

Abschlussbericht

Promotionsstipendium der deutschen Stiftung für junge Erwachsene mit Krebs

**Promotionsarbeit zur molekularen Charakterisierung von
Neurozytomen und Identifizierung von prognostischen Biomarkern**

von

Maja Krech

Aus dem Institut für Neuropathologie
der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

Stipendiatin 2022/2023

Sehr geehrte Freunde und Förderer der Deutschen Stiftung für junge Erwachsene mit Krebs,

ich möchte mich hiermit herzlich bei Ihnen und allen Beteiligten für das Promotionsstipendium und somit die Möglichkeit, mich mit ganzem Herzen ein Jahr lang meiner Promotion und der Forschung zu widmen, bedanken.

Für mich war dieses Jahr eines, in dem ich mit Hilfe der Unterstützung der Stiftung nicht nur viel im Rahmen meiner Forschung dazugelernt habe, sondern auch neue und interessante Kontakte knüpfen konnte. So wurde mir unter anderem ein dreimonatiges Praktikum, in dem ich wichtige Labormethoden erlernen konnte, in der Abteilung für Neuropathologie am Institut für Pathologie am Universitätsklinikum Heidelberg ermöglicht. Heidelberg stellt zusammen mit dem dort lokalisierten Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ) einen großen und wichtigen Standort im Bereich der molekularen Hirntumorforschung dar, mit welcher ich mich auch innerhalb meiner Promotion beschäftige. Darüber hinaus durfte ich mit Unterstützung der Stiftung über die Zeit des Stipendiums meine Arbeit nicht nur auf den Jahresmeetings der DGHO in Wien (2022) und Hamburg (2023) vorstellen, sondern auch an internationalen Kongressen wie dem International Congress for Neuropathology (ICN 2023) in Berlin und dem Meeting der European Association for Neuro-Oncology (EANO Meeting 2023) in Rotterdam teilnehmen und meine Arbeit dort präsentieren.

Zum aktuellen Zeitpunkt ist die Auswertung der Untersuchungsergebnisse, die ich im Rahmen meines Forschungsjahres erhoben habe in vollem Gange. Einen Teil der Analysen (insbesondere die genetischen und epigenetischen Daten) konnten wir bereits erfolgreich abschließen. Derzeit vervollständigen wir die klinischen Informationen und evaluieren verschiedene, neue Möglichkeiten der Risikostratifizierung für Patient*innen, wofür wir die Überlebensdaten der Patient*innen auswerten. Ich habe hier die Gelegenheit mit einem bioinformatischen Doktoranden zusammenzuarbeiten, der mich bei der Auswertung der Daten unterstützt. Ich habe hierdurch nicht nur viel Inhaltliches zu meinem Promotionsthema, sondern auch Grundsätzliches zur Herangehensweise von Frage- und Problemstellungen in der Wissenschaft gelernt und wichtige Einblicke in die interdisziplinäre Forschung erhalten, der ich mich auch in Zukunft beruflich widmen möchte.

Im Folgenden hoffe ich Ihnen in der kurzen Zusammenfassung einen Überblick über die Arbeit selbst, die wichtigsten vorläufigen Ergebnisse sowie einen kurzen Ausblick geben zu können.

Mit freundlichen Grüßen,
Maja Krech



Hintergrund:

Im Rahmen meiner Promotion beschäftige ich mich thematisch mit den zentralen Neurozytomen, einer bislang wenig erforschten Hirntumorentität, die vor allem bei jungen Erwachsenen auftritt (1). Die Patient*innen haben nach vollständiger Tumorresektion zumeist eine gute Prognose, können jedoch in den ersten postoperativen Jahren Rezidive entwickeln. Ein erneutes Tumorwachstum wird vor allem bei Patient*innen mit unvollständig resezierten Tumoren beobachtet (2, 3). Gelegentlich kommt es zu aggressiven klinischen Verläufen mit raschem Tumorwachstum und multiplen Rezidiven. Die Risikoeinschätzung für ein solches, oft als „atypisch“ bezeichnetes zentrales Neurozytom, findet momentan auf Basis morphologischer Eigenschaften in der Mikroskopie statt (4-6). Vor allem der immunhistochemische Marker Ki67, wird als wertvoller prognostischer Marker diskutiert. Dabei werden in der Literatur unterschiedliche Grenzwerte von 2% bis 4% zur Differenzierung zwischen klassischem und atypischen zentralem Neurozytom beschrieben. Der optimale Grenzwert wird noch diskutiert (4, 6-8).

Unser momentaner Wissensstand zu den zentralen Neurozytomen beruht überwiegend auf Kohorten, die auf Grundlage einer rein histologischen Diagnose zusammengestellt wurden. Mit dem technischen Fortschritt der letzten Jahrzehnte gewinnt vor allem die Analyse molekulargenetischer Eigenschaften innerhalb der Hirntumorforschung immer mehr an Bedeutung. So lassen sich heutzutage Tumorentitäten nicht mehr nur durch ihr Erscheinungsbild unter dem Mikroskop, sondern auch durch ihr spezifisches DNA-Methylierungsprofil voneinander unterscheiden (9). Mittels DNA-Methylierungsanalyse konnten neue, vorher unbekannte Tumorentitäten sowie klinisch relevante Subgruppen, mit unterschiedlicher Prognose, innerhalb bereits bekannter Tumorguppen identifiziert werden (10-12). Auch die zentralen Neurozytome besitzen ein spezifisches DNA-Methylierungsprofil, welches sie als eigene Tumorentität definiert (13). Über weitere molekulargenetische Veränderungen, die mit der Tumorentstehung und -progression assoziiert sind, ist bislang wenig bekannt.

Im Rahmen dieses Projektes wurde eine Kohorte von 126 zentralen Neurozytomen hinsichtlich histopathologischer, molekularer sowie klinischer Charakteristika untersucht. Ziel dieser Studie ist, zu einem besseren Verständnis der molekularen Pathogenese beizutragen sowie klinisch relevante Biomarker zu identifizieren, die zur Prognoseeinschätzung von Patient*innen mit zentralem Neurozytom eingesetzt werden können.

Methoden und Durchführung:

Zusammenstellung der Kohorte:

Im Rahmen dieser retrospektiven Studie wurde eine Kohorte von 107 Patient*innen mit der histologischen Diagnose eines zentralen Neurozytoms zusammengestellt. Die Fälle wurden durch eine systematische Suche in den digitalen Befundverwaltungssystemen der Institute für Neuropathologie der Universitäten Berlin, Heidelberg, Frankfurt, Hamburg, Hannover, Münster, Leipzig, Tübingen und London identifiziert. Von allen Patient*innen wurden diagnostische Basisinformationen wie Alter, Geschlecht und Datum der Erstdiagnose erhoben. Aktuell ergänzen wir Daten zur Therapie und dem klinische Verlauf. Histologische Parameter, wie beispielsweise der Ki67-Index, wurden aus den jeweiligen neuropathologischen Befunden extrahiert. Die Archive der vorgenannten Institute wurden hinsichtlich des Vorhandenseins von Tumormaterial, zur Anfertigung neuer histologischer Präparate (Haematoxylin-Eosin Färbung, immunhistochemische

Färbung gegen Ki67) und DNA-Isolation, durchsucht. Neu angefertigte histologischen Präparate wurden anschließend digitalisiert.

Untersuchung der Validität des Ki67-Index:

Die immunhistochemische Färbung gegen das Ki67 Antigen dient der Färbung von Zellen, die sich in der Vorbereitung zur Zellteilung befinden. Der Ki67-Index gibt den prozentualen Anteil dieser Zellen am Gesamtgewebe an. Somit kann eine Aussage über die Geschwindigkeit, mit der eine Gewebe wächst, getroffen werden. Allerdings fehlt es momentan an einheitlichen Laborprotokollen zur Herstellung der Färbung sowie an Vorgaben zur Auswertung der Färbung und Bestimmung des Indexes. Der Einfluss dieser Faktoren auf die Aussagekraft des Ki67-Index als prognostischen Marker sollte mit den folgenden Experimente genauer überprüft werden. Zur Untersuchung der Variabilität der Ergebnisse verschiedener Untersucher*innen (Interobserver-Variabilität), wurde 10 ausgewählte Neurozytom Fälle durch acht verschiedene Neuropatholog*innen bezüglich ihres gesamten und des fokal höchsten Ki67-Index bewertet. Mit dem Ziel, die Unterschiede der immunhistochemischen Ki67-Färbung zwischen verschiedenen Laboren (Interlaboratory-Variabilität) zu explorieren, wurden histologische Präparate von sieben zentralen Neurozytom Fällen in sechs verschiedenen Instituten (Berlin, Frankfurt, Hamburg, Hannover, Leipzig, Münster) gefärbt. Anschließend wurde der Ki67-Index manuell pro Fall, innerhalb der gleichen Gewebsregion bestimmt und die Färbungen der Institute untereinander verglichen.

DNA-Isolation und DNA-Methylierungsanalysen:

Die DNA-Isolation aus den gesammelten, in Formalin fixierten und in Paraffin eingebetteten Gewebeproben (FFPE-Gewebe), sowie die anschließende DNA-Methylierungsanalyse mit dem Illumina EPIC Bead Chip System, fand überwiegend im Labor des Instituts für Neuropathologie der Charité Berlin statt. In wenigen Fällen wurden die DNA-Methylierungsdaten von den externen Instituten direkt mit uns geteilt. Zusätzlich erhielten wir DNA-Methylierungsdaten von 22 zentralen Neurozytom Fällen der Referenzkohorte des Heidelberg Brain Classifier. Die Daten wurden mit dem Programm R analysiert und anschließend mit Hilfe des Heidelberg Brain Classifier v12.8 (<https://www.molecularneuropathology.org>) klassifiziert. Eingeschlossen wurden nur Fälle mit dem spezifischen DNA-Methylierungsprofil eines zentralen Neurozytoms und einem Klassifizierungsscore von über 0,9.

Aktuell laufende Analyse der Überlebensdaten:

Das Gesamtüberleben wurde als die Zeitspanne zwischen der Erstdiagnose im MRT oder dem Datum der ersten Tumoroperation und dem letzten Patient*innenkontakt oder dem Zeitpunkt des Todes definiert. Als Progression/Rezidiv wurde eine im MRT sichtbare Vergrößerung vorhandenen Resttumors nach unvollständiger Resektion oder ein erneutes Tumorwachstum nach kompletter Resektion, festgelegt. Das progressionsfreie Überleben wurde definiert als Zeitraum zwischen dem Zeitpunkt der Erstdiagnose und dem Zeitpunkt des Tumorprogresses im MRT oder dem Zeitpunkt der Rezidiv-Operation, falls Ersteres nicht zur Verfügung stand. Die statistische Analyse und anschließende Visualisierung der Überlebensdaten erfolgte ebenfalls mit R. Dabei wurde anhand unterschiedlicher Kriterien eine Einteilung der Kohorte in Subgruppen vorgenommen, die anschließend mittels log-rank Test auf signifikante Unterschiede getestet wurden. Die Einteilungskriterien waren die Folgenden: histologische Diagnose („klassisches“ vs. atypisches zentrales Neurozytom), der Ki67-Index im initialen Befund ($\leq 3\%$ vs. $> 3\%$), die Anzahl der Mitosen pro 10 Sichtfelder (≤ 3 vs. > 3 Mitosen und ≤ 5 vs. > 5 Mitosen), das Ausmaß der initialen Tumorsektion (komplette vs. unkomplette Entfernung), der Erhalt einer, der Tumoroperation folgenden, Bestrahlung (adjuvanten Radiotherapie, ja vs. nein) und zuletzt der Erhalt einer adjuvanten Radiotherapie in Zusammenhang mit dem Ausmaß der vorangegangenen Tumorsektion. Bezüglich des Ki67-Index wurde, als Mitte der in der Literatur existierenden Spanne an Grenzwerten von 2% - 4%, ein Grenzwert von 3% gewählt. Aktuell prüfen wir weitere

mögliche Einflussfaktoren auf das Überleben der Patient*innen, dazu gehören unter anderem das Kopienzahlprofil und die Anzahl der Kopienzahlvariationen. Beides lässt sich aus den DNA-Methylierungsdaten berechnen und gibt Aufschluss über strukturelle Veränderungen der DNA.

Vorläufige Ergebnisse:

Zusammenfassung der Studienkohorte:

Nach der DNA-Methylierungsprofil-basierten Klassifizierung der Tumorproben von 107 Patient*innen mit der histologisch gesicherten Diagnose eines zentralen Neurozytoms, wurde die histologische Diagnose in 96 Fällen bestätigt. Elf Fälle wurden ausgeschlossen, sechs davon aufgrund der Zuordnung zu einer anderen Tumorentität und fünf wegen eines Klassifizierungsscores unter 0,9 (Abb.1). Insgesamt wurden 96 zentrale Neurozytom-Fälle, zusammen mit 8 Rezidivtumoren und den 22 zentralen Neurozytomen der Referenzkohorte des Heidelberg Brain Classifier, epigenetisch analysiert. Zentrale Neurozytome scheinen eine epigenetisch homogene Tumorentität zu bilden. Evidenz für, auf dem DNA-Methylierungsprofil basierende, Subgruppen konnte nicht gefunden werden.

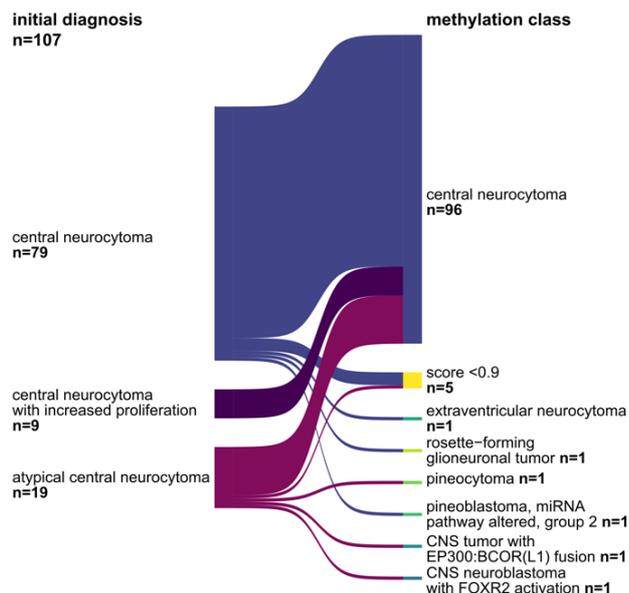
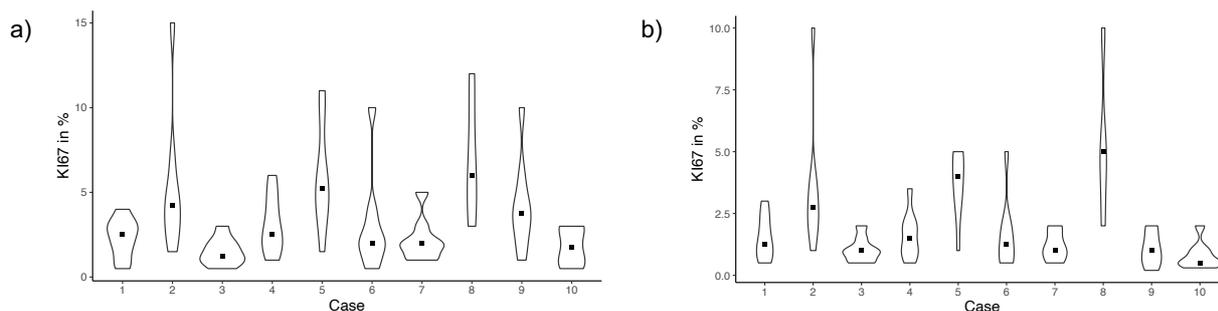


Abb.1: Reklassifizierung nach DNA-Methylierungsanalyse

In unserer Kohorte lag das mediane Alter bei Erstdiagnose bei 29 Jahren (Spanne: 12 - 61 Jahre). Daten zum klinischen Verlauf stehen aktuell bereits für 69 von 96 Patient*innen zur Verfügung, wobei 26 davon im Verlauf einen Progress oder ein Rezidiv aufzeigten. Weitere Fälle werden derzeit ergänzt. Das mediane progressionsfreie Überleben lag innerhalb der Kohorte bei 73 Monaten, die mediane Beobachtungszeit bei 56 Monaten (Spanne 1 - 256 Monaten). Keiner der Patient*innen verstarb im Untersuchungszeitraum an seiner Tumorerkrankung.

Interobserver- und Interlaboratory-Variabilität des Ki67 Index:

Bei der Untersuchung der Interobserver-Variabilität des Ki67 Indexes ließen sich nicht nur Diskrepanzen zwischen den einzelnen Ergebnissen der Untersucher*innen erkennen, sondern auch in den, durch die Untersucher*innen ausgewählten, Regionen mit dem fokal höchsten Ki67-Index (Abb.2). Überraschenderweise gingen die Schätzungen selbst dann stark auseinander, wenn die Übereinstimmung der Untersucher über eine Region hoch war (Abb.2, b und e).



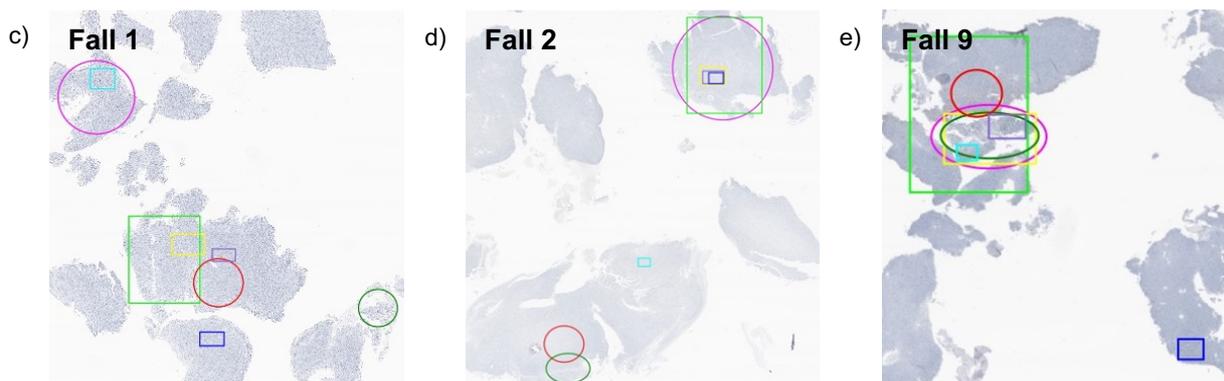


Abb.2: a) Schätzungen des gesamten und b) des fokal höchsten Ki67-Index der Untersucher*innen pro Fall (Case). Schwarzes Viereck gibt den Median an. c), d) und e) zeigen beispielhaft die, durch die Untersucher ausgewählten, Regionen mit dem fokal höchsten Ki67-Index.

Zwischen den Ki67-Färbungen der einzelnen Institute ergaben sich teils weit auseinandergelagerte Ergebnisse bezüglich des Ki67-Index (Abb.4, a). Eine anschließende Einteilung der Fälle in klassisches und atypisches zentrales Neurozytom auf Grundlage des Ki67-Index (Grenzwert 3%) zeigt, dass es infolgedessen zu unterschiedlichen Diagnosen in den Instituten kommt (Abb.4, b)).

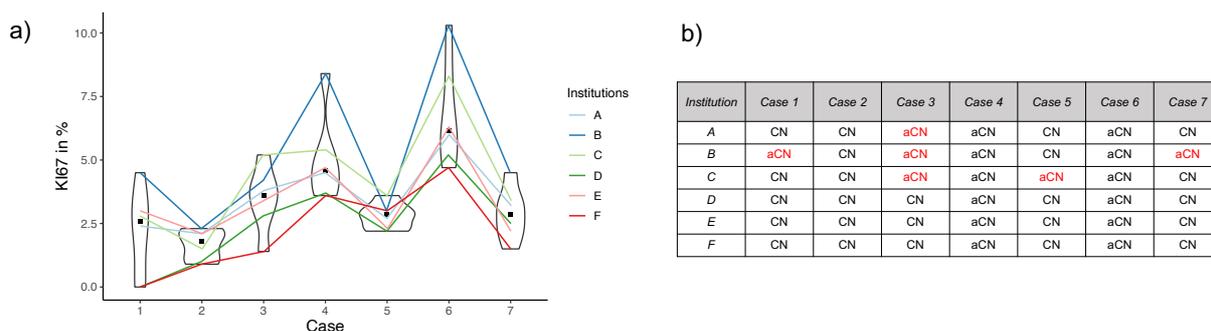


Abb.4: Variation des Ki67-Index bei Färbung in unterschiedlichen Instituten pro Fall (Graph links). Diagnose eines klassischen zentralen Neurocytoms (CN) oder eines atypischen zentralen Neurozytoms (aCN) je nach Institution, basierend auf einem Ki67-Index von $\leq 3\%$ oder $> 3\%$ (Tabelle rechts).

Analysen der Überlebensdaten:

Bei der Analyse der Überlebensdaten wurden unterschiedliche Subgruppen auf Grundlage verschiedener Kriterien miteinander verglichen (Abb. 5). Weder bei der Aufteilung der Kohorte nach der histologischen Diagnose oder auf der Grundlage eines Ki67-Index von $\leq 3\%$ oder $> 3\%$ im initialen Befund, schien ein signifikanter Unterschied im progressionsfreien Überleben zwischen den Patient*innen zu bestehen (Abb. 5, a und b). Im Vergleich dazu scheint die Anzahl der Mitosen eventuell eine prognostische Aussagekraft bezüglich des progressionsfreien Überlebens zu haben. Sowohl bei einem Grenzwert von 3 Mitosen als auch bei einem Grenzwert von 5 Mitosen pro 10 Sichtfelder, schien die Gruppe mit weniger als 3 oder 5 ein jeweils ein längeres Progressionsfreies Überleben aufzuzeigen (Abb.5, c und d). Vorherige Studien konnten ein längeres progressionsfreies Überleben für Patient*innen mit initial kompletter Tumorresektion (gross total resection, GTR) im Vergleich zu Patient*innen, bei denen nur eine unvollständige Tumorresektion (subtotal resection, STR) möglich war, nachweisen (2, 3). Anhand der vorläufigen Kohorte konnten wir bisher keinen signifikanten Unterschied zwischen diesen beiden Gruppen feststellen, wobei ein Trend zu einem längeren progressionsfreien Überleben für die Gruppe, die eine komplette Resektion erhielt, erkennbar war (Abb.5, e). Eine adjuvante Radiotherapie schien einen positiven Einfluss auf das progressionsfreie Überleben zu haben (Abb.5, f).

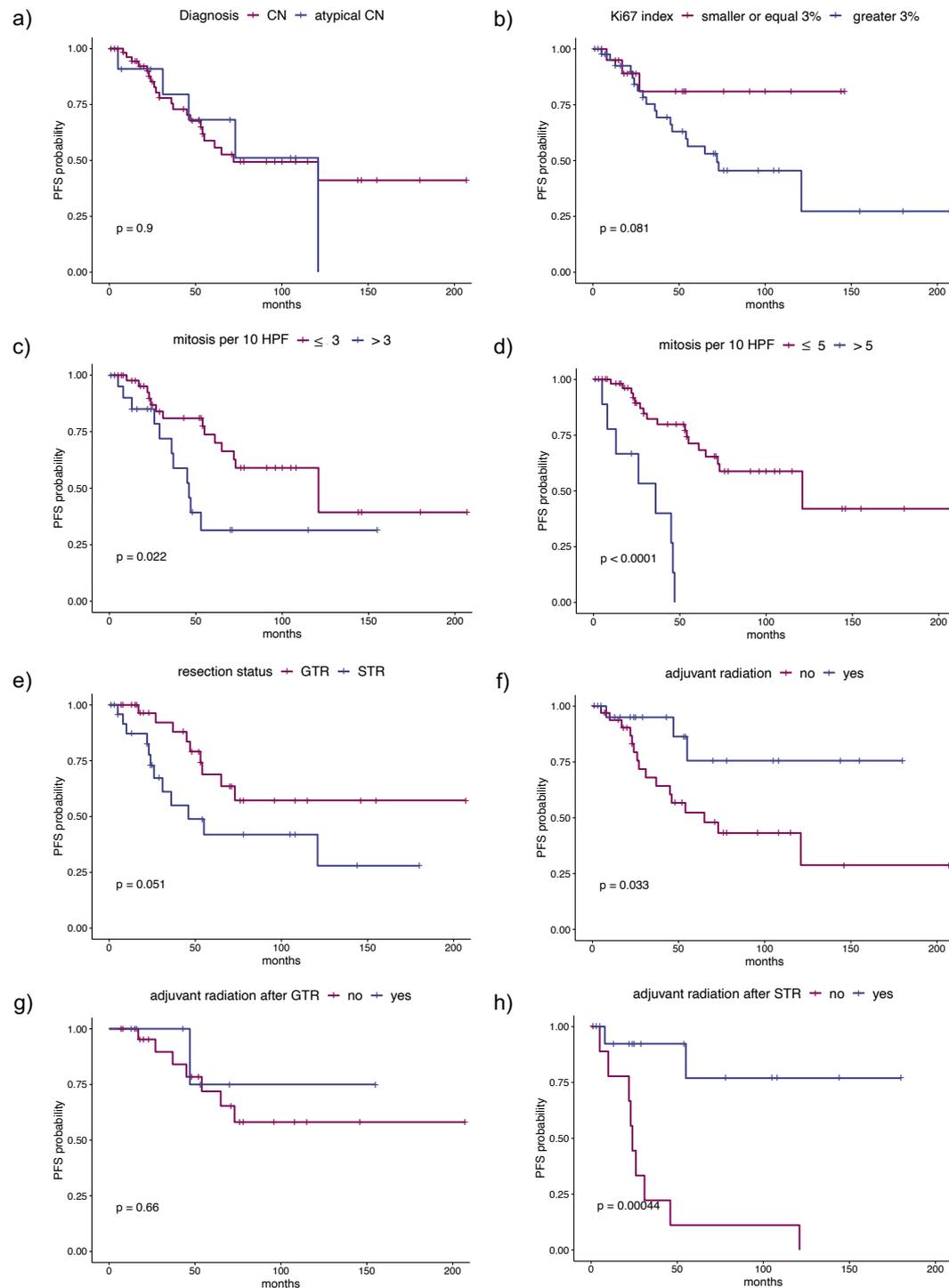


Abb.5: Wahrscheinlichkeit des Progressions-freien Überleben (progression free survival, PFS) zwischen verschiedenen Subgruppen dargestellt in Kaplan-Meier Kurven (n = 69). a) Unterschiede im PFS zwischen Patient*innen mit der histologischen Diagnose eines klassischen zentralen Neurozytoms (CN) und dem eines atypischen (atypical CN). b) PFS in Abhängigkeit von einem Ki67-Index $\leq 3\%$ oder $> 3\%$ und in Abhängigkeit von der Anzahl der Mitosen (c, d). e) PFS in Abhängigkeit des Ausmaß der initialen Tumoroperation, Vergleich zwischen kompletter (gross total resection, GTR) und inkompletter (subtotal resection, STR). f) Wahrscheinlichkeit des Progressions-freien Überleben in der Subgruppe mit adjuvanter Radiotherapie im Vergleich zur Gruppe ohne Radiotherapie. Einfluss der adjuvanten Radiotherapie auf das Progressions-freie Überleben in Zusammenhang mit dem Ausmaß der initialen Tumorresektion, GTR mit oder ohne adjuvante Radiotherapie(g) und STR mit oder ohne adjuvante Radiotherapie (h).

Dabei erhielten sieben Patient*innen mit initial kompletter Tumorresektion und 15 mit initial inkompletter Tumorresektion eine adjuvante Bestrahlung. In der Gruppe der Patient*innen mit kompletter Resektion des Tumors ließen sich keine Unterschiede im progressionsfreien Überleben zwischen Patient*innen mit zusätzlich nachfolgender Bestrahlung und denen ohne, erkennen (Abb.5, g). Während in der Gruppe, in der initial nur eine inkomplette Tumorentfernung möglich war, Patient*innen mit nachfolgender Bestrahlung ein längeres progressionsfreies Leben zu haben schienen (Abb.5, h).

Zusammenfassung und Ausblick:

Die epigenetische Analyse des DNA-Methylierungsprofils führte in einigen Fällen zu einer Änderung der Diagnose. Auf der Grundlage des DNA-Methylierungsprofils ließen sich keine klinisch relevanten Subgruppen innerhalb der Entität der zentralen Neurozytome identifizieren.

Unsere vorläufigen Daten bezüglich der Bestimmung des Ki67-Index, weisen auf eine starke Abhängigkeit der Ergebnisse vom Untersucher sowie auf Unterschiede zwischen verschiedenen Laboren hin. Infolgedessen ist die prognostische Relevanz des Ki67-Index und eine an diesem Marker orientierte Therapieentscheidung fraglich. Jedoch haben wir den Einfluss der Interobserver- und Interlaboratory-Variabilität bislang nur an wenigen Fällen untersucht. Zur genaueren Exploration dieser Faktoren sollen weitere 20 Neurozytom-Fälle von den gleichen Untersucher*innen bezüglich des gesamten und des fokal höchsten Ki67 Index sowie der Anzahl der Mitosen eingeschätzt werden. Anschließend soll mittels des interclass correlation coefficient (ICC) die Reliabilität zwischen verschiedenen Untersucher*innen stratifiziert werden. Hierfür soll der ICC und das 95% Konfidenz Intervall basierend auf den folgenden Variablen: „single rating“, „absolute-agreement“ und „2-way mixed effects model“ (ICC3) berechnet werden (14).

Die Analyse der bisherigen Überlebensdaten deutet auf einen möglicherweise positiven Einfluss einer adjuvanten Bestrahlung für Patient*innen mit initial nur inkomplett erfolgter Tumorresektion hin. Allerdings ist die Gruppe der Patient*innen, die ein Rezidiv erlitten, mit 26 relativ klein und die Ergebnisse bezüglich der Einflüsse auf das progressionsfreie Überleben, somit nur bedingt interpretierbar. Da wir noch auf weitere Daten zum klinischen Verlauf von einigen Patient*innen warten, hoffen wir mit Abschluss Datensammlung und erneuter Analyse genauere Aussagen zu den Einflussfaktoren auf das progressionsfreie Überleben treffen zu können. Darüber hinaus möchten wir weitere Variablen wie beispielsweise das Kopienzahlprofil in weitere Überlebensanalysen miteinbeziehen.

Abschließend soll ein Risikomodell berechnet werden, welches die momentanen Risikostratifizierungskriterien (Ki67 Index) mit molekularen Daten, wie zum Beispiel das Kopienzahlprofil und klinischen Daten miteinander vergleicht. Ziel ist es, mithilfe dieses Modells verlässlichere Marker für die Prognoseeinschätzung von Patient*innen mit zentralem Neurozytom zu identifizieren.

Literatur:

1. Hassoun J, Gambarelli D, Grisoli F, Pellet W, Salamon G, Pellissier JF, et al. Central neurocytoma. *Acta Neuropathologica*. 1982;56(2):151-6.
2. Rades D, Schild SE. Treatment recommendations for the various subgroups of neurocytomas. *J Neurooncol*. 2006;77(3):305-9.
3. Rades D, Fehlaue F. Treatment options for central neurocytoma. *Neurology*. 2002;59(8):1268-70.
4. Park SH GF, Honavar M, Sievers P, . Central neurocytoma. WHO Classification of Tumours Editorial Board Central nervous system tumours. 6 5ed. Lyon (France): International Agency for Research on Cancer; 2021.
5. Yasargil MG, von Ammon K, von Deimling A, Valavanis A, Wichmann W, Wiestler OD. Central neurocytoma: histopathological variants and therapeutic approaches. *J Neurosurg*. 1992;76(1):32-7.
6. Söylemezoglu F, Scheithauer BW, Esteve J, Kleihues P. Atypical central neurocytoma. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1997;56(5):551-6.
7. Imber BS, Braunstein SE, Wu FY, Nabavizadeh N, Boehling N, Weinberg VK, et al. Clinical outcome and prognostic factors for central neurocytoma: twenty year institutional experience. *J Neurooncol*. 2016;126(1):193-200.
8. Rades D, Schild SE, Fehlaue F. Prognostic value of the MIB-1 labeling index for central neurocytomas. *Neurology*. 2004;62(6):987-9.
9. Capper D, Jones DTW, Sill M, Hovestadt V, Schrimpf D, Sturm D, et al. DNA methylation-based classification of central nervous system tumours. *Nature*. 2018;555(7697):469-74.
10. Sturm D, Orr BA, Toprak UH, Hovestadt V, Jones DTW, Capper D, et al. New Brain Tumor Entities Emerge from Molecular Classification of CNS-PNETs. *Cell*. 2016;164(5):1060-72.
11. Schweizer L, Thierfelder F, Thomas C, Soschinski P, Suwala A, Stichel D, et al. Molecular characterization of CNS paragangliomas identifies cauda equina paragangliomas as a distinct tumor entity. *Acta Neuropathol*. 2020;140(6):893-906.
12. Pajtler KW, Witt H, Sill M, Jones DT, Hovestadt V, Kratochwil F, et al. Molecular Classification of Ependymal Tumors across All CNS Compartments, Histopathological Grades, and Age Groups. *Cancer Cell*. 2015;27(5):728-43.
13. Capper D, Stichel D, Sahm F, Jones DTW, Schrimpf D, Sill M, et al. Practical implementation of DNA methylation and copy-number-based CNS tumor diagnostics: the Heidelberg experience. *Acta Neuropathol*. 2018;136(2):181-210.
14. Koo TK, Li MY. A Guideline of Selecting and Reporting Intraclass Correlation Coefficients for Reliability Research. *J Chiropr Med*. 2016;15(2):155-63.