

Aus der Klinik für Geburtsmedizin
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Der sFlt-1/PIGF Quotient als Parameter für die
gestationsalterbezogene Diagnose, Prädiktion und
Prognose hypertensiver Schwangerschaftserkrankungen**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Katharina Margret Schoofs

aus Köln

Datum der Promotion 30.05.2015

Inhaltsverzeichnis

1	ZUSAMMENFASSUNG	1
1.1	ABSTRACTS	1
1.1.1	Abstract Deutsch	1
1.1.2	Abstract Englisch	3
1.2	EINLEITUNG	4
1.3	METHODIK	5
1.3.1	Studienpopulation	5
1.3.2	Proben	8
1.3.3	Probenmessung	8
1.3.4	Statistik	8
1.4	ERGEBNISSE	9
1.4.1	sFlt-1, PlGF und sFlt-1/PlGF Quotient in gesunden Schwangerschaften	9
1.4.2	Schwangerschaftsphasenspezifische Cut-off Werte zur Diagnose einer Präeklampsie	9
1.4.3	sFlt-1, PlGF und sFlt-1/PlGF Quotient in verschiedenen Schweregraden einer Präeklampsie	10
1.4.4	Der Verlauf des sFlt-1/PlGF Quotienten in Abhängigkeit vom zeitlichem Abstand zur Diagnose einer PE	11
1.4.5	Der Werteanstieg von sFlt-1/PlGF zwischen ausgewählten Zeitpunkten	11
1.5	DISKUSSION	12
1.6	LITERATURVERZEICHNIS	15
2	ANTEILSERKLÄRUNG	17
3	PUBLIKATIONEN	18
3.1	PUBLIKATION 1	18
3.2	PUBLIKATION 2	26
3.3	PUBLIKATION 3	41
4	LEBENS LAUF	54
5	PUBLIKATIONS LISTE	58
6	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	59
7	DANKSAGUNG	60

1 Zusammenfassung

1.1 Abstracts

1.1.1 Abstract Deutsch

Ziel: In mehreren Studien konnte bereits der Nutzen des sFlt-1/PIGF Quotienten für die Diagnose einer Präeklampsie (PE) gezeigt werden. Ziel unserer Studien war es, gestationsalterbezogene Cut-offs zu etablieren (1, Verlohren et al) sowie den Nutzen dieses Parameters in der Diagnose von hypertensiven Schwangerschaftserkrankungen (2, Engels et al) sowie in der Prädiktion der PE zu untersuchen (3, Schoofs et al).

Methodik: (1) und (2) stellen Fall-Kontroll-Studien dar, bei denen insgesamt (1) 1149 bzw. (2) 336 Patientinnen eingeschlossen wurden. In der prospektiven Studie wurden insgesamt 150 Patientinnen mit erhöhtem Risiko für eine PE eingeschlossen. Die Messung des sFlt-1/PIGF Quotienten erfolgte mittels des automatisierten Elecsys© Systems. Für den statistischen Vergleich wurden parametrische und nicht-parametrische Tests, ROC Analysen, logistische Regressionen, gemischte Modellanalysen und Gerhard Plots verwendet.

Ergebnisse: (1) Zwischen der 20+0 und 33+6 SSW resultierten die Cutoffs für den sFlt-1/PIGF Quotienten von ≤ 33 und ≥ 85 in einer Sensitivität/Spezifität von 95%/94% und 88%/99,5%. Nach der 34+0 SSW erreichten die Cutoffs von ≤ 33 und ≥ 110 eine Sensitivität/Spezifität von 89,6%/73,1% und 58,2%/95,5%. Im Vergleich hypertensiver Schwangerschaftserkrankungen (2) zeigten die Untergruppen ähnliche Unterschiede im sFlt-1/PIGF Quotienten (Median \pm SEM; Propf-PE: 202 \pm 110; milde PE: 137 \pm 27; schwere PE: 497 \pm 91; HELLP: 254 \pm 72 vs. Kontrollen 16 \pm 2, jedes $p < 0.001$). Patientinnen mit schwangerschaftsinduzierter Hypertonie und schwangerschaftsinduzierter Proteinurie zeigten signifikante Unterschiede im Vergleich zu Kontrollen ($p \leq 0.01$), milde PE ($p \leq 0.007$), schwere PE ($p < 0.001$) und HELLP ($p \leq 0.003$). In der Prädiktionsstudie (3) ließ sich ein signifikanter Unterschied der PE Gruppe im sFlt-1/PIGF Quotienten bis zu 4 Wochen vor klinischer Diagnose im Vergleich zu Kontrollen nachweisen (106.7 \pm 47.7 vs. 21.0 \pm 4.1; $p = 0.02$). Es konnten durchgehend höhere sFlt-1/PIGF Level bei Frauen mit IUGR im Vergleich zu PE/Kontrollen nachgewiesen werden (Intercept 1.57 vs. 1.30/0.67; $p < 0.05$). Die Anstiegssteilheit des sFlt-1/PIGF Quotienten war signifikant erhöht bei PE und IUGR Schwangerschaften im Vergleich zu Kontrollen.

Schlussfolgerung: Der sFlt-1/PIGF Quotient ist ein hilfreicher Parameter für die Diagnose einer Präeklampsie und anderer hypertensiver Schwangerschaftserkrankungen. Besonders durch spezifische Cut-offs für die frühe und späte Schwangerschaftsphase kann die

diagnostische Genauigkeit verbessert werden. Zusätzlich kann der sFlt-1/PlGF Quotient bereits vor dem Auftreten klinischer Symptome pathologische Schwangerschaftsverläufe wie PE und IUGR identifizieren. Anhand wiederholter Messungen kann eine Prognose über den weiteren Schwangerschaftsverlauf gegeben werden.

1.1.2 Abstract English

Aims: The sFlt-1/PlGF ratio has been evaluated as a diagnostic marker for preeclampsia (PE). The aims of our studies were to find out gestational specific cutoffs (1, Verlohren et al) as well as to show the utility in diagnosis of hypertensive disorders in pregnancy (2, Engels et al). Additionally we wanted to explore the use of the sFlt-1/PlGF ratio as an aid in prediction of PE (3, Schoofs et al).

Methods: In case-control studies (1 and 2) there were included (1) 1149 and (2) 336 patients. In the prospective part we included 150 patients with a high risk for PE. Automated measurements of the sFlt-1/PlGF ratio were performed on the automated Elecsys© system. Statistical analysis were performed using parametric and non-parametric tests, ROC analysis, logistic regression, mixed model analysis and gerhard plots.

Results: (1) Between 20+0 and 33+6 weeks, the cutoffs at ≤ 33 and ≥ 85 resulted in a sensitivity/specificity of 95%/94% and 88%/99,5%, respectively. After 34+0 weeks the cutoffs at ≤ 33 and ≥ 110 resulted in a sensitivity/specificity of 89,6%/73,1% and 58,2%/95,5%, respectively. Subgroups of hypertensive disorders showed similar differences in ratios (2) (median \pm SEM; superimposed PE: 202 \pm 110; mild PE: 137 \pm 27; severe PE: 497 \pm 91; HELLP: 254 \pm 72 vs. controls 16 \pm 2, each $p < 0.001$). Patients with pregnancy induced hypertension and pregnancy induced proteinuria showed significant differences in comparison to controls ($p \leq 0.01$), mild PE ($p \leq 0.007$), severe PE ($p < 0.001$) and HELLP ($p \leq 0.003$). In the prospective part (3) the sflt-1/PlGF ratio was significantly higher in pregnancies complicated by PE up to 4 weeks before clinical diagnosis compared to controls (106.7 \pm 47.7 vs. 21.0 \pm 4.1; $p = 0.02$). Levels of the sFlt-1/PlGF ratio were higher throughout pregnancy in women with IUGR compared to PE/control patients (intercept 1.57 vs. 1.30/0.67; $p < 0.05$). The slope for the sFlt-1/PlGF ratio was significantly higher in PE and IUGR pregnancies compared to controls.

Conclusion: The sFlt-1/PlGF ratio is a reliable tool in the diagnosis of preeclampsia and other hypertensive disorders in pregnancy. Especially gestational specific cutoffs for the early and late gestational phase can improve the diagnostic accuracy of the ratio as a diagnostic tool for PE. Additionally the sFlt-1/PlGF ratio is able to identify pathologic pregnancy outcomes such as PE and IUGR before clinical diagnosis. Repeated measurements can help to assess pregnancy outcome.

1.2 Einleitung

Die Präeklampsie (PE) ist eine Multiorgansystemerkrankung, die ausschließlich in der Schwangerschaft auftritt. Weltweit betrifft diese Erkrankung 2-8% aller Schwangerschaften und ist verantwortlich für einen Großteil der Müttersterblichkeit (1, 2). Die Entbindung stellt zur Zeit die einzig mögliche Therapie dar, um das Leben von Mutter und Kind zu retten.

Definiert wird die Präeklampsie nach der „National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy“ als das Neuauftreten einer Hypertonie mit Werten von ≥ 140 mmHg systolisch und ≥ 90 mmHg diastolisch begleitet von einer signifikanten Proteinurie mit $> 0,3$ g Protein/24h im Sammelurin, $\geq 1+$ im Urinstix oder ≥ 30 mg/dL Protein im Spontanurin nach der 20. Schwangerschaftswoche (3). In den letzten Jahren konnten jedoch mehrere Serumparameter identifiziert werden, die hilfreich für die Diagnose und Prädiktion der Präeklampsie sein können. Insbesondere eine Veränderung des Gleichgewichts zwischen pro- und anti-angiogenen Faktoren konnte in Schwangerschaften mit Präeklampsie dokumentiert werden. Dabei haben vor allem der pro-angiogene Faktor PlGF (placental growth factor) und der anti-angiogene Faktor sFlt-1 (soluble fms-like tyrosine kinase 1) an Bedeutung zugenommen. Erstmals konnten 2004 Levine et al. in einem großen Patientenkollektiv erhöhte Konzentrationen von sFlt-1 und erniedrigte Konzentrationen von PlGF bei Schwangeren mit Präeklampsie nachweisen (4).

Unsere Forschungsgruppe konnte bereits in vorherigen Studien zeigen, dass ein Quotient aus sFlt-1 und PlGF > 85 eine Präeklampsie mit einer Sensitivität von 82% und einer Spezifität von 95% diagnostizieren kann (5). Dieser Cut-off bezieht sich jedoch auf den ganzen Schwangerschaftszeitraum und unterscheidet nicht zwischen einer frühen Präeklampsie vor der 34.SSW und einer späten nach der 34.SSW. Diese Unterscheidung hat jedoch klinische Relevanz bezüglich der Prognose des weiteren Schwangerschaftsverlaufs und dem möglichen Auftreten von mütterlicher oder kindlicher Morbidität und Mortalität. Zusätzlich konzentrierten sich bisherige Studien wenig auf die Unterscheidung verschiedener Subtypen hypertensiver Schwangerschaftserkrankungen wie schwangerschaftsinduzierter Hypertonie, HELLP-Syndrom oder schwerer PE mittels verschiedener Serumparameter. Eine weitere zu klärende Frage blieb, in wie weit eine Prädiktion der Präeklampsie mittels sFlt-1 und PlGF bereits vor dem Auftreten von Hypertonie und Proteinurie möglich ist, da bereits in mehreren Studien veränderte Konzentrationen von sFlt-1 und PlGF vor dem Auftreten von klinischen Symptomen nachgewiesen werden konnten (6-9).

Zielstellung

Ziel unserer Studien war es, zum einen mittels der Konzentrationen von sFlt-1 und PlGF verschiedene hypertensive Schwangerschaftserkrankungen differenzieren zu können (Engels et al.) und zusätzlich spezifische Cutoffs für die Diagnose der PE in den Schwangerschaftsabschnitten vor und nach der 34. Schwangerschaftswoche zu dokumentieren (Verlohren et al.). Zudem interessierte uns die Rolle von sFlt-1 und PlGF in der Prädiktion der PE und der Nutzen von wiederholten Messungen dieser Parameter in der Schwangerschaft bei Patientinnen mit einem erhöhten Risiko für das Auftreten dieser Erkrankung (Schoofs et al.).

1.3 Methodik

1.3.1 Studienpopulation

Sämtliche Studienkohorten für die vorliegenden drei Veröffentlichungen sind Teil einer Europäischen Multicenterstudie, bei der ausschließlich Einlingsschwangerschaften eingeschlossen wurden. Die vorliegenden drei Veröffentlichungen umfassen sowohl einen prospektiven Studienteil als auch einen Fall-Kontroll-Teil dieser Multicenterstudie. Teils gingen lediglich Proben, die in der Geburtsmedizinischen Abteilung der Charité-Universitätsmedizin Berlin erhoben wurden, in die Auswertungen mit ein (Engels et al.; Schoofs et al.). Die Studien wurden durch die Ethikkommission der Charité-Universitätsmedizin Berlin genehmigt, alle eingeschlossenen Patientinnen gaben vor Eintritt in die Studie nach ausführlicher Aufklärung über Ziele und Risiken ihr schriftliches Einverständnis in Form einer unterzeichneten Einwilligungserklärung. Dabei wurde auch die Deklaration von Helsinki berücksichtigt. An allen Standorten wurde ein identisches Studienprotokoll sowie Datenerfassungsblatt verwendet.

In der Multicenterstudie von Verlohren et al. wurden insgesamt 1149 Patientinnen eingeschlossen, von denen 915 eine normale Schwangerschaft hatten und 234 eine Schwangerschaft mit Präeklampsie. Für die Berechnung von Receiver Operating Curves (ROC) und die Cutoff-Analyse wurden 234 Präeklampsiepatientinnen zu 468 gesunden Patientinnen bezüglich des Gestationsalters gematcht, sodass ein Verhältnis Fälle:Kontrollen von 1:2 geschaffen wurde. Für die Analyse der Normwerte für sFlt-1, PlGF und den sFlt-1/PlGF Quotienten in normalen Schwangerschaften wurde pro Schwangerschaftsfenster max. ein Wert pro Individuum berücksichtigt. Es wurden 7 Zeitfenster analysiert: Zeitfenster 1: 10+0 – 14+6 SSW, Zeitfenster 2: 15+0 – 19+6 SSW, Zeitfenster 3: 20+0 – 23+6 SSW,

Zeitfenster 4: 24+0 – 28+6 SSW, Zeitfenster 5: 29+0 – 33+6 SSW, Zeitfenster 6: 34+0 – 36+6 SSW, Zeitfenster 7: 37+0 SSW – Geburt.

Bei der Fall-Kontroll-Studie von Engels et al. wurden an der Klinik für Geburtsmedizin der Charité insgesamt 338 Patientinnen eingeschlossen, für die Vergleichsanalyse der Werte für sFlt-1 und PIGF wurden jedoch nur Schwangerschaften nach der ≥ 24 SSW eingeschlossen, da die früheste PE zu diesem Zeitpunkt diagnostiziert wurde. Dies resultierte in Fallzahlen von 184 Kontrollen und 64 Fällen. Die Fälle wurden unterteilt in milde PE (mPE, n=31), schwere PE (sPE, n=20) und Propf-PE (PPE, n=7) sowie HELLP-Syndrom (n=6). Des Weiteren ergab sich eine Gruppe von 35 Patientinnen mit entweder chronischem Hypertonus (cHT, n=2), schwangerschaftsinduziertem Hypertonus (SIH, n=16) oder schwangerschaftsinduzierter Proteinurie (SIP, n=17).

Für die prospektive Studie von Schoofs et al. wurden an der Klinik für Geburtsmedizin der Charité insgesamt 150 Patientinnen mit einem erhöhten Risiko für eine Präeklampsie eingeschlossen: 114 Kontrollen mit 244 Proben, 14 Patientinnen mit IUGR (24 Proben) und 22 Patientinnen mit PE (43 Proben), von denen 6 eine frühe PE < 34 SSW (9 Proben) hatten.

Für den prospektiven Studienteil galten folgende Einschlusskriterien: unterschriebene Einverständniserklärung; Alter ≥ 16 Jahre; mindestens einen der nachfolgenden Risikofaktoren in der Schwangerschaft bestehend aus Präeklampsie/HELLP-Syndrom/IUGR in vorheriger Schwangerschaft, zu Beginn der Schwangerschaft bestehende Adipositas mit einem Body-Mass-Index von > 30 , vorbestehender Hypertonus, vorbestehender Diabetes mellitus, vorbestehende Nierenerkrankung oder durch eine Doppler-Sonographie bestätigte abnorme uterine Perfusion in den Schwangerschaftswochen 18-24 mit einem mittleren Pulsatility-Index $\geq 1,45$ und/oder zweiseitigem Notch.

In den präsentierten Fall-Kontroll-Studien waren die Einschlusskriterien für die Fall- (PE) Gruppe eine vorhandene Einwilligungserklärung, mütterliches Alter ≥ 16 Jahre und das Vorhandensein einer PE-Form nach den weiter unten genannten Kriterien.

Eine normale Schwangerschaft wurde in alle Studien angenommen, wenn sämtliche Formen der Präeklampsie nicht auftraten und beim Feten kein IUGR nachgewiesen wurde.

Die Ausschlusskriterien enthielten für alle drei vorgestellten Studien: keine Einverständniserklärung; unbekannter Schwangerschaftsausgang; unbekannter klinischer Schwangerschaftsverlauf; vorhandenes Antiphospholipidsyndrom, systemischer Lupus erythematodes oder andere Autoimmunerkrankungen; chronische Kortikosteroid- oder NSAID-Einnahme mit Ausnahme von ≤ 150 mg Aspirin pro Tag.

Das Auftreten einer Präeklampsie wurde nach den Vorgaben der National High Blood Pressure Education Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy definiert (3). Demnach war eine Präeklampsie definiert als ein Neuauftreten von Bluthochdruck und Proteinurie nach der 20. SSW. Dabei war ein Bluthochdruck bei Werten ≥ 140 mmHg systolisch und ≥ 90 mmHg diastolisch vorhanden. Eine signifikante Proteinurie bestand bei $> 0,3$ g Protein/24h im Sammelurin, $\geq 1+$ im Urinstix oder ≥ 30 mg/dL Protein im Spontanurin.

Eine schwere Präeklampsie war definiert als eine Präeklampsie mit mindestens einem der folgenden zusätzlichen Symptome: Blutdruck systolisch ≥ 160 mmHg oder diastolisch ≥ 110 mmHg bei wiederholten Messungen mit mindestens 6 Stunden Abstand; ≥ 5 g Protein/24h; neurologische Symptome; Oligurie mit $< 0,5$ L/24h; erhöhte Transaminasen mit > 2 x des Referenzwertes; Thrombozytopenie mit $< 100.000/\mu\text{l}$; IUGR.

Eine Propf-Präeklampsie war definiert als ein chronischer Hypertonus, der schon vor der 20. SSW bestand, mit zusätzlicher signifikanter Proteinurie nach der 20. SSW.

Für die Einordnung des Schwangerschaftsausgangs als HELLP-Syndrom mussten die Transaminasen (AST, ALT) um mehr als das 2-fache des Referenzwertes erhöht sein und eine Thrombozytopenie mit $< 100.000/\mu\text{l}$ vorliegen. Zusätzlich mussten zur Bestätigung des HELLP-Syndroms entweder eine LDH-Erhöhung um mehr als das 2-fache des Referenzwertes oder erhöhte Werte des indirekten Bilirubins mit $> 1,2$ mg/dL oder reduzierte Haptoglobinwerte mit $< 0,3$ g/L nachgewiesen werden.

Ein schwangerschaftsinduzierter Hypertonus (SIH) war definiert als ein neu aufgetretener Hypertonus nach der 20. SSW, wohingegen ein chronischer Hypertonus (cHT) schon vor der 20. SSW bestand, jedoch jeweils ohne gleichzeitige Proteinurie.

Die schwangerschaftsinduzierte Proteinurie (SIP) war definiert als eine neu aufgetretene Proteinurie ohne Hypertonus.

Alle Präeklampsieformen, die nicht die Kriterien für schwere PE, Propf-PE oder HELLP-Syndrom erfüllten, wurden in der Studie von Engels et al. als milde PE gewertet.

Bei einem Geburtsgewicht des Kindes, welches bei Vergleich mit Perzentilenkurven unter der 5. Perzentile seines Gestationsalters und Geschlechts lag, sowie zusätzlichem Nachweis eines Oligohydramnions oder pathologischen Blutflusses in der Umbilicalarterie mit einem PI > 95 . Perzentile erfolgte die Einordnung der Schwangerschaft in die IUGR-Gruppe. Dabei durfte jedoch keine Form der Präeklampsie in der Schwangerschaft aufgetreten sein.

1.3.2 Proben

Nach sorgfältiger Prüfung der Ein- und Ausschlusskriterien und ausführlicher Aufklärung der Patientinnen erfolgte die venöse Blutentnahme aus der Vena cubitalis in ein Standardblutabnahmegefäß ohne Gelseparator. Es mussten wenigstens 4ml Blut abgenommen werden, um eine ordnungsgemäße Weiterverarbeitung zu gewährleisten. Mindestens 30 min. und maximal 180 min. nach der venösen Blutabnahme wurde die Probe durch 10-minütiges Zentrifugieren bei 2000 x g gewonnen. Mit Hilfe einer Eppendorf-Pipette wurde der Überstand vorsichtig abpipettiert und in ein Probenröhrchen überführt. Dieses wurde anonymisiert gekennzeichnet und für maximal 2 Wochen bei -20°C gelagert, danach bis zur Messung bei mindestens -70°C.

1.3.3 Probenmessung

Alle Proben wurden retrospektiv in den Laboren von Roche Diagnostics® mit den immunologischen in vitro Tests Elecsys® sFlt-1 und Elecsys® PIGF (Roche Diagnostics Deutschland) gemessen. Die Gesamtdauer beider Tests beträgt jeweils 18 Minuten. Für die Messung von sFlt-1 werden 20µl, für die Messung von PIGF werden 50µl der Serumprobe benötigt. Der Messbereich für sFlt-1 liegt laut Hersteller zwischen 10-85.000 pg/mL, für PIGF beträgt er 3-10.000 pg/mL (10). Der Test ist ein Immunoassay nach dem Sandwichprinzip. Hierbei wird die Probe zunächst mit einem biotinyliertem monoklonalem Antikörper und einem mit Ruthenium-Komplex markiertem monoklonalem Antikörper inkubiert und bildet so einen Sandwich-Komplex. Nach Zugabe von Streptavidin beschichteten Mikropartikeln wird das Gemisch an eine Festphase gebunden. In einer Messzelle werden die Mikropartikel durch magnetische Wirkung auf einer Elektrode fixiert und nach Entfernung von ungebundenen Substanzen die Chemilumineszenzemission durch Anlegen einer Spannung induziert und mit dem Photomultiplier gemessen. Die Probenkalibration erfolgt mit rekombinanten humanen Fragmenten von sFlt-1 und PIGF, die in einer serumähnlichen Matrix gepuffert sind.

1.3.4 Statistik

Die statistischen Auswertungen wurden mit Hilfe der Programme SPSS für Windows und SAS durchgeführt. Für den Vergleich der einzelnen klinischen Auswertungsgruppen wurde eine Basisstatistik (Mittelwert, Median, Standardabweichung, Quartilen, Interquartilrang) angefertigt. Der statistische Vergleich der Markerlevel wurde sowohl mit parametrischen (Anova, t-test) als auch mit nicht-parametrischen Tests (Wilcoxon/Kruskal-Wallis) durchgeführt. Ein p-Wert von ≤ 0.05 wurde als signifikant angesehen, alle berichteten p-Werte

sind zweigeteilt. ROC-Analysen wurden für die Berechnung der area under the curve (AUC) und der Spezifität und Sensitivität für verschiedene Cut-off Werte der Biomarker sFlt-1, PlGF und des Quotienten aus sFlt-1/PlGF verwendet. Um den Verlauf der einzelnen Werte über die Schwangerschaft darzustellen wurden Scatterplots und logistische Regressionen angefertigt. Für die Prädiktion des sFlt-1/PlGF Quotienten im Bezug zum Abstand zur klinischen Diagnose wurden für jede Auswertungsgruppe linear gemischte Modelle anhand von Random Intercept Models angefertigt.

1.4 Ergebnisse

1.4.1 sFlt-1, PlGF und sFlt-1/PlGF Quotient in gesunden Schwangerschaften

Für sieben definierte Schwangerschaftsabschnitte (Schwangerschaftswochen (SSW) 10-14, 15-19, 20-23, 24-28, 29-33, 34-36, ≥ 37) wurde der Median der Normwerte aus gesunden Schwangerschaften berechnet (Tabelle 1 aus Verlohren et al) sowie die einzelnen Messwerte in einer Grafik aufgetragen (Grafik S2a,b,c aus Verlohren et al). Dabei zeigte sich für den Verlauf der sFlt-1 Werte ein leicht steigender Verlauf gegen Ende der Schwangerschaft, für PlGF Werte in Form einer Glockenkurve über den Schwangerschaftsverlauf und für den Quotienten aus sFlt-1/PlGF eine U-förmige Kurve.

1.4.2 Schwangerschaftsphasenspezifische Cut-off Werte zur Diagnose einer Präeklampsie

In der Fall-Kontroll-Studie von Verlohren et al. wurden separate Cutoff Werte für die Diagnose einer Präeklampsie für die frühe Schwangerschaftsphase (20+0 bis 33+6 SSW) und die späte Schwangerschaftsphase (34+0 bis SSW der Entbindung) bestimmt (Tabelle 2 und 3, Grafik 3 aus Verlohren et al). Um die Genauigkeit des Quotienten aus sFlt-1 und PlGF zu verbessern wurde für jeden Schwangerschaftsabschnitt eine Übergangszone zwischen zwei Cutoff Werten bestimmt. Ziel war es dabei in frühen Schwangerschaftswochen Cutoffs mit einer Sensitivität von $\geq 95\%$ (für den unteren Cutoff) und einer Spezifität von $\geq 95\%$ (für den oberen Cutoff) zu finden. In diesem Schwangerschaftsabschnitt resultierte ein Cutoff von 33 in einer Sensitivität von 95% und einer Spezifität von 94%, entsprechend einer LR- von 0.05 (95% CI, 0.02-0.13) und einer LR+ von 15.8 (95% CI, 9.13-27.5). Dahingegen brachte ein Cutoff von 85 im gleichen Schwangerschaftsabschnitt eine Sensitivität von 88% und eine Spezifität von 99.5%, entsprechend einer LR- von 0.12 (95% CI 0.07-0.21) und einer LR+

von 176 (95% CI, 24.9-1245). In der Kombination beider Cutoffs konnte somit eine Sensitivität von 95% und eine Spezifität von 99,5% dokumentiert werden.

In späteren Schwangerschaftswochen (34+0 bis Entbindungswoche) wurden die Cutoffs mit dem Ziel gewählt Fälle von späten Präeklampsien (≥ 34 - < 37 SSW) mit einer Spezifität von $\geq 95\%$ zu erkennen. Dabei resultierte ein Cutoff von 33 in einer Sensitivität von 89.6% und einer Spezifität von 73.1%, entsprechend einer LR- von 0.14 (95% CI, 0.09-0.24) und einer LR+ von 3.33 (95% CI, 2.71-4.10). Bei einem Cutoff von 110 zeigte sich hingegen eine Sensitivität von 58.2% und eine Spezifität von 95.5%, entsprechend einer LR- von 0.44 (95% CI, 0.36-0.54) und einer LR+ von 13 (95% CI, 7.34-23.0). Bei Kombination beider Cutoffs mit $\leq 33/\geq 110$ ließ sich somit eine Sensitivität von 89.6% und eine Spezifität von 95.5% erreichen.

1.4.3 sFlt-1, PlGF und sFlt-1/PlGF Quotient in verschiedenen Schweregraden einer Präeklampsie

In der Fall-Kontroll Studie von Engels et al. wurden die unterschiedlichen Subtypen einer Präeklampsie wie milde PE, schwere PE, Propf-PE sowie HELLP-Syndrom und Schwangerschaften mit Hypertonus oder Proteinurie (SIH, SIP und chronische Hypertonie) sowohl gegen Kontrollen als auch untereinander in Ihren Werten für sFlt-1, PlGF und dem sFlt-1/PlGF Quotienten verglichen (Tabelle 2 aus Engels et al). Dabei zeigten sich für alle pathologischen Gruppen im Vergleich zu gesunden Schwangeren in den genannten Biomarkern signifikante Unterschiede mit Ausnahme des Vergleiches der Werte für sFlt-1 zwischen Propf-Präeklampsie und Kontrollgruppe ($p=0.108$). Eine weitere Ausnahme stellte die Gruppe mit cHT dar, bei der sich in keinem der Parameter signifikante Unterschiede im Vergleich zu Kontrollen zeigten ($p=0.979$, 0.460 und 0.544 für sFlt-1, PlGF und sFlt-1/PlGF). Beim Vergleich aller einzelnen Präeklampsieformen mit den Gruppen SIH, SIP oder cHT zeigten sich nur für die Gruppe der Propf-Präeklampsien keine signifikanten Unterschiede für sFlt-1 und den sFlt-1/PlGF Quotienten, jedoch signifikante Werte für PlGF. Einzig im Vergleich von milder PE mit SIH zeigte sich für PlGF ein nicht-signifikanter p-Wert von 0.121.

1.4.4 Der Verlauf des sFlt-1/PlGF Quotienten in Abhängigkeit vom zeitlichem Abstand zur Diagnose einer PE

Im prospektiven Studienanteil von Schoofs et al. wurde für eine Kalkulation der Werte des sFlt-1/PlGF Quotienten in Abhängigkeit vom Abstand zur Diagnose einer PE bzw. Geburt eine gemischte Modellanalyse mit dem Random Intercept Modell für jede einzelne Auswertungsgruppe (PE, frühe PE, IUGR, Kontrollen) durchgeführt (Grafik 2 aus Schoofs et al). Dabei zeigte sich für Patientinnen mit einem normalen Schwangerschaftsausgang das niedrigste Level an sFlt-1/PlGF Werten während der Schwangerschaft (Intercept=0.67 auf der logarithmierten Skala) mit einem leichten Anstieg der Werte in den letzten acht Schwangerschaftswochen. Patientinnen mit PE zeigten konstant höhere Werte (Intercept 1.00 auf der log. Skala) und einen steileren Anstieg für sFlt-1/PlGF vor Diagnose einer PE im Vergleich zu Kontrollen. In der Untergruppe der frühen PE <34.SSW konnten höhere Werteelevel als in der Gruppe aller PE berechnet werden (Intercept 1.30 auf log. Skala) mit einem steileren Anstieg der Werte bereits 8-12 Wochen vor Diagnose einer PE im Vergleich zur Gruppe aller PEs (Slope 0.09 vs. 0.05 auf log. Skala). Die höchsten Werte für sFlt-1/PlGF während des ganzen Schwangerschaftsverlaufes im Vergleich zu allen anderen zeigte die Gruppe der Schwangeren mit IUGR (Intercept 1.57 auf log. Skala). Alle berichteten Intercepts der Gruppen IUGR, frühe PE und alle PE waren signifikant unterschiedlich im Vergleich zur Kontrollgruppe.

1.4.5 Der Werteanstieg von sFlt-1/PlGF zwischen ausgewählten Zeitpunkten

Um die Steilheit des Werteanstiegs von sFlt-1/PlGF zwischen zwei Messungen unter den Auswertungsgruppen zu vergleichen wurden die aus der gemischten Modellanalyse berechneten Werte für 0, 4 und 8 Wochen vor Diagnose (Gruppe alle PE und frühe PE) bzw. Geburt (Gruppe Kontrollen und IUGR), wie in Tabelle 3 bei Schoofs et al dargestellt, gewählt. Die Absolutwerte für die Anstiegssteilheit sind in Grafik 3 bei Schoofs et al gezeigt. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Werten der verschiedenen Auswertungsgruppen für den Zeitraum acht bis vier Wochen vor Diagnose bzw. Geburt dokumentiert werden. Im Zeitraum null bis vier Wochen vor Diagnose bzw. Geburt zeigte sich jedoch ein signifikanter Unterschied zwischen der Anstiegssteilheit für sFlt-1/PlGF für den Vergleich der pathologischen Auswertungsgruppe mit den Kontrollen: IUGR vs. Kontrollen (8,21 vs. 4,34; $p=0.027$), frühe PE vs. Kontrollen (14,48 vs. 4,34; $p=0.016$) und alle PE vs. Kontrollen (9,61 vs. 4,34; $p=0.026$).

1.5 Diskussion

In vorherigen Studien unserer Arbeitsgruppe und auch anderer Arbeitsgruppen konnte bereits gezeigt werden, dass die automatisierte Messung von sFlt-1, PIGF und dem Quotienten aus sFlt-1/PIGF ein hilfreiches Instrument in der Diagnose der Präeklampsie ist und insbesondere der sFlt-1/PIGF Quotient dabei den alleinigen Messungen von sFlt-1 und PIGF überlegen ist (5, 11-14). Dies konnte auch in der Studie von Verlohren et al. bestätigt werden. Zudem konnte in der Studie von Schoofs et al. gezeigt werden, dass der sFlt-1/PIGF Quotient bereits 4 Wochen vor klinischer Diagnose einer PE mit Proteinurie und Hypertonus erhöht ist. Diese Ergebnisse sind kongruent mit Levine et al., die bis zu 5 Wochen vor klinischer Diagnose erhöhte Werte bei Patientinnen mit späterer PE fanden (7).

Im Jahre 2010 wurde in unserer Arbeitsgruppe für die Diagnose einer Präeklampsie ein Cutoff von 85 ermittelt, der diese Erkrankung mit einer Sensitivität von 82% und einer Spezifität von 95% unabhängig von der Schwangerschaftswoche diagnostiziert. In der finalen Auswertung der Multicenterstudie von Verlohren et al. konnte dieser Cutoff von 85 jedoch nur noch eine Sensitivität von 75,6% und eine Spezifität von 95,5% erreichen. Die Präeklampsie stellt eine Erkrankung dar, die sich in ihrer klinischen Präsentation und in den Folgen für die Schwangerschaft besonders zwischen der frühen ($\leq 33+6$ SSW) und der späten Form (≥ 34 SSW) erheblich unterscheidet. Besonders bei der frühen Form ist eine hohe Sensitivität des Cutoffs wichtig, um möglichst jede Erkrankte frühzeitig zu erkennen. Bei einem Cutoff von 33 konnte in der Studie von Verlohren et al. eine Sensitivität von 95% erreicht werden. Um jedoch die Erkrankung bei Patientinnen in der frühen Schwangerschaft mit unspezifischen Symptomen ausschließen zu können, bedarf es einer hohen Spezifität, welche bei einem Cutoff von 85 mit 99,5% erreicht wird. Kombiniert man nun beide Cutoffs miteinander, so würden alle Frauen bis auf eine aus der Multicenterstudie korrekt als gesund diagnostiziert werden und nur 5 von 100 als falsch negativ diagnostiziert werden.

Die Festlegung einer Übergangszone zwischen einem gemessenen sFlt-1/PIGF Quotienten von 33-85 ($\leq 33+6$ SSW) bzw. 33-110 (≥ 34 SSW) ermöglicht es Patientinnen mit einem möglichen Risiko für eine Präeklampsie zu identifizieren. Bei diesen Frauen wäre eine erneute Messung im Verlauf zu empfehlen, um das mögliche Risiko zu differenzieren.

Im speziellen Fall ebendieser Frauen könnte durch wiederholte Messungen eine Anstiegssteilheit zwischen zwei Messungen berechnet werden, anhand derer das Risiko für das Auftreten einer Präeklampsie im Laufe der weiteren Schwangerschaft abgeschätzt werden könnte. Schoofs et al konnten einen signifikanten Unterschied der slope-Werte aller pathologischen Schwangerschaften im Vergleich zu gesunden Schwangeren im Zeitraum 0-4

Wochen vor klinischer Diagnose zeigen. Dies deckt sich mit den Ergebnissen vorheriger Studien, die sich auf die Änderungen von sFlt-1 und PlGF bei wiederholten Messungen dieser Parameter während der Schwangerschaft als prädiktiven Marker für das Auftreten einer Präeklampsie fokussierten (8, 15-17).

Engels et al konnten zeigen, dass die Parameter sFlt-1, PlGF und der sFlt-1/PlGF Quotient sich auch zwischen den verschiedenen Unterformen der Präeklampsie und hypertensiven Schwangerschaftserkrankungen signifikant unterscheiden. Lediglich für den chronischen Hypertonus zeigten sich keine signifikanten Werte, was jedoch bereits in anderen Studien dokumentiert wurde (18-20). Diese Beobachtung deckt sich auch mit den histologischen und sonographischen Daten bei Schwangeren mit chronischem Hypertonus, die eine nahezu normale Morphologie und Funktion der Plazenta im Gegensatz zu Schwangeren mit Präeklampsie zeigen.

Für den Vergleich der Serummarker zwischen den Auswertungsgruppen PE und HELLP zeigten sich bei Young et al. vergleichbare Konzentrationen für sFlt-1, PlGF und den sFlt-1/PlGF Quotienten (21). Es konnte in unserer Studie jedoch ein signifikanter Unterschied für PlGF und den Quotienten im Vergleich von HELLP-Syndrom versus milde PE und für sFlt-1 im Vergleich HELLP Syndrom versus schwere PE gefunden werden. Bis jetzt hat jedoch noch keine Studie die angiogenen und antiangiogenen Faktoren zwischen HELLP-Syndrom ohne und mit PE untersucht. Weitere Untersuchungen dieser Biomarker bei unterschiedlichen Formen hypertensiver Schwangerschaftserkrankungen könnten Unterschiede mit prognostischer Relevanz herausarbeiten.

Für die Gruppe der IUGR konnte bei Schoofs et al. über die gesamte Schwangerschaft ein erhöhtes Wertlevel für den sFlt-1/PlGF Quotienten gezeigt werden. In der gemischten Modellanalyse hatten Schwangere mit IUGR den höchsten Intercept von 1.57 (auf der log-Skala) im Vergleich zu allen anderen Gruppen. Im klinischen Alltag ist eine Prognose für IUGR-Schwangerschaften schwierig. Veränderungen der Dopplersonographie und des CTGs können eine Indikation zur Entbindung sein, das Risiko für einen intrauterinen Tod steigt mit einer Abflachung der Wachstumskurve des Feten (22). In unseren Auswertungen zeigte sich für die Gruppe der IUGR der steilste Anstieg im Vergleich zu allen anderen Auswertungsgruppen für den sFlt-1/PlGF Quotienten bis zu 4 Wochen vor Entbindung dieser Patientinnen. Dies zeigt die Schwere dieser Erkrankung verbunden mit einer mangelhaften Plazentafunktion. Diese Schwangeren frühzeitig zu Erkennen und anhand der Steilheit der Veränderungen des sFlt-1/PlGF Quotienten eine Aussage über den zu erwartenden weiteren

Schwangerschaftsverlauf zu treffen vermag im klinischen Management dieser Frauen die fetale Morbidität und Mortalität zu verbessern.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass der sFlt-1/PlGF Quotient ein wichtiger diagnostischer Marker für das Auftreten einer Präeklampsie ist. Er ermöglicht sowohl die Unterscheidung zwischen verschiedenen Formen der Präeklampsie als auch die Prädiktion der Erkrankung vor dem Auftreten klinischer Symptome mit Proteinurie und Hypertonie, die immer noch den aktuellen Goldstandard der Diagnosesicherung darstellen. Mit Hilfe von diagnostischen Übergangszonen für frühe und späte Präeklampsieformen kann die frühzeitige Erkennung betroffener Patientinnen verbessert werden und das zu erwartende Risiko für das Auftreten einer PE abgeschätzt werden, besonders die Anstiegssteilheit zwischen zwei gemessenen Werten scheint ein aussagekräftiger Parameter für den weiteren Schwangerschaftsverlauf zu sein.

1.6 Literaturverzeichnis

1. Duley L. The global impact of pre-eclampsia and eclampsia. *Semin Perinatol.* 2009;33(3):130-7.
2. Khan KS, Wojdyla D, Say L, Gülmezoglu AM, Van Look PFA. WHO analysis of causes of maternal death: a systematic review. *The Lancet.* 2006;367(9516):1066-74.
3. Report of the National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 2000;183(1):S1-S22.
4. Levine RJ, Maynard SE, Qian C, Lim KH, England LJ, Yu KF, et al. Circulating angiogenic factors and the risk of preeclampsia. *N Engl J Med.* 2004;350(7):672-83.
5. Verlohren S, Galindo A, Schlembach D, Zeisler H, Herraiz I, Moertl MG, et al. An automated method for the determination of the sFlt-1/PIGF ratio in the assessment of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 2010;202(2):161.e1-.e11.
6. Lam C, Lim KH, Karumanchi SA. Circulating angiogenic factors in the pathogenesis and prediction of preeclampsia. *Hypertension.* 2005;46(5):1077-85.
7. Levine RJ, Lam C, Qian C, Yu KF, Maynard SE, Sachs BP, et al. Soluble endoglin and other circulating antiangiogenic factors in preeclampsia. *N Engl J Med.* 2006;355(10):992-1005.
8. Moore Simas TA, Crawford SL, Solitro MJ, Frost SC, Meyer BA, Maynard SE. Angiogenic factors for the prediction of preeclampsia in high-risk women. *Am J Obstet Gynecol.* 2007;197(3):244.e1-8.
9. Stepan H, Jank A. Angiogene Faktoren und ihre Rolle in der Entstehung und Vorhersage der Präeklampsie. *Z Geburtshilfe Neonatol.* 2009;213(03):101,5.
10. Schiettecatte J, Russcher H, Anckaert E, Mees M, Leeser B, Tirelli AS, et al. Multicenter evaluation of the first automated Elecsys sFlt-1 and PIGF assays in normal pregnancies and preeclampsia. *Clin Biochem.* 2010;43(9):768-70.
11. Verlohren S, Herraiz I, Lapaire O, Schlembach D, Moertl M, Zeisler H, et al. The sFlt-1/PIGF ratio in different types of hypertensive pregnancy disorders and its prognostic potential in preeclamptic patients. *Am J Obstet Gynecol.* 2011.
12. Ohkuchi A, Hirashima C, Suzuki H, Takahashi K, Yoshida M, Matsubara S, et al. Evaluation of a new and automated electrochemiluminescence immunoassay for plasma sFlt-1 and PIGF levels in women with preeclampsia. *Hypertens Res.* 2010;33(5):422-7.

13. Schiettecatte J, Russcher H, Anckaert E, Mees M, Leeser B, Tirelli AS, et al. Multicenter evaluation of the first automated Elecsys sFlt-1 and PlGF assays in normal pregnancies and preeclampsia. *Clin Biochem.* 2010;43(9):768-70.
14. Stepan H, Unversucht A, Wessel N, Faber R. Predictive value of maternal angiogenic factors in second trimester pregnancies with abnormal uterine perfusion. *Hypertension.* 2007;49(4):818-24.
15. Erez O, Romero R, Espinoza J, Fu W, Todem D, Kusanovic JP, et al. The change in concentrations of angiogenic and anti-angiogenic factors in maternal plasma between the first and second trimesters in risk assessment for the subsequent development of preeclampsia and small-for-gestational age. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2008;21(5):279-87.
16. Rana S, Karumanchi SA, Levine RJ, Venkatesha S, Rauh-Hain JA, Tamez H, et al. Sequential changes in antiangiogenic factors in early pregnancy and risk of developing preeclampsia. *Hypertension.* 2007;50(1):137-42.
17. Vatten LJ, Eskild A, Nilsen TI, Jeansson S, Jenum PA, Staff AC. Changes in circulating level of angiogenic factors from the first to second trimester as predictors of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 2007;196(3):239.e1-6.
18. Woolcock J, Hennessy A, Xu B, Thornton C, Tooher J, Makris A, et al. Soluble Flt-1 as a diagnostic marker of pre-eclampsia. *Aust N Z J Obstet Gynaecol.* 2008;48(1):64-70.
19. Sunderji S, Gaziano E, Wothe D, Rogers LC, Sibai B, Karumanchi SA, et al. Automated assays for sVEGF R1 and PlGF as an aid in the diagnosis of preterm preeclampsia: a prospective clinical study. *Am J Obstet Gynecol.* 2010;202(1):40.e1-7.
20. Salahuddin S, Lee Y, Vadnais M, Sachs BP, Karumanchi SA, Lim KH. Diagnostic utility of soluble fms-like tyrosine kinase 1 and soluble endoglin in hypertensive diseases of pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 2007;197(1):28.e1-6.
21. Young B, Levine RJ, Salahuddin S, Qian C, Lim KH, Karumanchi SA, et al. The use of angiogenic biomarkers to differentiate non-HELLP related thrombocytopenia from HELLP syndrome. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2010;23(5):366-70.
22. Pilliod RA, Cheng YW, Snowden JM, Doss AE, Caughey AB. The risk of intrauterine fetal death in the small-for-gestational-age fetus. *Am J Obstet Gynecol.* 2012;207(4):318.e1-6.

2 Anteilserklärung

Anteilserklärung an den erfolgten Publikationen

Katharina Margret Schoofs hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1: *Schoofs, Grittner, Engels, Pape, Denk, Henrich, Verlohren; The importance of repeated measurements of the sFlt-1/PlGF ratio for the prediction of preeclampsia and intrauterine growth restriction; Journal of Perinatal Medicine; 2013*

Beitrag im Einzelnen: Inklusion geeigneter Patienten, Organisation der Patientenaufklärung, Probengewinnung, laborchemische Probenbearbeitung, Datensammlung, Datenauswertung inkl. statistischer Auswertung, Literaturrecherche, Dateninterpretation, Erstellung und Überarbeitung des Manuskripts

Publikation 2: *Engels, Pape, Schoofs, Henrich, Verlohren; Automated measurement of sFlt-1, PlGF and sFlt-1/PlGF ratio in differential diagnosis of hypertensive pregnancy disorders; Hypertension in Pregnancy; 2013*

Beitrag im Einzelnen: Inklusion geeigneter Patienten, Organisation der Patientenaufklärung, Probengewinnung, laborchemische Probenbearbeitung, Datensammlung, Aufarbeitung der Rohdaten als Vorbereitung für die Auswertung, kritische Durchsicht des Manuskripts

Publikation 3: *Verlohren, Herraiz, Lapaire, Schlembach, Zeisler, Calda, Sabria, Markfeld-Erol, Galindo, Schoofs, Denk, Stepan; New gestational phase-specific cutoff values for the use of the soluble fms-like tyrosine kinase-1/placental growth factor ratio as a diagnostic test for preeclampsia; Hypertension; 2013*

Beitrag im Einzelnen: Inklusion geeigneter Patienten, Organisation der Patientenaufklärung, Probengewinnung, laborchemische Probenbearbeitung, Datensammlung, Aufarbeitung der Rohdaten als Vorbereitung für die Auswertung, kritische Durchsicht des Manuskripts

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

3 Publikationen

3.1 Publikation 1

DE GRUYTER

DOI 10.1515/jpm-2013-0074 — J. Perinat. Med. 2013; aop

Katharina Schoofs, Ulrike Grittner, Theresa Engels, Juliane Pape, Barbara Denk, Wolfgang Henrich and Stefan Verlohren*

The importance of repeated measurements of the sFlt-1/PlGF ratio for the prediction of preeclampsia and intrauterine growth restriction

Abstract

Aims: The sFlt-1/PlGF ratio has been evaluated as a diagnostic marker for preeclampsia (PE). The aim of this study was to explore the use of the sFlt-1/PlGF ratio as an aid in prediction for PE.

Methods: 150 patients with a high risk for PE were enrolled in this prospective study. Groups were compared according to the pregnancy outcome: controls (n=114), intrauterine growth restriction (IUGR) (n=14) and PE (n=22) with subclassification early PE <34 weeks (n=6). Measurements of sFlt-1 and PlGF were performed on the automated Elecsys system. Statistical comparison of the sFlt-1/PlGF ratio in different outcome groups and a mixed model analysis using random intercept models were performed.

Results: The sFlt-1/PlGF ratio was significantly higher in pregnancies complicated by PE up to 4 weeks before clinical diagnosis compared to controls (106.7±47.7 vs. 21.0±4.1; P=0.02). Levels of the sFlt-1/PlGF ratio were higher throughout pregnancy in women with IUGR compared to PE/control patients (intercept 1.57 vs. 1.30/0.67; P<0.05). The slope for the sFlt-1/PlGF ratio was significantly higher in PE and IUGR pregnancies compared to controls, indicating that a steep increase of the sFlt-1/PlGF ratio correlates with pathologic pregnancy outcomes.

Conclusion: The sFlt-1/PlGF ratio can identify pathologic pregnancy outcomes such as IUGR and PE before clinical diagnosis. Repeated measurements are necessary to assess the dynamics in serum values. The time-dependent slope of the sFlt-1/PlGF ratio is predictive for future pregnancy outcome and risk of developing preeclampsia.

Keywords: Angiogenic factors; biomarker; hypertension; IUGR; placental dysfunction; PlGF; prediction; preeclampsia; pregnancy; sFlt-1.

*Corresponding author: Stefan Verlohren, Department of Obstetrics, Charité University Medicine, Berlin, Germany, E-mail: stefan.verlohren@charite.de

Katharina Schoofs, Theresa Engels and Wolfgang Henrich: Department of Obstetrics, Charité University Medicine, Berlin, Germany

Ulrike Grittner: Department for Biostatistics and Clinical Epidemiology, Charité University Medicine, Berlin, Germany

Juliane Pape: Department of Gynecology and Obstetrics, DRK Berlin Westend, Berlin, Germany

Barbara Denk: Roche Professional Diagnostics, Penzberg, Germany

Introduction

Preeclampsia (PE) is a multisystem disorder in pregnancy. It affects 2–8% of all pregnancies worldwide and is a major cause of maternal mortality and morbidity [2, 24]. In some developing countries hypertensive disorders are responsible for 25% of all maternal deaths [6]. Delivery is currently the only disease limiting option.

Preeclampsia is defined according to the National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy as a new onset of hypertension and proteinuria after 20 weeks of gestation (weeks) [20]. Several studies in the last decade have identified serum parameters with a potential use in the diagnosis and prediction of the disease. In particular, the discovery of an imbalance between angiogenic and antiangiogenic factors such as soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt-1), placental growth factor (PlGF) and soluble endoglin (sEng) but also elevation of cardiac dysfunction markers such as N-Terminal pro-brain natriuretic peptide in women with PE, has brought new insights in the pathophysiology of the disease debating new therapeutic options [9–13, 22, 25].

Levine et al. were the first to show high concentrations of antiangiogenic sFlt-1 and low concentrations of angiogenic PlGF in a large study collective of women with preeclampsia [10]. In a study evaluating the ratio of sFlt-1/PlGF as a diagnostic marker for PE a preliminary cut-off of 85 after 20 weeks was found [29]. Several studies have already shown that marker levels are changing prior to clinical onset of the disease [7, 9, 14, 23]. Levine et al. measured significant changes in concentrations of angiogenic factors up to 11 weeks before clinical diagnosis of PE [9].

With the introduction of automated tests to assess sFlt-1 and PlGF, measurement of these markers has become widely accessible in the clinical routine. However, until now these assays have only been evaluated as diagnostic tests for preeclampsia in case-control studies. The single cut-off of 85 detects preeclampsia with a sensitivity of 82% and a specificity of 95% [15, 29].

Early onset PE frequently coincides with intrauterine growth restriction (IUGR). However, isolated IUGR without the presence of PE according to the current definition is often diagnosed, contributing substantially to fetal morbidity and mortality [4, 17]. Both disease entities share a common pathophysiology [1, 5]. To date, only a few studies explored the use of sFlt-1 and PlGF in pregnancies with IUGR without PE and found differences in serum levels of these markers [8, 21, 26].

The objective of our study was to evaluate the use of the sFlt-1/PlGF ratio as an aid in the prediction of preeclampsia. We aimed to assess the importance of the slope between repeated measurements of the sFlt-1/PlGF ratio in patients with PE, isolated IUGR and healthy pregnant women.

Materials and methods

Study population

The study cohort was part of a prospective European Multicenter Study evaluating the use of the sFlt-1/PlGF ratio as an aid in prediction of preeclampsia.

Pregnant women with a high risk for preeclampsia but with the absence of clinical diagnosis were enrolled in this prospective study. The inclusion criteria were the presence of an informed consent, maternal age ≥ 16 years and at least one of the following risk factors for preeclampsia: PE/HELLP or IUGR in previous pregnancy, obesity with a BMI > 30 kg/m², preexisting hypertension, preexisting diabetes, preexisting renal disease, multi-fetal gestation and an abnormal uterine perfusion detected by Doppler sonography during weeks 18–24 of gestation or with a mean pulsatility index ≥ 1.45 and/or bilateral notch sign. The exclusion criteria were: lack of an informed consent, loss to follow up with an unknown pregnancy outcome, lack of clinical history, antiphospholipid antibody syndrome, systemic lupus erythematosus, any other autoimmune disease and a chronic corticosteroid or NSAID use, except low dosage aspirin ≤ 150 mg/day.

For each woman, an identical study protocol and data collection form was used. The study was approved by the local Ethics Committee of Charité-University Medicine Berlin and all study subjects gave their written informed consent before participation. Patient data was documented in a case report form.

PE was defined according to the National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy [20]. PE was therefore defined as blood pressure ≥ 140 mm Hg systolic or ≥ 90 mm Hg diastolic in women who were normotensive before 20 weeks accompanied by proteinuria diagnosed by ≥ 0.3 g

protein/24 h or in emergency cases only a dipstick $\geq 1+$ on more than one occasion or ≥ 30 mg/dL protein in spot urine. Women with further PE subclassifications such as severe PE, superimposed PE and HELLP syndrome (hemolysis, elevated liver enzymes, high platelets) were also included in the PE outcome group for analysis as patient numbers were too small to form subgroups. Severe PE was diagnosed when fulfilling the criteria of PE plus either elevated blood pressure $\geq 160/110$ mm Hg or proteinuria ≥ 5 g protein/24 h. HELLP syndrome was diagnosed when transaminase (AST/ALT) levels were increased greater than two times the upper reference interval, reduced thrombocyte counts were $< 100,000/\mu\text{L}$ plus at least one of the following hemolysis criteria: increased LDH levels greater than two times the upper reference interval, increased indirect bilirubin levels > 1.2 mg/dL or reduced haptoglobin levels < 0.3 g/L. Superimposed PE was defined as a preexisting hypertension before 20 weeks with *de novo* proteinuria or sudden increase in the magnitude of hypertension or appearance of thrombocytopenia and/or abnormal transaminases or sudden increase in proteinuria when having proteinuria before 20 weeks.

IUGR was defined when fulfilling the following criteria detected in sonography: estimated fetal weight or abdominal circumference $< 5^{\text{th}}$ percentile plus either an oligohydramnion with an amniotic fluid index $< 10^{\text{th}}$ percentile or a pathologic flow in umbilical artery with a pulsatility index $> 95^{\text{th}}$ percentile. Women having an IUGR fetus and PE pathology were excluded from the IUGR group.

A normal pregnancy outcome was defined as the absence of any form of PE in the mother and the absence of IUGR in the fetus.

A total of 150 individuals were included: 114 patients with a normal pregnancy outcome, 22 with a PE outcome and 14 women with isolated IUGR.

Samples

Serum samples were collected from 7 weeks until 42 weeks. A total of 317 samples were collected of which six samples had to be excluded for having no information on pregnancy outcome. There were 244 samples of controls, 24 of IUGR patients and 43 of PE patients including nine samples of early PE women (PE diagnosed < 34 weeks). Serum was collected according to gestational age intervals as follows: interval 1=gestational weeks 0–14, interval 2=gestational weeks 15–19, interval 3=gestational weeks 20–23, interval 4=gestational weeks 24–28, interval 5=gestational weeks 29–33, interval 6=gestational weeks 34–36, interval 7=gestational weeks 37–42. Whenever possible the women were asked to donate samples of blood with a maximum of one sample per gestational age interval. However, not all patients donated blood samples in all gestational age intervals.

All samples were taken by venipuncture in tubes without anticoagulant. The tubes were centrifuged at 2000 g, pipetted and stored at -80°C until testing. The concentration of sFlt-1 and PlGF were measured by an automated Elecsys® system (Elecsys PlGF and Elecsys sFlt-1). These tests are sandwich immunoassays based on the electrochemiluminescence technology. Total time of each test is 18 min. The required volume is 20 μL for sFlt-1 and 50 μL for PlGF testing. According to the manufacturer's instruction for use, the sFlt-1 assay measures range is 10–85,000 pg/mL and the PlGF assay range is 3–10,000 pg/mL. Within-run imprecision coefficients of variation (CV) determined for the control samples of the assays are $< 2\%$ for sFlt-1 and PlGF. Between-run CVs range from 2.6 to 3.0% for sFlt-1 and 2.0–2.4% for PlGF. For every sample the sFlt-1/PlGF ratio was calculated.

Statistical analysis

To compare clinical groups basic statistics (mean, SD) were used. Characteristics of controls and patients were compared using Mann-Whitney U-test. A P-value <0.05 was considered statistically significant (for two-tailed tests). No correction for multiple testing was applied. For analyzing the dynamics of the sFlt-1/PlGF ratio time points of measures were defined according to weeks before diagnosis of PE (for groups all PE and early PE) and weeks before delivery (for groups IUGR and controls). The following time frames were created: interval 1: ≤2 weeks before diagnosis/delivery; interval 2: 3–4 weeks before diagnosis/delivery; interval 3: 5–8 weeks before diagnosis/delivery; interval 4: 9–11 weeks before diagnosis/delivery; interval 5: 12–15 weeks before diagnosis/delivery; interval 6: 16–20 weeks before diagnosis/delivery; interval 7: ≥20 weeks before diagnosis/delivery.

Because not all patients contributed samples in all gestational age intervals, linear mixed models for the prediction of sFlt-1/PlGF ratio according to weeks before diagnosis of PE were performed using random intercept models for every group separately. Mixed models account for the clustered data structure where the different measure-

ments are clustered in individuals. They allow analyzing unbalanced data by using all available data [28]. To overcome the skewness in the data we used logarithmized values for the regression models. The time variable was centered on the mean.

Results

Demographic and clinical characteristics of the study population

A total of 150 pregnant women were enrolled. According to clinical outcome there were 114 controls, 14 women with IUGR exclusive of PE pathology, 22 patients with PE including six women with early PE diagnosed <34 weeks. No significant differences with regards to age, preexisting diabetes, preexisting renal disease or a history of PE/HELLP/IUGR in previous pregnancies could be discovered

Table 1 Baseline characteristics of patient group.

Patient characteristics	Controls	IUGR	All PE	Early PE
Age (y)	31.5±5.4	34.0±9.5	33.0±6.4	33.8±8.2
Height (cm)	166.2±6.4	162.3±6.8 ^a	165.6±5.0	164.0±4.9
Weight (kg)	86.0±22.4	64.8±11.7 ^b	84.9±26.2	80.2±25.2
BMI (kg/m ²)	31.0±7.6	24.8±5.8 ^a	30.8±8.6	29.7±8.9
Birthweight (g)	3102.4±840.4	1230.0±635.9 ^b	2557.5±974.4 ^a	1639.4±1173.0 ^a
Gestational week of delivery	37.4±3.2	30.8±5.0 ^b	35.1±3.8 ^b	31.0±5.0 ^b
Diastolic BP max (mm Hg)	81.3±11.7	85.0±12.7	94.1±11.1 ^b	102.5±12.6 ^b
Systolic BP max (mm Hg)	127.8±15.6	132.8±15.2	148.0±15.3 ^b	157.5±15.4 ^b
Smoking status [n (%)]				
Current	12 (10.5)	1 (7.1)	2 (9.1)	0
Past	33 (28.9)	5 (35.7)	3 (13.6)	0
Never	62 (54.4)	7 (50.0)	16 (72.7)	6 (100.0)
Unknown	7 (6.2)	1 (7.1)	1 (4.5)	0
Preexisting hypertonus [n (%)]				
Yes	32 (28.1)	4 (28.6)	10 (45.5)	4 (66.7)
No	77 (67.5)	9 (64.3)	12 (54.5)	2 (33.3)
Unknown	5 (4.4)	1 (7.1)	0	0
Preexisting diabetes [n (%)]				
Yes	17 (14.9)	1 (7.1)	1 (4.5)	0
No	92 (80.7)	12 (85.7)	21 (95.5)	6 (100.0)
Unknown	5 (4.4)	1 (7.1)	0	0
Pre-existing chronic renal disease [n (%)]				
Yes	7 (6.1)	1 (7.1)	0	0
No	102 (89.5)	12 (85.7)	22 (100.0)	6 (100.0)
Unknown	5 (4.4)	1 (7.1)	0	0
PE/HELLP/IUGR in previous pregnancy [n (%)]				
Yes	32 (28.1)	2 (14.3)	7 (31.8)	2 (33.3)
No	77 (67.5)	11 (78.6)	15 (68.2)	4 (66.7)
Unknown	5 (4.4)	1 (7.1)	0	0
Total (n)	114	14	22	6

±Values are means±SD. Numerous variables are given in means±SD, other characteristics are given in total numbers n and percentage (%).

^aP<0.05, ^bP≤0.001. All P-values for comparison with control group using Mann-Whitney U-test.

BMI=body mass index; BP=maximal blood pressure per patient; PE=preeclampsia; HELLP=hemolysis, elevated liver enzymes, low platelets syndrome; IUGR=intrauterine growth restriction.

between outcome groups. Women with isolated IUGR were significantly shorter, had a lower weight and a lower body mass index than controls and women with PE. Neonatal weight and gestational age at delivery was significantly lower in IUGR and PE pregnancies compared to controls. Patients with PE had a significantly higher diastolic and systolic blood pressure, were less likely to smoke and had a higher prevalence of preexisting hypertension than controls. All results are listed in Table 1.

Mean sFlt-1/PlGF ratios according to weeks before diagnosis/delivery

To compare clinical groups, the sFlt-1/PlGF ratio in PE patients was classified according to weeks before clinical diagnosis and compared to the sFlt-1/PlGF ratio in controls and women with IUGR according to weeks before delivery. Figure 1 shows the mean and SE of the sFlt-1/PlGF ratio in different time frames for outcome groups. No significant differences in sFlt-1/PlGF ratios were detected until 9 weeks before diagnosis or delivery. 5–8 weeks before diagnosis/delivery women with IUGR and PE patients had elevated levels of the sFlt-1/PlGF ratio. This increased continuously until delivery/diagnosis in comparison to

controls. The steepest increment was documented for women diagnosed with early PE <34 weeks.

In time frame 5–8 weeks before delivery, patients with IUGR had a significantly higher sFlt-1/PlGF ratio as compared to controls (46.3 ± 17.1 vs. 8.2 ± 1.1 ; $P=0.020$). In time frame 3–4 weeks before diagnosis/delivery, women with IUGR (96.1 ± 24.7 vs. 21.0 ± 4.1 ; $P=0.006$) and PE (106.7 ± 47.7 vs. 21.0 ± 4.1 ; $P=0.020$) had a significantly higher sFlt-1/PlGF ratio compared to healthy controls. Up to 2 weeks before diagnosis of PE and delivery for IUGR, all pathologic outcome groups had a significantly higher sFlt-1/PlGF ratio compared to normal pregnancies. (IUGR/all PE/early PE vs. controls: $183.3 \pm 34.8/182.8 \pm 72.6/279.2 \pm 137.3$ vs. 34.1 ± 5.4 ; $P=0.001/P=0.010/P=0.040$.)

The sFlt-1/PlGF ratio as a function of weeks before diagnosis/delivery

To analyze the sFlt-1/PlGF ratio in relation to the time to clinical diagnosis of preeclampsia or to delivery, we performed a mixed model analysis with the random intercept model separately for every group. Due to missing information about the time of measurement in some women not all samples could be included into this analysis. Results

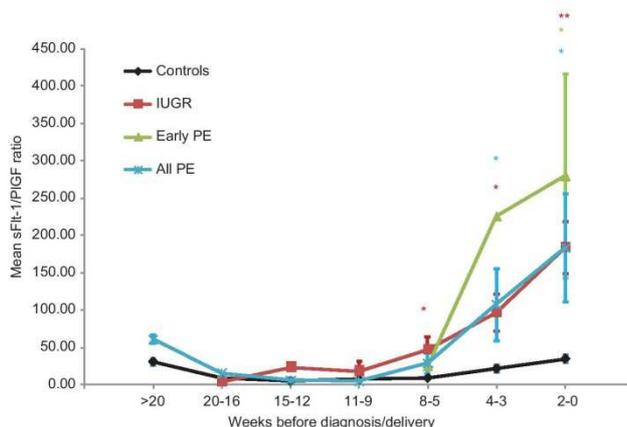


Figure 1 Mean sFlt-1/PlGF ratio according to weeks before diagnosis/delivery.

Points between curves show mean sFlt-1/PlGF ratio according to weeks before delivery (for groups controls and IUGR) and according to weeks before diagnosis (for groups PE and sub classification early PE) for selected time frames: interval 1: ≤ 2 weeks before diagnosis/delivery, interval 2: 3–4 weeks before diagnosis/delivery, interval 3: 5–8 weeks before diagnosis/delivery, interval 4: 9–11 weeks before diagnosis/delivery, interval 5: 12–15 weeks before diagnosis/delivery, interval 6: 16–20 weeks before diagnosis/delivery, interval 7: ≥ 20 weeks before diagnosis/delivery. Bars show the SE. * $P < 0.05$, ** $P \leq 0.001$, all P-values are given for comparison to controls in the same time frame using Mann-Whitney U-test.

IUGR=intrauterine growth restriction; PE=preeclampsia; Early PE=PE<34 weeks of gestation.

are shown in Figure 2 and Table 2. Subjects with a healthy outcome had the lowest biomarker ratio during pregnancy (intercept=0.67 on the log-scale). The sFlt-1/PlGF ratio remained constant throughout pregnancy with a slight increase during the final 8 weeks of pregnancy. Patients with PE showed permanently higher levels of the sFlt-1/PlGF ratio (intercept 1.00 on the log-scale) and a slightly steeper rise close to diagnosis of PE compared to controls (see Figure 2). The subgroup early PE <34 weeks showed a steeper increase beginning at 8–12 weeks before diagnosis in sFlt-1/PlGF ratio levels than the group all PE (slope 0.09 vs. 0.05 on the log-scale). The IUGR outcome group had

the highest ratios compared to all other groups (intercept 1.57 on the log-scale). All intercepts of pathologic outcome groups were significantly different when compared to controls. Selected predicted values of the sFlt-1/PlGF ratio from mixed model analysis are provided in Table 3.

Slope between selected points in time

We next analyzed the steepness of the line slope between two sFlt-1/PlGF values calculated in the mixed model analysis. Therefore we chose the values for 0, 4 and 8 weeks

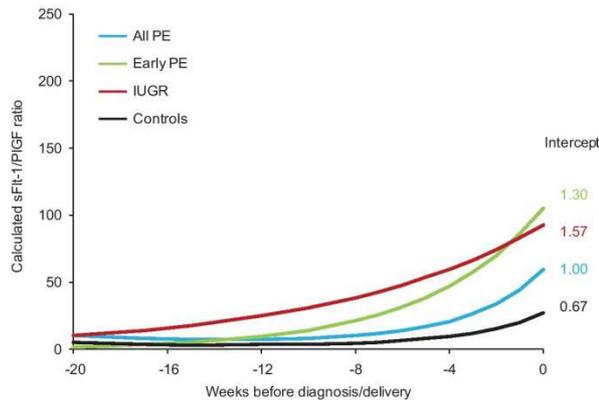


Figure 2 Calculated sFlt-1/PlGF ratio according to weeks before diagnosis of PE.

Values from mixed model analysis for the sFlt-1/PlGF ratio according to the weeks before delivery (for groups controls and IUGR) and according to the weeks before diagnosis respectively (for groups PE and sub classification early PE). The intercept (on log scale at value at mean time point –8,3 weeks) for each outcome group is demonstrated according to group colour. *P<0.05 compared to controls. IUGR=intrauterine growth restriction; PE=preeclampsia; Early PE=PE<34 weeks of gestation.

Table 2 Coefficients of linear mixed models for sFlt-1/PlGF ratio (logarithmised).

	Controls	IUGR	All PEs	Early PEs
	n=112 women/237 measures	n=14 women/24 measures	n=21 women/42 measures	n=6 women/9 measures
Fixed effects	Beta (SE)	Beta (SE)	Beta (SE)	Beta (SE)
Intercept	0.67 (0.04) ^a	1.57 (0.18) ^a	1.00 (0.16) ^a	1.30 (0.62) ^a
Time (diagnosis to delivery, weeks; centered on the mean: 8.29)	0.05 (0.004) ^a	0.05 (0.02)	0.05 (0.01) ^a	0.09 (0.06)
Time squared	0.005 (0.0003) ^a	–	0.005 (0.001) ^a	–
Random effects				
Variance between women	0.09 (0.02) ^a	0.22 (0.13)	0.28 (0.14) ^a	0.61 (0.55)
Residual variance	0.06 (0.01) ^a	0.13 (0.06) ^a	0.18 (0.06) ^a	0.21 (0.21)

The coefficients [beta (SE)] of linear mixed models for the ratio (logged values) for every outcome group separately (random intercept models).

^aSignificant coefficients.

IUGR=intrauterine growth restriction; PE=preeclampsia; Early PE=PE<34 weeks of gestation.

Table 3 Selected values of sFlt-1/PlGF ratio.

	-8 weeks	-4 weeks	0 weeks
Controls	4.83	9.63	27
IUGR	38.43	59.61	92.45
Early PE	21.08	47.03	104.93
All PE	10.49	21.01	59.71

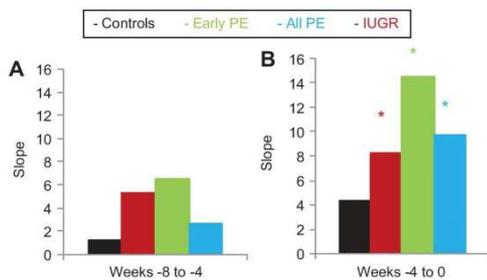
Predicted values of the sFlt-1/PlGF ratio from mixed model analysis for selected points of time.

IUGR=intrauterine growth restriction; PE=preeclampsia; Early PE=PE<34 weeks of gestation; weeks of gestation before diagnosis of PE or delivery by controls and IUGR.

before diagnosis (for groups all PE and early PE)/delivery (for groups controls and IUGR) as presented in Table 3. Absolute values for calculated slopes in different outcome groups are shown in the bar charts of Figure 3. There is no significant difference for the slope of any adverse pregnancy outcome as compared to controls for time frame 4–8 weeks. However for time frame 0–4 weeks, significant differences between pathologic pregnancies and healthy controls were measured. Statistical significant differences were found in the slope of the sFlt-1/PlGF ratio of IUGR vs. controls (8.21 vs. 4.34; $P=0.027$), early PE vs. controls (14.48 vs. 4.34; $P=0.016$) and all PE vs. controls (9.61 vs. 4.34; $P=0.026$).

Discussion

We confirmed that the sFlt-1/PlGF ratio rises prior to the onset of clinical symptoms in women with PE. We found

**Figure 3** Absolute values of slope.

Bar charts show absolute predicted values based on mixed regression models for: (A), slope between -8 to -4 weeks; (B), slope between -4 to 0 weeks before diagnosis of PE or delivery for groups controls/IUGR. Different outcome groups are marked by specific color. * $P<0.05$ compared to controls. IUGR=intrauterine growth restriction; PE=preeclampsia; Early PE=PE<34 weeks of gestation.

significant changes in the sFlt-1/PlGF ratio in pregnancies complicated by PE compared to healthy women up to 4 weeks before clinical diagnosis of PE. Our results are in line with Levine et al. who found higher levels of sFlt-1/PlGF ratio in PE patients up to 5 weeks before clinical diagnosis [9]. In the subgroup early PE, significant differences could only be demonstrated up to 2 weeks before diagnosis, in contrast to Levine et al. who found significantly higher sFlt-1/PlGF ratios in women with preterm PE up to 11 weeks before clinical signs of PE.

In the diagnostic setting, the single cut-off of 85 is able to determine preeclampsia with a sensitivity of 82% and a specificity of 95% [29]. Recently, Rana et al. were able to show that patients who present with signs and symptoms for preeclampsia and develop an adverse maternal and/or fetal outcome within 2 weeks have a significant elevation of the sFlt-1/PlGF ratio [19]. In this cohort, patients who showed a sFlt-1/PlGF ratio of >85 had a significantly reduced remaining pregnancy duration. Both studies relied on single measurements of the sFlt-1/PlGF ratio. While single measurements of the sFlt-1/PlGF ratio can only represent a current imbalance between angiogenic PlGF and anti-angiogenic sFlt-1, the slope between two measurements seems to be a more powerful tool in early detection of PE. Several studies focusing on changes in sFlt-1 and PlGF during pregnancy as predictive parameters for preeclampsia showed previously that absolute value changes and the steepness of an increase of serum values between two measurements are correlated with the onset of preeclampsia [3, 14, 18, 27].

Our data indicate that repeated measurements of the sFlt-1/PlGF ratio along with or in addition to calculating the slope between two measurements seems to be superior in predicting preeclampsia to a single measurement of the sFlt-1/PlGF ratio alone. We found significant changes in the slope of PE patients up to 4 weeks before clinical onset of hypertension and proteinuria. We were able to show via mixed model analysis that the slope for the sFlt-1/PlGF ratio in patients who will develop pathologic pregnancy outcomes up to 4 weeks later was significantly higher in the time period of 4–0 weeks (8.21; 14.48; 9.61 vs. 4.34 for IUGR; early PE; all PE vs. controls with $P<0.05$) than in the time period of 8–4 weeks before onset of disease.

Using a strict definition of IUGR – weight <5th percentile plus either oligohydramnion or increased umbilical artery pulsatility index – we were able to show that levels of the sFlt-1/PlGF ratio were elevated in women delivering an IUGR infant. In the mixed model analysis, the IUGR group exhibited the highest intercept of 1.57 (on the log-scale) as compared to all other outcome groups. Single

measurements showed significantly higher values for the IUGR group up to 8 weeks before delivery as compared to controls. This is in line with current knowledge about the pathophysiology of the disease. In the IUGR group, we only included patients with strictly defined IUGR, which is in contrast to the frequently used “small for gestational age” definition (SGA) in other studies. SGA is defined as an estimated fetal weight below the 10th percentile and is a different disease entity than IUGR. SGA fetuses by definition do not exhibit features of placental dysfunction, they may be genetically smaller. In contrast IUGR is a result of placental dysfunction. Shallow trophoblast invasion and incomplete spiral artery remodeling lead to a restricted supply of oxygen and nutrients to the fetus. Often, this coincides with early onset PE. However, these forms of early onset PE complicated by IUGR show a rapid clinical course with a need for imminent delivery [30].

In clinical practice, the prognosis of IUGR pregnancies is difficult to evaluate. The presence of Doppler abnormalities and CTG alterations give indications for delivery, however, in patients with IUGR fetuses a flattening of the growth slope already increases the risk for intrauterine fetal death [16]. Here, we were able to show that patients with IUGR that did not progress to PE in the observed time period had a significantly elevated sFlt-1/PlGF ratio. The significantly steeper increment of the slope in IUGR patients as compared to controls indicates disease severity connected to placental dysfunction. Detecting these IUGR fetuses with substantial placental dysfunction at risk for subsequent complications may aid in clinical management putatively leading to reduced fetal morbidity and mortality.

A limitation of our study is the small number of patients especially when regarding the subgroup early PE just as the small number of samples per women. Although our results show significant P-values based on the statistic method of the mixed model analysis, further studies with larger patient collectives and more follow up measures per patient are needed to confirm these findings.

It is known that the diagnostic “gold-standard” for diagnosing preeclampsia has a poor predictive accuracy for determining adverse pregnancy outcomes. Measuring blood pressure and proteinuria is inefficient, particularly in predicting maternal or fetal complications of placenta dysfunction [31]. Here, we were able to show that the sFlt-1/PlGF ratio is able to identify patients with preeclampsia prior to clinical diagnosis. The slope between repeated measurements can be a useful parameter for prediction of PE. Additionally, patients with IUGR show an elevation of the sFlt-1/PlGF ratio up to 8 weeks before delivery. Further studies should focus on algorithms for individual risk stratification for women with placenta dysfunction disorders implementing the sFlt-1/PlGF ratio.

Conflict of interest statement: Stefan Verlohren received lecture fees and research funding from Roche Diagnostics and Novartis, lecture fees from Thermo Fisher Scientific; Barbara Denk is employee of Roche Diagnostics Professional Diagnostics, Penzberg, Germany.

Received April 5, 2013. Accepted July 8, 2013.

References

- [1] Burton GJ, Yung HW, Cindrova-Davies T, Charnock-Jones DS. Placental endoplasmic reticulum stress and oxidative stress in the pathophysiology of unexplained intrauterine growth restriction and early onset preeclampsia. *Placenta*. 2009;30 Suppl A:S43–8.
- [2] Duley L. The global impact of pre-eclampsia and eclampsia. *Semin Perinatol*. 2009;33:130–7.
- [3] Erez O, Romero R, Espinoza J, Fu W, Todem D, Kusanovic JP, et al. The change in concentrations of angiogenic and anti-angiogenic factors in maternal plasma between the first and second trimesters in risk assessment for the subsequent development of preeclampsia and small-for-gestational age. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2008;21:279–87.
- [4] Iacovella C, Franchi M, Egbor M, Bhide A, Thilaganathan B. Relationship of first-trimester uterine artery Doppler to late stillbirth. *Prenat Diagn*. 2012;32:557–61.
- [5] Kaufmann P, Black S, Huppertz B. Endovascular trophoblast invasion: implications for the pathogenesis of intrauterine growth retardation and preeclampsia. *Biol Reprod*. 2003;69:1–7.
- [6] Khan KS, Wojdyla D, Say L, Gülmezoglu AM, Van Look PFA. WHO analysis of causes of maternal death: a systematic review. *Lancet*. 2006;367:1066–74.
- [7] Lam C, Lim KH, Karumanchi SA. Circulating angiogenic factors in the pathogenesis and prediction of preeclampsia. *Hypertension*. 2005;46:1077–85.
- [8] Lapaire O, Shennan A, Stepan H. The preeclampsia biomarkers soluble fms-like tyrosine kinase-1 and placental growth factor: current knowledge, clinical implications and future application. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2010;151:122–9.
- [9] Levine RJ, Lam C, Qian C, Yu KF, Maynard SE, Sachs BP, et al. Soluble endoglin and other circulating antiangiogenic factors in preeclampsia. *N Engl J Med*. 2006;355:992–1005.
- [10] Levine RJ, Maynard SE, Qian C, Lim KH, England LJ, Yu KF, et al. Circulating angiogenic factors and the risk of preeclampsia. *N Engl J Med*. 2004;350:672–83.

- [11] Maynard SE, Crawford SL, Bathgate S, Yan J, Robidoux L, Moore M, et al. Gestational angiogenic biomarker patterns in high risk preeclampsia groups. *Am J Obstet Gynecol.* 2013 Mar 18. doi:pii: S0002-9378(13)00290-1. 10.1016/j.ajog.2013.03.017. [Epub ahead of print].
- [12] Maynard SE, Min JY, Merchan J, Lim KH, Li J, Mondal S, et al. Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *J Clin Invest.* 2003;111:649–58.
- [13] Moghbeli N, Srinivas SK, Bastek J, Lu Y, Putt ME, Cappola TP, et al. N-terminal pro-brain natriuretic Peptide as a biomarker for hypertensive disorders of pregnancy. *Am J Perinatol.* 2010;27:313–9.
- [14] Moore Simas TA, Crawford SL, Solitro MJ, Frost SC, Meyer BA, Maynard SE. Angiogenic factors for the prediction of preeclampsia in high-risk women. *Am J Obstet Gynecol.* 2007;197:244.e1–8.
- [15] Ohkuchi A, Hirashima C, Suzuki H, Takahashi K, Yoshida M, Matsubara S, et al. Evaluation of a new and automated electrochemiluminescence immunoassay for plasma sFlt-1 and PlGF levels in women with preeclampsia. *Hypertens Res.* 2010;33:422–7.
- [16] Pilliod RA, Cheng YW, Snowden JM, Doss AE, Caughey AB. The risk of intrauterine fetal death in the small-for-gestational-age fetus. *Am J Obstet Gynecol.* 2012;207:318.e1–6.
- [17] Poon LC, Syngelaki A, Akolekar R, Lai J, Nicolaides KH. Combined Screening for Preeclampsia and Small for Gestational Age at 11–13 Weeks. *Fetal Diagn Ther.* 2013;33(1):16–27. doi: 10.1159/000341712. Epub 2012 Sep 13.
- [18] Rana S, Karumanchi SA, Levine RJ, Venkatesha S, Rauh-Hain JA, Tamez H, et al. Sequential changes in antiangiogenic factors in early pregnancy and risk of developing preeclampsia. *Hypertension.* 2007;50:137–42.
- [19] Rana S, Powe CE, Salahuddin S, Verlohren S, Perschel FH, Levine RJ, et al. Angiogenic factors and the risk of adverse outcomes in women with suspected preeclampsia. *Circulation.* 2012;125:911–9.
- [20] Report of the National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 2000;183:S1–S22.
- [21] Schlembach D, Wallner W, Sengenberger R, Stiegler E, Mörtl M, Beckmann MW, et al. Angiogenic growth factor levels in maternal and fetal blood: correlation with Doppler ultrasound parameters in pregnancies complicated by pre-eclampsia and intrauterine growth restriction. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2007;29:407–13.
- [22] Shibata E, Rajakumar A, Powers RW, Larkin RW, Gilmore C, Bodnar LM, et al. Soluble fms-like tyrosine kinase 1 is increased in preeclampsia but not in normotensive pregnancies with small-for-gestational-age neonates: relationship to circulating placental growth factor. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90:4895–903.
- [23] Stepan H, Jank A. Angiogene Faktoren und ihre Rolle in der Entstehung und Vorhersage der Präeklampsie. *Z Geburtshilfe Neonatol.* 2009;213:101,5.
- [24] Stepan H, Unversucht A, Wessel N, Faber R. Predictive value of maternal angiogenic factors in second trimester pregnancies with abnormal uterine perfusion. *Hypertension.* 2007;49:818–24.
- [25] Thadhani R, Kisner T, Hagmann H, Bossung V, Noack S, Schaarschmidt W, et al. Pilot study of extracorporeal removal of soluble fms-like tyrosine kinase 1 in preeclampsia. *Circulation.* 2011;124:940–50.
- [26] Vandenberghe G, Mensink I, Twisk JW, Blankenstein MA, Heijboer AC, van Vugt JM. First trimester screening for intrauterine growth restriction and early-onset pre-eclampsia. *Prenat Diagn.* 2011;31:955–61.
- [27] Vatten LJ, Eskild A, Nilsen TI, Jeansson S, Jenum PA, Staff AC. Changes in circulating level of angiogenic factors from the first to second trimester as predictors of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 2007;196:239.e1–6.
- [28] Verbeke G, Molenberghs G. *Linear mixed models for longitudinal data.* New York: Springer; 2008. p. 592.
- [29] Verlohren S, Galindo A, Schlembach D, Zeisler H, Herraiz I, Moertl MG, et al. An automated method for the determination of the sFlt-1/PlGF ratio in the assessment of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 2010;202:161.e1–e11.
- [30] Verlohren S, Herraiz I, Lapaire O, Schlembach D, Moertl M, Zeisler H, et al. The sFlt-1/PlGF ratio in different types of hypertensive pregnancy disorders and its prognostic potential in preeclamptic patients. *Am J Obstet Gynecol.* 2012;206:58.e1–8.
- [31] Zhang J, Klebanoff MA, Roberts JM. Prediction of adverse outcomes by common definitions of hypertension in pregnancy. *Obstet Gynecol.* 2001;97:261–7.

The authors stated that there are no conflicts of interest regarding the publication of this article.

3.2 *Publikation 2*

Engels, Pape, Schoofs, Henrich, Verlohren; Automated measurement of sFlt-1, PlGF and sFlt-1/PlGF ratio in differential diagnosis of hypertensive pregnancy disorders; Hypertension in Pregnancy; 2013 Nov;32(4):459-73.

<http://dx.doi.org/10.3109/10641955.2013.827205>.

Engels, Pape, Schoofs, Henrich, Verlohren; Automated measurement of sFlt-1, PlGF and sFlt-1/PlGF ratio in differential diagnosis of hypertensive pregnancy disorders; Hypertension in Pregnancy; 2013 Nov;32(4):459-73.

<http://dx.doi.org/10.3109/10641955.2013.827205>.

Engels, Pape, Schoofs, Henrich, Verlohren; Automated measurement of sFlt-1, PlGF and sFlt-1/PlGF ratio in differential diagnosis of hypertensive pregnancy disorders; Hypertension in Pregnancy; 2013 Nov;32(4):459-73.

<http://dx.doi.org/10.3109/10641955.2013.827205>.

Engels, Pape, Schoofs, Henrich, Verlohren; Automated measurement of sFlt-1, PlGF and sFlt-1/PlGF ratio in differential diagnosis of hypertensive pregnancy disorders; Hypertension in Pregnancy; 2013 Nov;32(4):459-73.

<http://dx.doi.org/10.3109/10641955.2013.827205>.

Engels, Pape, Schoofs, Henrich, Verlohren; Automated measurement of sFlt-1, PlGF and sFlt-1/PlGF ratio in differential diagnosis of hypertensive pregnancy disorders; Hypertension in Pregnancy; 2013 Nov;32(4):459-73.

<http://dx.doi.org/10.3109/10641955.2013.827205>.

Engels, Pape, Schoofs, Henrich, Verlohren; Automated measurement of sFlt-1, PlGF and sFlt-1/PlGF ratio in differential diagnosis of hypertensive pregnancy disorders; Hypertension in Pregnancy; 2013 Nov;32(4):459-73.

<http://dx.doi.org/10.3109/10641955.2013.827205>.

Engels, Pape, Schoofs, Henrich, Verlohren; Automated measurement of sFlt-1, PlGF and sFlt-1/PlGF ratio in differential diagnosis of hypertensive pregnancy disorders; Hypertension in Pregnancy; 2013 Nov;32(4):459-73.

<http://dx.doi.org/10.3109/10641955.2013.827205>.

Engels, Pape, Schoofs, Henrich, Verlohren; Automated measurement of sFlt-1, PlGF and sFlt-1/PlGF ratio in differential diagnosis of hypertensive pregnancy disorders; Hypertension in Pregnancy; 2013 Nov;32(4):459-73.

<http://dx.doi.org/10.3109/10641955.2013.827205>.

Engels, Pape, Schoofs, Henrich, Verlohren; Automated measurement of sFlt-1, PlGF and sFlt-1/PlGF ratio in differential diagnosis of hypertensive pregnancy disorders; Hypertension in Pregnancy; 2013 Nov;32(4):459-73.

<http://dx.doi.org/10.3109/10641955.2013.827205>.

Engels, Pape, Schoofs, Henrich, Verlohren; Automated measurement of sFlt-1, PlGF and sFlt-1/PlGF ratio in differential diagnosis of hypertensive pregnancy disorders; Hypertension in Pregnancy; 2013 Nov;32(4):459-73.

<http://dx.doi.org/10.3109/10641955.2013.827205>.

Engels, Pape, Schoofs, Henrich, Verlohren; Automated measurement of sFlt-1, PlGF and sFlt-1/PlGF ratio in differential diagnosis of hypertensive pregnancy disorders; Hypertension in Pregnancy; 2013 Nov;32(4):459-73.

<http://dx.doi.org/10.3109/10641955.2013.827205>.

Engels, Pape, Schoofs, Henrich, Verlohren; Automated measurement of sFlt-1, PlGF and sFlt-1/PlGF ratio in differential diagnosis of hypertensive pregnancy disorders; Hypertension in Pregnancy; 2013 Nov;32(4):459-73.

<http://dx.doi.org/10.3109/10641955.2013.827205>.

Engels, Pape, Schoofs, Henrich, Verlohren; Automated measurement of sFlt-1, PlGF and sFlt-1/PlGF ratio in differential diagnosis of hypertensive pregnancy disorders; Hypertension in Pregnancy; 2013 Nov;32(4):459-73.

<http://dx.doi.org/10.3109/10641955.2013.827205>.

Engels, Pape, Schoofs, Henrich, Verlohren; Automated measurement of sFlt-1, PlGF and sFlt-1/PlGF ratio in differential diagnosis of hypertensive pregnancy disorders; Hypertension in Pregnancy; 2013 Nov;32(4):459-73.

<http://dx.doi.org/10.3109/10641955.2013.827205>.

Engels, Pape, Schoofs, Henrich, Verlohren; Automated measurement of sFlt-1, PlGF and sFlt-1/PlGF ratio in differential diagnosis of hypertensive pregnancy disorders; Hypertension in Pregnancy; 2013 Nov;32(4):459-73.

<http://dx.doi.org/10.3109/10641955.2013.827205>.

3.3 Publikation 3

Verlohren, Herraiz, Lapaire, Schlembach, Zeisler, Calda, Sabria, Markfeld-Erol, Galindo, Schoofs, Denk, Stepan; New gestational phase-specific cutoff values for the use of the soluble fms-like tyrosine kinase-1/placental growth factor ratio as a diagnostic test for preeclampsia; Hypertension; 2014 Feb;63(2):346-52.

<http://dx.doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.01787>.

Verlohren, Herraiz, Lapaire, Schlembach, Zeisler, Calda, Sabria, Markfeld-Erol, Galindo, Schoofs, Denk, Stepan; New gestational phase-specific cutoff values for the use of the soluble fms-like tyrosine kinase-1/placental growth factor ratio as a diagnostic test for preeclampsia; Hypertension; 2014 Feb;63(2):346-52.

<http://dx.doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.01787>.

Verlohren, Herraiz, Lapaire, Schlembach, Zeisler, Calda, Sabria, Markfeld-Erol, Galindo, Schoofs, Denk, Stepan; New gestational phase-specific cutoff values for the use of the soluble fms-like tyrosine kinase-1/placental growth factor ratio as a diagnostic test for preeclampsia; Hypertension; 2014 Feb;63(2):346-52.

<http://dx.doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.01787>.

Verlohren, Herraiz, Lapaire, Schlembach, Zeisler, Calda, Sabria, Markfeld-Erol, Galindo, Schoofs, Denk, Stepan; New gestational phase-specific cutoff values for the use of the soluble fms-like tyrosine kinase-1/placental growth factor ratio as a diagnostic test for preeclampsia; Hypertension; 2014 Feb;63(2):346-52.

<http://dx.doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.01787>.

Verlohren, Herraiz, Lapaire, Schlembach, Zeisler, Calda, Sabria, Markfeld-Erol, Galindo, Schoofs, Denk, Stepan; New gestational phase-specific cutoff values for the use of the soluble fms-like tyrosine kinase-1/placental growth factor ratio as a diagnostic test for preeclampsia; Hypertension; 2014 Feb;63(2):346-52.

<http://dx.doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.01787>.

Verlohren, Herraiz, Lapaire, Schlembach, Zeisler, Calda, Sabria, Markfeld-Erol, Galindo, Schoofs, Denk, Stepan; New gestational phase-specific cutoff values for the use of the soluble fms-like tyrosine kinase-1/placental growth factor ratio as a diagnostic test for preeclampsia; Hypertension; 2014 Feb;63(2):346-52.

<http://dx.doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.01787>.

Verlohren, Herraiz, Lapaire, Schlembach, Zeisler, Calda, Sabria, Markfeld-Erol, Galindo, Schoofs, Denk, Stepan; New gestational phase-specific cutoff values for the use of the soluble fms-like tyrosine kinase-1/placental growth factor ratio as a diagnostic test for preeclampsia; Hypertension; 2014 Feb;63(2):346-52.

<http://dx.doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.01787>.

Verlohren, Herraiz, Lapaire, Schlembach, Zeisler, Calda, Sabria, Markfeld-Erol, Galindo, Schoofs, Denk, Stepan; New gestational phase-specific cutoff values for the use of the soluble fms-like tyrosine kinase-1/placental growth factor ratio as a diagnostic test for preeclampsia; Hypertension; 2014 Feb;63(2):346-52.

<http://dx.doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.01787>.

Verlohren, Herraiz, Lapaire, Schlembach, Zeisler, Calda, Sabria, Markfeld-Erol, Galindo, Schoofs, Denk, Stepan; New gestational phase-specific cutoff values for the use of the soluble fms-like tyrosine kinase-1/placental growth factor ratio as a diagnostic test for preeclampsia; Hypertension; 2014 Feb;63(2):346-52.

<http://dx.doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.01787>.

Verlohren, Herraiz, Lapaire, Schlembach, Zeisler, Calda, Sabria, Markfeld-Erol, Galindo, Schoofs, Denk, Stepan; New gestational phase-specific cutoff values for the use of the soluble fms-like tyrosine kinase-1/placental growth factor ratio as a diagnostic test for preeclampsia; Hypertension; 2014 Feb;63(2):346-52.

<http://dx.doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.01787>.

Verlohren, Herraiz, Lapaire, Schlembach, Zeisler, Calda, Sabria, Markfeld-Erol, Galindo, Schoofs, Denk, Stepan; New gestational phase-specific cutoff values for the use of the soluble fms-like tyrosine kinase-1/placental growth factor ratio as a diagnostic test for preeclampsia; Hypertension; 2014 Feb;63(2):346-52.

<http://dx.doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.01787>.

Verlohren, Herraiz, Lapaire, Schlembach, Zeisler, Calda, Sabria, Markfeld-Erol, Galindo, Schoofs, Denk, Stepan; New gestational phase-specific cutoff values for the use of the soluble fms-like tyrosine kinase-1/placental growth factor ratio as a diagnostic test for preeclampsia; Hypertension; 2014 Feb;63(2):346-52.

<http://dx.doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.01787>.

Verlohren, Herraiz, Lapaire, Schlembach, Zeisler, Calda, Sabria, Markfeld-Erol, Galindo, Schoofs, Denk, Stepan; New gestational phase-specific cutoff values for the use of the soluble fms-like tyrosine kinase-1/placental growth factor ratio as a diagnostic test for preeclampsia; Hypertension; 2014 Feb;63(2):346-52.

<http://dx.doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.01787>.

4 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

5 Publikationsliste

Originalarbeiten:

- Schoofs, Grittner, Engels, Pape, Denk, Henrich, Verlohren; The importance of repeated measurements of the sFlt-1/PlGF ratio for the prediction of preeclampsia and intrauterine growth restriction; *Journal of Perinatal Medicine*; 2014 Jan;42(1):61-8.
- Engels, Pape, Schoofs, Henrich, Verlohren; Automated measurement of sFlt-1, PlGF and sFlt-1/PlGF ratio in differential diagnosis of hypertensive pregnancy disorders; *Hypertension in Pregnancy*; 2013 Nov;32(4):459-73.
- Verlohren, Herraiz, Lapaire, Schlembach, Zeisler, Calda, Sabria, Markfeld-Erol, Galindo, Schoofs, Denk, Stepan; New gestational phase-specific cutoff values for the use of the soluble fms-like tyrosine kinase-1/placental growth factor ratio as a diagnostic test for preeclampsia; *Hypertension*; 2014 Feb;63(2):346-52.

Kongressbeiträge:

- Freier Vortrag mit dem Titel „Prädiktion der Präeklampsie mittels der Serummarker sFlt-1 und PlGF“ im Rahmen des 59. Kongresses der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe in München, 9.-13.10.2012
- Posterpräsentation mit dem Titel „Prediction of preeclampsia with the sFlt-1/PlGF ratio: impact of the slope of repeated measurements“ im Rahmen des 18. ISSHP World Congress (International Society for the Study of Hypertension in Pregnancy) in Genf, 9.-13.07.2012

6 Eidesstattliche Erklärung

„Ich, Katharina Margret Schoofs, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: **„Der sFlt-1/PIGF Quotient als Parameter für die gestationsalterbezogene Diagnose, Prädiktion und Prognose hypertensiver Schwangerschaftserkrankungen“** selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an den ausgewählten Publikationen entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Freitag, 3. April 2015

Unterschrift

7 Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Wolfgang Henrich danke ich für die Möglichkeit an seiner Klinik wissenschaftlich zu arbeiten.

Meinen besonderen Dank möchte ich Herrn PD Dr. med. Stefan Verlohren für die Überlassung des Themas aussprechen. Er hat mich als Doktorvater stets in meiner wissenschaftlichen Arbeit unterstützt und gefördert und mich immer wieder mit dem nötigen Nachdruck ermuntert meine Arbeit voran zu bringen. Durch seine konstruktive Kritik, seine Kompetenz und sein großes Engagement hat er einen wesentlichen Beitrag zum Gelingen meiner Dissertation beigetragen.

Der Arbeitsgruppe Präeklampsie der Charité-Universitätsmedizin Berlin danke ich für die durchgehend gute und nette kollegiale Zusammenarbeit, bei der man immer das Gefühl hatte sich gegenseitig zu unterstützen. Insbesondere Dr. med. Theresa Engels danke ich für die gute Einarbeitung in die Arbeitsgruppe und ihr offenes Ohr bei organisatorischen Fragen.

Besonders danken möchte ich auch Frau Dr. phil. Ulrike Grittner, die mir meine statistischen Fragen geduldig und hilfsbereit beantwortet hat.

Meinen Freunden, insbesondere Katharina Kopetschke und Jennifer Karle, danke ich für die zuverlässigen Ermunterungen und nötigen Motivationsschübe, die zum Abschluss meiner Promotion beigetragen haben.

Meinem Lebensgefährten Jan Döhring möchte ich für seine stetige emotionale Unterstützung während der Verfassung meiner Arbeit danken.

Zu guter Letzt danke ich meinen Eltern für ihre fortwährende und nie endende Unterstützung. Ihr großer Rückhalt, ihre Geduld und ihre Fürsorge haben mich stets darin bekräftigt meine Lebensziele zu realisieren.