec environ 11,000 accouchements par an. La pré-éclampsie est la principale cause de décès maternels survenus dans le site. Avec une couverture universelle d'assurance maladie pour les femmes enceintes, la maternité assure une permanence 24/24.

Dans cette étude, des femmes présentant la pré-éclampsie âgées entre 18 et 45 ans ayant donné leur consentement éclairé ont participé dans cette étude suite à un diagnostic de pré-éclampsie. Ces femmes ont été sélectionnées sur la base d'un échantillonnage aléatoire simple après le diagnostic initial et la prise d'échantillon sanguins au moment du diagnostic antérieurement au début de traitement. Les critères d'exclusions spécifiques comprenaient les femmes présentant la hypertension chronique, le diabète sucré, la drépanocytose, l'épilepsie, l'alcoolisme ou de tout autre trouble médical. Le comité d'éthique et protocole de la faculté de médecine de l'université du Ghana a approuvé l'étude et un consentement éclairé écrit a été obtenu de toutes les participantes dans l'étude. Les risques éventuels associés à la participation dans l'étude ont été

was obtained from all study participants. The potential risks associated with the participation in the study were thoroughly explained to the participants. The study participants were informed that their participation in the study was voluntary and that failure to be included in the study would not affect the normal management of their medical conditions in anyway.

Pre-eclampsia is defined as new onset of hypertension and proteinuria after the gestational age of 20 weeks<sup>14,15</sup>. Hypertension was defined as systolic blood pressure of 140mm Hg or more and/or diastolic blood pressure of 90mm Hg or more. Proteinuria of +1 or more, determined by a urine dipstick, was considered significant. Also, early- and late onset pre-eclampsia were defined as the development of pre-eclamptic syndrome before and at/or after 34 weeks of gestation<sup>5,7</sup>, respectively.

#### **DETERMINATION OF BIOCHEMICAL AND HEMATOLOGICAL PARAMETERS**

The pre-eclamptic women included in the study had their blood samples obtained from the veins at the antecubital fossae following an application of a tourniquet. Serum urea, uric acid levels and liver function tests were determined using a Microlab 300 Chemistry Semi-automated Analyzer. A Sysmex Hematology Analyzer was employed to assess the full blood count parameters including white cell differentials. Urinary albumin levels were determined with the use of Albumin Blue Fluorescent Assay kit (Active Motif, USA). Serum creatinine levels were determined by the alkaline picrate method. Creatinine level in urine was measured with a commercial kit (No. CR01; Oxford Biomedical Research, Oxford, MI, USA) strictly based on the manufacturer's instructions.

#### **ASSESSMENT OF URINARY ISOPROSTANE AND TOTAL ANTIOXIDANT POWER**

Urinary isoprostane levels were determined using a 15- Isoprostane- F2t enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (Oxford Biomedical Research, Oxford, MI, USA) based

véritablement expliqués aux participantes. Les participantes à l'étude ont été informées que leur participation était à titre volontaire et que le fait de non-inclusion dans l'étude ne portait nullement préjudice à la prise en charge de leur condition médicale.

La pré-éclampsie se définit comme le début de l'hypertension et la protéinurie après l'âge gestationnel de 20 semaines. Par hypertension, on entend une tension artérielle systolique supérieure à 140mmHg et/ou une tension artérielle diastolique égale ou supérieure à 90mmHg. Une protéinurie égale à +1 par jauge d'urine est considérée significative.

Par ailleurs, l'on entend par la pré-éclampsie précoce et la pré-éclampsie tardive le développement du syndrome de la pré-éclampsie avant, pendant, ou après 34 semaines de gestation par grossesse respectivement.

#### **DEFINITION DES PARAMETRES BIOCHIMIQUES ET HEMATOLOGIQUES.**

Des échantillons sanguins ont été obtenus des femmes participantes dans cette étude au niveau de fossae ante cubital après application d'un tourniquet. Les teneurs en urée de sérum, acide urique ainsi que la fonction hépatique ont été évaluées à l'aide de l'analyseur semi-automatique Microlab 300 Chemistry. Un analyseur d'hématologie Sysmex a servi à effectuer une numération globulaire y compris les différentiels de globules blancs.

La teneur en albumine urinaire a été évaluée à l'aide de l'Albumin Blue Fluorescent Assay Kit (Active motif USA). La teneur en créatinine de sérum a été évaluée par la méthode de picrate d'alkaline. La teneur en créatinine dans l'urine a été mesurée à l'aide d'un kit commercial (No. CR01; Oxford Biomedical Research, Oxford MI, USA) en stricte conformité avec les consignes du fabricant.

#### **EVALUATION DE L'ISOPROSTANE URINAIRE ET DU POUVOIR ANTIOXYDANT TOTAL**

Les teneurs en isoprostane urinaire ont été évaluées à l'aide d'un kit ELISA 15-Isoprostane F2+. (Oxford Bio...) en strict conformité avec les consignes du fabricant. Le pouvoi

strictly on the instructions of the manufacturer. The total antioxidant power in urine samples were determined using Total Antioxidant Power Colorimetric Microplate Assay kit (No. TA 01; Oxford Biomedical Research) based strictly on the manufacturer's advice.

### **STATISTICAL ANALYSIS**

The analysis of data obtained was performed with MEGASTAT statistical software package. Descriptive statistics were performed and the results were presented in means ( $\pm$ SD) and bar graphs where appropriate. The independent Student t-test was used to compare the continuous variables and statistically significant difference was considered for a p-value of less than 0.05.

### **RESULTS**

During the study duration, we enrolled 102 pre-eclamptic women comprising 68 (66.7%) and 34 (33.3%) early-onset and late-onset pre-eclampsia respectively. There were no statistically significant differences between early and late onset pre-eclampsia regarding the mean maternal age, haematological indices, serum ALT, AST, ALT, albumin, urea, creatinine uric acid and total protein at the time of diagnosis (Table 1). The mean gestational age (in weeks) at diagnosis of early and late onset pre-eclampsia were  $31.65 \pm 0.41$  and  $38.03 \pm 0.21$  respectively ( $p < 0.001$ ). Also, there were statistically significant differences between the two subtypes of pre-eclampsia with respect to the diastolic BP, systolic BP and MAP at diagnosis of pre-eclampsia in the categories (Table 1). The mean urinary Isoprostane excretion was significantly higher in the early onset pre-eclamptic group ( $3.04 \pm 0.34$  ng/mg Cr) compared to that of the late onset pre-eclamptic group ( $2.36 \pm 0.45$ ) with  $p=0.019$  (Figure 1). Urinary total antioxidant power (TAP) in early onset pre-eclampsia ( $1.64 \pm 0.06$ ) was lower but not significantly different from that of late onset pre-eclampsia ( $1.74 \pm 0.09$ ) with  $p=0.369$  (Figure 2).

doxydant total dans les échantillons urinaires a été évalué à l'aide du Total Antioxydant Power Colorimetric Microplate Assay Kit (No. TA 01; Oxford Biomedical Research) en stricte conformité avec les consignes du fabricant.

### **ANALYSE DE DONNES**

Les données obtenues ont été analysées à l'aide du logiciel de statistique MEGASTAT.

Des procédés de statistique descriptif ont permis de présenter les résultats en moyennes ( $\pm$ SD) et en graphiques en cas de besoin. Le kit de Test- t indépendant de Student a permis de comparer les variables continues tout en considérant les différences statistiquement significatives pour la valeur P inférieur à 0.05.

### **RESULTATS**

Pendant la durée de l'étude, 102 femmes présentant la PE ont été enrôlés dont 68 (66.7%) et 34 (33.3%) pour la PE précoce et la PE tardive respectivement. Aucune différence statistique significative n'a été constatée entre les deux catégories en ce qui concerne l'âge maternelle moyenne, les indices hématologiques, les ALT, AST, ALT de sérum, d'albumine, l'urée, l'acide urique de créatinine et la protéine total au moment du diagnostique (Tableau 1). L'âge maternelle moyenne (en semaines) au moment du diagnostique la PE précoce et la PE tardive était de  $31.65 \pm 0.41$  et  $38.03 \pm 0.21$  respectivement ( $P < 0.001$ ). Par ailleurs, d'importantes différences statistique ont été relevée entre les deux sous-types de PE par rapport à la tension artérielle diastolique, et la MAP au moment de diagnostique la PE chez les deux catégories (Tableau 1). La moyenne de l'excrétion de l'isoprostane urinaire était significativement plus élevée dans le groupe atteinte de la PE précoce ( $3.03 \pm 0.34$  ng/mg Cr) que dans le groupe atteinte de la PE tardive ( $2.36 \pm 0.45$ ) avec  $P=0.019$  (Figure 1). Le pouvoir d'antioxydant urinaire total dans le groupe de la PE précoce ( $1.64 \pm 0.06$ ) était moins élevée sans toutefois être significativement qui s'élève à  $1.74 \pm 0.09$  avec  $P=0.369$  (Figure 2).

**Table 1: Demographic and laboratory data of pregnant women with early and late onset pre-eclampsia**

<b>Parameter</b>	<b>Early onset pre-eclampsia (n=68)</b>	<b>Late onset pre-eclampsia (n=34)</b>	<b>P value</b>
<b>Maternal age (Years)</b>	30.15 ± 0.71	30.31 ± 0.86	0.886
<b>Gestational age (weeks)</b>	31.65 ± 0.41	38.03 ± 0.21	0.001
<b>Systolic BP (mmHg)</b>	169.78 ± 2.82	157.14 ± 2.34	0.004
<b>Diastolic BP (mmHg)</b>	111.54 ± 1.67	104.43 ± 1.57	0.007
<b>MAP (mmHg)</b>	130.56 ± 1.94	122.10 ± 1.55	0.024
<b>Haemoglobin (g/dl)</b>	11.36 ± 0.21	11.04 ± 0.25	0.298
<b>Haematocrit (%)</b>	35.34 ± 0.56	34.84 ± 0.73	0.503
<b>Total WBC (× 10<sup>9</sup>)</b>	8.30 ± 0.36	8.45 ± 0.60	0.885
<b>Platelets (× 10<sup>9</sup>)</b>	193.54 ± 9.66	188.29 ± 10.95	0.230
<b>ALT (μ /l)</b>	24.18 ± 1.13	26.35 ± 1.56	0.674
<b>AST (μ/L)</b>	31.00 ± 1.38	29.60 ± 1.23	0.148
<b>ALP (μ /l)</b>	321.98 ± 20.00	298.53 ± 17.69	0.237
<b>Gamma GT (μ /L)</b>	34.94 ± 1.34	31.44 ± 1.20	0.040
<b>Serum albumin (g/L)</b>	38.07 ± 1.35	35.37 ± 1.57	0.222
<b>Urea (mg/dL)</b>	22.14 ± 1.12	24.81 ± 1.74	0.183
<b>Serum Cr (mg/dl)</b>	1.12 ± 0.02	1.07 ± 0.03	0.191
<b>Serum uric acid (mg/dL)</b>	6.07 ± 0.27	5.69 ± 0.33	0.393
<b>Serum total protein (g/l)</b>	76.18 ± 1.12	76.57 ± 1.97	0.852
<b>Microalbuminuria (g/l)</b>	161.44 ± 99.96	142.67 ± 95.68	0.1809

**Table 1: Données démographique et de laboratoire des femmes enceintes présentant la pré-éclampsie précoce et tardive**

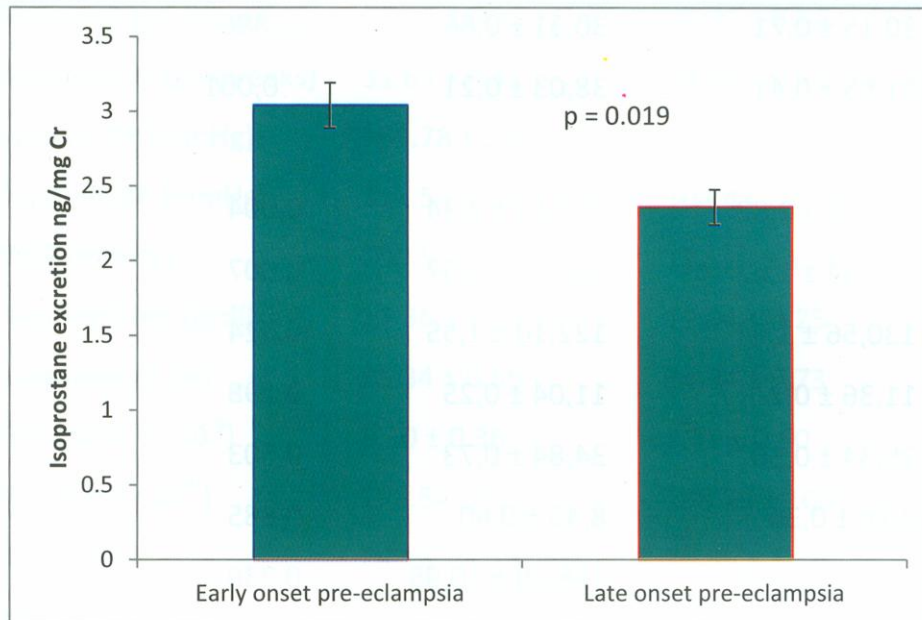
Paramètre	Pré-éclampsie précoce (n=68)	Pré-éclampsie tardive (n=34)	Valeur P
L'âge maternelle (ans)	30,15 ± 0,71	30,31 ± 0,86	0,886
L'âge gestationnelle (semaines)	31,65 ± 0,41	38,03 ± 0,21	0,001
BP Systolique (mmHg)	169,78 ± 2,82	157,14 ± 2,34	0,004
BP Diastolique (mmHg)	111,54 ± 1,67	104,43 ± 1,57	0,007
MAP (mmHg)	130,56 ± 1,94	122,10 ± 1,55	0,024
Hémoglobine (g/dl)	11,36 ± 0,21	11,04 ± 0,25	0,298
Hématocrite (%)	35,34 ± 0,56	34,84 ± 0,73	0,503
Total WBC ( $\times 10^9$ )	8,30 ± 0,36	8,45 ± 0,60	0,885
Platelets ( $\times 10^9$ )	193,54 ± 9,66	188,29 ± 10,95	0,230
ALT ( $\mu$ /l)	24,18 ± 1,13	26,35 ± 1,56	0,674
AST ( $\mu$ /L)	31,00 ± 1,38	29,60 ± 1,23	0,148
ALP ( $\mu$ /l)	321,98 ± 20,00	298,53 ± 17,69	0,237
Gamma GT ( $\mu$ /L)	34,94 ± 1,34	31,44 ± 1,20	0,040
albumine de sérum (g/L)	38,07 ± 1,35	35,37 ± 1,57	0,222
Urée (mg/dL)	22,14 ± 1,12	24,81 ± 1,74	0,183
Sérum Cr (mg/dl)	1,12 ± 0,02	1,07 ± 0,03	0,191
Acide urique de sérum (mg/dL)	6,07 ± 0,27	5,69 ± 0,33	0,393
Protéine total de sérum (g/l)	76,18 ± 1,12	76,57 ± 1,97	0,852
Microalbuminurie (g/l)	161,44±99,96	142,67±95,68	0,1809

Les résultats dans ce tableau sont présentés comme l'écart standard moyen  $\pm$ , ALT=Alanine transaminase, AST=aspartate aminotransferase, ALP= Alkaline phosphatase, WBC=globules blancs, GGT=Gamma-glutamyl transferase, Cr= Creatinine, BP= tension artérielle.



The results in the table are presented as mean  $\pm$  standard deviation (SD), ALT= Alanine transaminase, AST= aspartate aminotransferase, ALP= Alkaline phosphatase, WBC= White blood cells, GGT= Gamma-glutamyl transferase, Cr= Creatinine, BP= Blood pressure

Figure 1: Urinary 15-F2t-Isoprostane excretion in Early- and Late-onset pre-eclampsia



Les résultats dans ce tableau sont présentés comme l'ecart standard moyen  $\pm$ , ALT=Alanine transaminase, AST=aspartate aminotransferase, ALP= Alkaline phosphatase, WBC=globules blancs, GGT=Gamma-glutamyl transferase, Cr= Creatinine, BP= tension arterielle.

Figure 1: Excrétion urinaire de 15-F2t-Isoprostane dans la pré-éclampsie précoce et tardive

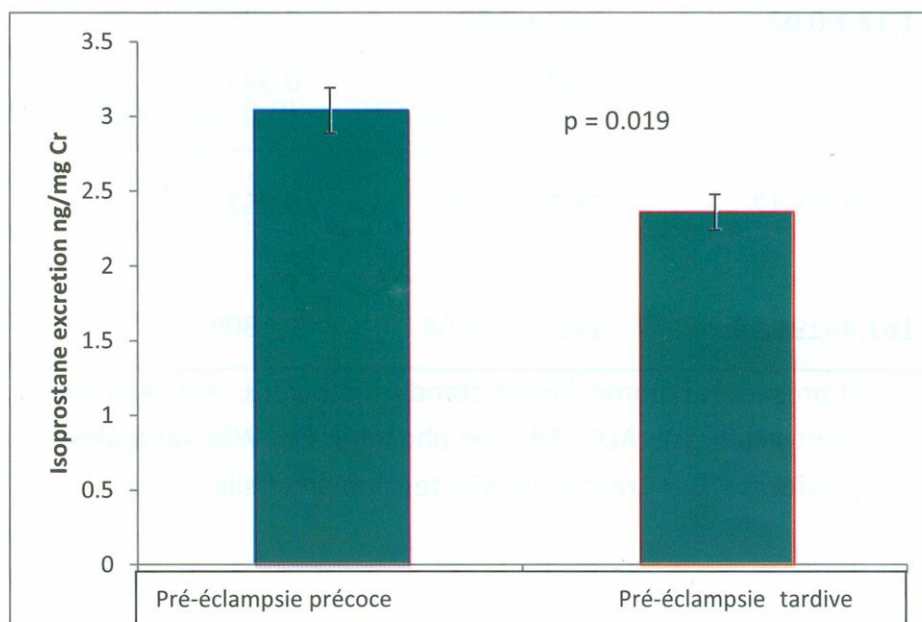


Figure 2: Total antioxidant power (TAP) in early-onset (LO) and late-onset (LO) pre-eclampsia

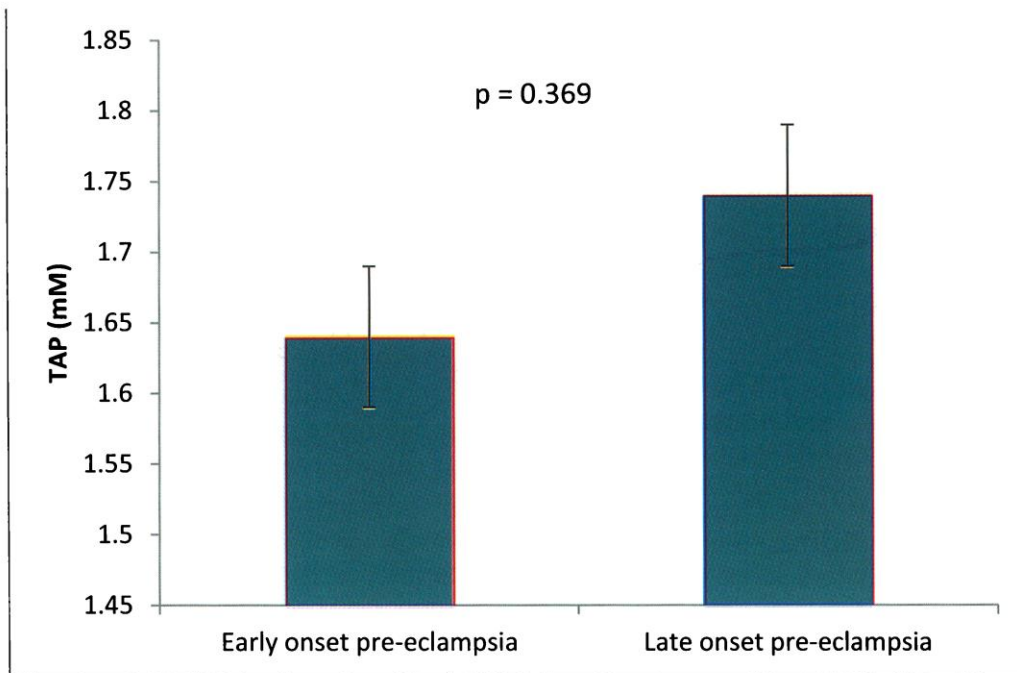
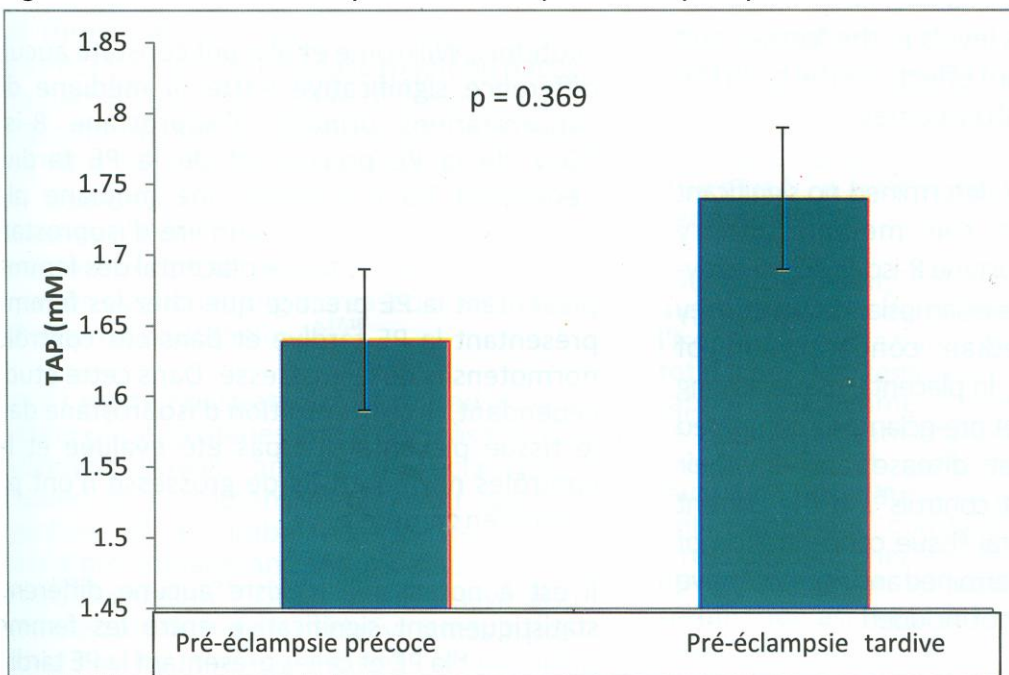


Figure 2: Pouvoir d'antioxydant dans la pré-éclampsie précoce et tardive



## **Discussion**

Oxidative stress is considered a central feature in the pathophysiology of pre-eclampsia although conflicting results have been determined in previous studies. In this study, we sought to determine the level of oxidative stress in early and late onset pre-eclampsia to buttress the purported role of oxidative stress in pre-eclampsia. Our study showed a statistically significant increase in urinary isoprostane excretion in the women with early-onset pre-eclampsia compared with the late-onset disease (Figure 1). Generally, early-onset pre-eclampsia is considered a more severe form of the disease associated with different etiopathogenesis and subsequently, worse multi-organ derangement<sup>5</sup>. Oxidative stress is thought to be indispensable in the pathogenesis of early onset disease via endothelial cell dysfunction mediated by the release of toxic substances from the injured stressed placenta. The finding of significant increase in excretion of urinary isoprostane in early-onset compared to late-onset PE suggests worse oxidative stress levels in the former and this may have significant effects on the both the maternal and perinatal outcomes.

However, Wilkrom et al determined no significant differences between the median urinary concentrations of isoprostane 8-iso-PGF<sub>2α</sub> in early-onset and late-onset pre-eclampsia. However, they found a higher median concentration of isoprostane 8-iso-PGF<sub>2α</sub> in placental tissue among women with early-onset pre-eclampsia compared to that of late onset disease and in their normotensive pregnant controls<sup>16</sup>. In the current study, however, placental tissue concentration of isoprostane was not determined and normotensive pregnant controls were not included.

Interestingly, there was no statistically significant difference in Total Oxidative Power between women with early and late-onset pre-eclampsia although the level of TAP was lower in the former as shown in Figure 2. This finding was unexpected because with the significantly increased urinary isoprostane

## **ANALYSE**

Le stress oxydatif est considéré comme élément clé de la pathophysiologie de la PE malgré le caractère conflictuel des résultats obtenus des études précédentes, Dans cette étude, il s'agit d'évaluer le niveau de stress oxydatif dans la PE précoce et la PE en vue d'asseoir le rôle supposé du stress oxydatif dans la PE. L'étude a démontré une augmentation statistiquement significative de l'excrétion de l'isoprostane urinaire chez les femmes présentant la PE précoce par rapport à la phase tardive de la PE (Figure 1). En général, la PE précoce est considérée comme une forme plus grave de la maladie associée à diverses étiopathogénèses et, par conséquent, au dérangement multi-organe aggravé. Le stress oxydatif est censé être indispensable dans la pathogénèse de la maladie précoce via le dysfonctionnement de la cellule endothéliale médié par la libération des substances toxiques par le placenta. Le fait d'avoir constaté une augmentation significative de l'excrétion de l'isoprostane urinaire dans la PE précoce par rapport à la PE tardive est indicative d'un plus grand stress oxydatif dans la PE précoce que la PE tardive, ce qui peut avoir des effets significatifs sur les finalités maternelle et périnatales.

Toutefois, Wilkrome et al n'ont constaté aucune différence significative entre la médiane des concentrations urinaire d'isoprostane 8-iso-PGF<sub>2</sub> de la PE précoce et de la PE tardive. Cependant US ont relevé une médiane plus élevée de concentration urinaire d'isoprostane 8-150-PGF<sub>2</sub> dans le tissu placental des femmes présentant la PE précoce que chez les femmes présentant la PE tardive et dans ces contrôles normotensifs de la grossesse. Dans cette étude, cependant, la concentration d'isoprostane dans le tissu placental n'a pas été évaluée et les contrôles normotensifs de grossesse n'ont pas été pris en compte.

Il est à noter qu'il n'existe aucune différence statistiquement significative entre les femmes présentant la PE et celles présentant la PE tardive en ce qui concerne le pouvoir d'oxydation total même si le niveau de TAP est moins élevé chez les femmes présentant la PE précoce (voir figure 2). Ce résultat était inattendu car avec l'augmentation importante de l'excrétion en isoprostane urinaire dans la PE précoce, l'on s'attendait à ce que la réduction significative de TAP devait permettre de mieux comprendre la

excretion in early-onset pre-eclampsia the significant reduction in the TAP was anticipated to complete the picture to provide better understanding of the pathophysiology of the disease. This might be attributed to smaller numbers recruited in this study and, perhaps, the use of a larger sample size would have resulted in statistical difference in the results, given the fact that a decreased level of TAP is seen in early-onset subjects.

In the current study, there was a significantly higher diastolic, systolic and mean arterial pressures in the early-onset pre-eclampsia compared to late-onset disease (Table 1) and this buttresses the fact that the former is a more severe disease. It is therefore not surprising that urinary isoprostane excretion was higher in the early onset disease mirroring high plasma and placental concentrations of this potent biomarker of oxidative stress. Although we did not determine the plasma and placental levels of isoprostanes the significantly higher urinary level determined in our study is suggestive of increased plasma concentration with spillage into the urine by exceeding its renal threshold. Therefore the higher blood pressures in early onset disease might be partly attributed to the high levels of isoprostanes, biologically active biomarkers of oxidative stress. This assertion is supported by the fact that, isoprostanes generally have a potent vasoconstrictive effect on the placental vasculature in addition to maternal systemic circulation by stimulating increased endothelial production of endothelin-1<sup>6,17,18</sup>.

Recently, we demonstrated an increased urinary excretion of isoprostanes and a decreased total antioxidant power among pre-eclamptics compared to normotensive pregnant women suggestive of an imbalance between the maternal pro-oxidants and antioxidants in favour of excess oxidation<sup>19</sup>. Other studies have also determined an increase in oxidative stress in pre-eclampsia by measurement of serum isoprostane levels indicative of significant oxidative stress<sup>20,21</sup>. In addition, Baden et al found a significantly lower urinary 8-iso-prostane excretion in pre-eclamptics compared with women with normotensive pregnancies and they attributed it to impaired renal clearance of 8-iso-prostane in pre-eclampsia<sup>21</sup>. The significantly elevated urinary isoprostane

pathophysiology of the disease.

Ceci pourrait s'expliquer par le nombre réduit de personnes ayant participé à l'étude. Il se peut qu'un échantillonnage plus large ait donné de résultats statistiquement différents étant donné qu'un niveau plus bas de TAP a été constaté chez les sujets de la PE précoce.

Dans cette étude, il a été constaté que les tensions artérielle diastolique, systolique et moyennes étaient significativement plus élevées dans la PE précoce que dans la PE tardive (Table 1), ce qui renforce le fait que la PE précoce est la plus grave des deux maladies. Par conséquent, c'est peu étonnant que l'excrétion urinaire de l'isoprostane était plus élevée dans la PE précoce, ce qui reflète des concentrations plasmatique et placentale de ce puissant biomarqueur du stress oxydatif. Bien que nous n'ayons pas évalué la teneur de l'isoprostane dans le plasma et le placenta, le niveau significativement plus élevé d'isoprostane urinaire constaté dans cette étude est indicatif d'une plus grande concentration plasmatique avec débordement dans l'urine en excès de son seuil rénal, Il s'en suit que les tensions artérielles plus élevées de la PE précoce pourraient être partiellement dues à des niveaux élevés d'isoprostanes, des marqueurs actifs du stress oxydatif.

Cette affirmation est fondée sur le fait qu'en général, les isoprostanes ont un puissant effet vasoconstrictif sur la vasculature du placenta en plus de la circulation systémique maternel en stimulant la production d'une plus grande quantité d'endothelin-16,17,18 dans l'endothélial.

Tout récemment, nous avons démontré une augmentation de l'excrétion urinaire de l'isoprostane et la baisse du pouvoir d'oxydation total chez les femmes présentant la PE par rapport aux femmes enceintes normotensives, ce qui est indicatif d'un déséquilibre entre les pro-oxydants et antioxydants maternels en faveur de l'oxydation excessif. D'autres études ont également constaté l'augmentation du stress oxydatif chez les personnes présentant la PE en mesurant le niveau d'isoprostane de sérum qui est indicatif d'un stress oxydatif important.

En outre, Baden et al ont relevé une excrétion urinaire significativement réduite de l'isoprostane-8-ISO chez les pré-éclamptiques par rapport aux femmes enceintes normotensives. Ils ont conclu que cela était due à des troubles de clearance rénales de l'isoprostane-8-iso chez des personnes présentant la PE. L'augmentation significative de l'excrétion urinaire de l'isoprostane relevée dans la présente étude est en désaccord avec les

excretion determined in the current study is not consistent with the low levels reported by Barden et al who attributed it to renal impairment in the midst of higher concentrations of free plasma isoprostanes in pre-eclampsia. In our study, we did not find any significant differences in parameters of renal function such as serum urea, creatinine and uric acid between the two subtypes of pre-eclampsia. This suggests that the significantly higher urinary excretion of isoprostane determined in early onset disease might be related to high isoprostane with spillage into the urine.

Generally, Isoprostanes are generated by random peroxidation of the phospholipid tissue by oxygen free radicals and increased levels may be found in conditions associated with high levels of oxidative stress such as pre-eclampsia. Significant elevation of serum 8-isoprostane is indicative of deficient antioxidant mechanisms in conditions associated with increased oxidative stress such as pre-eclampsia<sup>20</sup>. In this context, timely administration of antioxidants to susceptible women in early pregnancy may effectively prevent and or delay the onset of pre-eclampsia and avert the major complications attributable to pre-eclampsia syndrome. However conflicting results have been determined in large randomized trials regarding the effectiveness of these antioxidant vitamins and this buttresses the fact that the etiology of pre-eclampsia remains enigmatic and its pathophysiology not well understood<sup>22</sup>.

Some studies have determined the oxidative stress at the placental levels by measuring the serum level of isoprostane in the placenta which provides a direct reflection of placental pathology in pre-eclampsia<sup>16,23</sup>. However, in the current study the oxidative stress at the placental level was not determined and urinary isoprostane excretion is considered a surrogate for the serum levels which is also indicative of the placental oxidative stress level.

The limitation of our study include the fact that dietary considerations were not taken into account in determining the level of total antioxidant as dietary preferences could have influenced the pro-oxidant and anti-oxidant balance<sup>24</sup>. Also, fetal outcomes of early and late onset pre-eclampsia were not included in the study and this would have thrown more light into the effect of increased oxidative stress on fetal wellbeing. The strength of the

faibles niveaux relevés par Baden et al selon qui le phénomène est due à l'insuffisance rénale dans un contexte de grande concentration d'isoprostane plasmatiques libre dans la PE. Nous n'avons trouvé aucune différence significatives en termes de paramètres de la fonction rénale tels que l'urée de sérum, la créatinine et l'acide urique entre les deux sous-types de la PE. Cela indique que le niveau considérablement plus élevé de l'excrétion de l'isoprostane par voie urinaire constatée dans la PE précoce pourrait être liée à la hyperisoprostanémie avec débordement dans l'urine.

En General, les isoprostanes sont générés par la peroxydation aléatoire du tissu phospholipide par les radicaux libres de l'oxygène et des niveaux élevés peuvent être relevés dans des conditions liées à des niveaux élevés de stress oxydatif tel que la pré-éclampsie. Des teneurs élevées en isoprostanes-8 sont symptomatiques des mécanismes d'antioxydants défaillants dans les conditions associées au stress oxydatif accru telle que la pré-éclampsie.

Dans ce contexte, l'administration opportune des antioxydants aux femmes pendant les premières semaines de grossesse peut prévenir ou retarder le déclenchement de la pré-éclampsie, mais aussi éviter des complications majeures liées au syndrome de pré-éclampsie.

Toutefois, des résultats contradictoires ont été obtenus dans de larges essais randomisés en termes de l'efficacité de ces vitamines antioxydants, ce qui confirme le fait que l'étiologie de la pré-éclampsie reste inconnue et sa pathophysiologie peu maîtrisée.

Certaines études ont établi le stress oxydatif au niveau du placenta en mesurant le niveau d'isoprostane de sérum dans le placenta, attendu que le niveau d'isoprostane reflète directement la pathologie du placenta dans la pré-éclampsie.

Toutefois, cette étude n'a pas relevé le stress oxydatif au niveau du placenta et l'excrétion urinaire de l'isoprostane est considérée comme intermédiaire des niveaux de sérum, ce qui est également indicatif du niveau de stress oxydatif dans le placenta.

Notre étude est soumise à des limitations dont le fait que les considérations DIETIQUE n'ont pas été prises en compte dans l'évaluation du niveau d'antioxydant total. En effet, les préférences alimentaires auraient pu influencer l'équilibre entre pro-oxydants et antioxydants.

En outre, les issues fœtales de la PE précoce et la PE tardive, qui auraient permis de mieux saisir l'effet du stress oxydatif accru sur le bien-être du fœtus, n'ont pas été prise en compte. Toutefois, la validité de cette étude repose sur le fait qu'elle représente l'une des premières à évaluer le

current study, however, hinges on the fact that this is one of the first studies to determine the oxidative stress in early and late onset pre-eclampsia especially in Sub-Saharan Africa (SSA). This should serve as a springboard for further investigations into the subject, especially in SSA.

In conclusion, the current study has demonstrated significantly increased urinary isoprostane excretion in early onset pre-eclampsia compared to late onset disease suggestive of increased oxidative stress in the former. However, there was no significant difference in Total Anti-oxidant Power between the two categories of pre-eclampsia syndrome. There is the need for more in-depth studies in relating the relevance of oxidative stress to the pathophysiology of early and late onset pre-eclampsia especially in SSA where the disease burden is huge with significant adverse perinatal and maternal morbidity. Selective administration of essential vitamins with anti-oxidant properties to prospective mothers with risk factors for the development of early onset or severe pre-eclampsia in early pregnancy might prevent and or delay the onset of the disease and its complications.

## REFERENCES

1. Duley L. The Global Impact of Pre-eclampsia and Eclampsia. *Semin Perinatol.* 2009; 33:130-137.
2. Adu-Bonsaffoh K, Oppong SA, Binlinla G, Obed SA. Maternal deaths attributable to hypertensive disorders in a tertiary hospital in Ghana. *Int J Gynecol Obstet.* 2013; 123(2):110-113.
3. Lee QY, Odoi AT, Opere-Addo H, Dassah ET. Maternal mortality in Ghana: a hospital based review. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2012; 91(1):87-92.
4. Adu-Bonsaffoh K, Obed SA, Seffah JD. Maternal outcomes of hypertensive disorders in pregnancy at Korle Bu Teaching Hospital, Ghana. *Int J Gynecol Obstet.* 2014; 127(3):238-242.
5. Tranquilli AL, Brown MA, Zeeman GG, Dekker G, Sibai BA. The definition of severe and early-onset pre-eclampsia. Statements from the International Society for the Study of Hypertension in Pregnancy (ISSHP). *Pregnancy Hypertension: An International Journal of Women's Cardiovascular Health.* 2013; ??(3): 44-47.

stress oxydatif dans la PE précoce et la PE tardive surtout en Afrique sub-saharienne. Elle représente donc un tremplin pour d'autres chercheurs en termes de futures enquêtes en la matière en Afrique sub-saharienne de surcroit.

En conclusion, la présente étude a démontré une augmentation significative de l'excrétion de l'isoprostane par voie urinaire dans la pré-éclampsie précoce par rapport à la pré-éclampsie tardive, ce qui est indicatif de stress oxydatif. Toutefois, aucune différence significative n'a été relevée par rapport au pouvoir d'oxydation total entre les deux catégories du syndrome de pré-éclampsie. Des lors, il ya lieu de mener des études plus approfondies en vue d'établir le rapport entre le stress oxydatif et la pathophysiologie de la PE précoce et la PE tardive surtout en Afrique sub-saharienne où le fardeau de maladie est énorme avec dans son cortège d'importants taux de mortalité périnatale et maternelle. L'administration sélective/ciblée des vitamines essentielles ayant des propriétés antioxydants à des futures mères à risque de la PE précoce ou grave pendant les premières semaines de grossesse pourrait prévenir et/ou retarder l'apparition de la maladie et ses complications.

## REFERENCES

1. Duley L. The Global Impact of Pre-eclampsia and Eclampsia. *Semin Perinatol.* 2009; 33:130-137.
2. Adu-Bonsaffoh K, Oppong SA, Binlinla G, Obed SA. Maternal deaths attributable to hypertensive disorders in a tertiary hospital in Ghana. *Int J Gynecol Obstet.* 2013; 123(2):110-113.
3. Lee QY, Odoi AT, Opere-Addo H, Dassah ET. Maternal mortality in Ghana: a hospital based review. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2012; 91(1):87-92.
4. Adu-Bonsaffoh K, Obed SA, Seffah JD. Maternal outcomes of hypertensive disorders in pregnancy at Korle Bu Teaching Hospital, Ghana. *Int J Gynecol Obstet.* 2014; 127(3):238-242.
5. Tranquilli AL, Brown MA, Zeeman GG, Dekker G, Sibai BA. The definition of severe and early-onset pre-eclampsia. Statements from the International Society for the Study of Hypertension in Pregnancy (ISSHP). *Pregnancy Hypertension: An International Journal of Women's Cardiovascular Health.* 2013; ??(3): 44-47.

6. Hubel CA. Oxidative stress in the pathogenesis of pre-eclampsia. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1999; 222(3):222–235.
7. Raymond D, Peterson E. A critical review of early-onset and late-onset pre-eclampsia. *Obstetrical & gynecological survey.* 2011. 66(8):497-506.
8. Chang JJ, Muglia LJ, Macones GA. Association of early-onset pre-eclampsia in first pregnancy with normotensive second pregnancy outcomes: a population-based study. *BJOG.* 2010; 117(8): 946-953.
9. Meekins JW, Pijnenborg R, Hanssens M, McFadyen IR, van Asshe A . A study of placental bed spiral arteries and trophoblast invasion in normal and severe pre-eclamptic pregnancies. *Br J Obstet Gynaecol.* 1994; 101:669-674.
10. Burton GJ, Jauniaux, E. Oxidative stress. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2011; 25(3): 287-299.
11. Smith RA, Kenny LC. Current thoughts on the pathogenesis of pre-eclampsia. *The Obstetrician & Gynaecologist.* 2006; 8:7-13.
12. Hung TH, Skepper JN, Burton GJ. In vitro ischaemia-reperfusion injury in term human placenta as a model for oxidative stress in pathological pregnancies. *Am J Pathol.* 2001; 159:1031-43.
13. Egbor M, Ansari T, Morris N, Green CJ, Sibbons PD. Morphometric placental villous and vascular abnormalities in early- and late-onset pre-eclampsia with and without fetal growth restriction. *BJOG.* 2006; 113(5):580-589.
14. Report of the National High Blood Pressure Education Program (NHBPEP) Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy. *Am J Obstet. Gynecol.* 2000; 183, S1-S22.
15. Brown MA, Lindheimer MD, de Swiet M, Assche AV, Moutquin J-M. The classification and diagnosis of the hypertensive disorders of pregnancy: statement from the international society for the study of hypertension in pregnancy (ISSHP). *Hypertens Pregnancy* 2001; 20(1):ix–xiv.
16. Wikström AK, Nash P, Eriksson UJ, Olovsson MH. Evidence of increased oxidative stress and a change in the plasminogen activator inhibitor (PAI)-1 to PAI-2 ratio in early-onset but not late-onset pre-eclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 2009; 201(6): 597-e1.
6. Hubel CA. Oxidative stress in the pathogenesis of pre-eclampsia. *Proc SocExpBiol Med.* 1999;222 (3):222–235.
7. Raymond D, Peterson E. A critical review of early-onset and late-onset pre-eclampsia. *Obstetrical & gynecological survey.* 2011. 66(8):497-506.
8. Chang JJ, Muglia LJ, Macones GA. Association of early-onset pre-eclampsia in first pregnancy with normotensive second pregnancy outcomes: a population-based study. *BJOG.* 2010; 117(8): 946-953.
9. Meekins JW, Pijnenborg R, Hanssens M, McFadyen IR, van AssheA . A study of placental bed spiral arteries and trophoblast invasion in normal and severe pre-eclamptic pregnancies. *Br J ObstetGynaecol.* 1994;101:669-674.
10. Burton GJ,Jauniaux, E. Oxidative stress. *Best Pract Res ClinObstetGynaecol.* 2011; 25(3): 287-299.
11. Smith RA, Kenny LC. Current thoughts on the pathogenesis of pre-eclampsia. *The Obstetrician & Gynaecologist.* 2006; 8:7-13.
12. Hung TH, Skepper JN, Burton GJ. In vitro ischaemia-reperfusion injury in term human placenta as a model for oxidative stress in pathological pregnancies. *Am J Pathol.* 2001; 159:1031-43.
13. Egbor M, Ansari T, Morris N, Green CJ, Sibbons PD. Morphometric placental villous and vascular abnormalities in early- and late-onset pre-eclampsia with and without fetal growth restriction. *BJOG.* 2006; 113(5):580-589.
14. Report of the National High Blood Pressure Education Program (NHBPEP) Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy. *Am J Obstet. Gynecol.* 2000; 183, S1-S22.
15. Brown MA, Lindheimer MD, de Swiet M, Assche AV, Moutquin J-M. The classification and diagnosis of the hypertensive disorders of pregnancy: statement from the international society for the study of hypertension in pregnancy (ISSHP). *Hypertens Pregnancy* 2001; 20 (1):ix–xiv.
16. Wikström AK, Nash P, Eriksson UJ, Olovsson MH. Evidence of increased oxidative stress and a change in the plasminogen activator inhibitor (PAI)-1 to PAI-2 ratio in early-onset but not late-onset pre-eclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 2009; 201(6): 597-e1.

17. Patrono C, FitzGerald GA. Isoprostanes: potential markers of oxidant stress in atherothrombotic disease. *ArteriosclerThromb Biol.* 1997;17:2309–15.
18. Fukunaga M, Yura T, Badr KF. Stimulatory effect of 8-Epi-PGF2alpha, an F2-isoprostane, on endothelin-1 release. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1995; 26 (Suppl. 3): S51–S52.
19. Tetteh PW, Antwi-Boasiako C, Gyan B, Antwi D, Adzaku F, Adu-Bonsaffoh K, Obed S. Impaired renal function and increased urinary isoprostane excretion in Ghanaian women with pre-eclampsia. *Research and Reports in Tropical Medicine.* 2013; 4:7-13.
20. Bazavilvaso-Rodríguez MA, Hernández-Valencia M, et al . Oxidative stress changes in pregnant patients with and without severe pre-eclampsia. *Archives of medical research.* 2011; 42(3):195-198.
21. Barden A, Beilin LJ, Ritchie J, Croft KD, Walters BN, Michael CA. Plasma and urinary 8-isoprostane as an indicator of lipid peroxidation in pre-eclampsia and normal pregnancy. *Clin Sci* 1996;91:711–8.
22. Xu, Hairong, Perez-Cuevas R, Xiong X et al. An international trial of antioxidants in the prevention of pre-eclampsia (INTAPP). *Am J Obstet Gynecol.* 2010; 202(3):239.
23. Walsh SW, Vaughan JE, Wang Y, Roberts LJ. Placental isoprostane is significantly increased in pre-eclampsia. *The FASEB Journal.* 2000; 14(10):1289-1296.
24. Scholl TO, Leskiw M, Chen X, Sims M, Stein TP. Oxidative stress, diet, and the etiology of pre-eclampsia. *Am J Clin Nutr.* 2005; 81(6):1390-1396.
17. Patrono C, FitzGerald GA. Isoprostanes: potential markers of oxidant stress in atherothrombotic disease. *ArteriosclerThromb Biol.* 1997;17:2309–15.
18. Fukunaga M, YuraT,Badr KF. Stimulatory effect of 8-Epi-PGF2alpha, an F2-isoprostane, on endothelin-1 release. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1995; 26(Suppl. 3): S51–S52.
19. Tetteh PW, Antwi-Boasiako C, Gyan B, Antwi D, Adzaku F, Adu-Bonsaffoh K, Obed S. Impaired renal function and increased urinary isoprostane excretion in Ghanaian women with pre-eclampsia. *Research and Reports in Tropical Medicine.* 2013; 4:7-13.
20. Bazavilvaso-Rodríguez MA, Hernández-Valencia M, et al . Oxidative stress changes in pregnant patients with and without severe pre-eclampsia. *Archives of medical research.* 2011;42(3):195-198.
21. Barden A, Beilin LJ, Ritchie J, Croft KD, Walters BN, Michael CA. Plasma and urinary 8-isoprostane as an indicator of lipid peroxidation in pre-eclampsia and normal pregnancy. *ClinSci* 1996;91:711–8.
22. Xu, Hairong, Perez-Cuevas R, Xiong X et al. An international trial of antioxidants in the prevention of pre-eclampsia (INTAPP). *Am J Obstet Gynecol.* 2010; 202(3):239.
23. Walsh SW, Vaughan JE, Wang Y, Roberts LJ. Placental isoprostane is significantly increased in pre-eclampsia. *The FASEB Journal.* 2000; 14(10):1289-1296.
24. Scholl TO, Leskiw M, Chen X, Sims M, Stein TP. Oxidative stress, diet, and the etiology of pre-eclampsia. *Am J ClinNutr.* 2005; 81(6):1390-1396.