

Aus der Klinik für Innere Medizin mit Schwerpunkt Kardiologie der Medizinischen
Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Test-Retest-Reliabilität von zirkulierenden Endothelzellen und peripherer
Pulsamplituden-Tonometrie zur Quantifizierung von endothelialer Dysfunktion

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Josephine Büscher
geb. Wagner

aus Tübingen

Datum der Promotion: 3. Dezember 2021

Vorwort

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

Farinacci M, Krahn T, Dinh W, Volk HD, Dungen HD, Wagner J, Konen T, von Ahsen O. Circulating endothelial cells as biomarker for cardiovascular diseases. *Res Pract Thromb Haemost.* 2019;3(1):49-58.

Buescher J, Weisrock F, Fritschka M, Beckmann S, Litmeier S, Tahirovic E, Radenovic S, Busjahn A, Krahn T, Dinh W, Duengen HD. Test-Retest Reliability of Flow-Cytometric Quantification of Circulating Endothelial Cells and Endothelial Progenitor Cells in Cardiovascular Diseases. *Int J Cardiovasc Res.* 2021;10(4).

Weisrock F, Fritschka M, Beckmann S, Litmeier S, Wagner J, Tahirovic E, Radenovic S, Zelenak C, Hashemi D, Busjahn A, Krahn T, Pieske B, Dinh W, Dungen HD. Reliability of peripheral arterial tonometry in patients with heart failure, diabetic nephropathy and arterial hypertension. *Vasc Med.* 2017;22(4):292-300.

INHALTSVERZEICHNIS

Vorwort	2
Abkürzungsverzeichnis	4
Zusammenfassung	5
Abstract	7
1. Einführung	9
1.1 Endotheliale Dysfunktion	9
1.2 Nicht-invasive Methoden zur Quantifizierung der endothelialen Dysfunktion	10
1.3 Fragestellung	12
2. Material und Methodik	14
2.1 Studienkonzept und -population	14
2.2 Durchflusszytometrie	15
2.3 PAT-Messung	16
2.4 Statistische Auswertung	16
3. Ergebnisse	18
3.1 Durchflusszytometrische Quantifizierung von CECs und EPCs	18
3.2 Test-Retest-Reliabilität der Quantifizierung von CECs und EPCs	19
3.3 Test-Retest-Reliabilität von PAT-Messungen	19
4. Diskussion	21
4.1 Wesentliche Ergebnisse	21
4.2 CECs und EPCs	21
4.3 Pulsamplituden-Tonometrie (PAT)	22
4.4 Allgemeine Limitationen	23
4.5 Ausblick	24
4.6 Schlussfolgerung	25
Literaturverzeichnis	26
Anteilerklärung/eidesstattliche Versicherung	31
Druckexemplare der Publikation	36
Lebenslauf	63
Publikationsliste	66
Danksagung	68

Abkürzungsverzeichnis

CEC	Zirkulierende Endothelzellen
EPC	Endotheliale Progenitorzellen
PAT	Pulsamplituden-Tonometrie
ICC	Intra-Klassen-Korrelation
HFpEF	Patienten mit Herzinsuffizienz und erhaltener Ejektionsfraktion
HFrEF	Patienten mit Herzinsuffizienz und reduzierter Ejektionsfraktion
DN	Diabetische Nephropathie
aHT	arterielle Hypertonie
RHI	Reaktive-Hyperämie-Index
AI	Augmentationsindex

Anmerkung: Der Einfachheit halber wird im folgenden Text von Patienten, Teilnehmern und Probanden gesprochen, hierbei sind immer Patientinnen, Teilnehmerinnen und Probandinnen genauso gemeint.

Zusammenfassung

Hintergrund: Die endotheliale Dysfunktion spielt eine entscheidende Rolle für Pathogenese und Progredienz kardiovaskulärer Erkrankungen wie arterielle Hypertonie, Herzinsuffizienz oder diabetische Nephropathie, die maßgeblich zur weltweiten Sterblichkeit beitragen. Um die pathophysiologischen Vorgänge noch besser verstehen und die Veränderungen der Endothelfunktion frühzeitig und möglichst präklinisch erkennen zu können, bedarf es praktikabler und verlässlicher Messmethoden. Hierbei gewinnen nicht-invasive Verfahren wie die Bestimmung zirkulierender Endothelzellen (CECs) und endothelialer Progenitorzellen (EPCs) und die Pulsamplituden-Tonometrie (PAT) an Bedeutung. Eine reliable Quantifizierungsmethode vorausgesetzt, haben diese Surrogatparameter das Potenzial, für Diagnostik und Monitoring der endothelialen Dysfunktion eingesetzt zu werden [1-3].

Methoden: In einem ersten Schritt wurde ein flowzytometrisches Protokoll zur Detektion und Quantifizierung von CECs und EPCs entwickelt und getestet [1]. In einem zweiten Schritt wurde die Test-Retest-Reliabilität dieses Messverfahrens sowie der PAT (mittels reaktive-Hyperämie-Index, RHI, und Augmentationsindex, AI) am selben Patientenkollektiv evaluiert. Untersucht wurden 4 Patientengruppen: Patienten mit Herzinsuffizienz und erhaltener Ejektionsfraktion (HFpEF), Patienten mit Herzinsuffizienz und reduzierter Ejektionsfraktion (HFrEF), Patienten mit diabetischer Nephropathie (DN) und Patienten mit arterieller Hypertonie (aHT) [2, 3].

Ergebnisse: Die durchflusszytometrische Quantifizierung für CECs und EPCs zeigte eine hohe Reproduzierbarkeit und hohe Spezifität von 90 % und eine Sensitivität von 70,4 %, 68,0 %, 66,7 % und 52 % für HFpEF, DN, aHT und HFrEF. Die ermittelten CEC-Werte bei Patienten mit DN und HFpEF waren signifikant erhöht im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen. Die EPC- und CEC-Werte der anderen Patientengruppen waren nicht erhöht [1].

Die Test-Retest-Reliabilität der CEC/EPC-Messung, ausgedrückt als Intra-Klassen-Korrelation (ICC) die im nächsten Schritt untersucht wurde, war für CECs in allen Patientengruppen schlecht (ICC = -0,031–0,294). Für EPCs war die Reliabilität in der HFrEF- (ICC = 0,946) und der DN-Gruppe (ICC = 0,946) exzellent und in der HFpEF- (ICC = 0,694) und der aHT-Gruppe (ICC = 0,668) moderat [2].

Die Reliabilität der PAT-Messung war in der DN-Gruppe gut (ICC = 0,863), bei HFpEF (ICC = 0,557) und HFrEF (ICC = 0,576) moderat und bei Patienten mit aHT schlecht (ICC = 0,125) [3].

Fazit: Eine verlässliche Quantifizierung von CECs und EPCs mittels Durchflusszytometrie ist grundsätzlich möglich. Die Konzentration von CECs konnte insbesondere bei Patienten mit DN und bei Patienten mit HFpEF als diagnostischer Parameter herangezogen werden. Die PAT-Methode erfasst die Endothelfunktion bei HFpEF, HFrEF und DN zuverlässig [1-3].

Abstract

Background: Endothelial dysfunction plays a major role in the pathogenesis and progression of cardiovascular diseases, including hypertension, congestive heart failure, and diabetic nephropathy, which contribute significantly to worldwide mortality.

We are in need of practical and reliable measurement techniques of endothelial dysfunction to better understand the underlying pathophysiology. Such techniques could allow detection and monitoring of endothelial dysfunction even before it manifests clinically. Noninvasive techniques such as pulse amplitude tonometry (PAT) as well as circulating endothelial cells (CECs) and endothelial progenitor cells (EPCs) are gaining importance as surrogate parameters of endothelial dysfunction. The prerequisite to implementing these parameters in clinical practice is a reliable and accurate quantification technique [1-3].

Methods: In a first step, a flowcytometric protocol to quantify CECs and EPCs was developed and assessed [1]. In a second step, test-retest reliability of this protocol and of the PAT technique (via reactive hyperemia index, RHI, and augmentation index, AI) was evaluated in the same patient groups. The study cohort consisted of 4 patient groups: patients with heart failure and preserved ejection fraction (HFpEF), patients with heart failure and reduced ejection fraction (HFrEF), patients with diabetic nephropathy (DN), and patients with arterial hypertension (aHT) [2, 3].

Results: The flowcytometric quantification method showed good reproducibility with a diagnostic specificity of 90% and a sensitivity of 70.4 %, 68.0 %, 66.7 % and 52 % for DN, HFpEF, aHT, and HFrEF, respectively. CEC counts in patients with DN and HFpEF were significantly elevated compared to healthy controls. CEC counts in the remaining study groups and EPC counts were not elevated [1].

Test-retest reliability of CEC/EPC measurements, expressed as intra-class correlation (ICC) was poor for CECs across all patient groups (-0.031–0.294). For EPCs, reliability was excellent in patients with HFrEF (ICC = 0.946) and patients with DN (ICC = 0.946) and moderate in patients with HFpEF (ICC = 0.694) and patients with aHT (ICC = 0.668) [2].

Reliability of the PAT measurement was good in patients with DN (ICC = 0.863), moderate in patients with HFpEF (ICC = 0.557) and HFrEF (ICC = 0.576), and poor in patients with aHT (ICC = 0.125) [3].

Conclusion: Reliable quantification of CECs and EPCs using flow cytometry is possible. CECs have shown promising results as a diagnostic parameter, especially among patients with DN and HFpEF. PAT can reliably detect endothelial dysfunction in HFpEF, HFrEF, and DN [1-3].

1. Einführung

1.1 Endotheliale Dysfunktion

Das gesunde Endothel hat antiinflammatorische Eigenschaften, vermindert oxidativen Stress in der Gefäßwand und trägt so entscheidend zur Integrität und Funktion der Gefäße bei [4].

Kommt es zu einer Schädigung des Endothels, vermindert sich seine Fähigkeit der Vasodilatation, wodurch die Entstehung und Progression von Gefäß- und Herzerkrankungen begünstigt wird [5]. Diese kardiovaskulären Erkrankungen, zum Beispiel die arterielle Hypertonie, die Herzinsuffizienz oder die diabetische Nephropathie, tragen in der westlichen Welt maßgeblich zur Sterblichkeit bei [6]. Es besteht dringender Bedarf an wirksamen, vor allem gezielten Ansatzpunkten, Gefäßschäden und die oft zugrunde liegende endotheliale Dysfunktion frühzeitig zu erkennen bzw. den Erfolg therapeutischer Maßnahmen zu kontrollieren.

Neben bereits etablierten invasiven Verfahren zur Messung von Endothelschäden wie die Messung der Vasodilatation oder die intrakoronare Flussmessung [7] existieren mittlerweile einige nicht-invasive Verfahren zur quantitativen Erfassung der Endothelfunktion. Die Pulsamplituden-Tonometrie (PAT) ist eine solche funktionelle Messung, während die Bestimmung zirkulierender Endothelzellen (CEC) und endothelialer Progenitorzellen (EPC) eine Messmethode auf zellulärer Ebene darstellt. Zirkulierende Endothelzellen gewinnen durch die Entwicklung und Optimierung der Methoden ihrer Isolation und Charakterisierung zunehmend an Bedeutung [8].

Die komplementäre Anwendung dieser Verfahren stellt einen vielversprechenden Ansatz dar, sowohl Veränderungen der Endothelfunktion frühzeitig festzustellen als auch mögliche Therapieeffekte abzubilden. Idealerweise ergeben sich hieraus Möglichkeiten, Vorboten der endothelialen Dysfunktion zu erfassen und messbar zu therapieren. Zirkulierende Endothelzellen könnten hier die Möglichkeit eines Surrogatparameters bieten [9].

Voraussetzung ist, dass die Messverfahren reproduzierbar und verlässlich sind, und sich im Klinikalltag praktisch umsetzen lassen. Bislang existieren keine Studien im ausgewählten Patientenkollektiv, die die Verlässlichkeit der oben genannten Verfahren untersuchen.

Die vorliegende Arbeit untersucht funktionelle und zelluläre Messmethoden der endothelialen Dysfunktion, wobei zuerst eine flowzytometrische Methode zur exakten

Quantifizierung zirkulierender Endothelzellen und endothelialer Progenitorzellen entwickelt wurde (Publikation 1). Anschließend wurde die Test-Retest-Reliabilität dieser Messung untersucht (Publikation 2). Analog erfolgte die Untersuchung der Test-Retest-Reliabilität der PAT-Methode (Publikation 3).

1.2 Nicht-invasive Methoden zur Quantifizierung der endothelialen Dysfunktion

Es existieren verschiedene funktionelle und biologische nicht-invasive Methoden zur Messung der endothelialen Dysfunktion, allerdings fehlt ein verbindlicher Konsens über einen entsprechenden Goldstandard [7]. Zu den funktionellen Verfahren zählen die venöse Okklusions-Plethysmographie, die Puls-Wellen-Analyse und die Doppler-Flowmetrie. Zu den biologischen Verfahren gehören Serum-Biomarker, wie Interleukin-6 und Tumor-Nekrose-Faktor-Alpha [10].

Die Pulsamplituden-Tonometrie (PAT) ist ein nicht-invasives funktionelles Messverfahren, bei dem über einen Sensor am Zeigefinger pulsatile Volumen-Veränderungen als Reaktion auf eine temporäre Stauung der Armgefäße gemessen werden. Eine speziell entwickelte Computer-Software berechnet den Reaktiven-Hyperämie-Index (RHI) und den Augmentationsindex (AI). Der RHI spiegelt Stickstoffmonoxid-assoziierte Veränderungen im Gefäßtonus wider [11], der AI ist ein Maß für die Steifigkeit arterieller Gefäße. Beide Parameter werden als Korrelate der endothelialen Dysfunktion betrachtet [12, 13]. Studien belegen eine Korrelation zwischen einem niedrigen RHI und zukünftig auftretenden kardiovaskulären Ereignissen [14].

Einige Untersuchungen konnten bereits zeigen, dass die PAT eine verlässliche Messmethode zur Erfassung der Endothelfunktion gesunder Probanden darstellt [15]. Auch für Patienten mit metabolischem Syndrom [16] und koronarer Herzkrankheit [17] wurde die Methode als praktikabel beschrieben. Allerdings gab es zum Zeitpunkt unserer Studie nur sehr limitierte Daten zu Patienten mit Herzinsuffizienz und unseres Wissens keine Test-Retest-Studien.

Zirkulierende Endothelzellen (CECs) und endotheliale Progenitorzellen (EPCs) werden als vielversprechende quantitative Marker der endothelialen Dysfunktion diskutiert [18]. CECs entstammen dem Endothel und werden dort entweder als Reaktion auf mechanische Reize an den Gefäßwänden oder infolge beeinträchtigter Zelladhäsion freigesetzt [19]. EPCs hingegen entstammen dem Knochenmark. Sie dienen dem Schutz der Gefäßwände und der Hämostase, indem sie als Reaktion auf Gefäßwandschäden proliferieren und sich in reife Endothelzellen verwandeln [20]. Während das Auftreten von CECs für einen Endothelschaden spricht, weist das Vorhandensein von EPCs auf Regenerationsprozesse des Endothels hin. Diese zwei Zelltypen spiegeln somit unterschiedliche Komponenten der endothelialen Dysfunktion wider.

Zur Quantifizierung von CECs und EPCs existieren unterschiedliche Verfahren, am verbreitetsten sind die magnetischen Immunobeads und die Flowzytometrie. Beide charakterisieren CECs bzw. EPCs anhand einer speziellen Kombination von Oberflächenmarkern [21]. Allerdings existiert keine allgemein gültige Definition, welche Oberflächenmoleküle dies sind [8].

Die verlässliche Identifikation dieser Zellsubtypen bleibt eine Herausforderung, weil sie unterschiedliche Oberflächenmoleküle exprimieren, die teilweise nicht nur in beiden Zellreihen, sondern auch bei anderen zirkulierenden Zellen zu finden sind. Weiterhin verändern sich diese Antigene während des Lebenszyklus der Zellen [22, 23].

Üblicherweise werden CECs/EPCs anhand einer Kombination aus Oberflächenmarkern typisiert, da kein einzelnes Antigen spezifisch genug wäre. Obwohl oder gerade weil in der Literatur immer wieder unterschiedliche Oberflächenprofile genannt werden, variieren die vorhandenen Messverfahren und vor allem auch die so gemessenen Zellzahlen erheblich, und die Diskussion um eine exakte Definition bleibt kontrovers [24-26].

Das Endothel ist ständigen Umbauprozessen unterworfen. Zirkulierende Endothelzellen sind im peripheren Blut gesunder Probanden nur in sehr niedriger Zahl zu finden (~10 CECs/ml), weshalb das Freiwerden von CECs als seltenes Ereignis („rare cellular event“) gilt [27]. Koronarerkrankungen sind mit erhöhten CEC Werten assoziiert, während EPCs bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung und fortgeschrittener Herzinsuffizienz in kleinerer Zahl messbar sind als in gesunden Vergleichsgruppen [28] [29]. Dies wiederum lässt auf eine eingeschränkte Regenerationsfähigkeit des Endothels schließen. In

Patientengruppen mit milden Formen der Herzinsuffizienz können EPCs vermehrt gemessen werden [30]. Dies weist vermutlich auf eine erhöhte Ausschüttung von EPCs aus dem Knochenmark hin [31].

Obwohl zum Zeitpunkt der Erhebung unserer Daten bereits eine Vielzahl von Studien zur Verwendbarkeit von CECs als Biomarker für endotheliale Dysfunktion vorliegt, ist die klinische Anwendung eingeschränkt. Einerseits liegt dies am Fehlen einer einheitlichen Definition von CECs, andererseits sind CECs aufgrund ihrer Seltenheit und des komplexen Phänotyps schwierig zu bestimmen [32].

Um die Bestimmung von CECs als Routineverfahren im klinischen Alltag zu etablieren, ist eine verlässliche, reproduzierbare und praktikable Methode, endotheliale Dysfunktion anhand von CEC-Messungen zu erkennen und zu quantifizieren, unabdingbar.

Im Jahr 2018 haben Lanuti et al. ein neues standardisiertes Protokoll zur flowzytometrischen Messung von CECs, basierend auf einem anderen Oberflächenprofil, vorgeschlagen, das möglicherweise als neues „Standardprotokoll“ dienen könnte [32].

1.3 Fragestellung

Nicht-invasive Verfahren zur Prognoseabschätzung und Beurteilung der Endothelfunktion gewinnen zunehmend an Bedeutung. Sowohl zirkulierende Endothelzellen als Surrogatparameter als auch die PAT-Messung als einfaches klinisches Tool könnten zukünftig zur Entwicklung neuer, gezielter und individualisierter Therapien und zur Verlaufskontrolle der endothelialen Dysfunktion beitragen.

Obwohl unterschiedliche Messverfahren der Endothelfunktion existieren, fehlen bislang genauere Untersuchungen zur Verlässlichkeit der einzelnen Methoden.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist folglich die Untersuchung der Test-Retest-Reliabilität der genannten Verfahren in unterschiedlichen Patientenkollektiven, was bislang noch nicht erfolgt ist.

Die präzise und akkurate Isolation von CECs ist Grundvoraussetzung für die weitergehende Erforschung der Endothelfunktion. Zu diesem Zweck wurde in einem ersten Schritt ein Marker-Panel etabliert, anhand dessen CECs von Blutzellen differenziert werden können (Publikation 1, [1]).

In einem zweiten Schritt wurde die entwickelte Methode an zwei Messzeitpunkten angewandt und die Reliabilität der Messungen bestimmt (Publikation 2, [2]). Gleiches erfolgte für die PAT-Methode (Publikation 3, [3]).

2. Material und Methodik

2.1 Studienkonzept und -population

Alle Studienteilnehmer wurden zwischen August 2014 und September 2015 über die Datenbank des Kompetenzzentrums Herzinsuffizienz und die kardiologischen Stationen des Virchow Klinikums der Charité Universitätsmedizin Berlin rekrutiert.

Die Patienten waren zwischen 35 und 80 Jahren alt und mussten 4 Wochen vor Studienbeginn klinisch stabil sein.

Ausschlusskriterien waren symptomatische koronare Herzerkrankungen, Herzinfarkt oder Schlaganfall in den letzten 3 Monaten, eine Koronarintervention in den letzten 4 Wochen, relevante Herzklappenerkrankungen, unkontrollierter Bluthochdruck (mit systolischem Blutdruck > 180 mmHg oder diastolischem Blutdruck > 95 mmHg), Anämie mit Hämoglobin < 10 g/dl oder unbehandelte Schilddrüsenerkrankungen.

Es wurden vier Patientengruppen eingeschlossen: Patienten mit Herzinsuffizienz und erhaltener Ejektionsfraktion (HFpEF), Patienten mit Herzinsuffizienz und reduzierter Ejektionsfraktion (HFrEF), Patienten mit diabetischer Nephropathie (DN) und Patienten mit arterieller Hypertonie ohne strukturelle Herzerkrankungen (aHT). Ziel war es, 25 Patienten pro Gruppe zu rekrutieren. Für die beiden Test-Verfahren PAT und CEC-Bestimmung unterschieden sich die Teilnehmerzahlen leicht, da Patienten aus unterschiedlichen Gründen, zum Beispiel aufgrund von einer PAT-Messung mit Signalartefakten, ausgeschlossen wurden.

Alle Teilnehmer nahmen eine Screeningvisite und zwei Studienvisiten wahr. Die Screeningvisite diente dazu, Ein- und Ausschlusskriterien erneut zu evaluieren und Basisdaten (Größe, Alter, Gewicht, BMI) zu erheben. Beide Studienvisiten liefen identisch ab und beinhalteten die PAT-Messung und die Gewinnung der Blutproben für die CEC- (bzw. EPC-)Bestimmung. Das Zeitintervall zwischen beiden Studienvisiten, die zumeist morgens und zur selben Zeit erfolgten, betrug 4 – 14 Tage.

Die Studienteilnehmer waren am Untersuchungstag nüchtern und sollten, wenn möglich, auf die Einnahme ihrer Dauermedikation verzichten.

2.2 Durchflusszytometrie

Primär diente die Durchflusszytometrie als Methode zur Etablierung eines Messverfahrens für zirkulierende Endothelzellen und endotheliale Progenitorzellen. Die im Folgenden knapp beschriebene Methode wurde dann sekundär in unserer Studie verwendet, um die CECs und EPCs in venösen Blutproben der Studienteilnehmer zu bestimmen.

Die Blutentnahme erfolgte mit Transfix/EDTA-Röhrchen. Die ersten 3 ml Blut wurden verworfen, um mögliche Kontaminationen durch die Venenpunktion zu vermeiden. Die Blutproben wurden anschließend unter Kühlung bei konstant 4°C gelagert, transportiert und innerhalb von 72 Stunden nach Blutentnahme verarbeitet.

Die Messung der zirkulierenden Endothelzellen und endothelialen Progenitorzellen erfolgte mittels Durchflusszytometrie unter Verwendung eines Markerpanels mononuklearer Antikörper und der Kernfärbung Syto16. CECs wurden definiert als DNA⁺, CD45^{dim}, CD31⁺, und CD146⁺ [23]. EPCs wurden definiert als CD45^{dim}, CD34^{br}, CD133⁺, and CD31⁺, FSC^{low-medium}, SSC^{low} [33]. Jede Blutprobe durchlief drei Messungen, aus denen der Mittelwert gebildet wurde. Die Angabe der Zellzahlen wurde dann in Relation zu peripheren mononukleären Zellen (PMNCs, peripheral mononuclear cells) als CECs/EPCs pro PMNC gemacht. Um absolute CEC/EPC-Zahlen (Zellen/ml) zu erhalten, erfolgte die Multiplikation der initialen Ergebnisse mit der absoluten PMNC-Zahl. Diese wurde mittels Flow-Count-Fluorospheres ermittelt, einer Technik, die eine Suspension aus fluoreszierende Mikropartikeln verwendet [34].

Im Anschluss dienten Spiking Experimente zur Validierung dieser Methode: Probandenblut wurde hierbei in steigender Konzentration mit einer bekannten Anzahl Zellen aus definierten Zelllinien angereichert, deren Wiederfindungsraten anschließend mittels der beschriebenen Markerpanel ermittelt wurden. Analog lief anhand entsprechender Kontrollen die erfolgreiche Validierung der Gating-Strategie zur Identifikation von EPCs ab. Eine Gating-Strategie ist, vereinfacht gesagt, eine Methode

zur Auswahl von Zellen aus einer Flowzytometrie-Messung auf Basis definierter Eigenschaften der Zelloberfläche [35].

2.3 PAT-Messung

Verwendet wurde das EndoPAT-System (Firma Itamar Medical Ltd.), das pulsatile Volumenveränderungen an beiden Zeigefingern misst.

Zu Beginn erfolgte die elektronische Erfassung des Ausgangs-Blutdruckwertes am nicht-dominanten Oberarm. An eine 5-minütige Baseline-Periode schloss sich eine 5-minütige Oberarm-Blutsperre (100 mmHg über dem systolischen Ausgangswert, maximal aber 300 mmHg) an, auf die eine weitere abschließende 5-minütige Post-Okklusionsphase folgte. Während dieser drei Phasen erfasste das EndoPAT-System kontinuierlich die pulsatischen Volumenveränderungen.

Hierbei lag der Proband in einem abgedunkelten Raum bei etwa 20°C Umgebungstemperatur. Beide Arme wurden unter Verwendung von Armschienen am Körper angelagert.

Die EndoPAT-Software berechnete dann für jeden Test den Augmentations-Index (AI), den AI normiert auf 75 Herzschläge pro Minute (AI@75 [13]) und den Reaktive-Hyperämie-Index (RHI, reactive hyperemia index), der das Ausmaß des Endothelschadens angeben soll [36]. Wegen der Asymmetrie der RHI-Verteilung wurden die gemessenen RHI-Werte mittels logarithmischer Transformation ($\ln RHI$) in eine Normalverteilung überführt.

2.4 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mittels der Software-Programme R Version 3.3.1 und Statistical Package for Social Science (SPSS), IBM® Version 25.0. Die Analysen wurden von Dr. rer. nat. A. Busjahn, HealthTwist GmbH, durchgeführt und überprüft.

Zuerst fand eine Auswertung der Ergebnisse mittels Methoden der deskriptiven Statistik unter Berechnung der Mittelwerte, Standardabweichungen und Medianwerte statt. Anschließend erfolgte die Untersuchung der Daten auf das Vorliegen einer Normalverteilung unter Verwendung des Komogorov-Smirnov-Tests. Als statistisch signifikant galt ein $p < 0,05$.

Zur Analyse der Test-Retest-Reliabilität erfolgte die Berechnung der Intra-Klassen-Korrelation bzw. des Intra-Klassen-Koeffizienten (ICC). Hierbei erfolgte ein Vergleich der Ergebnisse aus beiden Studienvisiten. Die Berechnung des ICC fand für die CECs/EPCs und analog für die PAT-Messung statt.

Der ICC ist ein statistisches Maß zur Analyse der Übereinstimmungsreliabilität. Seine Werte liegen zwischen -1 und 1. Die Interpretation des ICC folgte den Empfehlungen von Koo et al. [37]: ICC < 0.50 weist auf eine schlechte, ICC 0.5 – 0.75 auf eine moderate, ICC 0.75 – 0.9 auf eine gute und ICC > 0.9 auf eine exzellente Reliabilität hin.

Die grafische Veranschaulichung der Übereinstimmung (Konkordanz) erfolgte mittels Bland-Altman-Diagrammen. In einem kartesischen Koordinatensystem werden hierbei auf der Abszisse der Mittelwert beider Messungen, auf der Ordinate die Differenz beider Messwerte aufgetragen. Somit wird das Verhältnis zwischen den Unterschieden von Visite 1 und Visite 2 (Differenz: Visite 1 – Visite 2) und den Mittelwerten beider Visiten $[(\text{Visite 1} + \text{Visite 2})/2]$ dargestellt [38].

3. Ergebnisse

3.1 Durchflusszytometrische Quantifizierung von CECs und EPCs

Die durchschnittlichen Wiederfindungsraten in den Spiking-Experimenten zur Validierung der beschriebenen Markerpanel für die durchflusszytometrische Quantifizierung von CECs und EPCs lagen zwischen 83 und 115%.

Die Reliabilität des Messverfahrens für CECs und EPCs war in Transfix-Röhrchen höher als in EDTA- und Lithium-Heparin-Röhrchen (Li-Heparin-Röhrchen). Anders als in EDTA- und Li-Heparin-Röhrchen, ließen sich CECs in Transfix-Röhrchen auch nach 72 h noch messen. Bei CECs lag die Inter-assay-Variabilität von unabhängigen Messungen nach 0, 24, 48 und 72 Stunden hinweg in Transfix-Röhrchen bei 13%, während die Intra-assay-Variabilität von 4 Wiederholungsmessungen zum gleichen Zeitpunkt bei 15,1% lag. Nach 72 h waren in den Transfix-Röhrchen durchschnittlich 109% der initialen EPC-Werte, im Vergleich zu 77,1% (EDTA) und 79,1% (Li-Heparin) messbar. Auch die Inter-assay-Variabilität der Messwerte für EPCs über die 4 Messzeitpunkte hinweg war in den Transfix-Röhrchen (Variationskoeffizient 6,7%) deutlich niedriger als in EDTA- (17,7%) und Li-Heparin-Röhrchen (10,5%). Die Intra-assay Variabilität der 4 Messungen von EPCs in Transfix-Röhrchen lag bei 15,1%. Aufgrund dieser Befunde erfolgten die weiteren Messungen von CECs und EPCs unter Verwendung von Transfix-Röhrchen.

Der mediane CEC-Wert, gemittelt jeweils aus 3 Messungen aus derselben Blutprobe, lag bei gesunden Probanden bei 5,5/ml (Interquartilenabstand 4–7,3). Im Vergleich dazu betrug die medianen CEC-Werte bei Patienten mit HFpEF 23/ml (8,1–31,7), bei HFrEF 11,7/ml (4,7–28,5), bei DN 16,7/ml (9,7–28,1) und bei HTN 14,4/ml (6,3–21,4). Bei Patienten mit DN und HFpEF waren die medianen CEC-Werte im Vergleich zu gesunden Probanden statistisch signifikant erhöht ($P < 0.05$). Die ermittelten medianen Werte für EPCs zeigten in keiner der 4 untersuchten Gruppen signifikante Unterschiede zu den EPC-Werten gesunder Probanden.

Die Spezifität des Assays bei einem Cut-off von 10,5 CECs/ml betrug insgesamt 90% für das Gesamtkollektiv sämtlicher Patientensubgruppen. Die Sensitivität des Assays für die Subgruppen lag bei diesem Cut-off-Wert für HFpEF bei 70,4 %, für HFrEF bei 52 %, für DN bei 68 % und für aHT bei 66,7 %.

3.2 Test-Retest-Reliabilität der Quantifizierung von CECs und EPCs

In der darauffolgenden Test-Retest-Reliabilitätsstudie der neu etablierten Methodik zur durchflusszytometrischen Quantifizierung von CECs und EPCs betrug der Median der CECs bei der ersten Visite 12/ml (5./95. Perzentile: 6/22) und bei der zweiten Visite 11/ml (6/24) für das Gesamtkollektiv, während der Median der EPCs bei der ersten Visite bei 679/ml (447/1281) und bei der zweiten Visite bei 736/ml (510/1105) lag. Der mediane Zeitabstand zwischen den Messungen betrug 7 Tage. Die Intraklassen-Korrelationen zwischen den Messungen an den beiden Visitentagen zeigten eine schlechte Reliabilität für CECs in allen Patientengruppen (CEC-ICC -0,031–0,294) und eine moderate bis exzellente Reliabilität für EPCs (EPC-ICC 0,694–0,946).

Im Einzelnen lagen die Intraklassen-Korrelationen der ermittelten medianen Werte von CECs an den beiden Visitentagen bei Patienten mit HFpEF bei 0,294 (ICC 95% CI -0,08–0,6), bei Patienten mit HFrEF bei 0,076 (-0,32–0,45), bei Patienten mit DN bei -0,031 (0,44–0,37) sowie 0,143 (-0,27–0,51) bei Patienten mit aHT. Die Intraklassen-Korrelationen der ermittelten medianen Werte von EPCs betrugen bei Patienten mit HFpEF 0,694 (ICC 95% CI 0,43–0,85), bei Patienten mit HFrEF 0,946 (0,88–0,98), bei Patienten mit DN 0,946 (0,88–0,98) und bei Patienten mit aHT 0,668 (-0,37–0,84).

Die visuelle Auswertung des Bland-Altman-Diagramms für mediane CECs zeigte eine positive Korrelation der Differenz der CEC-Werte beider Visiten und der absoluten medianen CEC-Werte. Dieser Trend war für EPC-Werte nicht erkennbar.

3.3 Test-Retest-Reliabilität von PAT-Messungen

Die Ergebnisse der Test-Retest-Reliabilitätsstudie zur PAT als funktionellem Parameter zur Quantifizierung der endothelialen Dysfunktion waren wie folgt: Die Test-Retest-Reliabilität der Mittelwerte der Ergebnisse des InRHI war moderat bis gut (InRHI-ICC 0,557–0,863) für die beiden Visitentage. Auch die Reliabilität der Ergebnisse des AI@75 war moderat bis gut (AI@75-ICC 0,548–0,879). Lediglich bei Patienten mit arterieller Hypertonie zeigte sich eine schlechte Intraklassen-Korrelation zwischen den Messungen (InRHI-ICC = 0,125, AI@75-ICC = 0,144).

Im Einzelnen lagen die Intraklassen-Korrelationen der ermittelten Mittelwerte des lnRHI an beiden Visitentagen bei Patienten mit HFpEF bei 0,557 (ICC 95% CI 0,21–0,78), bei Patienten mit HFrEF bei 0,576 (0,22–0,8), bei Patienten mit diabetischer Nephropathie bei 0,863 (0,7–0,94) und bei Patienten mit arterieller Hypertonie bei 0,125 (-0,27–0,51). Die Intraklassen-Korrelationen der ermittelten Mittelwerte des AI@75 betrugen bei Patienten mit HFpEF 0,879 (ICC 95% CI 0,75–0,94), bei Patienten mit HFrEF 0,619 (0,27–0,82), bei Patienten mit DN 0,548 (0,76–0,96) und bei Patienten mit aHT 0,136 (-0,3–0,52).

Die visuelle Auswertung des Bland-Altman-Plots für mediane lnRHI-Werte zeigte keine offensichtliche Abhängigkeit zwischen der Differenz des lnRHI an beiden Visitentagen und den jeweiligen Mittelwerten.

4. Diskussion

4.1 Wesentliche Ergebnisse

Zusammenfassend haben die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Quantifizierung von CECs und EPCs gezeigt, dass eine verlässliche Detektion dieser Zellen anhand der beschriebenen Methode grundsätzlich möglich ist. Die Konzentration von CECs konnte insbesondere bei Patienten mit DN und bei Patienten mit HFpEF als diagnostischer Parameter herangezogen werden. Die Test-Retest-Reliabilität der CEC-Bestimmung war allerdings bei allen Patientensubgruppen gering.

Zwar konnten wir zeigen, dass die Reliabilität der EPC-Konzentrationsbestimmung moderat (Patienten mit HFpEF, aHT) bzw. exzellent (Patienten mit HFREF, DN) war, die absoluten EPC-Konzentrationen in den Patientensubgruppen unterschieden sich jedoch nicht signifikant von der bei gesunden Probanden.

Die PAT-Studie zeigte eine exzellente bis gute (Patienten mit DN) bzw. gute bis moderate (Patienten mit HFpEF, HFREF) Test-Retest-Reliabilität. Lediglich in der aHT-Gruppe war die ermittelte Test-Retest-Reliabilität niedrig.

4.2 CECs und EPCs

Zum Zeitpunkt der Studiendurchführung existierte in der Literatur noch kein einheitliches Oberflächenmarkerprofil zur Differenzierung von CECs [39]. Mittlerweile hat die Gruppe Lanuti et al. [32] in einer multizentrischen Studie eine Definition von CECs (alive/nucleated/CD45⁻ /CD34^{bright}/CD146⁺) überprüft und als zukünftigen Standard vorgeschlagen, die allerdings von der in unseren Studien verwendeten Definition abweicht. Mit dem von uns untersuchten Durchflusszytometrie-Markerprofil scheint aber grundsätzlich eine Quantifizierung von CECs (und EPCs) möglich. Dies wird insbesondere durch die hohen durchschnittlichen Wiederfindungsraten von CECs in Spiking-Experimenten zwischen 83 und 115 % deutlich.

Das Abschilfern von geschädigten Endothelzellen ist ein seltenes zelluläres Ereignis. Selbst bei Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen ist die Konzentration von nachweisbaren CECs sehr gering. Dementsprechend haben bereits kleine Variationen einen großen Effekt auf Korrelation und Übereinstimmung von zeitlich versetzten Tests, was die Validität der Ergebnisse limitiert. Signifikante Erhöhungen von CECs sind oft transient und am häufigsten bei Patienten mit akuten vaskulären Erkrankungen zu beobachten (z.B. beim akuten Koronarsyndrom oder bei akuter Herzinsuffizienz) [33, 40].

Das Vorliegen einer akuten kardiovaskulären Erkrankung war in dieser Studienpopulation jedoch ein Ausschlusskriterium.

Laut Lanuti et al. liegt die mediane CEC-Konzentration bei gesunden Frauen bei 11,55 CECs/ml (5./95. Perzentile: 1,85/35,4 CECs/ml) und bei gesunden Männern bei 9,31 CECs/ml (2,53/32,04 CECs/ml). In unserem Patientenkollektiv konnten wir in der ersten Studie zwar gegenüber gesunden Probanden signifikant erhöhte CEC-Konzentrationen in zwei Kohorten nachweisen, allerdings gab es keine signifikanten Unterschiede bei den EPC-Konzentrationen. Auch wenn hier keine statistische Auswertung erfolgte, lassen die absolute Werte der EPC-Konzentrationen in den Patientengruppen der Test-Retest-Studie vermuten, dass auch hier kein signifikanter Unterschied zu gesunden Probanden besteht. Nur 5 % der Patienten hatten eine CEC-Konzentration über 22 CECs/ml, dementsprechend waren der Großteil der ermittelten Werte noch innerhalb des von Lanuti et al. beschriebenen Referenzbereichs. Da die absoluten CEC-Konzentrationen mit dem Ausmaß des vorliegenden Endothelschadens korrelieren [27, 41], legt diese Verteilung nahe, dass die untersuchten Patienten insgesamt wenig Endothelschäden aufwiesen. Wir konnten demnach zeigen, dass die wiederholte Messung der EPC-Konzentration reliabel ist. Wir vermuten, dass sich die Konzentration der EPCs allerdings erst bei ausgeprägtem Endothelschäden signifikant reduziert und sehen deshalb in der CEC-Konzentration eher einen Parameter zur Früherkennung von Endothelschäden.

Die Bland-Altman-Analyse unserer Ergebnisse lässt vermuten, dass die biologische Variabilität der CEC-Konzentrationen positiv mit den absoluten CEC-Konzentrationen korreliert. Mit anderen Worten, je höher die absoluten Werte, desto größer auch der Schwankungsbereich der Konzentrationen bei ein und derselben Person. Dies deckt sich mit den vorliegenden Ergebnissen der wenigen Studien, die zwar longitudinal stabile CEC-Konzentrationen bei Gesunden gefunden haben, bei Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen jedoch eine hohe Variabilität der CEC-Konzentrationen feststellten [32, 42].

4.3 Pulsamplituden-Tonometrie (PAT)

Vorherige Studien zur Analyse der PAT bei gesunden Probanden sowie bei Patienten mit metabolischem Syndrom haben eine moderate bis sehr gute Reliabilität der Messung demonstriert [15, 17, 43, 44]. Das deckt sich mit den von uns ermittelten Ergebnissen zur

Reliabilität der PAT in den Patientengruppen mit HFpEF, HFrEF und DN. Diese Ergebnisse sind hilfreich zur Etablierung der PAT als ergänzender Parameter zur Messung der flussvermittelten Vasodilatation. Diese ist zum aktuellen Zeitpunkt das am häufigsten eingesetzte nicht-invasive funktionelle Verfahren zur Messung der Endothelfunktion. Während die flussvermittelte Vasodilatation aber primär die Endothelfunktion der großen Arterien erfasst [45], ermöglicht die PAT die Messung der Endothelfunktion in der Mikrozirkulation, die in der Regel zuerst von Endothelschäden betroffen ist [4]. Da die Messung der flussvermittelten Vasodilatation untersucherabhängig und vergleichsweise teuer ist, stellt die PAT eine vielversprechende Alternative dar. Beide Verfahren haben gemein, dass sie vom Einfluss verschiedener Faktoren abhängig sind, wie beispielsweise dem Ausmaß der Sympathikus-Aktivität und dem Zeitpunkt der Messung, der Raumtemperatur (und weiteren physikalischen Faktoren z.B. Luftdruck) und der Einnahme von Medikamenten oder Substanzen, die den Gefäßtonus beeinflussen [44, 46].

Die schlechte Test-Retest-Reliabilität der PAT in der Patientengruppe mit arterieller Hypertonie könnte indessen am ehesten folgendermaßen zu erklären sein.

Einerseits erfolgten die Messungen in dieser Gruppe häufig erst nachmittags und im Vergleich zu den anderen Gruppen durchschnittlich zu einer späteren Uhrzeit. Andererseits zeigten sich in der aHT Gruppe verglichen mit den anderen Gruppen größere Unterschiede zwischen den Herzfrequenzen beider Messzeitpunkte. Aus letzterer lassen sich Rückschlüsse auf den Sympathikotonus ziehen [44].

4.4 Allgemeine Limitationen

Trotz unserer Bemühungen, bekannte Einflussfaktoren auf die Gefäßfunktion zu kontrollieren, wie beispielweise Umgebungstemperatur, Tageszeitpunkt der Messung, Konsum von Alkohol, Zigaretten oder Koffein, sowie kurzfristige Änderungen der eingenommenen Medikation, können wir nicht ausschließen, dass diese Faktoren die Analyse der endothelialen Dysfunktion mittels PAT und CEC/EPC-Quantifizierung beeinflusst haben.

Darüber hinaus limitieren die vergleichsweise kleinen Kohortengrößen (24-26 Patienten) die Generalisierbarkeit der Ergebnisse. Die Größe der Kohorten erklärt zudem auch die

hohen Variationskoeffizienten der PAT- und CEC/EPC-Studien sowie die großen Spannweiten der Konfidenzintervalle für die ermittelten Intraklassen-Korrelationen. Entsprechend eingeschränkt ist die Aussagekraft der Ergebnisse über die tatsächliche Reliabilität.

Der mediane Zeitabstand zwischen den Messungen an beiden Visiten betrug 7 Tage. Eine Aussage über die langfristige Test-Retest-Reliabilität der Messparameter für die endotheliale Dysfunktion ist anhand dieses Studiendesigns naturgemäß nicht möglich.

4.5 Ausblick

Zukünftige Studien sollten die Test-Retest-Reliabilität der durchflusszytometrischen Quantifizierung von CECs und EPCs sowie der PAT in einer größeren Studienpopulation testen und dabei weitere kardiovaskuläre Erkrankungen einschließen, die mit endothelialer Dysfunktion einhergehen.

Das Etablieren einer einheitlichen Definition von CECs ist essentiell, um Studienergebnisse vergleichen zu können. Die multizentrische Studie von Lanuti et al. ist ein wichtiger Schritt in diese Richtung.

Da CECs als Biomarker gelten, die Endothelschäden bereits vor dem Auftreten klinischer Symptome anzuzeigen vermögen, wäre außerdem eine Analyse der Reliabilität der CEC-Bestimmung in einer Gruppe mit asymptomatischen Patienten mit nachgewiesener früher endothelialer Dysfunktion im Vergleich zu einer Gruppe asymptomatischer Patienten ohne nachweisbare Endothelschäden hilfreich. Ein solches Studiendesign ließe Rückschlüsse auf die Anwendbarkeit von CECs zum Nachweis von Endothelschäden vor deren klinischer Manifestation zu.

Um die PAT weiter als Messmethode für endotheliale Dysfunktion zu etablieren, sollten zukünftige Studien die Wirkung von kontrollierbaren Einflussfaktoren (z.B. Sympathikotonus, Tageszeit, Medikation) und deren Eliminierung untersuchen.

Darüber hinaus wäre eine übergreifende Analyse der Ergebnisse aus den beiden Test-Retest-Studien vielversprechend, da hierüber ein Vergleich der Quantifizierung von Endothelschäden mittels Biomarkern gegenüber einer funktionellen Messung möglich wäre.

In Zukunft ist möglicherweise eine Differenzierung des Ursprungsortes von CECs anhand ihres Oberflächenprofils möglich. Da sich die Antigenexpression von Endothelzellen

sowohl innerhalb des selben Organs wie auch zwischen verschiedenen Organen unterscheidet [47], erscheint eine differenzierte Analyse von CECs basierend auf dem Phänotyp sinnvoll. Eine solche Subanalyse könnte eine präzise Zuordnung von CECs zum tatsächlichen Ort des zugrundeliegenden Endothelschadens ermöglichen.

4.6 Schlussfolgerung

In den beschriebenen Studien konnten wir ein Markerprofil zur durchflusszytometrischen Quantifizierung von CECs und EPCs etablieren. Obwohl die Test-Retest-Reliabilität der CEC-Quantifizierung niedrig war, glauben wir, dass CECs im Vergleich zu EPCs der vielversprechendere Biomarker zur Früherkennung von Endothelschäden ist.

Die schlechte Reliabilität weist auf die hohe biologische Variabilität insbesondere bei fortgeschrittenem Endothelschaden hin.

Des Weiteren haben wir eine sehr gute bis gute Test-Retest-Reliabilität der PAT bei Patienten mit diabetischer Nephropathie sowie eine gute bis moderate Test-Retest-Reliabilität bei Patienten mit HFrEF und HFpEF festgestellt. Dies unterstreicht das Potenzial dieser Methode.

Grundsätzlich sind Maßnahmen zur frühzeitigen Erkennung der endothelialen Dysfunktion und somit zur Verhinderung von Folgekrankheiten sinnvoll und wünschenswert. Eine Grundvoraussetzung für die Etablierung nicht-invasiver Methoden im Klinikalltag ist eine zuverlässige und sensitive Messung.

Die Erfassung der Test-Retest-Reliabilität stellt hier eine wichtige Grundlage dar, um die klinische Anwendung der diskutierten Parameter auf den Weg zu bringen.

Literaturverzeichnis

1. Farinacci M, Krahn T, Dinh W, Volk HD, Dungen HD, Wagner J, Konen T, von Ahsen O. Circulating endothelial cells as biomarker for cardiovascular diseases. *Res Pract Thromb Haemost*. 2019;3(1):49-58.
2. Buescher J, Weisrock F, Fritschka M, Beckmann S, Litmeier S, Tahirovic E, Radenovic S, Busjahn A, Krahn T, Dinh W, Duengen HD. Test-Retest Reliability of Flow-Cytometric Quantification of Circulating Endothelial Cells and Endothelial Progenitor Cells in Cardiovascular Diseases. *Int J Cardiovasc Res*. 2021;10(4).
3. Weisrock F, Fritschka M, Beckmann S, Litmeier S, Wagner J, Tahirovic E, Radenovic S, Zelenak C, Hashemi D, Busjahn A, Krahn T, Pieske B, Dinh W, Dungen HD. Reliability of peripheral arterial tonometry in patients with heart failure, diabetic nephropathy and arterial hypertension. *Vasc Med*. 2017;22(4):292-300.
4. Rajendran P, Rengarajan T, Thangavel J, Nishigaki Y, Sakthisekaran D, Sethi G, Nishigaki I. The vascular endothelium and human diseases. *Int J Biol Sci*. 2013;9(10):1057-69.
5. Blann AD. Endothelial cell activation, injury, damage and dysfunction: separate entities or mutual terms? *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2000;11(7):623-30.
6. Jokinen E. Obesity and cardiovascular disease. *Minerva Pediatr*. 2015;67(1):25-32.
7. Poredos P, Jezovnik MK. Testing endothelial function and its clinical relevance. *J Atheroscler Thromb*. 2013;20(1):1-8.
8. Blann AD, Woywodt A, Bertolini F, Bull TM, Buyon JP, Clancy RM, Haubitz M, Hebbel RP, Lip GY, Mancuso P, Sampol J, Solovey A, Dignat-George F. Circulating endothelial cells. Biomarker of vascular disease. *Thromb Haemost*. 2005;93(2):228-35.
9. Wu H, Chen H, Hu PC. Circulating endothelial cells and endothelial progenitors as surrogate biomarkers in vascular dysfunction. *Clin Lab*. 2007;53(5-6):285-95.
10. Al-Qaisi M, Kharbanda RK, Mittal TK, Donald AE. Measurement of endothelial function and its clinical utility for cardiovascular risk. *Vasc Health Risk Manag*. 2008;4(3):647-52.
11. Nohria A, Gerhard-Herman M, Creager MA, Hurley S, Mitra D, Ganz P. Role of nitric oxide in the regulation of digital pulse volume amplitude in humans. *J Appl Physiol* (1985). 2006;101(2):545-8.

12. Bonetti PO, Pumper GM, Higano ST, Holmes DR, Jr., Kuvin JT, Lerman A. Noninvasive identification of patients with early coronary atherosclerosis by assessment of digital reactive hyperemia. *J Am Coll Cardiol.* 2004;44(11):2137-41.
13. Hamburg NM, Keyes MJ, Larson MG, Vasani RS, Schnabel R, Pryde MM, Mitchell GF, Sheffy J, Vita JA, Benjamin EJ. Cross-sectional relations of digital vascular function to cardiovascular risk factors in the Framingham Heart Study. *Circulation.* 2008;117(19):2467-74.
14. Rubinshtein R, Kuvin JT, Soffler M, Lennon RJ, Lavi S, Nelson RE, Pumper GM, Lerman LO, Lerman A. Assessment of endothelial function by non-invasive peripheral arterial tonometry predicts late cardiovascular adverse events. *Eur Heart J.* 2010;31(9):1142-8.
15. McCrea CE, Skulas-Ray AC, Chow M, West SG. Test-retest reliability of pulse amplitude tonometry measures of vascular endothelial function: implications for clinical trial design. *Vasc Med.* 2012;17(1):29-36.
16. Sauder KA, West SG, McCrea CE, Campbell JM, Jenkins AL, Jenkins DJ, Kendall CW. Test-retest reliability of peripheral arterial tonometry in the metabolic syndrome. *Diab Vasc Dis Res.* 2014;11(3):201-7.
17. Nil M, Schafer D, Radtke T, Saner H, Wilhelm M, Eser P. Reproducibility of peripheral arterial tonometry measurements in male cardiovascular patients. *Eur J Clin Invest.* 2014;44(11):1065-71.
18. Erdbruegger U, Dhaygude A, Haubitz M, Woywodt A. Circulating endothelial cells: markers and mediators of vascular damage. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2010;5(4):294-302.
19. Hill JM, Zalos G, Halcox JP, Schenke WH, Waclawiw MA, Quyyumi AA, Finkel T. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N Engl J Med.* 2003;348(7):593-600.
20. Hristov M, Erl W, Weber PC. Endothelial progenitor cells: isolation and characterization. *Trends Cardiovasc Med.* 2003;13(5):201-6.
21. Goon PK, Boos CJ, Stonelake PS, Blann AD, Lip GY. Detection and quantification of mature circulating endothelial cells using flow cytometry and immunomagnetic beads: a methodological comparison. *Thromb Haemost.* 2006;96(1):45-52.
22. Rafii S. Circulating endothelial precursors: mystery, reality, and promise. *J Clin Invest.* 2000;105(1):17-9.

23. Mancuso P, Antoniotti P, Quarna J, Calleri A, Rabascio C, Tacchetti C, Braidotti P, Wu HK, Zurita AJ, Saronni L, Cheng JB, Shalinsky DR, Heymach JV, Bertolini F. Validation of a standardized method for enumerating circulating endothelial cells and progenitors: flow cytometry and molecular and ultrastructural analyses. *Clin Cancer Res.* 2009;15(1):267-73.
24. Lanuti P, Rotta G, Almici C, Avvisati G, Budillon A, Doretto P, Malara N, Marini M, Neva A, Simeone P, Di Gennaro E, Leone A, Falda A, Tozzoli R, Gregorj C, Di Cerbo M, Trunzo V, Mollace V, Marchisio M, Miscia S. Endothelial progenitor cells, defined by the simultaneous surface expression of VEGFR2 and CD133, are not detectable in healthy peripheral and cord blood. *Cytometry A.* 2016;89(3):259-70.
25. Woywodt A, Goldberg C, Scheer J, Regelsberger H, Haller H, Haubitz M. An improved assay for enumeration of circulating endothelial cells. *Ann Hematol.* 2004;83(8):491-4.
26. Kachamakova-Trojanowska N, Bukowska-Strakova K, Zukowska M, Dulak J, Jozkowicz A. The real face of endothelial progenitor cells - Circulating angiogenic cells as endothelial prognostic marker? *Pharmacol Rep.* 2015;67(4):793-802.
27. Boos CJ, Lip GY, Blann AD. Circulating endothelial cells in cardiovascular disease. *J Am Coll Cardiol.* 2006;48(8):1538-47.
28. Schmidt DE, Manca M, Hofer IE. Circulating endothelial cells in coronary artery disease and acute coronary syndrome. *Trends Cardiovasc Med.* 2015;25(7):578-87.
29. Shantsila E, Watson T, Lip GY. Endothelial progenitor cells in cardiovascular disorders. *J Am Coll Cardiol.* 2007;49(7):741-52.
30. Valgimigli M, Rigolin GM, Fucili A, Porta MD, Soukhomovskaia O, Malagutti P, Bugli AM, Bragotti LZ, Francolini G, Mauro E, Castoldi G, Ferrari R. CD34+ and endothelial progenitor cells in patients with various degrees of congestive heart failure. *Circulation.* 2004;110(10):1209-12.
31. Nonaka-Sarukawa M, Yamamoto K, Aoki H, Nishimura Y, Tomizawa H, Ichida M, Eizawa T, Muroi K, Ikeda U, Shimada K. Circulating endothelial progenitor cells in congestive heart failure. *Int J Cardiol.* 2007;119(3):344-8.
32. Lanuti P, Simeone P, Rotta G, Almici C, Avvisati G, Azzaro R, Bologna G, Budillon A, Di Cerbo M, Di Gennaro E, Di Martino ML, Diodato A, Doretto P, Ercolino E, Falda A, Gregorj C, Leone A, Losa F, Malara N, Marini M, Mastroberto P, Mollace V, Morelli M, Muggianu E, Musolino G, Neva A, Pierdomenico L, Pinna S, Piovani G, Roca MS, Russo D, Scotti L, Tirindelli MC, Trunzo V, Venturella R, Vitagliano C, Zullo F,

- Marchisio M, Miscia S. A standardized flow cytometry network study for the assessment of circulating endothelial cell physiological ranges. *Sci Rep*. 2018;8(1):5823.
33. Duda DG, Cohen KS, Scadden DT, Jain RK. A protocol for phenotypic detection and enumeration of circulating endothelial cells and circulating progenitor cells in human blood. *Nat Protoc*. 2007;2(4):805-10.
34. Chieriegato K, Bernardi M, Alghisi A, Giordano R, Lazzari L, Perbellini O, Rassu M, Ruggeri M, Astori G. A flow cytometric assay for the quantification of MSC lysis by peripheral blood mononucleated cells. *Heliyon*. 2021;7(2):e06036.
35. Aghaeepour N, Simonds EF, Knapp D, Bruggner RV, Sachs K, Culos A, Gherardini PF, Samusik N, Fragiadakis GK, Bendall SC, Gaudilliere B, Angst MS, Eaves CJ, Weiss WA, Fantl WJ, Nolan GP. GateFinder: projection-based gating strategy optimization for flow and mass cytometry. *Bioinformatics*. 2018;34(23):4131-3.
36. Axtell AL, Gomari FA, Cooke JP. Assessing endothelial vasodilator function with the Endo-PAT 2000. *J Vis Exp*. 2010(44).
37. Koo TK, Li MY. A Guideline of Selecting and Reporting Intraclass Correlation Coefficients for Reliability Research. *J Chiropr Med*. 2016;15(2):155-63.
38. Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet*. 1986;1(8476):307-10.
39. Almici C, Skert C, Verardi R, Di Palma A, Bianchetti A, Neva A, Braga S, Malagola M, Turra A, Marini M, Russo D. Changes in circulating endothelial cells count could become a valuable tool in the diagnostic definition of acute graft-versus-host disease. *Transplantation*. 2014;98(7):706-12.
40. Martinez-Sales V, Sanchez-Lazaro I, Vila V, Almenar L, Contreras T, Reganon E. Circulating endothelial cells in patients with heart failure and left ventricular dysfunction. *Dis Markers*. 2011;31(2):75-82.
41. Jacques N, Vimond N, Conforti R, Griscelli F, Lecluse Y, Laplanche A, Malka D, Vielh P, Farace F. Quantification of circulating mature endothelial cells using a whole blood four-color flow cytometric assay. *J Immunol Methods*. 2008;337(2):132-43.
42. Ryder JR, O'Connell MJ, Rudser KD, Fox CK, Solovey AN, Hebbel RP, Kelly AS. Reproducibility of circulating endothelial cell enumeration and activation in children and adolescents. *Biomark Med*. 2016;10(5):463-71.
43. Del Bo C, Deon V, Porrini M, Campolo J, Parolini M, Riso P. Intra- and interday repeatability of peripheral arterial function: suitability and potential limitations. *Microcirculation*. 2016;23(7):503-11.

44. Liu J, Wang J, Jin Y, Roethig HJ, Unverdorben M. Variability of peripheral arterial tonometry in the measurement of endothelial function in healthy men. *Clin Cardiol.* 2009;32(12):700-4.
45. Hamburg NM, Palmisano J, Larson MG, Sullivan LM, Lehman BT, Vasan RS, Levy D, Mitchell GF, Vita JA, Benjamin EJ. Relation of brachial and digital measures of vascular function in the community: the Framingham heart study. *Hypertension.* 2011;57(3):390-6.
46. Hamada S, Oono A, Ishihara Y, Hasegawa Y, Akaza M, Sumi Y, Inoue Y, Izumiyama H, Hirao K, Isobe M, Sasano T. Assessment of vascular autonomic function using peripheral arterial tonometry. *Heart Vessels.* 2017;32(3):260-8.
47. Aird WC. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms. *Circ Res.* 2007;100(2):158-73.

Anteilerklärung/eidesstattliche Versicherung

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Josephine Büscher (geb. Wagner) versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: ‚Test-retest-Reliabilität von zirkulierenden Endothelzellen und peripherer Pulsamplituden-Tonometrie zur Quantifizierung von endothelialer Dysfunktion‘ 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/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilerklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

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

Datum

Unterschrift

Anteilerklärung an den erfolgten Publikationen

Josephine Büscher hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1:

Maura Farinacci, Wilfried Dinh, Hans-Dieter Volk, Hans-Dirk Düngen, Josephine Wagner, Timo Konen, Oliver von Ahsen, Circulating endothelial cells as biomarker for cardiovascular diseases, Research and practice in thrombosis and haemostasis, 2018

Beitrag im Einzelnen:

Als Teil eines 4-köpfigen Teams rekrutierte ich zusammen mit den anderen 3 Mitarbeitern, zu ungefähr gleichen Teilen, die notwendigen ca. 100 Patienten. Identifiziert wurden sie initial in einer Datenbank des Kompetenzzentrum Herzinsuffizienz am Campus Virchow Klinikum und auf der kardiologischen Station, die ich regelmäßig besuchte.

Im Verlauf war ich für jegliche Korrespondenz mit den Studienteilnehmern verantwortlich (Terminierung der Visiten, Koordination der Aufwandsentschädigung, Erhebung aller Daten).

Beide Studienvisiten liefen gleichermaßen ab und ich habe jeweils die Blutentnahmen und Verarbeitung der Proben für die CEC-Messungen gemäß Protokoll durchgeführt.

Daraufhin folgte immer (bei Raumtemperatur) der zeitnahe Transport ins Bayer Labor, den ich mit der zuständigen Mitarbeiterin im Labor terminierte. Dort wurden die Proben weiter analysiert. Die erhobenen Messwerte kamen unmittelbar zu mir zurück und ich trug diese in eine Online-Datenbank ein, auf die unser Statistiker für weitere Analysen zugreifen konnte.

Für die Publikation habe ich den ersten Abschnitt des Methodik-Teils geschrieben (,subjects and sample collection'), außerdem habe ich die Tabelle S1 erstellt.

Mit der Erstautorin war ich während des Schreibprozesses in regem Austausch. Wir erörterten die Bedeutung der Ergebnisse. Schließlich las ich Korrektur, verbesserte stellenweise und ergänzte, wenn nötig.

Publikation 2:

Josephine Büscher, Fabian Weisrock, Max Fritschka, Sebastian Beckmann, Simon Litmeier, Elvis Tahirovic, Sara Radenovic, Andreas Busjahn, Thomas Krahn, Wilfried Dinh, Hans-Dirk Düngen, Test-retest reliability of flow-cytometric quantification of circulating endothelial cells and endothelial progenitor cells in cardiovascular diseases, International Journal of Cardiovascular Research, 2021

Beitrag im Einzelnen:

Zu Beginn der Studie war ich maßgeblich an der Rekrutierung der Probanden und Probandinnen beteiligt. Hierbei konnte ich auf die Datenbank des Instituts zurückgreifen. Außerdem konnte ich Patienten und Patientinnen von Station rekrutieren. Dies erfolgte überwiegend persönlich-mündlich, teilweise telefonisch.

Als erstes führte ich dann die Screening-Visite alleine durch. Ich habe zunächst Basis-Parameter erhoben (Größe, Gewicht, Blutdruck, Medikation, Suchtmittelkonsum etc.). Lediglich für weitere Studienzwecke wurde eine Herz-Ultraschall Untersuchung durch einen Arzt durchgeführt, die ich koordinierte und terminierte. Die Visiten 1 und 2 liefen gleich ab, ich führte hier die Blutentnahmen durch (jeweils 2 Heparin- und ein EDTA Röhrchen, wobei das erste Heparin Röhrchen verworfen wurde). Danach brachte ich das Blut ins Bayer-Labor, wo die Proben weiteren Analysen unterzogen wurden. Mittels Flowzytometrie wurde die Anzahl der zirkulierenden Endothelzellen und endothelialen Progenitorzellen ermittelt. Diese Zahlen trug ich dann in die Online Datenbank ein, sodass die Rohdaten der Statistik durch Dr. Andreas Busjahn erstellt werden konnten.

Das Manuskript habe ich alleine verfasst. Korrekturen erfolgten durch Prof. Hans-Dirk Düngen und die Co-Autoren. Basierend auf den Rohdaten habe ich alle Tabellen und Darstellungen selbst erstellt. Die statistische Auswertung der Daten erfolgte selbstständig durch mich.

Beim Publikationsprozess war ich die Korrespondenzadresse, immer in Absprache mit meinem Doktorvater Prof. Düngen.

Publikation 3:

Fabian Weisrock, Max Fritschka, Sebastian Beckmann, Simon Litmeier, Josephine Wagner, Elvis Tahirovic, Sara Radenovic, Christine Zelenak, Diawid Hashemi, Andreas Busjahn, Thomas Krahn, Burkert Pieske, Wilfried Dinh, Hans-Dirk Dungen, Reliability of peripheral arterial tonometry in patients with heart failure, diabetic nephropathy and arterial hypertension, *Vascular Medicine*, 2017

Beitrag im Einzelnen:

Analog zu den anderen beiden Artikeln war ich auch hier als Teil eines 4-köpfigen studentischen Teams gleichwertig daran beteiligt (zu ungefähr 25%) die komplette Kommunikation mit den Studienteilnehmern durchzuführen (Rekrutierung, Einschluss/Ausschluss prüfen, Abwicklung der Aufwandsentschädigung, Terminierung der Visiten).

Bei den Screening- und Studienvisiten übernahm ich alle nicht-ärztlichen Tätigkeiten (Erhebung anamnestischer Daten, EndoPat-Messung) zu einem großen Teil (ca 30%).

Im Anschluss an alle Messungen habe ich die erhobenen Daten inklusive der EndoPat Messwerte in eine online Datenbank eingespeist, auf die unser Statistiker Zugriff hatte.

Bevor der Schreibprozess losging, verfasste ich stichpunktartig die Einleitung und den Methodik-Teil und präsentierte dies der Arbeitsgruppe.

Das Manuskript selbst wurde dann vom Erstautor erstellt.

Während des Schreibprozesses war ich begleitend tätig, indem ich die vom Erstautor verfassten Tabellen und Graphiken überarbeitete. Die Idee zu Abbildung 1 kam von mir, der Erstautor setzte sie um. Weiterhin gab es im Rahmen der Arbeitsgruppe einige Treffen, bei der wir uns gemeinsam auf den Inhalt des Ergebnis- und Diskussionsteil einigten.

Unterschrift, Datum und Stempel des/der erstbetreuenden Hochschullehrers/in

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

Druckexemplare der Publikation

Farinacci M, Krahn T, Dinh W, Volk HD, Dungen HD, **Wagner J**, Konen T, von Ahsen O. Circulating endothelial cells as biomarker for cardiovascular diseases. Res Pract Thromb Haemost. 2019;3(1):49-58.

<https://doi.org/10.1002/rth2.12158>



Test-Retest Reliability of Flow-Cytometric Quantification of Circulating Endothelial Cells and Endothelial Progenitor Cells in Cardiovascular Diseases

Josephine Buescher^{1*}, Fabian Weisrock¹, Max Fritschka², Sebastian Beckmann¹, Simon Litmeier¹, Elvis Tahirovic¹, Sara Radenovic¹, Andreas Busjahn³, Thomas Krahn⁴, Wilfried Dinh^{5†} and Hans-Dirk Duengen^{1†}

Abstract

Circulating Endothelial Cells (CECs) and Endothelial Progenitor Cells (EPCs) are gaining importance as quantifiable surrogate biomarkers of Endothelial Dysfunction (ED). Lack of a common definition and consequently, a standardized quantification method has limited clinical applicability of these biomarkers. A reliable, reproducible, and practicable method is required to achieve the full potential of these parameters. The objective of this study was to evaluate the test-retest reliability over a short period of time (~7 days) of flow cytometric quantification of CECs and EPCs in human whole blood from patients with cardiovascular disease. 100 patients (mean age 65 years ± 10 years, 30 women) were enrolled into a prospective study consisting of 4 patients groups: Heart Failure with reduced Ejection Fraction (HFpEF; n=25), Heart Failure with preserved Ejection Fraction (HFpEF; n=26), Diabetic Nephropathy (DN; n=25), and Hypertension (HTN; n=24). In addition, 11 healthy volunteers were included as a control group. At 2 study visits, a blood sample was drawn, which underwent an identical sequence of preparation and analysis. CECs (DNA+, CD45 dim, CD31+, and CD146+) and EPCs (CD45 dim, CD34 br, CD133+, and CD31+, FSC low-medium, SSC low) were counted *via* Flow cytometry. To assess short-term test retest reliability, correlation (intraclass correlation) and agreement (Bland-Altman plot) of the measurements obtained at the 2 study visits were evaluated. Across all patients, median CECs/ml and EPCs/ml were 12 (5th/95th percentile: 6/22) and 679 (447/1281) at visit 1 and were 11 (6/24) and 736 (510/1105) at visit 2, respectively; Intraclass Correlation (ICC) was poor for CEC count (0.106; ICC-95% CI-0.08–0.29) and good for EPC count (0.9; 0.86–0.93). In patients with HFpEF, ICC was poor for CEC count (0.294; 95% CI-0.08–0.6) and moderate in strength for EPC count (0.694; 0.43–0.85). In patients with HFpEF, ICC was poor for CEC count (0.076; -0.32–0.45) and excellent in strength for EPC count (0.946; 0.88–0.98). In patients with DN, ICC was poor for CEC count (-0.031; -0.44–0.37) and excellent in strength for EPC count (0.946; 0.88–0.98). In patients with HTN, ICC was poor for CEC count (0.143; -0.27–0.51) and moderate in strength for EPC count (0.668; 0.37–0.84). In healthy controls, ICC was poor for CEC count (0.378;

-0.26–0.78) and good in strength for EPC count (0.846; 0.59–0.96). A Bland-Altman plot showed a positive correlation of variations of differences and increasing median CEC counts; there were no distinct trends for median EPC counts. Our analyses indicate that flow cytometric quantification of EPC concentrations is reliable in patients with HFpEF, HFpEF, DN, and HTN. Quantification of CEC concentrations showed poor test-retest reliability across all patient groups. Further research is necessary to elucidate the nature of this finding, which could be due to higher biological variability in patients with severe ED. Clinical Trial Registration Identifier: NCT02299960

Keywords

Circulating endothelial cells, Endothelial progenitor cells, Cardiovascular disease, Endothelial dysfunction, Heart failure, Diabetic nephropathy, Hypertension, Test-retest reliability

Abbreviations: CEC: Circulating Endothelial Cell; CI: Confidence Interval; CTRL: Control; DN: Diabetic Nephropathy; ED: Endothelial Dysfunction; EPC: Endothelial Progenitor Cell; HFpEF: Heart Failure with Preserved Ejection Fraction; HFpEF: Heart Failure with Reduced Ejection Fraction; HTN: Hypertension; ICC: Intraclass Correlation; LoA95: 95% Limits of Agreement; PMNC: Peripheral Mononuclear Cell; UACR: Urine Albumin to Creatinine Ratio.

Introduction

The endothelium has a pivotal role not just in establishing the functional integrity of the vasculature, but also in the regulation of blood pressure, coagulation, and leukocyte migration. Among a myriad of different conditions, a dysfunction of the endothelial vessel layer is associated with Cardiovascular Diseases (CVD) as well as their pathophysiologic drivers such as hypertension, diabetes mellitus, and atherosclerosis [1-3]. Endothelial Dysfunction (ED) has been shown to be integral for both the pathogenesis and the progression of CVD [4]. A measurable ED often precedes the onset of symptoms of these diseases and its complications, such as congestive heart failure, myocardial infarction, stroke, kidney disease, and pulmonary hypertension [1,5,6]. Therefore, reliable and accurate assessment and quantification of ED has considerable potential as a diagnostic, therapeutic, and a prognostic parameter.

Circulating Endothelial Cells (CECs) and circulating Endothelial Progenitor Cells (EPCs) have been described as promising biological markers of ED [1,5,7,8]. CECs are desquamated endothelial cells that detach in response to either mechanical vessel injury or as a result of impaired cellular adhesion [8]. EPCs, on the other hand, are derived from the bone marrow and play an important role in the maintenance of endothelial integrity and hemostasis as they proliferate at the site of vessel injury and can differentiate into mature endothelial cells. While CECs reflect endothelial injury, EPCs indicate endothelial recovery; Thus, the two types of cells are believed to represent different aspects of the spectrum of ED [2]. EPCs can be further differentiated into early and late EPCs based on their maturation stage.

The two most widely used methods for measurement of CECs and EPCs are immune magnetic separation and flow cytometry, both of which rely on the expression of different cell surface markers [9]. Polychromatic flow cytometry is currently considered the most sensitive method for quantification of CECs [10].

*Corresponding author: Josephine Buescher, Department of Cardiology, Charité Universitätsmedizin, Campus Virchow-Klinikum, Berlin, Germany E-mail: josephine.wagner@charite.de

† Authors have contributed equally

Received Date: November 21, 2020; Accepted Date: February 25, 2021; Published Date: March 05, 2021



The reliable identification of the cell lines is challenging, as they share some of their cell surface antigens among each other as well as with many other circulating cells and the expressed antigens vary throughout the life cycle of these cells [11,12]. Typically, a combination of cell surface markers is used for their definition because no single cell surface marker is fully specific. Although various marker profiles have been proposed for standardization, detection methods and reported counts vary greatly across different laboratories and exact definitions remain controversial [13-15].

Because the endothelial lining is regularly renewed, levels of CECs are very low (~10 CECs/ml) in healthy individuals, making the release of these cells a rare event [1]. In CVD, CEC count is increased significantly (often exceeding 100 CECs/ml) [1]. EPCs, in contrast, are typically decreased in advanced CVD such as coronary artery disease and severe congestive heart failure, reflecting an impaired ability of vascular recovery [6,16]. In mild congestive heart failure, on the other hand, EPCs are increased presumably reflecting increased recruitment of progenitor cells from the bone marrow [17,18].

Though numerous studies have been published that praise the potential of CECs as a biomarker of endothelial injury, the lack of common definitions and the difficulty of quantifying CECs and EPCs reliably has so far limited their application in clinical practice [10]. A prerequisite for the transfer of this method from the laboratory to clinics is a reproducible, reliable, and practicable approach for identifying and quantifying endothelial dysfunction based on these cell counts.

Recently, our group reported a novel, robust, reproducible flow cytometric approach of quantifying CECs (DNA+, CD45 dim, CD31+, and CD146+) and EPCs (CD45 dim, CD34 br, CD133+, and CD31+, FSC low-medium, SSC low) from whole blood in healthy volunteers and in patients with cardiovascular diseases. We found significantly increased CEC counts in patients with cardiovascular diseases compared to healthy volunteers, while EPC counts were similar to healthy individuals [19].

To the best of our knowledge, no data have been reported concerning the test-retest reliability of flow cytometric enumeration of CECs or EPCs in adult patients with CVD. In addition, there are no available studies about the biological variability of CEC and EPC counts, which impacts test-retest reliability, in patients with CVD. Lastly, limited data are available about disease-specific CEC/EPC counts in general.

We are now reporting the results of the first test-retest reliability study of flow cytometric quantification of CECs/EPCs in four separate patient groups over a short (~7 days) time span: Heart Failure with Preserved Ejection Fraction (HFpEF), Heart Failure with Reduced Ejection Fraction (HFrEF), Diabetic Nephropathy (DN), and hypertension without structural cardiovascular damage (HTN). All of these conditions have been shown to be associated with endothelial dysfunction [20-23]. To assess test-retest reliability, we evaluated intra class correlation as well as agreement. We hypothesized this method would demonstrate a high short-term test-retest reliability, indicating that CEC/EPC count could serve as a stable biomarker of endothelial dysfunction.

Materials and Methods

Study design

We performed a prospective, single-center, investigator-initiated test-retest study in 100 patients with HFpEF, HFrEF, DN, and HTN

and 11 age-matched healthy volunteers. The study protocol and amendments were approved by the Medical Ethics Committee of Charité –University Medicine Berlin. All subjects provided written informed consent prior to participation in the trial. All procedures related to the trial conformed to the principles outlined in the Helsinki Declaration and ICH-GCP. This trial is registered at clinicaltrials.gov under clinical trials number NCT02299960.

Patient selection

Patients were recruited using the database of the study center, from the Charité Center for cardiovascular diseases, and from outpatient clinics between August 2014 and September 2015. A partially different subset of the patient cohort has been described previously [19,24]. In summary, inclusion criteria were age 35 years–80 years and absence of clinical symptoms for 4 weeks (HFpEF, DN, and HTN) and 7 days (HFrEF) prior to screening. Exclusion criteria were symptomatic coronary artery disease, recent (<3 months) myocardial infarction or stroke, complex congenital heart disease, valvular defects, cardiac arrhythmia, active myocarditis, significant respiratory disease, change of medications during the course of the study, recent implementation of cardiac resynchronization therapy or a cardiac pacemaker, uncontrolled hypertension (systolic blood pressure >180 mmHg; diastolic blood pressure >95 mmHg), current participation in a rehabilitation program, significant anemia (hemoglobin concentration <10 mg/dl), untreated symptomatic thyroid disease, and known malignancy or any other disease with a life expectancy of less than one year. Detailed inclusion and exclusion criteria can be found under the registered trial number.

171 potentially eligible patients were screened based on the criteria described above, of which 71 were excluded and 101 were included in the study. One patient dropped out of the study after the baseline screening assessment, leaving 100 patients, who were subsequently divided into four study groups based on additional criteria:

1. 26 patients with HFpEF based on the modified criteria suggested by Paulus et al. with symptomatic heart failure NYHA I-III at least three months prior to screening, sinus rhythm, and capability to perform spirometry [25].
2. 25 patients with HFrEF based on LVEF <45% as measured through echocardiography. Patients showed symptoms of heart failure (NYHA I-III) at least 30 days prior to screening. Underlying causes of heart failure included ischemic and nonischemic etiologies.
3. 25 patients with DN based on the presence of type 2 diabetes mellitus and intake of oral antidiabetic medication or insulin. Further criteria were GFR <90 ml/min/1.73 m² (CKD-EPI), macroalbuminuria (Urine Albumin to Creatinine Ratio (UACR) >300 mg/g creatinine) or microalbuminuria (UACR 30 mg/g–300 mg/g creatinine).
4. 24 patients with HTN without clinical or echocardiographic evidence of structural heart disease (ejection fraction >55%, no clinical signs for coronary heart disease or HFpEF, stable antihypertensive medication, and systolic blood pressure during screening visits <140 mmHg).

In addition, 11 healthy volunteers were enrolled at Clinical Research Services Berlin GmbH.

Each patient underwent a baseline screening assessment and two study visits: visit 1 (V1, 0 days–7 days after baseline assessment) and visit 2 (V2, 4 days–14 days after visit 1). On study visit days, patients were instructed to take their home medication as usual. V1 and V2 each included a physical examination, vital sign measurement, and

Citation: Buescher J, Weisrock F, Frischka M, Beckmann S, Simon I, et al. (2021) Test-Retest Reliability of Flow-Cytometric Quantification of Circulating Endothelial Cells and Endothelial Progenitor Cells in Cardiovascular Diseases. *Int J Cardiovasc Res* 10:4.

taking peripheral venous blood samples under the same conditions. The median time between the two measurements was 7 days. Baseline clinical characteristics, medications, and laboratory parameters of patients at the baseline screening assessment are shown in Tables 1 and 2.

Table 1: Characteristics, medications, and laboratory parameters of enrolled patients at baseline screening assessment. Values are mean \pm SD, median and 25th/75th percentile, or n (%). P-values represent the analysis of variance. HFpEF: Heart Failure with preserved Ejection Fraction; HFrEF: Heart Failure with reduced Ejection Fraction; DN: Diabetic Nephropathy; HTN: Arterial Hypertension; CTRL: Control; BMI: Body Mass Index; HR: Heart Rate; BP: Blood Pressure; NYHA: New York Heart Association; LVEF: Left Ventricular Ejection Fraction; LAVI: Left Atrial Volume Index; LVMI: Left Ventricular Mass Index; E/E': Ratio between early mitral inflow velocity (E) and mitral annular early diastolic velocity (E'); ACE: Angiotensin-Converting Enzyme; eGFR: Estimated Glomerular Filtration Rate; HbA1c: Glycosylated Hemoglobin A1c; NTproBNP: N-terminal Prohormone Of Brain Natriuretic Peptide; TSH: Thyroid-Stimulating Hormone; HDL: High-Density Lipoprotein; LDL: Low-Density Lipoprotein; TAG: Triacylglycerides.

Variable	All (n=100)	HFpEF (n=26)	HFrEF (n=25)	DN	HTN (n=24)	CTRL (n=11)	p
				(n=25)			
Age (years)	65 \pm 10	69 \pm 8	62 \pm 11	70 \pm 9	59 \pm 7	56 \pm 3	0.001
Female	30 (30%)	11 (42%)	5 (25%)	4 (16%)	10 (42%)	6 (55%)	0.076
BMI	29 \pm 5	28 \pm 4	29 \pm 4	31 \pm 5	29 \pm 6	24 \pm 4	0.233
HR (bpm)	70 \pm 13	69 \pm 13	69 \pm 10	74 \pm 16	69 \pm 10	-	0.378
BPsys (mmHg)	134 \pm 20	137 \pm 22	127 \pm 22	140 \pm 19	130 \pm 14	-	0.114
BPdia (mmHg)	80 \pm 11	78 \pm 10	78 \pm 12	79 \pm 12	86 \pm 8	-	0.035
NYHA I	15 (15%)	6 (23%)	7 (28%)	2 (8%)	0 (0%)	-	0.001
NYHA II	39 (39%)	16 (62%)	13 (52%)	10 (40%)	0 (0%)	-	
NYHA III	16 (16%)	4 (15%)	5 (20%)	7 (28%)	0 (0%)	-	
LVEF (%)	52 \pm 13	59 \pm 5	35 \pm 8	53 \pm 11	62 \pm 6	-	0.001
LAVI (mL/m ²)	30 \pm 11	36 \pm 10	33 \pm 13	29 \pm 11	22 \pm 4	-	0.001
LVMI (g/m ²)	106 \pm 30	92 \pm 26	126 \pm 31	117 \pm 23	88 \pm 21	-	0.001
E/E'	13 \pm 5	13 \pm 6	14 \pm 5	13 \pm 6	11 \pm 2	-	0.054
Current smoker	17 (17%)	2 (8%)	8 (32%)	5 (20%)	2 (8%)	-	0.075
ACE inhibitor	52 (52%)	12 (46%)	15 (60%)	16 (64%)	9 (38%)	-	0.225
Acetylsalicylic acid	44 (44%)	9 (35%)	15 (60%)	17 (68%)	3 (13%)	-	0.001
Beta blocker	69 (69%)	19 (69%)	24 (96%)	19 (76%)	7 (29%)	-	0.001
Calcium inhibitor	25 (25%)	7 (27%)	2 (8%)	12 (48%)	4 (17%)	-	0.008
Statin	49 (49%)	11 (42%)	15 (60%)	20 (80%)	3 (13%)	-	0.001
Oral antidiabetic	33 (33%)	7 (27%)	2 (8%)	20 (80%)	4 (17%)	-	0.001
Diuretic	53 (53%)	12 (46%)	17 (68%)	17 (68%)	7 (29%)	-	0.015
eGFR (mL/min)	72 \pm 21	77 \pm 15	76 \pm 18	51 \pm 21	85 \pm 10	-	0.001
HbA1c (%)	5.9 (5.5/7.0)	5.8 (5.6/6.2)	5.8 (5.5/6.1)	7.2 (6.5/7.8)	5.4 (5.3/6.0)	-	0.001
NTproBNP (pg/mL)	187 (75/444)	219 (89/372)	459 (224/1,306)	257 (150/930)	62 (42/95)	-	0.001
TSH (μ IU/mL)	1.0 (0.7/1.7)	0.9 (0.8/1.3)	0.8 (0.5/1.5)	1.4 (0.7/2.1)	1.4 (0.9/2.1)	-	0.154
Hemoglobin (g/dL)	14 \pm 2	14 \pm 1	15 \pm 2	14 \pm 1	15 \pm 1	-	0.039
Total cholesterol	182 \pm 49	180 \pm 44	172 \pm 37	172 \pm 52	206 \pm 54	-	0.04
HDL cholesterol (mg/dL)	52 (41/65)	61 (45/67)	51 (43/64)	42 (31/51)	56 (51/72)	-	0.002
LDL cholesterol (mg/dL)	112 \pm 42	106 \pm 44	108 \pm 37	101 \pm 49	134 \pm 28	-	0.021
TAG (mg/dL)	137 (92/193)	123 (91/174)	134 (76/196)	180 (109/309)	137 (105/172)	-	0.207

Citation: Buescher J, Weisrock F, Fritschka M, Beckmann S, Simon I, et al. (2021) Test-Retest Reliability of Flow-Cytometric Quantification of Circulating Endothelial Cells and Endothelial Progenitor Cells in Cardiovascular Diseases. *Int J Cardiovasc Res* 10:4.

Table 2: Correlations between paired measurements (V1 vs. V2) for all patients, individual patient groups, and control group. V1: Visit 1; V2: Visit 2; ICC: Interclass Correlation; CI: Confidence Interval; CEC: Circulating Endothelial Cell; CV: Coefficient of Variability; EPC: Endothelial Progenitor Cell.

Variable	Variable	Variable	Variable	Variable	Variable	Variable
All patients (n=100)						
	CECs/mL	12 (6/22)	11 (6/24)	111	0.106	-0.08–0.29
	EPCs/mL	679 (447/1,281)	736 (510/1,105)	112	0.9	0.86–0.93
Heart failure with preserved ejection fraction (n=26)						
	CECs/mL	16 (9/24)	26 (9/37)	100	0.294	-0.08–0.6
	EPCs/mL	612 (427/906)	719 (537/883)	121	0.694	0.43–0.85
Heart failure with reduced ejection fraction (n=25)						
	CECs/mL	8 (4/24)	10 (4/17)	118	0.076	-0.32–0.45
	EPCs/mL	810 (499/1,514)	783 (524/1,537)	138	0.946	0.88–0.98
Diabetic nephropathy (n=25)						
	CECs/mL	14 (7/33)	14 (7/22)	123	-0.031	-0.44–0.37
	EPCs/mL	674 (464/1,306)	711 (407/1,194)	59	0.946	0.88–0.98
Arterial hypertension (n=24)						
	CECs/mL	10 (5/17)	13 (7/22)	120	0.143	-0.27–0.51
	EPCs/mL	699 (437/1,253)	779 (497/1,114)	119	0.668	0.37–0.84
Control group (n=11)						
	CECs/mL	7 (5/11)	3.1 (1/7)	60	0.378	-0.26–0.78
	EPCs/mL	609 (408/1,169)	841 (519/894)	103	0.864	0.59–0.96

CEC/EPC identification and quantification

CECs and EPCs were assessed in each sample according to the recently published method by Farinacci et al, which showed robust and reproducible cell count results in healthy volunteers as well as in patients with HFpEF, HFrEF, DN, and HTN [19]. In summary, multicolor flow cytometry panels were used to determine the cell counts from whole blood samples using monoclonal antibodies directed at CD31, CD 36, CD45, and CD146 and nuclear staining SYTO [16]. Following previously described protocols, CECs were defined as DNA+, CD45 dim, CD31+ and CD146+,12 and EPCs were defined as CD45 dim, CD34 br, CD133+ and CD31+, FSClow-medium, SSClow [26]. Cell counts were counted in each sample in triplicate to determine a mean count. Counts were then assessed in relation to Peripheral Mononuclear Cells (PMNCs) as CECs/EPCs per PMNC. To calculate absolute CEC/EPC counts (cells/ml), the initial results were multiplied by the absolute PMNC count, which, in turn, was determined through flow-count fluorospheres.

Statistical analysis

All analyses were conducted with RV 3.3.1. Continuous variables with normal distribution are expressed as mean and Standard Deviation (SD). Continuous variables with skewed distribution are summarized as median and 25th/75th percentile unless otherwise specified. Probability was significant at a level of <0.05. Reliability was analyzed as test-retest reliability with Intraclass Correlation (ICC) type II (single random raters), calculated as $(MSB - MSE) / (MSB + (nr - 1) * MSE + nr * (MSJ - MSE) / nc)$ $Sb2 - Sw2 / (Sb2 + Sw2)$ (where $Sb2$ =Between-Subject Variance; $Sw2$ =Within-Subject Variance; MSB =between mean square variance; MSE =variance and Mean Squared Error; MSJ =Mean Square Between Judges). Confidence Intervals (CI) for ICC (ICC-CI) were calculated according to Shrout and Fleiss [27,28]. The mean variability was reported as mean and SD of absolute differences in V1 and V2. For a better comparison of

variabilities, Coefficients of Variation (CVs) were computed based on absolute differences. CVs were calculated as $SD/mean \times 100$ and were reported in percentages. The necessary minimal sample size is based on the expected ICC of $\rho=0.8$ versus $\rho=0.5$, as the minimal ICC of clinical relevance. For interpretation of ICC, we follow the recommendations as proposed by Koo et al., ICC <0.50, 0.5–0.75, 0.75–0.9, and >0.9 indicate poor, moderate, good, and excellent reliability. Data were plotted as scatterplots for V1 vs. V2 with the expected fit, and the estimated linear fit using the nonparametric loess (locally weighted scatterplot smoothing) regression method [29]. Furthermore, Bland-Altman plots were generated depicting the relationship between differences in V1 and V2 and mean (V1/V2) [30]. Bias was calculated as mean (V2-V1). Limits of agreement (LoA95) were calculated as $bias \pm 1.96 * SD (V2 - V1)$ [28].

Results

Median, CV, ICC, and ICC Confidence Interval (ICC-CI) of investigated parameters at V1 and V2 overall as well as for the individual patient groups are displayed.

Across all patients (n=100), median CEC and EPC counts were 12 (5th/95th percentile: 6/22) CECs/ml and 679 (447/1281) EPCs/ml at V1 and 11 (6/24) CECs/ml and 736 (510/1105) EPCs/ml at V2, respectively. Coefficients of variations for CECs/ml and EPCs/ml were 111% and 112%, respectively. Correlations between paired measurements (V1 vs. V2) overall were poor for CEC count (ICC 0.106; 95% confidence interval: -0.08–0.29) and good in strength for EPC count (ICC 0.9; 0.86–0.93).

In patients with HFpEF, median CEC and EPC counts were 16 (9/24) CECs/ml and 612 (427/906) EPCs/ml at V1 and 26 (9/37) CECs/ml and 719 (537/883) EPCs/ml at V2, respectively. Coefficients of variations for CECs/ml and EPCs/ml were 100% and 121%, respectively. Correlations between paired measurements (V1 vs. V2) in this group was poor for CEC count (ICC 0.294; -0.08–0.6) and

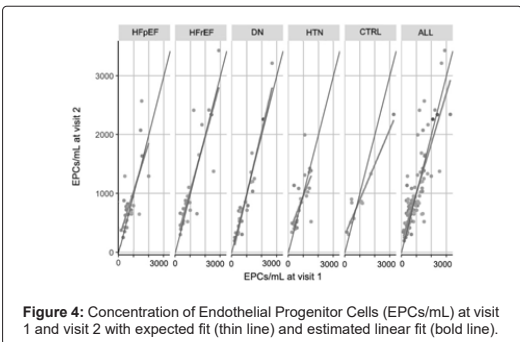
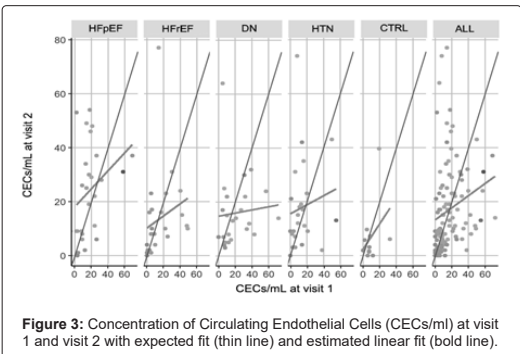
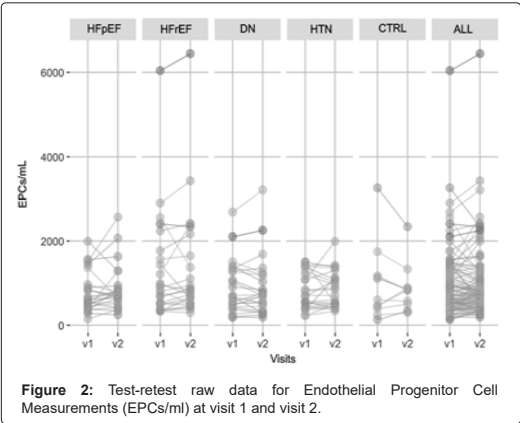
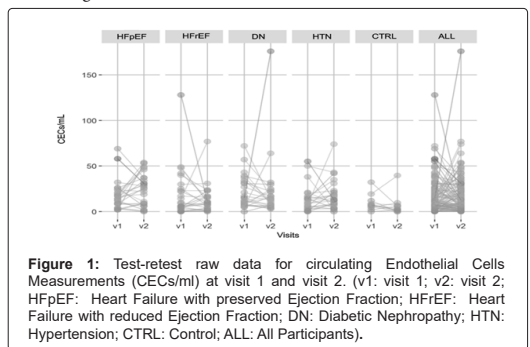
moderate in strength for EPC count (ICC 0.694; 0.43–0.85).

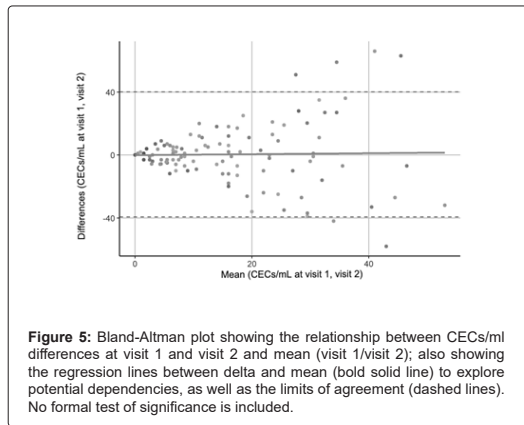
In patients with HFREF, median CEC and EPC counts were 8 (4/24) CECs/ml and 810 (499/1514) EPC/ml at V1 and 10 (4/17) CECs/ml and 783 (524/1537) EPCs/ml at V2, respectively. Coefficients of variations for CECs/ml and EPCs/ml were 118% and 138%, respectively. Correlations between paired measurements (V1 vs. V2) in this group were poor for CEC count (ICC 0.076; -0.32–0.45) and excellent in strength for EPC count (0.946; 0.88–0.98).

In patients with DN, median CEC and EPC counts were 14 (7/33) CECs/ml and 674 (464/1306) EPCs/ml at V1 and 14 (7/22) CECs/ml and 711 (407/1194) EPCs/ml at V2, respectively. Coefficients of variations for CECs/mL and EPCs/ml were 123% and 59%, respectively. Correlations between paired measurements (V1 vs. V2) in this group were poor for CEC count (-0.031; -0.44–0.37) and excellent in strength for EPC count (0.946; 0.88–0.98). In patients with HTN, median CEC and EPC counts were 10 (5/17) CECs/ml and 699 (437/1253) EPCs/ml at V1 and 13 (7/22) CECs/ml and 779 (497/1114) EPCs/ml at V2, respectively. Coefficients of variations for CECs/ml and EPCs/ml were 120% and 119%, respectively. Correlations between paired measurements (V1 vs. V2) in this group were poor for CEC count (0.143; -0.27–0.51) and moderate in strength for EPC counts (0.668; 0.37–0.84).

In healthy controls, CEC and EPC counts were 7 (5/11) CECs/ml and 609 (408/1169) EPCs/ml at V1 and 3 (1/7) CECs/ml and 841 (519/894) EPCs/ml at V2, respectively. Coefficients of variations for CECs/ml and EPCs/ml were 60% and 103%, respectively. Correlations between paired measurements (V1 vs. V2) in this group were poor for CEC count (0.378; -0.26–0.78) and good in strength for EPC counts (0.864; 0.59–0.96).

Test-retest raw data for CECs/ml and EPCs/ml are shown in Figures 1 and 2, respectively. Scatterplots of CECs/ml and EPCs/ml at V1 in relation to V2 are shown in Figures 3 and 4, respectively. For a better overview, the scale of the graphs was reduced and does not show the outliers for CECs and EPCs (see Figures 1 and 2). Bland-Altman plots were conducted for further examination of the differences. In CECs/ml (Figure 5), visual inspection of the plot showed increased variations of differences as the average CEC count increased. The mean difference between V1 and V2 CEC count was 0 CECs/ml \pm 20 CECs/ml overall and the width of LoA95 was -38 CECs/ml to 39 CECs/ml; 94 (94%) patients fell within the 95% limits of agreement. In EPCs/ml, the Bland Altman plot showed no obvious systemic trend. The mean difference between V1 and V2 CEC count was 25 EPCs/ml \pm 360 EPCs/ml overall and the width of LoA95 was -680 EPCs/ml to 731 EPCs/ml; 89 (89%) patients fell within the 95% limits of agreement.





Discussion

In this manuscript, we evaluate the test-retest reliability of flow cytometric quantification of CECs and EPCs in patients with HFpEF, HFrEF, DN, and HTN for the first time. We carried out a prospective, single-center, investigator-initiated study in which we quantified cell counts with a multicolor flow cytometric protocol from whole blood samples taken at separate points in time and following an identical protocol. We subsequently determined the correlation (ICC) and agreement (Bland-Altman plot) to evaluate short-term test-retest reliability.

If measured reliably and accurately, CECs and EPCs can serve as biomarkers of ED. CECs and EPCs have been described as independent predictors of cardiac events [31,32]. As these cell counts change even before the onset of clinical symptoms of cardiovascular events, timely quantification could help predict the morbidity and mortality of cardiovascular diseases, monitor the response to pharmacotherapy, and prevent progression of these conditions [3,33,34].

Lanuti et al. recently reported their results from a standardized multicenter study in which the median CEC counts in healthy patients was 9.31 CECs/ml (5th/95th percentile: 1.85/35.40 CECs/ml) for females and 11.55 CECs/ml (2.53/32.04 CECs/ml) for males, but they defined CECs differently (alive/nucleated/CD45-/CD34 bright/CD146+). While they found that CEC counts in healthy patients remained stable over time (3 months), they described high intra subject and inter subject variability of CEC counts [10]. Ryder et al. reported longitudinally reproducible CEC counts in a cohort of healthy children and adolescents using immune beads, but similarly found high intra subject variability [35].

We observed poor test-retest reliability of CEC counts in all patient groups as well as in the control group as demonstrated by the low ICCs. Given that absolute numbers of CECs are so low even in patients with CVD, little variations obviously have a great effect on correlation and agreement of repeated tests, which limits the accuracy of our analyses. In addition, in patients with CVD, significant CEC elevations are often transient in nature and CEC counts are highest in patients with acute conditions (e.g., acute coronary syndrome, acute heart failure) [21,36]. Such individuals with acute illness were excluded from this study. We found a relatively wide range of CEC concentrations (0 CECs/ml –176 CECs/ml), but with median values

of only 12 CECs/ml (V1) and 11 CECs/ml (V2) and only 5% of values being above 22 CECs/ml, many of the enrolled patients had CEC counts that would be considered within the normal range according to Lanuti et al. Our control group of healthy volunteers, in contrast, had lower median CEC counts of 7 CECs/ml (V1) and 3 CECs/ml (V2), which is comparable to what has been described by other authors [37]. Interestingly, the variability of measured CECs/ml appeared to be proportional to the average CEC count, which suggests the biological variability of CECs is higher in patients with elevated CEC counts. The absolute level of CECs has been found to correlate with the degree of endothelial dysfunction [1,36,38]. Thus, the positive correlation between the absolute count of CECs and their biological variability could be explained by the more widespread endothelial damage found in patients with higher absolute CEC counts, involving multiple vascular sites across the body.

Although we attempted to control for variables known to affect endothelial function (e.g., room temperature, exercise, circadian variations, recent intake of alcohol, caffeine, or tobacco, recent changes in medications), we cannot rule out that these factors have impacted the CEC count.

In contrast to the poor test-retest reliability in CECs, we demonstrated moderate test-retest reliability of EPCs in patients with HFpEF and HTN and excellent test-retest reliability in patients with HFrEF and DN. This confirms the reliability of flow cytometric assessment of EPC counts. Moreover, it supports the applicability of this parameter as a surrogate biomarker of endothelial dysfunction in these conditions.

The relatively small sample size of 24–26 patients per patient group, which was determined based on a comparison against the expected threshold ICC of $\rho=0.8$, limits the generalizability of our findings and the comparison of differences in reliability across the patient groups or in relation to the control group. The limited size of the groups contributes to the wide range of ICC-CIs and high CVs. In addition, we have only evaluated the short-term test-retest reliability (median time between measurements: 7 days) in these patients. Therefore, we cannot draw any conclusions about the long-term test-retest reliability of flow cytometric CEC/EPC quantification.

Further studies should assess the test-retest reliability of flow-cytometric CEC quantification in a larger sample and a broader range of CVDs to investigate the reasons for poor test-retest reliability in more detail. In addition, because CECs are considered as biomarkers for detection of endothelial damage even before it manifests clinically, the test-retest reliability of flow cytometric CEC quantification should further be assessed in a group of asymptomatic individuals with proven early endothelial dysfunction compared to a group of asymptomatic individuals without endothelial dysfunction. Such a study would help to determine the usability of flow-cytometric CEC quantification as a method to detect preclinical vascular injury.

Furthermore, future methods could allow differentiating the phenotype of CECs based on the endothelial bed from which the cells are derived, which would be crucial for a more precise assessment of endothelial function. Considering the functional and antigenic heterogeneity of endothelial cells across different organs and even within an organ, [39] a more differentiated evaluation of CECs might be feasible.

Conclusion

In summary, we evaluated, for the first time, the test-retest reliability of flow-cytometric quantification of CEC and EPC counts. The study showed moderate to excellent test-retest reliability of flow-cytometric quantification of EPCs in patients with HFpEF, HFrEF, DN, and HTN, supporting the use of this biomarker in the context of both research and clinical settings. Reliability of CEC enumeration was poor across these patient groups, possibly owing to the rarity of this cellular event even in patients with CVD. Higher biological variability in patients with elevated CEC counts, possibly reflecting more extensive endothelial dysfunction across the vascular system, might also contribute to the poor test-retest reliability of CECs. Reliable enumeration of these cells is the requirement for clinical application of this method of noninvasive assessment of ED. A significant degree of intra-individual variability would limit the clinical applicability of this diagnostic measure in these patient cohorts.

Relationship disclosures and conflicts of interest

The authors disclose receipt of the following financial support for the research, authorship, and/or publication of this article: The trial was conducted as an investigator-initiated study and supported by an unrestricted grant by Bayer Pharma AG. The study was sponsored by the Charité University Medicine Berlin. The sponsor did not influence trial conduction or interpretation of the data.

The trial was supported by an unrestricted grant by Bayer Pharma AG. The study was sponsored by the Charité University Medicine Berlin. The authors report that conduction of the trial and analysis of the data were not impacted by the sponsoring. M. Farinacci has had a research collaboration contract supported by Bayer AG. T. Krahn is an employee and shareholder of Bayer AG. H.-D. Düngen reports travel grants and personal fees from Bayer AG during the conduct of the study. W. Dinh is employed at Bayer AG. All other authors claim no conflicts of interest.

References

- Boos CJ, Lip GY, Blann AD (2006) Circulating endothelial cells in cardiovascular disease. *J Am Coll Cardiol* 48: 1538-1547.
- Endemann DH, Schiffrin EL. (2004) Endothelial dysfunction. *J Am Soc Nephrol* 15: 1983-1992.
- Poredos P (2002) Endothelial dysfunction and cardiovascular disease. *Pathophysiol Haemost Thromb* 32: 274-277.
- Bonetti PO, Lerman LO and Lerman A (2003) Endothelial dysfunction: A marker of atherosclerotic risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23: 168-175.
- Burger D, Touyz RM (2012) Cellular biomarkers of endothelial health: Microparticles, endothelial progenitor cells, and circulating endothelial cells. *J Am Soc Hypertens* 6: 85-99.
- Schmidt DE, Manca M, Hoefler IE (2015) Circulating endothelial cells in coronary artery disease and acute coronary syndrome. *Trends Cardiovasc Med* 25: 578-587.
- Blann AD, Woywodt A, Bertolini F, Bull TM, Buyon JP, et al. (2005) Circulating endothelial cells. Biomarker of vascular disease. *Thromb Haemost* 93: 228-235.
- Hill JM, Zalos G, Halcox JPJ, Schenke WH, Waclawiw MA, et al. (2003) Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N Engl J Med* 348: 593-600.
- Goon PK, Boos CJ, Stonelake PS, Blann AD, Lip GYH (2006) Detection and quantification of mature circulating endothelial cells using flow cytometry and immunomagnetic beads: A methodological comparison. *Thromb Haemost* 96: 45-52.
- Lanutti P, Simeone P, Rotta G, Almici C, Avvisati G, et al. (2018) A standardized flow cytometry network study for the assessment of circulating endothelial cell physiological ranges. *Sci Rep* 8: 5823.
- Rafii S (2000) Circulating endothelial precursors: mystery, reality, and promise. *J Clin Invest* 105: 17-19.
- Mancuso P, Antoniotti P, Quarna J, Calleri A, Rabascio C, et al. (2009) Validation of a standardized method for enumerating circulating endothelial cells and progenitors: flow cytometry and molecular and ultrastructural analyses. *Clin Cancer Res* 15: 267-273.
- Kachamakova-Trojanowska N, Bukowska-Strakova K, Zukowska M, Dulak J, Jozkowicz A (2015) The real face of endothelial progenitor cells - Circulating angiogenic cells as endothelial prognostic marker? *Pharmacol Rep* 67: 793-802.
- Woywodt A, Goldberg C, Scheer J, Regelsberger H, Haller H, et al. (2004) An improved assay for enumeration of circulating endothelial cells. *Ann Hematol* 83: 491-494.
- Lanutti P, Rotta G, Almici C, Avvisati G, Budillon A, et al. (2016) Endothelial progenitor cells, defined by the simultaneous surface expression of VEGFR2 and CD133, are not detectable in healthy peripheral and cord blood. *Cytometry A* 89: 259-270.
- Shantsila E, Watson T, Lip GY (2007) Endothelial progenitor cells in cardiovascular disorders. *J Am Coll Cardiol* 49: 741-752.
- Valgimigli M, Rigolin GM, Fucili A, Porta MD, Soukhomovskaia O, et al. (2004) CD34+ and endothelial progenitor cells in patients with various degrees of congestive heart failure. *Circulation*; 110: 1209-1212.
- Nonaka-Sarukawa M, Yamamoto K, Aoki H, Nishimura Y, Tomizawa H, et al. (2007) Circulating endothelial progenitor cells in congestive heart failure. *Int J Cardiol* 119: 344-348.
- Farinacci M, Krahn T, Dinh W, Volk HD, Dungen HD, et al. (2018) Circulating endothelial cells as biomarker for cardiovascular diseases. *Res Pract Thromb Haemost* 3: 49-58.
- Gevaert AB, Lemmens K, Vrints CJ, Craenenbroeck EMV (2017) Targeting endothelial function to treat heart failure with preserved ejection fraction: The promise of exercise training. *Oxid Med Cell Longev* 2017: 4865756.
- Martinez-Sales V, Sanchez-Lazaro I, Vila V, Almenar L, Contreras T, et al. (2011) Circulating endothelial cells in patients with heart failure and left ventricular dysfunction. *Dis Markers* 31: 75-82.
- Eleftheriadis T, Antoniadi G, Pissas G, Liakopoulos V, Stefanidis L (2013) The renal endothelium in diabetic nephropathy. *Ren Fail* 35: 592-599.
- Dharmashankar K, Widlansky ME (2010) Vascular endothelial function and hypertension: Insights and directions. *Curr Hypertens Rep* 12: 448-455.
- Weisrock F, Fritschka M, Beckmann S, Litmeier S, Wagner J, et al. (2017) Reliability of peripheral arterial tonometry in patients with heart failure, diabetic nephropathy and arterial hypertension. *Vasc Med* 22: 292-300.
- Paulus WJ, Tschope C, Sanderson JE, Rusconi C, Flachskampf FA, et al. (2007) How to diagnose diastolic heart failure: a consensus statement on the diagnosis of heart failure with normal left ventricular ejection fraction by the heart failure and echocardiography associations of the European society of cardiology. *Eur Heart J* 28: 2539-2550.
- Duda DG, Cohen KS, Scadden DT, Jain Rk (2007) A protocol for phenotypic detection and enumeration of circulating endothelial cells and circulating progenitor cells in human blood. *Nat Protoc* 2: 805-810.
- Shrout PE, Fleiss JL (1979) Intraclass correlations: uses in assessing rater reliability. *Psychol Bull* 86: 420-428.
- Koo TK, Li MY (2016) A guideline of selecting and reporting intra class correlation coefficients for reliability research. *J Chiropr Med* 15: 155-163.
- Cleveland WS (1979) Robust locally weighted regression and smoothing scatterplots. *J Am Stat Assoc* 74: 829-836.
- Bland JM, Altman DG (1986) Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet* 1: 307-310.
- Koc M, Richards HB, Bihorac A, Ross AE, Schold JD, et al. (2005) Circulating endothelial cells are associated with future vascular events in hemodialysis patients. *Kidney Int* 67: 1078-1083.

Citation: Buescher J, Weisrock F, Fritschka M, Beckmann S, Simon I, et al. (2021) Test-Retest Reliability of Flow-Cytometric Quantification of Circulating Endothelial Cells and Endothelial Progenitor Cells in Cardiovascular Diseases. *Int J Cardiovasc Res* 10:4.

32. Schmidt-Lucke C, Rossig L, Fichtlscherer S, Vasa M, Britten M, et al. (2005) Reduced number of circulating endothelial progenitor cells predicts future cardiovascular events: proof of concept for the clinical importance of endogenous vascular repair. *Circulation* 111: 2981-2987.
33. Werner N, Wassmann S, Ahlers P, Schiegl T, Kosiol S, et al. (2007) Endothelial progenitor cells correlate with endothelial function in patients with coronary artery disease. *Basic Res Cardiol* 102: 565-571.
34. Michowitz Y, Goldstein E, Wexler D, Sheps D, Keren , et al. (2007) Circulating endothelial progenitor cells and clinical outcome in patients with congestive heart failure. *Heart* 93: 1046-1050.
35. Ryder JR, O'Connell MJ, Rudser KD, Fox, et al. (2016) Reproducibility of circulating endothelial cell enumeration and activation in children and adolescents. *Biomark Med* 10: 463-471.
36. Lee KW, Lip GY, Tayebjee M, Foster W, Blann AD (2005) Circulating endothelial cells, von willebrand factor, interleukin-6, and prognosis in patients with acute coronary syndromes. *Blood* 105: 526-532.
37. Jacques N, Vimond N, Conforti R, Griscelli F, Lecluse Y, et al. Quantification of circulating mature endothelial cells using a whole blood four-color flow cytometric assay. *J Immunol Methods* 337: 132-143.
38. Makin AJ, Blann AD, Chung NA, Silverman SH, Lip GY (2004) Assessment of endothelial damage in atherosclerotic vascular disease by quantification of circulating endothelial cells. Relationship with von willebrand factor and tissue factor. *Eur Heart J* 25: 371-376.
39. Aird WC (2007) Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. structure, function, and mechanisms. *Circ Res* 100: 158-173.

Author Affiliations

[Top](#)

¹Department of Cardiology, Charité Universitätsmedizin, Campus Virchow-Klinikum, Berlin, Germany

²Department of Internal Medicine - Cardiology, Deutsches Herzzentrum Berlin, Germany.

³HealthTwist GmbH, Berlin, Germany.

⁴Maastricht University, Faculty of Health, Medicine & Life Science, Netherlands.

⁵Bayer AG, Drug Discovery, Clinical Sciences- Experimental Medicine, Wuppertal, Germany

Weisrock F, Fritschka M, Beckmann S, Litmeier S, **Wagner J**, Tahirovic E, Radenovic S, Zelenak C, Hashemi D, Busjahn A, Krahn T, Pieske B, Dinh W, Dungen HD. Reliability of peripheral arterial tonometry in patients with heart failure, diabetic nephropathy and arterial hypertension. *Vasc Med.* 2017;22(4):292-300.

<https://doi.org/10.1177/1358863X17706752>

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

Publikationsliste

Publikationen:

M. Farinacci, W. Dinh, H.-D. Volk, H.-D. Düngen, **J. Wagner**, T. Konen, O. v. A. Circulating endothelial cells as biomarker for cardiovascular diseases. Research and practice in thrombosis and haemostatis, 2018

IF: 5,6

J. Buescher, F. Weisrock, M. Fritschka, S. Beckmann, S. Litmeier, E. Tahirovic, S. Radenovic, A. Busjahn, T. Krahn, W. Dinh, H.-D. Düngen. Test-retest reliability of flow-cytometric quantification of circulating endothelial cells and endothelial progenitor cells in cardiovascular diseases. International Journal of Cardiovascular Research, 2021

IF: 0,8

F. Weisrock, M. Fritschka, S. Beckmann, S. Litmeier, **J. Wagner**, E. Tahirovic, S. Radenovic, C. Zelenak, D. Hashemi, A. Busjahn, T. Krahn, B. Pieske, W. Dinh, H.-D. Düngen. Reliability of peripheral arterial tonometry in patients with heart failure, diabetic nephropathy and arterial hypertension. Vascular Medicine, 2017

IF: 2,5

Kongressbeiträge:

F. Weisrock, M. Fritschka, S. Beckmann, S. Litmeier, **J. Wagner**, E. Tahirovic, S. Radenovic, C. Zelenak, D. Hashemi, A. Busjahn, T. Krahn, B. Pieske, W. Dinh, H.-D. Düngen (Berlin, Wuppertal). Reliability of Peripheral Arterial Tonometry for Assessment of Endothelial Function in Patients with Heart Failure with Preserved and Reduced EF, Diabetic Nephropathy and Arterial Hypertension. 83. Jahrestagung der DGK, Mannheim, 19. – 22.04.2017;

S. Beckmann, F. Weisrock, M. Fritschka, **J. Wagner**, E. Tahirovic, S. Radenovic, D. Hashemi, A. Busjahn, T. Krahn, W. Dinh, H.-D. Düngen (Berlin, Wuppertal). Non-invasive monitoring of peripheral and cardiac influence on exercise limitation in patients with heart

failure with preserved ejection fraction. 83. Jahrestagung der DGK, Mannheim, 19. – 22.04.2017

J. Wagner, M. Farinnaci, S. Beckmann, S. Litmeier, F. Weisrock, M. Fritschka, S. Radenovic, E. Tahirovic, D. Hashemi, W. Dinh, H.-D. Düngen (Berlin, Wuppertal). Test-retest-reliability of circulating endothelial and endothelial progenitor cells in peripheral blood in patients with heart failure, diabetic nephropathy and arterial hypertension. 83. Jahrestagung der DGK, Mannheim, 19. – 22.04.2017; 66

F. Weisrock, M. Fritschka, S. Beckmann, S. Litmeier, **J. Wagner**, E. Tahirovic, S. Radenovic, C. Zelenak, D. Hashemi, A. Busjahn, T. Krahn, B. Pieske, W. Dinh, H.-D. Düngen. Reliability of Peripheral Arterial Tonometry for Assessment of Endothelial Function in Patients with Heart Failure with Preserved and Reduced EF, Diabetic Nephropathy and Arterial Hypertension. 4th World Congress on Acute Heart Failure, Paris, 29.04 – 02.05.2017;

S. Litmeier, F. Weisrock, M. Fritschka, S. Beckmann, **J. Wagner**, E. Tahirovic, S. Radenovic, A. Busjahn, W. Dinh, H.-D. Düngen. Reliability of biomarkers (Nt-proBNP, Gal-3, NGAL, hsTnT, AVP, ST-2, MDA) in patients with HFrEF, HFpEF, diabetic nephropathy and arterial hypertension. 4th World Congress on Acute Heart Failure, Paris, 29.04 – 02.05.2017

J. Wagner, M. Farinnaci, S. Beckmann, S. Litmeier, F. Weisrock, M. Fritschka, S. Radenovic, E. Tahirovic, D. Hashemi, W. Dinh, H.-D. Düngen. Test-retest-Reliability of explorative measurement of CEC and EPC from peripheral blood in patients with systolic and diastolic heart failure, diabetic nephropathy and arterial hypertension. 4th World Congress on Acute Heart Failure, Paris, 29.04 – 02.05.2017

S. Beckmann, F. Weisrock, M. Fritschka, **J. Wagner**, E. Tahirovic, S. Radenovic, D. Hashemi, A. Busjahn, T. Krahn, W. Dinh, H.-D. Düngen. Non-invasive monitoring of peripheral and cardiac influence on exercise limitation in patients with heart failure with preserved ejection fraction. European Heart Journal, Volume 38, Issue suppl_1, 1 August 2017, ehx493.P5271, <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehx493.P5271>, Published: 29 August 2017

Danksagung

Bedanken möchte ich mich in erster Linie bei allen 171 Probandinnen und Probanden, die bereit waren, das Studienprozedere zu durchlaufen und sich hierfür die Zeit genommen haben. Ohne ihre Bereitschaft und ihr Interesse hätten wir die Studie so nicht durchführen können.

Ferner möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Hans-Dirk Düngen für die geduldige und kompetente Betreuung und die unendliche Zuversicht bedanken. Prof. Düngen diente stets als Ansprechpartner und zeigte sich unermüdlich im Beantworten meiner Fragen. Zusammen mit PD Dr. med. Wilfried Dinh hat er diese Studie ins Leben gerufen. Auch hierfür und für die Überlassung des Themas bedanke ich mich ausdrücklich.

Ein weiterer Dank gilt meinem gesamten Studienteam für die konstruktive, positive Arbeitshaltung und die unerschöpfliche Disziplin bei der Datenakquise. Auch möchte ich mich bei dem Team der kardiologischen Studienambulanz für die bereitwillige Überlassung der Räumlichkeiten und Gerätschaften und das damit verbundene Vertrauen bedanken.

Ganz besonders möchte ich meiner Familie und meinen Freunden einen ausdrücklichen Dank aussprechen, für die motivierenden Worte und die große Überzeugung, dass dieses Projekt ein erfolgreiches Ende haben würde.

Insbesondere meinem Großvater, Jochen Wagner, und meinen Eltern, Stefanie und Dr. Thomas Wagner, gilt ein ausdrücklicher Dank für die Unterstützung auf den letzten Metern.

Zuletzt möchte ich meinem Ehemann, Dr. Niklas Büscher, für seine unendliche Geduld, seine unterstützenden Worte und das konstruktive Feedback danken, aber auch für das latente ‚Druck-Machen‘. Ohne seine Hilfe wäre diese Doktorarbeit (nach der unerwarteten Frühgeburt unserer Zwillinge) nicht fertig geworden.