

**Aus dem Institut für Virologie
der Universität Würzburg
Lehrstuhlinhaber: Univ.-Prof. Dr. med. Lars Dölken**

**Effekte einer Lithium-Therapie bei HIV-Patienten mit HAND auf neurochemische und
immunologische Marker der Krankheitsprogression:
Analyse einer randomisierten, doppelt-verblindeten, kontrollierten klinischen Studie
in Südafrika**

**Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
vorgelegt von
Melanie Gleich
aus Nürnberg**

Würzburg, November 2020



Referent: apl. Prof. Dr. rer. nat. Carsten Scheller

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. med. Marcel Romanos

Berichterstattung: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Klaus Brehm

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 24.11.2020

Die Promovendin ist Ärztin

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Zielsetzung	1
1.2 HIV.....	1
1.3 Mechanismus der durch HIV ausgelösten Immunschwäche und Immunaktivierung.....	3
1.4 HIV-assoziierte Demenz und HIV-assoziierte neurokognitive Störung (HAND)	5
1.5 Global Deficit Score	8
1.6 Behandlung von HIV-assoziierten neurokognitiven Störungen (HAND)	12
1.7 Lithium und Demenz.....	13
2. Material	15
2.1 Geräte	15
2.1.1 Elektrogeräte	15
2.2 Verbrauchsmaterialien	16
2.2.1 Plastikmaterialien	16
2.2.2 Glasmaterialien.....	17
2.2.3 Sonstige Verbrauchsmaterialien.....	17
2.3 Chemikalien	18
2.4 Lösungen und Puffer.....	18
2.5 Antikörper (Immunfärbung und Durchflusszytometrie)	19
2.5.1 Prinzip	20
2.5.2 Immunfärbung	20
3. Methoden	21
3.1 Dopamin-ELISA	21
3.2 BDNF ELISA.....	23
3.3 Durchflusszytometrie	23
3.4 Statistik	24

4. Ergebnisse	24
5. Diskussion	39
6. Zusammenfassung.....	45
6.1 Hintergrund	45
6.2 Methoden	45
6.3 Ergebnisse.....	46
6.4 Diskussion	48
7. Anhang.....	48
7.1 Abkürzungsverzeichnis	48
7.2 Tabellenverzeichnis	50
7.3 Abbildungsverzeichnis	51
8. Literaturverzeichnis.....	52

1. Einleitung

1.1 Zielsetzung

In einer randomisierten, Placebo-kontrollierten, Investigator-initiierten Phase 2b Studie wurde die Effizienz und Sicherheit von Lithium zur Behandlung von HIV-assoziierten neurokognitiven Störungen (HAND) untersucht.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, aus Blut- und Plasmaproben von Studienteilnehmern verschiedene Marker der HIV-Krankheitsprogression (Immunaktivierung in T-Zellen und B-Zell Fraktionen, Dopamingehalt in CSF sowie im Plasma und neurotrophe Faktoren (BDNF)) zu bestimmen und diese Werte mit der neurologischen Performance der Patienten (Global Deficit Score, GDS) und Standard-Parametern des HIV-Therapie-Monitorings (CD4 Count und HIV-Viruslast) zu korrelieren. Daraus sollten neben einer Prüfung auf Sicherheit und Wirksamkeit von Lithium zur Behandlung von HAND auch Erkenntnisse zur Pathogenese von HAND gewonnen werden und die Nutzbarkeit dieser Parameter gegebenenfalls als Biomarker für HAND untersucht werden.

1.2 HIV

Weltweit sind ca. 37,9 Millionen Menschen mit dem Human Immundeficiency Virus (HIV) infiziert (Stand 2018)¹. Davon waren im Jahr 2018, Schätzungen zufolge ca. 36,2 Millionen Menschen über 15 Jahre alt und es gab ca. 1,7 Millionen Kinder unter 15 Jahre, die mit einer HIV-Infektion lebten. Von den 37,9 Millionen infizierten Personen waren sich nur ca. 79% über ihren Gesundheitszustand und HIV-Status in Bezug auf die HIV-Infektion bewusst. Weiterhin erhielten bis Juni 2019 ca. 24,5 Millionen Menschen, also 78% der Menschen, die ihren HIV-Status kannten, eine antiretrovirale Therapie und davon hatten nur ca. 86% dieser Personen eine unterdrückte Viruslast. Insgesamt wurde davon ausgegangen, dass ca. 770 000 Menschen im Jahr 2018 an den Folgen des erworbenen Immunschwäche Syndroms (AIDS) gestorben sind. Allein in Afrika liegt die geschätzte Zahl an Menschen mit einer HIV-Infektion bei 25,7 Millionen Menschen.

Im Jahr 2017 lag die Zahl der Neuinfektionen bei ca. 1,8 Millionen und im Jahr 2018 bei ca. 1,7 Millionen Menschen, darunter insgesamt 160 000 Kinder unter 15 Jahren. Unter diesen Neuinfektionen traten 61% südlich der Sahara auf.²

Die Übertragung des Virus findet durch direkten Kontakt mit infiziertem Blut oder Blutprodukten, abgeschürfte Epithelien der Schleimhaut bei Geschlechtsverkehr sowie von der infizierten Mutter auf ihr Kind in der Gebärmutter oder durch Stillen statt.¹ Bei den meisten mit HIV-1 infizierten AIDS Patienten manifestiert sich die Erkrankung innerhalb von zehn Jahren, diese kann sich jedoch auch in einzelnen Fällen für einen längeren Zeitraum symptomfrei darstellen.³ Die im Deutschen als „Erworbenes Immunschwäche Syndrom“ bekannte Krankheit wird im Englischen als Acquired Immunodeficiency Syndrome, kurz AIDS, bezeichnet und beschreibt die komplexen Auswirkungen einer Infektion mit dem HI-Virus. Die HIV-Infektion wird mit antiretroviralen Medikamenten therapiert, um die HIV-Replikation zu hemmen und HIV-induzierte Symptome zu unterdrücken. Dadurch soll die Krankheitsprogression verzögert bzw. verhindert werden.^{4,5} Gemäß aktueller Therapieleitlinien besteht die HIV-Kombinationstherapie aus zwei Nukleosid-Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NRTIs) und zusätzlich entweder einem Integrase-Inhibitor (INI), einem Protease-Inhibitor (PI) oder einem Nicht-NRTI (NNRTI).⁶ Eine regelmäßige Einnahme wird als Voraussetzung für den Therapieerfolg gesehen⁷. Einnahmefehler werden durch eine simple und zugleich gut verträgliche Kombination reduziert.⁸ Diese fördert einen frühen Therapiebeginn und senkt das Risiko einer Entwicklung von Resistenzen gegen die Medikamente.^{9,10} Desweiteren führt die frühe Erkennung der Infektion und die zeitnahe Einleitung einer wirksamen Therapie zu einer deutlichen Verringerung der Morbidität^{8,11,12} sowie zu einer deutlich verbesserten Prognose der an HIV-infizierten Patienten¹³⁻¹⁵. Eine antiretrovirale Behandlung, die zwei bis vier Monate nach der Infektion eingeleitet wurde und bestenfalls lebenslang ohne Unterbrechung eingenommen wird¹⁶, senkt die Aktivierung der T-Zellen und die damit verbundene geringere HIV-1-spezifische CD8+ T-Zellantwort kann sich klinisch als protektiv erweisen¹⁷.

Die antiretrovirale Therapie wird heute für alle HIV-infizierten Personen, unabhängig vom Stadium ihrer Erkrankung und unabhängig der CD4+ T-Zellzahl, empfohlen.¹⁸ Eine Anpassung der Therapie an individuelle Aspekte wie Nebenwirkungsprofil, Therapiewirksamkeit, Lebensumstände, Komorbidität und Koinfektion ist sinnvoll.⁶

1.3 Mechanismus der durch HIV ausgelösten Immunschwäche und Immunaktivierung

Das Immunsystem des Menschen setzt sich aus drei wichtigen Komponenten zusammen: die angeborene Immunität, die adaptive Immunität und die intrinsische Immunität. In Bezug auf die HIV-Abwehr beinhaltet das angeborenen Immunsystem die Schleimhaut, sowie dendritische Zellen, Interferone und das Komplementsystem. Unter dem adaptiven Immunsystem versteht man hauptsächlich CD4+ T-Zellen und B-Zellen und zusätzlich gibt es noch das intrinsische Immunsystem.¹⁹ Die Immunaktivierung bei HIV-infizierten Personen hängt von verschiedenen Faktoren ab. Darunter ist die Infektion mit dem HI-Virus zu nennen, die zur Produktion von Alloantigenen führt, die wiederum das Immunsystem direkt aktivieren oder aber auch weitere HIV-Komponenten, die die Immunzellen direkt stimulieren. Als Folge der HIV-Infektion ist die systemische Immunaktivierung zu nennen. Diese kann selbst bei Patienten mit einer unterdrückten Virämie eine gewisse Hyperaktivität in Bezug auf das Immunsystem und das Endothel aufweisen.²⁰

Klinisch kann sich dies mit einer Immunschwäche, neurokognitiven Defiziten, Atherothrombose und Osteoporose äußern.²⁰ Infolge der HIV-Infektion liegt eine persistente Aktivierung durch die mikrobielle Translokation im Darm vor. Die anhaltende Immunaktivierung ist zudem ein typischer Verlauf der HIV-Infektion, selbst unter einer suppressiven antiretroviralen Therapie. Des Weiteren können im lymphatischen Gewebe latente HIV-Reservoirs gefunden werden, die durch eine Immunaktivierung im Rahmen der Immunsuppression, zu einer Vergrößerung des Virusreservoirs und der Virusreplikation führen können.²¹

Diese anhaltende Aktivierung kann in zahlreichen Bereichen des angeborenen Immunsystems beobachtet werden, unter anderem bei Makrophagen und dendritischen Zellen, Zytokine und Chemokine, wie dem Tumornekrosefaktor oder Interleukin(IL)-1, IL-6, IL-8, IL-10 und IL-15. Weitere Beispiele sind Akutphasenproteine, wie das C-reaktives Protein oder auch Elemente der Koagulationskaskade, wie D-Dimere und Gewebefaktoren. Die chronische Immunaktivierung wird durch die Verlagerung von proinflammatorischen Mediatoren über die Darmschleimhaut, einer bakteriellen Überwucherung oder das Vorhandensein von anderen Viruserkrankungen, wie z.B. Herpesviren, begünstigt. Unter einer akuten HIV-Infektion kann es bei den Patienten zu einem massiven Verlust von CD4+ T-Zellen im Darm kommen. Dies äußert sich mit einer Enteropathie durch Enterozytenapoptose und einer 2- bis 10-fach erhöhten Permeabilität des Darms. Die Darmpermeabilität ermöglicht die Translokation von mikrobiellen Produkten in den systemischen Kreislauf und verursacht eine systemische Immunaktivierung.²¹ Das HI-Virus kann die Permeabilität des Darmepithels durch die induzierte lokale Entzündung steigern und die Abwehrbarriere, die sogenannte Gut Associated Lymphatic Tissue (GALT) zerstören, in der sich die Mehrheit der IL-17 und IL-22 produzierenden TH17-Zellen (eine Teilmenge von CD4+ T-Zellen) befindet. Diese Zellen haben die Aufgabe die Darmhomöostase im Gleichgewicht zu halten und die Abwehr mikrobieller Wirkstoffe zu gewährleisten.²⁰ Ein weiterer Faktor, der die Immunaktivierung indirekt begünstigt, ist eine niedrige CD4+ T-Zellzahl, wie z.B. bei einer idiopathischen CD4+ T-Zell-Lymphopenie²². Es wurde beobachtet, dass der Anteil der CD4+ T-Zellen, die Aktivierungsmarker an ihrer Oberfläche exprimieren (z.B. CD38, HLA-DR oder CD71), bei virämischen Patienten²³ dauerhaft erhöht ist und die Zahl der sich teilenden CD4+ T-Zellen außergewöhnlich gestiegen ist²⁴. Unter einer HIV-Infektion kommt es zu einer Überproduktion der Zytokine TNF α , IL-1 β und IL-6. Zudem produzieren Mononukleäre Zellen (PBMCs) des peripheren Blutes von HIV-1-infizierten Personen in der Regel spontan oder unter Stimulation entzündliche Zytokine²⁵ ²⁰. Die HIV-Infektion hat eine Erhöhung der Tumornekrosefaktor (TNF)-Werte im Plasma und im Gewebe zur Folge. Die ausgelöste TNF Rezeptor Aktivierung wirkt sich wiederum auf die Replikation des HI-Virus aus.

Der TNF wird von unterschiedlichen Immunzell-Typen, wie zum Beispiel von aktivierten Makrophagen, T- Lymphozyten, Natural Killer (NK) Zellen und Mastzellen als Reaktion auf pathologische Bedingungen produziert. Der TNF Signalweg betrifft verschiedene zelluläre Funktionen wie Entzündungsreaktion, Immunregulation, zelluläre Proliferation und Apoptose.²⁶ Eine HIV-Infektion führt bei fast allen infizierten Personen ohne eine antiretrovirale Therapie zur Entwicklung von AIDS. Das klinische Ergebnis korreliert beim Menschen mit dem Grad der chronischen Immunaktivierung und der damit zusammenhängenden Viruslast. Demnach hat eine gesteigerte Immunaktivierung eine hohe Viruslast und eine schnellere Krankheitsprogression zur Folge. Dieser Krankheitsverlauf führt bis hin zur AIDS Erkrankung und zum Tod. Generell tritt beim infizierten AIDS Patienten eine reduzierte zellvermittelte Immunantwort (CMI) im Verlauf der Erkrankung relativ früh auf. Unter anderem tritt eine verminderte zellvermittelte Immunantwort auch bei anderen chronischen Infektionskrankheiten wie Tuberkulose, aber auch bei Tumorerkrankungen wie z.B. Darmkrebs, auf.²⁷ Im Gegensatz dazu, entwickelt sich aufgrund des Fehlens einer pan-immunen Aktivierung im infizierten Primaten, bei den wenigsten Schimpansen das erworbene Immundefektsyndrom und es zeigt sich eine dadurch begründete geringere Viruslast und reduzierte Apoptose der CD4+ T-Helferzellen.²⁷ Die Viruslast im Plasma gibt eine ungefähre Auskunft über die Rate des Rückgangs der CD4+-Lymphozytenzahl und des Fortschreitens zu AIDS und Tod. Jedoch kann eine genauere Prognose für HIV-infizierte Patienten nur durch die kombinierte Messung von Plasma-HIV-1-RNA und CD4+-Lymphozyten gestellt werden.²⁸

1.4 HIV-assoziierte Demenz und HIV-assoziierte neurokognitive Störung (HAND)

Die HIV-assoziierte neurokognitive Störung (HAND) kann als Komplikation durch eine Infektion mit HIV auftreten. Die „Frascati Kriterien“ wurden im Jahr 2007 in Frascati bei einer Konsensuskonferenz festgelegt und unterteilen die HIV-assoziierten neurokognitiven Defizite in drei Schweregrade.

Aufgrund der Veränderung des klinischen Bildes der Erkrankung hat die American Academy of Neurology (AAN) die diagnostischen Kriterien festgelegt.²⁹ Die Einteilung setzt voraus, dass kein Delir festgestellt wurde und es keine vorbestehenden Ursachen für die neurokognitive Symptomausprägung in allen Unterformen von HAND gibt. Des Weiteren darf bei Patienten mit HAND weder eine Aphasie noch eine Apraxie auftreten. Dieselben neuropsychologischen Testprofile müssen mit einem Abstand von mindestens vier Wochen, erneut ein auffälliges pathologisches Ergebnis zeigen, um die Diagnose stellen zu können. Unter der ersten Stufe der virusassoziierten Erkrankung versteht man ein Asymptomatisches Neuropsychologisches Defizit (ANPD) bzw. im Englischen auch Asymptomatic Neurocognitive Impairment (ANI) genannt. Hierbei können eine Verschlechterung von zwei oder mehreren kognitiven Domänen, wie die verbale Flüssigkeit, die Aufmerksamkeit, das Arbeitsgedächtnis, die visuelle Informationsverarbeitung, sowie die Exekutivfunktion, ohne eine Beeinträchtigung der motorischen Fähigkeiten beobachtet werden. Dies gilt ab einer Mindestdauer von einem Monat und zusätzlich müssen mindestens zwei standardisierte Tests außerhalb der einfachen Standardabweichung liegen. Vorausgesetzt wird auch, dass weitere Gründe für ein ANPD, wie chronischer Alkohol,- oder Drogenabusus, Psychosen und schwere depressive Episoden, ausgeschlossen wurden.^{29,30}

Die zweite Stufe der virusassoziierten Gehirnerkrankung wird auch milde neurokognitive Störung (MNCD) und im Englischen Mild Neurocognitive Deficit (MND) genannt und beschreibt weiter fortgeschrittene kognitive Beeinträchtigungen. Hierbei tritt zusätzlich zu den oben genannten kognitiven Einschränkungen, wovon mindestens zwei standardisierte Tests positiv ausfallen müssen, eine leichte funktionelle Beeinträchtigung auf. Die kognitiven Defizite machen sich im Alltag bemerkbar und müssen durch die Familie und/oder den Partner oder die Partnerin des Patienten bestätigt oder sogar primär geäußert werden. Die Patienten sind ineffizient im Bezug auf ihre Leistung im Beruf oder im Haushalt, sie klagen über eine reduzierte intellektuelle Präsenz oder haben Schwierigkeiten in sozialen Interaktionen.^{29,30}

Die dritte Stufe, eine deutlich ausgeprägte Form, von HAND stellt die HIV-assoziierte Demenz (HAD) dar.

Es liegt eine fulminante kognitive, sowie funktionelle und emotionale Beeinträchtigung vor.²⁹ Die HAD definiert somit eine virusassoziierte Gehirnerkrankung, die durch Störungen der Feinmotorik, aber auch durch Gedächtnis,- und Konzentrationsstörungen, Verlangsamung der Reagibilität und Auffassung, sowie Antriebslosigkeit, sozialen Rückzug, dem Verlust sozialer Kompetenz, Depression und verminderter Schwingungsfähigkeit gekennzeichnet ist. In mindestens zwei psychometrischen Testverfahren verschiedener kognitiver Funktionsbereiche, müssen erhebliche Beeinträchtigungen ersichtlich sein und somit außerhalb der zweifachen Standardabweichung liegen. Ohne fremde Hilfe wird das Alltagsleben von den Patienten nicht mehr bewältigt. Folglich kann es zu einer schweren Demenz und im fortgeschrittenen Stadium zu Mutismus und einer spastischen Tetraparese mit Blasenstörung führen. Die Diagnose HAD ist unwiederrufbar, im Gegensatz zu den Diagnosen ANPD und MNCD. Diese können als ANPD oder MNCD in Remission benannt werden, falls in einer Verlaufsuntersuchung die Kriterien nicht mehr zutreffen.²⁹⁻³¹ Möglicherweise hat selbst eine leichte kognitive Dysfunktion schwerwiegende Auswirkungen auf die Lebensqualität und den Behandlungserfolg von HIV-Infektionen.³² Des Weiteren gewinnen Kofaktoren wie therapieinduzierte metabolische Störungen und Koinfektionen, beispielsweise mit dem Hepatitis-C-Virus oder Syphilis, sowie Komorbiditäten wie Alkohol- und Drogenabhängigkeit, zunehmend an Bedeutung.³⁰ Allgemein hat sich die HIV assoziierte Demenz in den letzten Jahren verändert und schwere klinische Bilder zeigen sich deutlich seltener. Jedoch nehmen die Demenzvorstufen in der Häufigkeit zu.³³ Unter Langzeitüberlebenden versteht man einen Zeitraum von mindestens zehn Jahren nach Erstdiagnose der HIV Infektion. Bei diesen Patienten kommt es zu einer chronischen Immunaktivierung mit entzündlichen Veränderungen des zentralen Nervensystems.^{30,34}

Um Fortschritte im Forschungsbereich von HAND zu erzielen, wurde eine HAND-Datenbank etabliert, die zum besseren Verständnis der viralen Mechanismen, die der Entwicklung von neurokognitiven Störungen zugrunde liegen, beitragen soll.

Diese Datenbank enthält aktuelle Informationen über Virusisolate und klinische Daten von HAND-Patienten und soll Forschern die Möglichkeit geben, ihre Hochdurchsatz-HAND-Sequenzierungsprojekte in die Datenbank einzupflegen.³⁵

1.5 Global Deficit Score

Der Global Deficit Score ist ein Testverfahren zur Überprüfung der kognitiven Bereiche unter Berücksichtigung von Geschlecht, Ethnizität, Alter und Bildungsstand.³⁶ Es werden fünf Angaben zu verschiedenen Bereichen von null bis fünf Punkten angegeben. In der untersuchten Studie, die als Grundlage dieser Arbeit dient, wurden die Teilnehmer zu folgenden Bereichen getestet.

Die Aufmerksamkeit wurde mithilfe des Mental Alternation Test, des Digit Span und des Paced Auditory Serial Addition Test bewertet. Der Mental Alternation Test beinhaltet eine einfache Umsetzung und schnelle Durchführung. Jedoch gibt es keinen Hinweis darauf, dass der Test speziell Patienten mit HAND identifiziert, sondern er ist lediglich gut geeignet, um zu erkennen, welche Patienten eine weitere kognitive Abklärung benötigen. Der Test erfordert einen Wechsel zwischen Zahlen und Buchstaben, dabei soll der Patient von eins bis 20 zählen und dazwischen das Alphabet von A beginnend aufsagen. Sobald die Zahl 20 oder der Buchstabe Z erreicht wird, wird die Reihenfolge von vorne wiederholt. In der Abfolge 1A, 2B, 3C usw., wird in 30 Sekunden die Anzahl an richtigen Abfolgen dokumentiert. Die maximale Punktzahl lautet 52.³⁷ Bei dem Digit Span Test handelt es sich um einen einfachen Test in dem eine Zahlenreihenfolge in umgekehrter Reihenfolge abgefragt wird.³⁸ Der Paced Auditory Serial Addition Test (PASAT) wird zur Beurteilung kognitiver Defizite bei verschiedenen neuropsychiatrischen Leiden eingesetzt, um beispielsweise den Status des Gedächtnisses und der Geschwindigkeit der Informationsverarbeitung wiederzuspiegeln. Der Test wurde Ende der 1970er Jahre eingeführt und es werden auditorische Stimuli, durch gesprochene Zahlen in zufälliger Reihenfolge von ursprünglich 1 bis 60, präsentiert.³⁹ Die Probanden werden angewiesen, jede Ziffer mit der zuvor genannten Zahl zu summieren und das Ergebnis, vor Ertönen der nächsten Zahl, laut auszusprechen.⁴⁰

In der modifizierten Studie werden in sechs Blöcken von je 30 Sekunden, Ziffern von eins bis neun halbrandomisiert genannt, die jeweils zu der unmittelbar vorausgehenden Ziffer addiert werden sollen. Sobald die Summe bei zehn liegt, sollten die Versuchspersonen den rechten Daumen nach oben zeigen.³⁹

Der Bereich Lernen und Gedächtnis wird mithilfe des Hopkins Verbal Learning Test untersucht. Dabei wird der Patient aufgefordert, genau zuzuhören und zu versuchen, sich eine 12-stellige vorgelesene Wortliste zu merken. Die Wortliste wird anschließend zweimal komplett wiederholt. Danach werden insgesamt 24 Wörter vorgelesen, die 12 bekannte Wörtern und weitere 12 unbekannte Wörter enthält. Dabei soll die Testperson mit ‚Ja‘ bzw. ‚Nein‘ auf die richtigen bzw. falschen Begriffe antworten. Der Test wurde so konstruiert, dass für jede Liste vier Begriffe aus drei verschiedenen Kategorien ausgewählt werden. Die neuen bzw. unbekanntes Wörter, die als Ablenkung dienen sollen, werden ebenfalls aus der gleichen Kategorie gewählt, wurden aber in der Wortliste zuvor nicht genannt.^{41,42}

Die motorische Geschwindigkeit wird mittels Finger Tapping Dominant Hand, Finger Tapping Non-Dominant Hand und Grooved Pegboard Test Dominant Hand bestimmt. Der Patient soll bei dem Rapid Finger Tapping Test schnell mit den Fingern der dominanten und der nicht dominanten Hand klopfen. Dies ist ein Test der feinmotorischen Kontrolle der oberen Extremität, der häufig bei Parkinson Patienten als Index der Bradykinesie und Hypokinesie genutzt wird. Aber auch bevorzugt in Bereichen der Neuropsychiatrie und Verhaltensneurologie als Prädiktor des IQ und der Reaktionszeit, als auch nach traumatischen Hirnverletzungen und Schlaganfall als Indikator für die motorische Erholung, Anwendung findet.⁴³ Es wird die durchschnittliche Anzahl der Schläge jeweils mit dem dominanten und nicht dominanten Finger, die Summe beider Seiten und die Differenz zwischen den Werten der dominanten und nicht dominanten Seite (Differenzwert) gewertet.⁴⁴ Der Halstead-Reitan-Finger-Tapping-Test (FFT) soll motorische und kognitive Beeinträchtigungen identifizieren. Er wird zudem häufig zur Erkennung und Lokalisierung zerebraler Läsionen verwendet, indem der Test an beiden Händen durchgeführt und anschließend miteinander verglichen wird.

Normalerweise werden in fünf Durchgängen zu je 10 Sekunden, die Anzahl an manuellen Fingerklopfen an beiden Händen separat gezählt und als Maß für die motorische Geschwindigkeit gesehen.⁴⁵

Der Grooved Pegboard Test (GPB)⁴⁶ bewertet die feinmotorische Geschwindigkeit indem der Proband angewiesen wird, auf einer kleinen Tafel mit jeweils fünf Linien und fünf Löchern, so schnell wie möglich geriffelte Dübel in Langlochbohrungen zu platzieren, die in verschiedenen Winkeln zueinander stehen. Gewertet wird hierbei die Zeit bis zur Fertigstellung.⁴⁷

Die psychomotorische Geschwindigkeit wird mit dem Trail Making Test A, dem Digit Symbol-Coding und dem Color Trails Test 1 gemessen. Der Patient erhält bei dem Trail Making Test die Aufgabe, eine Linie zu zeichnen, die Kreise in einer bestimmten Reihenfolge verbindet. Es gibt den Trail Making Test A, der die psychomotorische Geschwindigkeit und die Fähigkeit zur Sequenzierung beinhaltet und Teil B, der die Fähigkeit bewertet, zwischen zwei Kategorien zu wechseln.³⁷ Der Digit Symbol-Coding Test, der Wechsler Adult Intelligence Scale-Third Edition (WAIS-III)^{48,49} liefert nützliche klinische Informationen, beispielsweise über Motivation und Aufmerksamkeit.⁵⁰ Er wird als Maß für die Verarbeitungsgeschwindigkeit angesehen und es wird angenommen, dass er von der motorischen Koordination, der visuellen Wahrnehmung und dem Kurzzeitgedächtnis beeinflusst wird.⁵¹ Der Color Trails Test (CTT) wurde erstmals 1996 beschrieben.⁵² Im CTT 1 wird der Proband aufgefordert, mit einem Stift 25 Zahlen in aufsteigender Reihenfolge zu verbinden.⁵³ Im Vergleich zum CTT 1, wird im CTT 2 gefordert, dass zusätzlich eine Linie von den 1 bis 25 nummerierten Kreisen zu ziehen ist, diese Aufgabe ist so schnell wie möglich zu erledigen. Die Zahlen sind durch zwei verschiedene Farben gekennzeichnet, zwischen denen zusätzlich zur Einhaltung der Zahlenreihenfolge abgewechselt werden muss. Die Testperson muss beispielsweise vom rosa Kreis 1 zum gelben Kreis 2 und dann wieder zum rosa Kreis 3 eine Linie ziehen.⁵³

Des Weiteren wird somit die exekutive Funktion mit dem Color Trails Test 2, aber auch mit im folgenden beschriebenen Stroop Color-Word Test und dem Wisconsin Card-Sorting Test getestet.

Der Stroop Color Word Test (SCWT) beurteilt die Fähigkeit, trotz widersprüchlicher Reizen, richtig zu reagieren. Ein Beispiel hierfür, ist ein Name einer Farbe, der in der Tinte einer anderen Farbe gedruckt wurde.^{54,55}

Der Wisconsin Card-Sorting Test⁶⁴ basiert auf einem computergestützten Sortierungstest für ein Kartenspiel aus 64 Spielkarten. Es ist ein Verfahren, um die Funktion des Frontallappens durch die Fähigkeit, einfache Konzepte zu lernen und flexibel zu denken, bewerten zu können.⁵⁶ Er wurde ursprünglich konzipiert, um eine komplexe Entscheidungsfindung in einem Experiment zu untersuchen. Die Karten lassen sich durch die Dimensionen Farbe, Form und Anzahl charakterisieren. Diese sollen von den Probanden in vier Stapel sortiert werden. Der Versuchsleiter gibt anschließend eine positive oder negative Rückmeldung über die Wahl des Teilnehmers, das wiederum eine starke soziale Belohnung oder Bestrafung darstellt. Nach zehn korrekten Sortierungen, ohne dass der Proband davon erfährt, ändert sich die Dimension. Dies geschieht in insgesamt sechs verschiedenen Kategorien, bevor der Test abgebrochen wird.⁵⁷

Das visuelle Lernen und Gedächtnis wird mithilfe des Rey Complex Figure Tests und die verbale Flüssigkeit mithilfe des Tests Animals and Fruits and Vegetables untersucht. Der Rey Complex Figure Test ist ein visueller Test, bei dem die Testperson aufgefordert wird, eine komplexe geometrische Figur zu kopieren und diese kurz danach aus dem Gedächtnis zu zeichnen und dies nach 30 Minuten erneut zu wiederholen.^{58,59} Der Test Animals and Fruits and Vegetables wird unter anderem zur Feststellung der Sprachbeherrschung und Sprachkompetenz verwendet. Der Test erfordert die Generierung von Wörtern einer bestimmten Kategorie, wie zum Beispiel Tiere, Obst und Gemüse. Es wird die Anzahl an richtigen Wörtern gezählt, die in einer Minute gebildet werden.⁶⁰

Im Folgenden wird erklärt, wie sich der Global Deficit Score aus den Ergebnissen der einzelnen Tests, den sogenannten T-Scores, zusammensetzt. In dem Verfahren werden zum einen die Schwere aber auch die Anzahl an Leistungseinschränkungen betrachtet. Wenn die Punktzahl größer oder gleich 40 T-Punkte ist, liegt der Deficit Score bei 0 und somit wird kein Defizit, also eine normale kognitive Funktion angezeigt.

Eine leichte Minderung, ein sogenanntes geringes kognitives Defizit, liegt bei einem Defizit Score von 1 mit 35-39 T-Punkten vor. Es folgt ein leichtes bis mittelschweres Defizit mit einem Defizit Score von 2 und einer T-Punktzahl von 30-34, sowie ein mittelschweres Defizit, Defizit Score 3, mit 25-29 T-Punkten. 20-24 T-Punkte bzw. ein Defizit Score von 4 wird als mittelschweres bis schweres Defizit bezeichnet. Weniger oder genau 19 T-Punkte liegen bei einem schweren neurokognitiven Defizit mit einem Score von 5 vor.^{36,61}

1.6 Behandlung von HIV-assoziierten neurokognitiven Störungen (HAND)

Unabhängig von der CD4+ Zellzahl ist eine antiretrovirale Therapie bei Patienten mit gesicherter HAD indiziert. Zudem sollte die Kombinationstherapie Azidothymidin (AZT) beinhalten, da AZT eine ausreichend belegte Liquorgängigkeit vorweist.³⁰

Da in Studien ein niedriger CPE (CNS Penetration Effectiveness) Wert mit einer höheren Viruslast im CNS korreliert, sollte die Therapie den CPE Score berücksichtigen.⁶² Für HIV-assoziierte neurokognitive Störungen gibt es noch keine zufriedenstellende Therapie. Dennoch hat die Auswahl an antiretroviralen Medikamenten in den letzten Jahren deutlich zugenommen. Unter den neu synthetisierten Substanzgruppen befinden sich Integrase-Inhibitoren, Fusions-Inhibitoren, sowie CCR5-Antagonisten und nicht kompetitive Inhibitoren der reversen Transkriptase. Epidemiologische Daten zeigen zudem, dass die ART oft nicht ausreichend ZNS effizient wirkt und dass zusätzliche adjuvante Therapieoptionen notwendig sind.³⁰

Bei neuropathischen Schmerzen kann ein Capsaicin-Pflaster, beispielsweise bei HIV-Patienten, zusätzliche therapeutische Möglichkeiten darstellen.³⁰ Des Weiteren gibt es die Möglichkeit, Liquor bei einer ausreichend großen Kopienzahl an Virusvarianten zu untersuchen, falls im Blut bereits multiresistente Virusvarianten gefunden wurden.⁶² Zwei Studien zeigten einen positiven Effekt auf die Symptome von HAND bei Patienten, die mit antiretroviralen Medikamenten und Lithium therapiert wurden.

In beiden Studien konnte in bildgebenden Verfahren eine Veränderung der Hirnaktivierungsmuster erkannt werden, die auf eine Verbesserung der HIV-assoziierten ZNS-Schädigung hinwies. In einer von den beiden Studien führte Lithium zu der Verbesserung der neuropsychologischen Leistung, was möglicherweise mit der beobachteten Hemmung der neuronalen Glykogensynthase Kinase-3beta in Zusammenhang steht.⁶³ In der anderen Studie konnte jedoch keine signifikante Veränderung der kognitiven Leistung und depressiven Stimmung festgestellt werden und es wurde darauf hingewiesen, weitere Untersuchungen in diesem Gebiet anzuschließen.⁶⁴

1.7 Lithium und Demenz

In der Therapie von bipolaren Störungen und schweren Depressionen wird Lithium bereits zur Stimmungsstabilisierung eingesetzt.⁶⁵ Die genaue Wirkungsweise von Lithium ist noch nicht vollständig erschlossen, jedoch wird angenommen, dass Lithium die Glykogensynthase Kinase-3beta (GSK-3 β) hemmt. Es konnte nachgewiesen werden, dass Lithium die Neurotransmission und Signaltransduktion und somit auch die Zelloberflächenrezeptoren, die Freisetzung von Transkriptionsfaktoren und die Genexpression, beeinflusst. Lithium soll außerdem zu einer Modulation von Autophagie, Wachstumsfaktoren und Enzymaktivität führen. Es wurde daher in verschiedenen Studien diskutiert, ob Lithium unter anderem über die Hemmung von GSK-3 β in der Prävention und Therapie von Demenz (AD) verwendet werden kann.^{66 67 68} Eine weitere Studie zeigt neben der lithiumvermittelten Phosphorylierung der Glykogensynthase-Kinase-3beta, eine Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) abhängige Aktivierung der Proteinkinase C alpha (PKC- α). Lithium erhöht somit in dieser Studie die PKC- α -Aktivität in zwei Zelllinien um das Doppelte. Es kann eine zunehmende Phosphorylierung einer wichtigen Inhibitorstelle der GSK-3 β , dem Serin-9 in HEK293-Zellen und PC12-Zellen, gezeigt werden. Auch in einem zusätzlichen in vivo Versuch, durch eine intrazerebroventrikuläre Injektion von Lithium, wird die Serin-9-Phosphorylierung von GSK-3 β erhöht und die PKC- α -Aktivität um das 1,8-fache im Hippocampus der Maus verstärkt.⁶⁹

Weitere veröffentlichte Daten weisen drauf hin, dass es einen direkten oder indirekten Mechanismen der Hemmung von GSK-3 β durch eine Lithium-Therapie, gibt, jedoch sind dazu weitere Studien erforderlich.⁷⁰ Neuerdings gab es Hinweise darauf, dass Lithium eine neuroprotektive Wirkung im Hinblick auf Demenz hat. Lithium wirkte stimulierend auf die Synthese und Freisetzung von neurotrophen Faktoren, v.a. BDNF und VEGF (vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor). Ein erhöhtes Vorkommen dieser Faktoren stellte einen Schutz für Neurone vor einer neurotoxischen Wirkung dar und zeigt einen positiven Effekt auf das Zellüberleben.^{63,71} Es gab präklinische Modelle, die darauf hinwiesen, dass unter einer Therapie mit Lithium bei transgenen Mäusen eine Verbesserung der kognitiven Fähigkeiten auftritt und dass Lithium die Tau Pathologie abschwächt.⁶³

In einer weiteren Studie von Forlenza et al. wurde die These unterstützt, dass Lithium krankheitsmodifizierende Eigenschaften hat und sich positiv auf die Prävention der Alzheimer Krankheit auswirkt.⁶⁶ Eine Studie von Nunes et al. gibt ebenfalls an, dass unter der Gabe von kleinen Mengen Lithium eine deutliche Verbesserung des GDS bereits nach sechs Monaten eintrat und bis zum Ende der Studie, insgesamt 18 Monate anhielt.⁷² Andererseits lagen Ergebnisse vor, die keinen signifikanten Zusammenhang zwischen einer Lithium-Behandlung über den Zeitraum von einem Jahr und einer Verbesserung der kognitiven Funktionen zeigten.⁷³

Zwei weitere Studien führten jeweils eine Lithium-Behandlung für zehn Wochen durch. Ein nicht signifikantes Ergebnis, in Bezug auf eine Verbesserung der kognitiven Leistungsfähigkeit, wurde mit der kurze Behandlungsdauer begründet. In einer Sekundäranalyse gab es jedoch einen Hinweis darauf, dass eine erhöhte Konzentration von BDNF teilweise zum neuroprotektiven Effekt beiträgt.^{74 75} In einer weiteren Studie wurden signifikante Unterschiede zwischen der Lithium-, und Placebo-Gruppe gezeigt. Im Lithiumarm wurden verbesserte kognitive Parameter (Gedächtnis, Aufmerksamkeit und globale kognitive Funktion) und eine Abnahme von phosphorylierten Tau Protein im Liquor festgestellt.

Diese Studie gab einen Ausblick darauf, dass Lithium bald als neue Therapieoption gegen die chronische Neurodegeneration bei neuropsychiatrischen Erkrankungen, der Verringerung der Symptome und als krankheitsbegleitende Therapie eingeführt werden könnte. Es wurde jedoch ebenfalls darauf verwiesen, dass der genaue Mechanismus in Bezug auf die neuroprotektive Wirkung in kontrollierten Studien überprüft werden sollte.⁶⁶ Unsere Arbeitsgruppe war Teil eines Studienteams, von dem die erste größere, randomisierte Studie zum Einsatz von Lithium bei HIV-Patienten mit HAND durchgeführt wurde. Zum Zeitpunkt des Beginns der vorliegenden Doktorarbeit lagen bereits die klinischen Ergebnisse dieser Studie vor, die keinen signifikanten Effekt von Lithium auf den GDS der Patienten zeigten.⁷⁶ Im Folgenden sollten immunologische und virologische Korrelate mit dem Einsatz von Lithium bei den Studienteilnehmern untersucht werden.

2. Material

2.1 Geräte

2.1.1 Elektrogeräte

Gerät	Typ	Hersteller
Absorptionsmesser	Spectramax plus 384	Molecular Devices
Autoclav	5075 ELC	Tuttnauer Systec
Brutschrank	Incubat (CO ₂ begast)	Heraeus
Eismaschine	AF-10	Scotsman
Elektrophorese-Zelle mit Blot Modul	XCell SureLock™	Thermo Fischer Scientific
FACS- Gerät	FACSCalibur	BD Biosciences
Heizblock	TDB-120	Biosan
Image System	Odyssey	Li-Cor
Kühlschrank		Bosch
Lichtmikroskop	Fluovort	Leitz
Magnetrührer	IKAMAG RO Motor	Janke und Kunkel

Netzgerät	E835	Consort
Pipetten	2, 200,1000 µL	Eppendorf
Pipettierhilfe (elektrisch)	Pipetboy comfort	Integra
Schwenker	Duomax 1030	Heidolph
Sicherheitswerkbank	BSB 4A	Gelaire
Tischzentrifuge	Centrifuge 5415C	Eppendorf
Vortexer	L46	GLW
Waage	SBA 51	SebiTec
Wasserbad	WB14	Memmert
Zentrifuge	Multifuge 1sr	Hereaus

Tabelle 1: Verwendete Elektrogeräte

2.2 Verbrauchsmaterialien

2.2.1 Plastikmaterialien

Material	Typ	Hersteller/ Firma
Einfrierbox		Nalgene
Einfrier-Röhrchen	2 ml	Hartenstein
Eppendorf Gefäße	1.5 ml, 2 ml	Eppendorf
Eppendorf-Ständer		Eppendorf
FACS-Röhrchen	5 ml	Falcon
FACS-Röhrchen-Ständer	Kartell	Hartenstein
Falcon-Röhrchen	15 ml, 50 ml	Thermo Fisher Scientific
Falcon-Ständer		Thermo Fisher Scientific
Griff-Stopfen	12 mm	Hartenstein
Mehrfachdispenser	Handy step	Brand
PE-Deckel		Schott
Pipetten	5 ml, 10 ml	Brand
Pipettenspitzen	20-1000 µl	Roth
Pipettenspitzen mit Filter	20-1000 µl	Peglab

Schutzbrille		Hartenstein
Spritzen	2.5 ml	Brand
Wägeschalen	80x80x25 mm	Hartenstein
Zellkulturflaschen (75 ml)	Filter, T75	Greiner bio-one
Zellkulturplatten	96 LP (Flachboden)	Nunc

Tabelle 2: Verwendete Plastikmaterialien

2.2.2 Glasmaterialien

Gerät	Volumen (ml)	Hersteller/ Firma
Messzylinder	50,100, 250	Schott
Objektgläser		Marienfeld
Objektträger		Marienfeld
Pipetten	1, 5, 10	Brand
Schraubverschlussflaschen	50, 250, 500, 1000	Schott

Tabelle 3: Verwendete Glasmaterialien

2.2.3 Sonstige Verbrauchsmaterialien

Gegenstand	Typ/ Größe	Hersteller/ Firma
CPE-Überschuhe		ASID BONZ GmbH
Filter		Hartenstein
Latex-Handschuhe	Gentile Tec, M	Meditrade
OP-Maske	Sentinex Lite	Lohmann und Rauscher
Parafilm		Roth
Rührfisch	Verschieden Größen	Hartenstein
Rührfisch-Angel		Hartenstein
Spatel		Hartenstein

Tabelle 4: Verwendete Verbrauchsmaterialien

2.3 Chemikalien

Chemikalie	Bestellnummer	Hersteller/ Firma
Formaldehyd (37proz.)	A01, 1000	AppliChem GmbH
Saponin	4185,1	Roth GmbH

Tabelle 5: Verwendete Chemikalien

2.4 Lösungen und Puffer

Lösung	Zusammensetzung	Firma/ Bestellnummer
5% Essigsäure		
5% Magermilchpulver in TPBS (mTBPS)		
Formalin-Lösung		
FACS-Puffer	137 mM NaCl 2.7 mM KCl 4.3 mM Na ₂ HPO ₄ 1.4 mM K ₂ HPO ₄ 1.5 mM CaCl ₂ 1.0 mM MgCl ₂ 10 mM NaN ₃	Medienküche
LDS-Probenpuffer		
Phosphate Buffered Saline (PBS)	137 mM NaCl 2.7 mM KCl 4.3 mM Na ₂ HPO ₄ 1.4 mM K ₂ HPO ₄ 1.5 mM CaCl ₂ 1.0 mM MgCl ₂	Medienküche
PBS + 0.1 % BSA	137 mM NaCl 2.7 mM KCl 4.3 mM Na ₂ HPO ₄	Medienküche

	1.4 mM K ₂ HPO ₄ 1.5 mM CaCl ₂ 1.0 mM MgCl ₂ 0.1 %BSA	
PBS + 0.1 % BSA + 0,5 % Saponin (500 ml)	500 ml PBS + 0.1 %BSA + 2.5 g Saponin	
R10-Medium	500ml RPMI-Medium 55.5 ml FBS 0.5 ml Penicillin/ Streptomycin	
Restore™ Western Blot Stripping Buffer		Thermo Fisher Scientific/ 21059
SDS-Laufpuffer (1x)	950 ml dd H ₂ O 50 ml Bolt™ Transfer Buffer (20x)	Thermo Fisher Scientific
0.1 % TPBS	1 ml Tween- 20 1 L PBS	

Tabelle 6: Verwendete Lösungen und Puffer

2.5 Antikörper (Immunfärbung und Durchflusszytometrie)

Antikörper	Antigen	Verdünnung	Bestellnummer	Hersteller
B-Zell Subsets				
FL1	CD21 FITC	RUO	561372	BD Biosciences
FL2	CD27 PE	RUO	555441	BD Biosciences
FL3	CD19 PerCP Cy5	RUO	561295	BD Biosciences
FL4	CD10 APC	IVD	332777	BD Biosciences

Tabelle 7: Verwendete Antikörper (B-Zell Subsets)

Antikörper	Antigen	Verdünnung	Bestellnummer	Hersteller
FL1	CD8 FITC	IVD	345772	BD Biosciences
FL2	CD38 PE	RUO	555460	BD Biosciences
FL3	CD3 PerCP Cy5	RUO	560835	BD Biosciences
FL4	HLADR APC	RUO	559866	BD Biosciences

Tabelle 8: T-Zell-Aktivierung

2.5.1 Prinzip

Die PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cell, auf Deutsch: mononukleäre Zellen des peripheren Blutes) wurden mit Fluorochrom-markierten Antikörpern gegen CD19 (PerCP-Cy 5.5), CD21 (FITC) und CD27 (PE) gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Außerdem wurden PBMC mit Fluorochrom-markierten Antikörpern gegen CD3 (PerCP-Cy 5.5), CD8 (FITC), CD38 (PE) und HLADR (APC) gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert.

2.5.2 Immunfärbung

Je 10^5 Zellen/ml PBMC wurden in FACS-Röhrchen überführt und mit 3 ml PBS/0.5% BSA gewaschen und bei 1200 rpm (rounds per minute) für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet mit 100 μ l eines Antikörper-Mastermixes versetzt.

B-Zell-Antikörper-Mastermix (pro Färbung)

CD21-FITC	1.25	μ l
CD27-PE	10	μ l
CD19-PerCpCy5	1.25	μ l
CD10-APC	5	μ l
<u>PBS/0.5% BSA</u>	<u>82.5</u>	<u>μl</u>
total:	100	μl

T-Zell-Antikörper-Mastermix (pro Färbung)

CD8-FITC	2.5	µl
CD38-PE	5	µl
CD3-PerCpCy5	1.0	µl
HLADR-APC	2.5	µl
<u>PBS/0.5% BSA</u>	<u>89</u>	<u>µl</u>
total:	100	µl

Die Zellen wurden gevortext und für 30 Minuten mit den Antikörpern inkubiert. Anschließend wurden die Zellen einmal mit 3 ml PBS (Phosphate-Buffered Saline) /0.5% BSA (Bovines Serum Albumin) gewaschen und bei 1200 rpm (rounds per minute) für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet mit 100 µl PBS-4%FA (Formaldehyd) versetzt.

3. Methoden

3.1 Dopamin-ELISA

Die gefrorenen Reagenzien wurden bei Raumtemperatur (20-25°C) aufgetaut und zu Beginn vorsichtig gemischt. Für die Durchführung eines Immunoassays, lag die optimale Temperatur bei 20-25°C, da die Bindung des Antiserums, die Enzymkopplung und die Enzymaktivität temperaturabhängig waren. Je 10 µL der Standards, Kontrollen und 300µL der Plasmaproben wurden auf der Extraktionsplatte in die jeweiligen Vertiefungen pipettiert und anschließend 250 µL destilliertes Wasser in alle Well, außer denen der Plasmaproben gegeben. Es wurden je 50 µL Assay Puffer und 50 µL Extaktionspuffer in jede Vertiefung pipettiert. Die Platte wird für 30 Minuten mit Haftklebefolie abgedeckt, bei Raumtemperatur inkubiert und auf einem Vortex (ca. 600 rpm) extrahiert. Die Folie wurde wieder abgenommen und die Platte und somit die Flüssigkeitsreste durch Klopfen der umgedrehten Platte auf einer Zellstoffunterlage entfernt. Der im Folgenden beschriebene Vorgang wurde zweimal durchgeführt.

Je 1 μL des Waschpuffers wurde in jede Vertiefung gegeben, für fünf Minuten bei Raumtemperatur in einem Vortex (ca. 600 rpm) inkubiert und danach entleert. Anschließend wurden je 150 μL des Acylierungspuffer und 25 μL Acylierungsreagenz in jede Vertiefung pipettiert und bei Raumtemperatur für 15 Minuten in einem Vortex (ca. 600 rpm) inkubiert, danach entleert und erneut mit je 1 μL Waschpuffer in jedes Well bei Raumtemperatur und auf einem Vortex für zehn Minuten inkubiert und erneut entleert. Es wurden 175 μL einer Salzsäure in alle Vertiefungen gegeben und erneut für zehn Minuten unter Nutzung der Haftklebefolie und dem Vortex bei Raumtemperatur inkubiert. Je 25 μL der Catechol-O-MethylTransferase (COMT) Enzymlösung wurden in alle Vertiefungen der Dopamin Mikrotiterplatte, 25 μL der extrahierten Standards, Kontrollen und Proben und 50 μL der extrahierten Plasma Proben in die jeweiligen Vertiefungen, pipettiert. Danach wurden 25 μL der Salzsäure zu den Standard- und Kontrollproben hinzugefügt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur in einem Vortex (ca. 600 rpm) inkubiert. Anschließend wurden je 50 μL des Dopamin Antiserums in jede Vertiefung pipettiert, mit Haftklebefolie abgedeckt und für zwei Stunden bei Raumtemperatur in einem Vortex inkubiert. Im nächsten Schritt wurde die Folie entfernt, der Inhalt entleert, die Platte dreimal mit 300 μL des Waschpuffers gewaschen und der Inhalt, zwischen dem Waschvorgang, verworfen. Je 100 μL des Enzymkonjugates wurden in jedes Well hinzugegeben und für 30 Minuten bei Raumtemperatur im Vortex inkubiert. Der Inhalt wurde erneut verworfen und wie oben beschrieben dreimal gewaschen und abgeklopft. In jede Vertiefung wurden weitere 100 μL des Substrates hinzugegeben und für 25-30 Minuten bei Raumtemperatur, auf einem Vortex inkubiert und danach 100 μL der Stopp Lösung in jede Vertiefung pipettiert und die Mikrotiterplatte geschüttelt, um eine gleichmäßige Vermischung gewährleisten zu können. Innerhalb von 10 Minuten sollte die Absorption der Lösung mithilfe eines Photometers/Mikroplattenleser, der auf 450 nm eingestellt wurde, gemessen werden (Referenzwellenlänge von 620-650 nm).⁷⁷

3.2 BDNF ELISA

Es wurde der Abcam BDNF Human ELISA Kit, ein in vitro Enzym-linked Immunosorbent Assay, für die quantitative Messung von humanem BDNF in Serum, Plasma und Zellkulturüberständen verwendet. Es wurde hierbei ein Antikörper genutzt, der spezifisch für Human-BDNF ist und auf einer 96-Lochplatte beschichtet war. Die Proben wurden mit 1:100 verdünnt und gemäß Herstellerangaben verarbeitet. Die Standards und Proben wurden in die Vertiefungen pipettiert und danach wurde der BDNF Standard in einer Probe durch den immobilisierten Antikörper an die Lochplatten gebunden. Diese wurden anschließend gewaschen und mit biotinyliertem Anti-Human-BDNF-Antikörper versetzt. Der ungebundene biotinylierte Antikörper wurde abgewaschen und dazu ein HRP (Horseradish Peroxidase) -konjugiertes Streptavidin in die Brunnen pipettiert, erneut gewaschen und eine TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin) - Substratlösung hinzugegeben. Die Farbe entwickelte sich proportional zur Menge des gebundenen BDNF. Nach der Zugabe einer Stopp Solution änderte sich die Farbe von blau nach gelb und die Intensität der Farbe wurde bei 450 nm abgelesen.⁷⁸

3.3 Durchflusszytometrie

Durchflusszytometrie wird im Englischen als Fluorescence Active Cell Sorting (FACS) bezeichnet. Diese wurde genutzt, um Zellpopulationen zu analysieren, die mit Farbstoff-konjugierten Antikörpern behandelt wurden. Die Zellen wurden in Formalin fixiert und mithilfe von FACS Calibur (BD Bioscience) analysiert. Folgende Populationen wurden definiert: B-Zellen (CD19+), Memory-B-Zellen (CD19+/CD27+), resting Memory-B-Zellen (CD19+/CD27+/CD21+) und activated Memory-B-Zellen (CD19+/CD27+/CD21-) ⁷⁹. T-Zellen (CD3+), CD8-positive T-Zellen (CD3+/CD8+), CD4-positive T-Zellen (CD3+/CD8-), aktivierte T-Zellen (CD38+/HLADR+). Zur Auswertung der Daten wurde die FlowJo - Software verwendet.

3.4 Statistik

Die Messwerte wurden auf Normalverteilung mit dem Test von D'Agostino und Pearson untersucht. Normalverteilte Werte wurden mit Mittelwert und Standardabweichung beschrieben. Unterschiede zwischen zwei nicht normalverteilten Wertegruppen wurden mit dem Student's T-Test untersucht. Nicht normalverteilte Werte wurden mit Median- und Interquartilbereichen beschrieben und bei zwei unabhängigen Stichproben mit einem U-Test nach Mann-Whitney verglichen. Abhängige Stichproben wurden wiederum mit einem Wilcoxon Test gegenübergestellt.⁸⁰ Die Korrelation der Werte wurde mittels linearer Regressionsanalyse untersucht und die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm Prism 6.0h for Mac OS X von GraphPad Software, Inc.

4. Ergebnisse

In Abbildung 1 wurde das Hauptergebnis des Global Deficit Scores (GDS) in der Lithium-Studie in Südafrika dargestellt. Das Diagramm zeigte die Verteilung des GDS innerhalb der Placebo- bzw. der Lithium-Therapie-Subgruppe zum Zeitpunkt V3 bzw. V12. Im zeitlichen Verlauf von V3 zu V12 konnte ein signifikanter Abfall des GDS innerhalb der Placebo-, sowie innerhalb der Lithium-Gruppe beobachtet werden ($p < 0.0001$), wohingegen bei den Gruppen untereinander, Lithium versus Placebo, zum gleichen Zeitpunkt V3 sowie V12 ähnliche Werte gemessen werden konnten und sich daher die Lithium und die Placebo Gruppe nicht signifikant voneinander unterschieden. Die Lithium-Therapie hatte also keinen messbaren Einfluss auf den GDS.

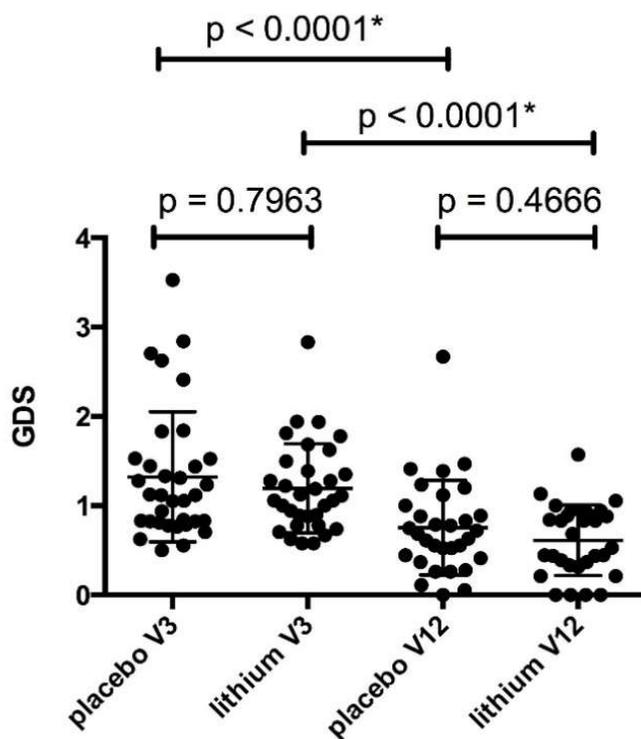


Abbildung 1: Einfluss von Lithium auf den Global Deficit Score (GDS). Dargestellt wurde der GDS bei Behandlung mit Lithium versus Placebo zu Visite 3 (V3, Woche 0) und Visite 12 (V12, Monat 6).

In Abbildung 2 wurde die Immunaktivierung der CD8+ T-Lymphozyten (CD38+, HLA-DR) dargestellt (Abb. 2A). Die Immunaktivierung wurde durch die Lithium-Behandlung nicht beeinflusst (Vergleich V12 Placebo versus V12 Lithium, $p = 0.5408$). Die Behandlung mit Lithium führte hingegen zu einer leichten, aber signifikanten Reduktion der Plasmakonzentration des neurotrophen Faktors BDNF bei Patienten unter Lithium-Therapie (Abb. 2C; Vergleich V3 Lithium versus V12 Lithium, $p = 0.0477$). Zwischen den Behandlungsgruppen zu V12 zeigten sich jedoch keine Unterschiede in der BDNF-Konzentration (V12 Placebo vs. V12 Lithium, $p = 0.7606$).

Der Anteil von memory-B-Zellen (CD27+) (Abb. 2B) und von Dopamin (DA) im Plasma (Abb. 2D) konnte nur für den Zeitpunkt V3 bestimmt werden, weil zu wenig Probenmaterial aus V12 zur Verfügung stand.

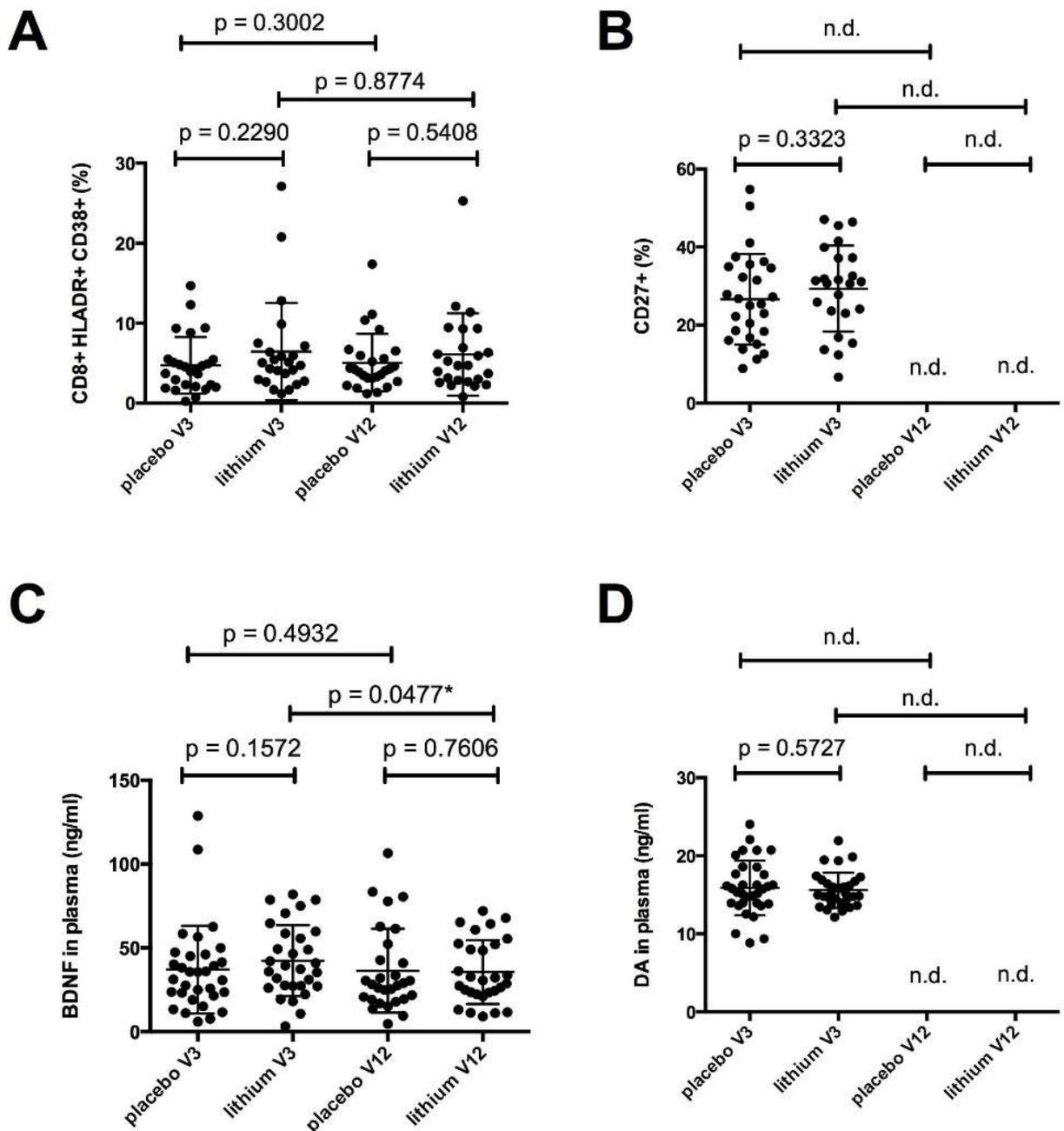


Abbildung 2: Einfluss von Lithium auf Immunaktivierung und neurochemische Marker.

HLADR+, CD38+ Expression auf CD8+ T-Lymphozyten (A) CD27+ B-Lymphozyten (B) BDNF in Plasma (C) DA in Plasma (D) A-D: Lithium versus Placebo zu Visite 3 (V3, Woche 0) und Visite 12 (V12, Monat 6).

In Abbildung 3 wurde der Einfluss der Lithium-Behandlung auf neurochemische Marker im Liquor cerebrospinalis (CSF = Cerebrospinal Fluid) bestimmt. Für die Konzentration von neurotrophen Faktoren (BDNF) im CSF zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen Placebo- und Lithium-Behandlung (V12 Placebo versus V12 Lithium, $p = 0.4625$) und auch im zeitlichen Verlauf innerhalb der Gruppe gibt es keine signifikante Veränderung (V3 Lithium vs. V12 Lithium, $p = 0.3750$) (Abb. 3A). Es wurde zudem Dopamin im CSF in der Placebo und der Lithium-Gruppe gemessen.

Auch hierbei konnte keine signifikante Veränderung zwischen den Gruppen (V12 Placebo versus V12 Lithium, $p = 0.7984$) festgestellt werden. Innerhalb der Gruppen im zeitlichen Verlauf konnte aufgrund der ungenügenden Anzahl an Proben keine Messung vorgenommen werden (V3 Lithium versus V12 Lithium, $p = \text{not done}$) (Abb. 3B).

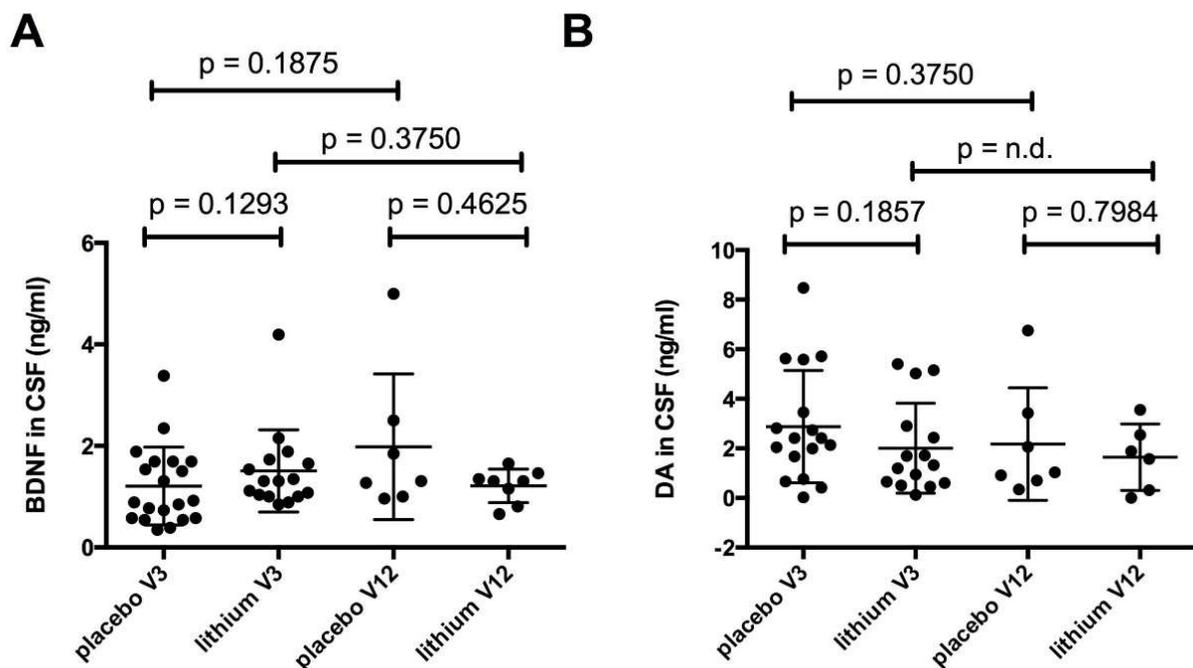


Abbildung 3: Werte im CSF: BDNF in CSF (A); DA in CSF (B) versus Placebo (V3, V12) und Lithium (V3, V12). Es wurde BDNF im CSF in der Placebo sowie in der Lithium-Therapie-Subgruppe jeweils zum Zeitpunkt V3 und V12 verglichen.

Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen und auch im zeitlichen Verlauf innerhalb der Gruppe gibt es keine signifikante Veränderung. Es wurde zudem Dopamin im CSF in der Placebo und der Lithium-Gruppe gemessen. Auch hierbei konnte keine signifikante Veränderung, weder zwischen den Gruppen zum gleichen Zeitpunkt, noch innerhalb der Gruppen im zeitlichen Verlauf festgestellt werden.

Um zu untersuchen, ob die Immunaktivierung der Lymphozyten im peripheren Blut mit dem Global Deficit Score (GDS) in Zusammenhang steht, wurden die Daten der CD38/HLADR-Expression mit dem GDS korreliert (Abb. 4A). Es zeigt sich keine Abhängigkeit beider Werte voneinander ($p = 0.9294$). Des Weiteren wurde die CD27+ Expression mit dem GDS korreliert (Abb. 4B). Hierbei wurde ebenfalls keine Abhängigkeit der beiden Werte untereinander festgestellt ($p = 0.3991$). Der Zusammenhang zwischen dem BDNF in Plasma (ng/ml) und dem GDS wurde in Diagramm 4C dargestellt, es konnte hierbei keine Korrelation gefunden werden ($p = 0.5800$). Zudem wurde Dopamin in CSF (ng/ml) mit dem GDS korreliert (Abb. 4D), wobei ebenfalls keine Abhängigkeit beider Werte voneinander festgestellt werden konnte (Abb. 4D). Typischerweise stellt ein hoher Wert an Dopamin im CSF einen Biomarker für einen schlechten GDS dar.

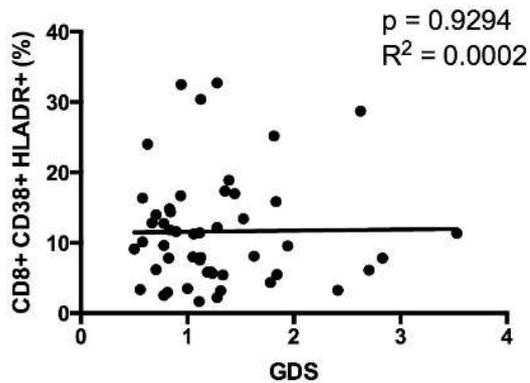
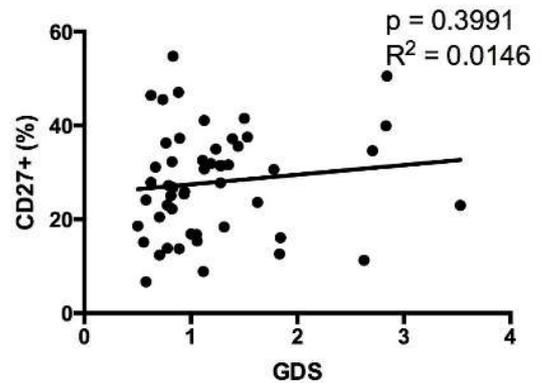
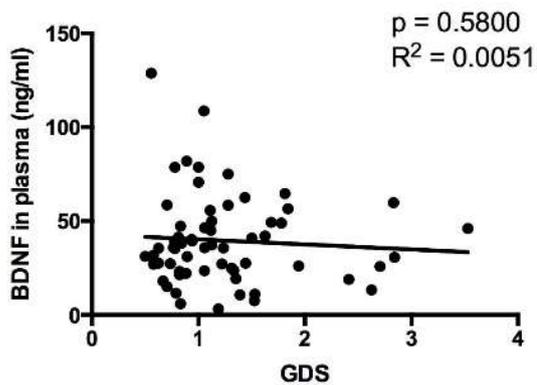
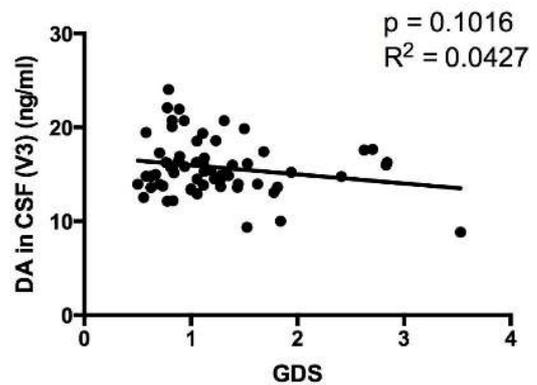
A**B****C****D**

Abbildung 4: Biomarker für HAND im Blut: CD8+, CD38+, HLADR+ (A); CD27+ (B); BDNF in Plasma (C); DA in CSF (D) vs. GDS. In Abbildung 4 wurde der Zusammenhang der Biomarker für HAND im Blut (CD8+, CD38+ und HLADR, sowie CD27+), BDNF im Plasma und Dopamin im Liquor cerebrospinalis (CSF) mit dem GDS innerhalb der Placebo- bzw. der Lithium-Therapie-Subgruppe zum Zeitpunkt V3 bzw. V12 dargestellt. Es zeigte sich kein signifikanter Zusammenhang der Biomarker für HAND im Blut, BDNF im Plasma und Dopamin im Liquor mit dem GDS innerhalb der Placebo- bzw. der Lithium-Therapie-Subgruppe.

In einer weiteren Untersuchung der Immunaktivierung wurde Dopamin in CSF (ng/ml) mit dem GDS zum Zeitpunkt V3 bzw. V12 verglichen. Es konnte kein Zusammenhang zwischen Dopamin in CSF zum Zeitpunkt V3 und dem Global Deficit Score festgestellt werden und es konnte daher auch nicht von einem signifikanten Zusammenhang zwischen Dopamin im CSF (ng/ml) und dem GDS ausgegangen werden ($p = 0.0637$) (Abb. 5A).

In Abbildung 5B wurde ein Zusammenhang zwischen Dopamin in CSF und GDS zum Zeitpunkt V12 festgestellt ($p = 0.0355$). Die Nullhypothese konnte mit einer Wahrscheinlichkeit von fast 4% abgelehnt werden und es handelte sich daher um einen signifikanten Zusammenhang zwischen Dopamin in CSF und dem GDS zum Zeitpunkt V12.

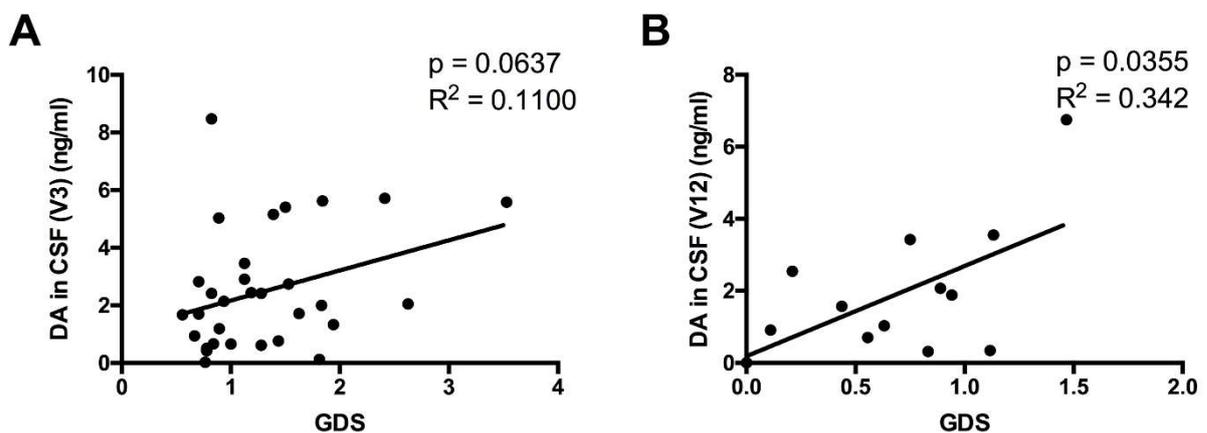


Abbildung 5: Biomarker für HAND im CSF: DA in CSF in V3 (A); DA in CSF in V12 (B) vs. GDS. Es wurde Dopamin in CSF mit dem GDS zum Zeitpunkt V3 bzw. V12 verglichen. Es zeigte sich keine positive Korrelation zwischen Dopamin im CSF und dem GDS zum Zeitpunkt V3 ($p = 0.0637$). Zum Zeitpunkt V12 korrelierte Dopamin im CSF positiv mit dem GDS ($p = 0.0355$).

Im Folgenden wurden die Marker (CD8+, CD38+/HLADR+) mit den Standard Parametern des HIV-Therapie Monitorings (Viruslast bzw. "no blip" und "blip") verglichen.

Es wurde der Zusammenhang der Biomarker für HAND im Blut (CD8+, CD38+ und HLADR+) und der HIV- Viruslast (in RNA Kopien/ml) dargestellt. Es konnte daher von einem signifikanten Zusammenhang zwischen den Biomarkern (%) und der HIV-Viruslast ausgegangen werden (Abb. 6A). Je höher die Viruslast im *blip* war, desto höher zeigte sich der CD4-Abfall.

Die Verteilung der gemessenen Werte zwischen CD8+, CD38+ und HLADR+ positiven Zellen im Blut (%) und einem sogenannten *blip* bzw. *no blip* wurde, im Hinblick auf eine mögliche schädigende Wirkung der Patienten aufgrund von *blips*, untersucht (Unterschied der CD4-Zellzahl V3 versus V12). *Blips* gingen mit einem Abfall der CD4+ Zellzahl einher. Die in Abbildung 6B dargestellten Gruppen unterschieden sich nicht signifikant voneinander. Patienten ohne *blips* waren immunologisch stabil und hatten somit kaum einen CD4 Abfall. Patienten mit *blips* hatten einen stärkeren CD4-Abfall. In unserer Messung erreichte dies jedoch keine Signifikanz, da möglicherweise eine zu geringe Anzahl an Patienten bzw. Proben zur Verfügung standen (geringes n). Eine andere Erklärung könnte genauso gut der fehlende Effekt durch das Placebo und Lithium gewesen sein. *Blips* waren bei Lithium und Placebo ähnlich verteilt. Die Immunaktivierung korrelierte mit der Viruslast im *blip* und somit zeigten Patienten mit einer hohen Viruslast eine höhere Immunaktivierung der CD8+ Zellen. Je höher die Immunaktivierung angezeigt wird, desto schneller gibt es eine Progression hin zu AIDS.

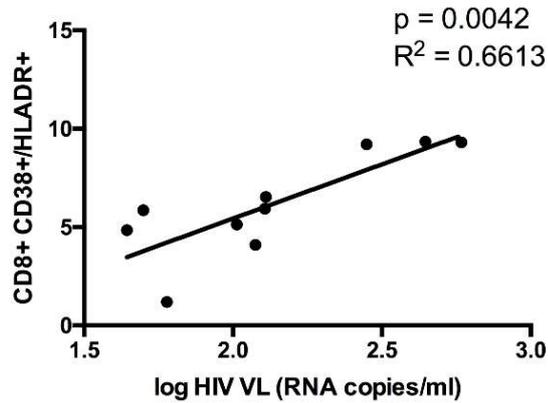
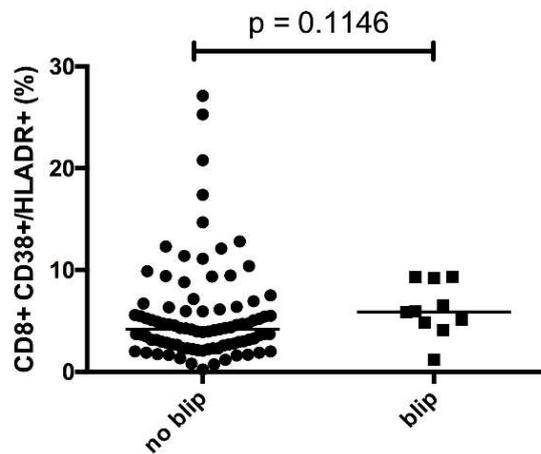
A**B**

Abbildung 6: Biomarker (CD8+, CD38+/HLADR+) im Blut versus Viruslast (A) und *blip/no blip* (B). Die CD38+/HLADR Immunaktivierung von CD8+ T-Zellen korrelierte positiv mit der HIV-Viruslast bei Patienten, die unter HAART eine spontane Virusreplikation (*blip*) gezeigt haben ($p = 0.0042$). Insgesamt war ein Trend erkennbar, dass Patienten mit *blip* eine höhere Immunaktivierung zeigten, als Patienten ohne *blip* (Median 4.185% versus 5.895%, $p = 0.1146$).

Um zu untersuchen, ob Lithium-Therapie einen Einfluss auf die CD4-Zellzahl hatte, wurde die CD4 Verschiebung von der Baseline bis V12 mit der HIV-Viruslast (*no blip* und *blip*) verglichen.

Es wurde der Zusammenhang der CD4+ T-Zellverschiebung von der Baseline bis V12 mit der HIV-Viruslast dargestellt und es konnte daher von einem signifikanten Zusammenhang zwischen der CD4+ T-Zellverschiebung von der Baseline bis V12 mit der HIV-Viruslast ausgegangen werden. (Abb. 7A)

Des Weiteren wurde die Verteilung der gemessenen Werte zwischen einer CD4 Verschiebung von der Baseline bis V12 und einem *blip* bzw. *no blip* dargestellt. (Abb. 7B) Die beiden Gruppen unterscheiden sich nicht signifikant voneinander, was darauf hindeutet, dass das Auftreten eines *blips* unter Therapie nicht in Zusammenhang mit einem T-Helferzell-Abfall steht. Möglicherweise sind hier andere Faktoren entscheidend, wie z.B. die Therapieadhärenz. Es zeigte sich ein Trend zu niedrigeren CD4+ Werten unter Lithium, jedoch ohne Signifikanz.

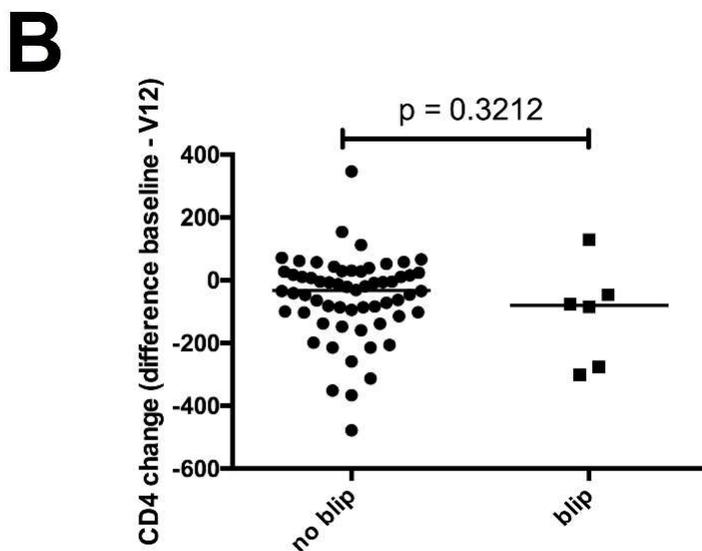
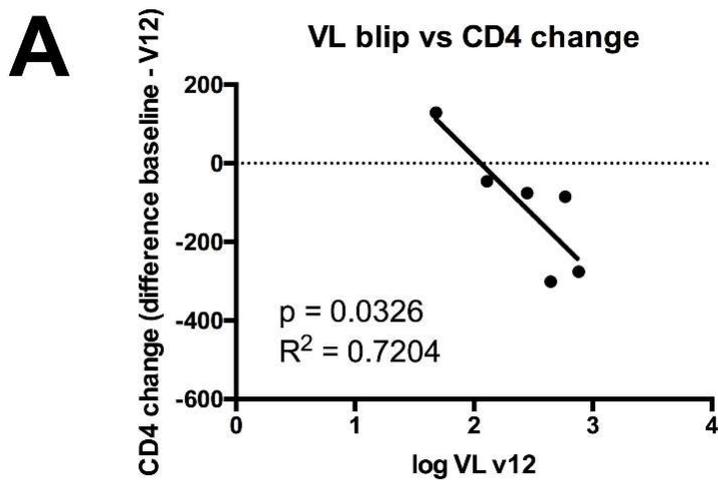


Abbildung 7: CD4 Change versus Viruslast (A) und *no blip/blip* (B). Es wurde die CD4 Verschiebung von der Baseline bis V12 mit der HIV-Viruslast bzw. (*blip* und *no blip*) verglichen. Es zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen der CD4+ Verschiebung von der Baseline bis V12 und der spontanen Virusreplikation ($p = 0.0326$; $R^2 = 0.7204$). (Median 497.5; 502.0; 490.0; 433.0)

Zusätzlich wurden die Standard Parameter des HIV-Therapie Monitoring, CD4+ T-Zellanzahl (Zellen/ μ l) und CD4+ T-Zellverschiebung, innerhalb der Placebo- bzw. der Lithium-Therapie-Gruppe zum Zeitpunkt V3 bis V12 bzw. Baseline bis V12 dargestellt. Es wurde die CD4+ T-Zellanzahl (Zellen/ μ l) zwischen der Placebo-, und der Lithium-Gruppe zum Zeitpunkt V3 und V12 verglichen.

Zum Zeitpunkt V3 unterschieden sich Kontroll-, und Behandlungs-Gruppe nicht signifikant voneinander. Wohingegen gezeigt werden konnte, dass sich die gemessenen Mittelwerte signifikant zwischen dem Zeitpunkt V3 und V12 innerhalb der Lithium-Gruppe unterschieden. Im zeitlichen Verlauf wurde beobachtet, dass die Lithium-Therapie mit einer signifikanten ($p = 0.00412$) Reduktion der TH-Zellen verbunden war. Dies war kritisch zu betrachten. Beim Vergleich der Gruppen untereinander, zeigte sich ein Trend zu niedrigeren CD4+ Werten unter Lithium. Diese Werte waren jedoch ohne Signifikanz. (Abb. 8A)

Anschließend wurde der CD4+ Count in der Placebo-, und der Lithium-Gruppe zum gleichen Zeitpunkt verglichen und es konnte beobachtet werden, dass sie sich in der Kontroll-, und Treatment Gruppe nicht signifikant voneinander unterschieden. (Abb.8B)

Auf der Grundlage, dass Lithium kritisch für die Entwicklung der CD4+ T-Zellzahl erschien, war es fragwürdig, ob Lithium sich ebenfalls negativ auf die Viruslast bei *blips* auswirkte.

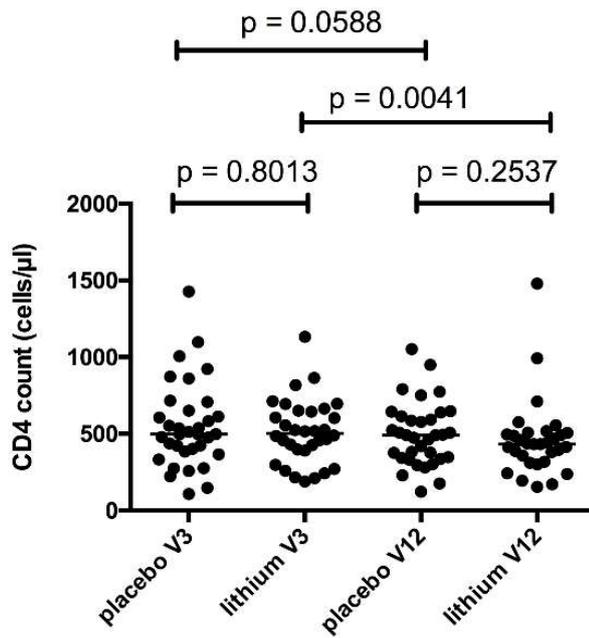
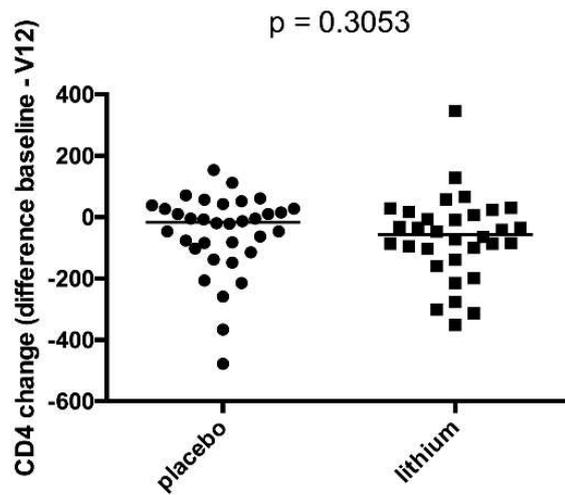
A**B**

Abbildung 8: CD4+ Count (A); CD4 + Change (B) versus Placebo und Lithium. Die Standard Parameter des HIV-Therapie Monitorings, CD4 Anzahl (Zellen/ μ l) und CD4 Verschiebung, wurden innerhalb der Placebo- bzw. der Lithium-Therapie-Subgruppe zum Zeitpunkt V3 bis V12 bzw. Baseline bis V12, verglichen.

Es wurde kein signifikanter Unterschied innerhalb der Placebo Therapie Subgruppe von V3 bis V12 beobachtet, wohingegen in der Lithium-Therapie Subgruppe ein signifikanter Abfall im zeitlichen Verlauf von V3 zu V12 gezeigt werden konnte. (Median: 497.5; 502.0; 490.0; 433.0)

Lithium hatte in unseren Messungen keinen Vorteil in Bezug auf die Verbesserung des GDS. Zusätzlich konnte davon ausgegangen werden, dass Lithium zu einem CD4+ T-Zellabfall führte. Des Weiteren hatte Lithium möglicherweise negative Auswirkungen auf *blips* und in diesem Zusammenhang könnte die antiretrovirale Therapie nicht mehr die ausreichende und zuverlässige Wirkung entfalten.

Abschließend wurden die analysierten Daten mit und ohne *blip* aufgezeigt. Insgesamt gab es 66 Messungen, jeweils 34 Proben aus der Placebo Gruppe und 32 Proben aus der Lithium-Gruppe. Es gab 60 Messungen ohne *blip*, davon waren 32 Proben von Teilnehmern aus der Placebo Gruppe und 28 Proben von Teilnehmern aus der Lithium-Gruppe. Des Weiteren lagen sechs Messungen vor, die einen *blip* aufwiesen, davon stammten zwei Proben aus der Placebo Gruppe und vier Proben aus der Lithium-Gruppe. Insgesamt zeigte sich unter Lithium-Behandlung gegenüber der Placebo Therapie also eine leichte Zunahme von *blips* (4 vs. 2), die allerdings statistisch keine Signifikanz erreichte. (Abb. 9A) Es wurde zusätzlich der CD4+ Count in der Placebo und der Lithium-Gruppe zum gleichen Zeitpunkt verglichen, mit dem Ergebnis, dass die Werte sich in der Kontroll- und Treatment Gruppe nicht signifikant voneinander unterschieden. (Abb. 9B)

A

	placebo	lithium	Total
Data analyzed			
no blip	32	28	60
blip	2	4	6
Total	34	32	66

P value	0.4202
P value summary	ns
One- or two-tailed	Two-tailed
Statistically significant? (alpha<0.05)	No

B

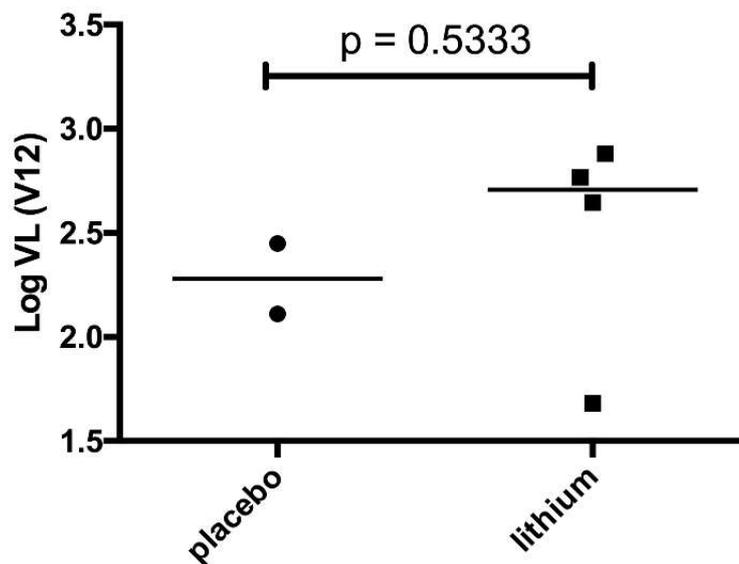


Abbildung 9: Tabelle „blip/ no blip“ und Viruslast unter Placebo vs. Lithium. Es zeigten sich 4 spontane Virusreplikationen (blips) unter Lithium-Gabe gegenüber 2 blips unter Placebo Gabe. Diese Häufung ist allerdings nicht signifikant ($p = 0.4202$, Fishers Test).

5. Diskussion

In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass im zeitlichen Verlauf von V3 zu V12 ein signifikanter Abfall des GDS innerhalb der Placebo-, sowie innerhalb der Lithium-Gruppe vorlag. Dagegen unterschieden sich die beiden Gruppen, Lithium vs. Placebo, zum gleichen Zeitpunkt V3 sowie V12 nicht signifikant voneinander. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass die Konzentration von BDNF im Plasma im Laufe der Lithium-Behandlung signifikant abfiel (Median 38.37 pg/ml vs. 30.57 pg/ml, $p = 0.0477$).

Dieses Ergebnis allerdings stand im Gegensatz zu einer früher publizierten Studie, in der gezeigt wurde, dass bei erwachsenen Ratten die BDNF- Werte im Plasma zunahmen, d.h. Lithium eine neurotrophische Wirkung einleitete.⁸¹

Neben dem signifikanten Anstieg des BDNF-Spiegels unter Lithium-Behandlung bei Ratten, konnte in einer anderen Studie ein ähnliches Ergebnis beim Menschen beobachtet werden. Der BDNF-Spiegel wurde vor und nach einer 28-tägigen Lithium Monotherapie bei Patienten mit bipolarer I-Störung während einer manischen Episode, gemessen und es wurde ein signifikanter Anstieg der Plasma BDNF-Werte nach 28 Tagen festgestellt. (Lithium-Monotherapie (510.9 ± 127.1 pg/ml) im Vergleich zur ersten Messung vor der Lithium-Therapie (406.3 ± 69.5 pg/ml) ($p = 0.03$)). Es zeigte sich somit ein Anstieg des BDNF-Spiegels bei 87 % der Patienten, der auf die Aktivierung von neurotrophischen Kaskaden unter Lithium-Einfluss hinwies. Weiterhin konnte jedoch keine klinische Verbesserung (YMRS) verzeichnet werden.⁸²

Proinflammatorische Zytokine im Liquor, Chemokine und neurodegenerative Biomarker waren in höheren Konzentrationen mit fortgeschrittener Immunsuppression assoziiert und können eine Rolle bei der Entwicklung von HAND spielen. Das Vorhandensein einiger ZNS-Biomarker kann auch eine protektive Rolle bei der Entwicklung von HAND darstellen.⁸³ Im CSF dagegen traten in unserer Studie keine signifikanten Unterschiede der BDNF-Konzentration innerhalb der Behandlungs- und Kontroll- Gruppen auf.

In einer amerikanischen Studie wurde festgestellt, dass steigende Werte von BDNF im Liquor bei HIV-positiven Patienten mit HAND, mit einer verminderten Wahrscheinlichkeit einer leichten neurokognitiven Störung (n=22) oder einer HIV-assoziierten Demenz (n=15) im Vergleich zur normalen Funktion (n=30) oder einer asymptomatischen neurokognitiven Beeinträchtigung (n=11) assoziiert waren. Erhöhte Werte des Interferon- γ waren mit einer gesteigerten Wahrscheinlichkeit einer leichten neurokognitiven Beeinträchtigung oder einer HIV-assoziierten Demenz, im Vergleich zu normalen oder asymptomatischen neurokognitiven Beeinträchtigungen, verbunden.⁸³

Weiterhin zeigte sich in unseren Messungen keine positive Korrelation zwischen Dopamin im CSF und dem GDS zum Zeitpunkt V3 ($p = 0.0637$). Zum Zeitpunkt V12 korreliert jedoch Dopamin im CSF positiv mit dem GDS ($p = 0.0355$). Eine BDNF-Zunahme unter der Lithium-Behandlung konnte positiv, wohingegen ein CD4-Abfall negativ gewertet werden konnte. Ein temporäres virologisches Therapieversagen (*blips*) unter Lithium-, versus Placebo-Therapie war in unseren Messungen leicht gehäuft (4 vs. 2), allerdings war der Unterschied nicht signifikant.

Die erhobenen Daten deuteten auf einen negativen Verlauf der CD4+ T-Zellen unter Lithium-Therapie hin. Dieses war insbesondere bei HIV-Patienten sehr kritisch zu bewerten. Möglicherweise handelte es sich dabei aber auch um Verteilungseffekte, da Lymphozyten unter einer Lithium-Therapie stärker gewebebeständig bleiben. In Folge dessen sinkt die Zahl der Lymphozyten im Blut. Fraglich ist, ob dieses Phänomen nur ein Kurzzeit-Effekt darstellte und die CD4+ T-Zellen einmalig um im Mittel -70 cells/ μ l absanken und dann stabil auf diesem Wert bleiben oder ob die CD4+ -T-Zellen im Verlauf weiter sinken. Dazu scheint es sinnvoll Langzeitdaten in weiteren Studien zu erheben.

In einer Studie aus Uganda wurde unter allen HIV-1 Subtypen bei 312 antiretroviral behandelten HIV-Patienten ohne Lithium-Behandlung ein CD4 Zellrückgang um -34,5 Zellen/Jahr [95% Konfidenzintervall (CI), -47,1, -22,0] Zellen/ μ L pro Jahr, angepasst an Alter, Geschlecht und HIV-Viruslast, gemessen.⁸⁴

Frühere Studien zeigten, dass die Abnahme der HIV-Virämie durch die antiretrovirale Therapie mit einem signifikanten Anstieg der B-Zellen und einem Anstieg der CD4+ T-Zellen einher ging.

Die Normalisierung der B-Zellzahlen kann möglicherweise durch den Rückgang der HIV-Virämie unter einer antiretroviralen Therapie erklärt werden, da über eine signifikante Abnahme reifer aktivierter und unreifer Übergangs-B-Zellen zugunsten eines Anstiegs der B-Zellzahlen berichtet wurde.⁸⁵

Es wurde der Effekt der in-vivo-Verabreichung von Lithium auf die virale Latenzmodulation bei neun antiretroviralen Therapien unterdrückten HIV-1-infizierten Personen untersucht. Hierbei zeigte sich, dass die Lithium-Carbonat-Behandlung die HIV-1-Restexpression in CD4-T-Zellen in vivo vorübergehend unterdrücken konnte, dies führte wiederum zu einer gleichzeitigen kurzfristigen Abnahme der Größe des proviralen Reservoirs.⁸⁶

In unseren Ergebnissen wurde unter Lithium-Therapie eine signifikant geringere CD4+ Zellzahl bei V12 als bei V3 gemessen. Ein CD4-Abfall wurde negativ gewertet, allerdings waren die Effekte nicht sehr stark ausgeprägt. Ein temporäres virologisches Therapieversagen unter Lithium-Therapie versus Placebo Therapie war in unseren Ergebnissen leicht gehäuft (4 vs. 2), dies stellte sich allerdings nicht signifikant dar (Median Placebo V3 = 497.5; Lithium V3 = 502.0; Placebo V12 = 490.0; Lithium V12 = 433.0). Da Lithium keinen Effekt auf den GDS hatte, waren diese Daten jedoch kritisch zu bewerten.

Ziel einer weiteren prospektiven Studie war es, die bisher wenig bekannte Rolle der generalisierten T-Zellaktivierung bei der chronischen HIV-Pathogenese und den Einfluss der Immunaktivierung auf die T-Zellaktivierung zu untersuchen. Zu Beginn der Studie wurde bei den insgesamt 151 erwachsenen Probanden mit einer frühen HIV-Infektion (davon 68 ohne antiretrovirale Therapie und 83 unter antiretroviraler Therapie) eine Assoziation zwischen der T-Zell Aktivierung und der Virämie festgestellt, darunter exponentiell hohe CD8+ T-Zell-Aktivierungswerte bei Plasma-HIV-RNA-Werten von mehr als 10 000 Kopien/mL.

Das Niveau der CD8+ T-Zell Aktivierung bei unbehandelten Probanden variierte stark zwischen den einzelnen Individuen, blieb jedoch innerhalb eines Individuums weitestgehend stabil. Die Rate des CD4+ T-Zellverlustes wurde mit der T-Zell-Aktivierung und dem Plasma-HIV-RNA-Spiegel bei unbehandelten Probanden unabhängig voneinander miteinander verglichen. Von den 68 Probanden, die keine Therapie erhielten, zeigte sich bei 15 Patienten ein Rückgang der CD4+ T-Zellzahlen auf 350 Zellen/mm³ oder weniger. Wohingegen bei Individuen mit höheren Ausgangsquartilen der CD8+ T-Zell-Aktivierung, eine höhere Wahrscheinlichkeit vorlag, eine Abnahme der CD4+ T-Zellzahl zu beobachten ($p = 0.002$ nach dem Log-Rank-Test). Ähnliche Trends wurden zudem für den Plasma-HIV-RNA-Spiegel ($p = 0.004$) gemessen, jedoch nicht für die CD4+ T-Zellaktivierung ($p = 0.21$). Die Daten deuteten darauf hin, dass der immunologische Aktivierungssollwert in der HIV-Infektion bereits sehr früh festgelegt wurde. Demnach bestimmt dieser Sollwert sehr wahrscheinlich auch die Rate, mit der CD4+ T-Zellen im Laufe der Zeit verloren gehen.⁸⁷

In unserer Studie korrelierte die CD38+/HLADR Immunaktivierung von CD8+ T-Zellen positiv mit der HIV-Viruslast bei Patienten, die unter der antiretroviralen Therapie eine spontane Virusreplikation gezeigt hatten ($p = 0.0042$). Insgesamt ist ein Trend erkennbar gewesen, dass Patienten mit *blip* eine höhere Immunaktivierung zeigten, als Patienten ohne *blip* (Median 4.185% vs. 5.895%, $p = 0.1146$). Die Behandlung mit Lithium allerdings hatte keinen Einfluss auf die Immunaktivierung (CD38+/HLADR+) der CD8+ T-Zellen.

Proinflammatorische Zytokine im Liquor, Chemokine und neurodegenerative Biomarker waren in höheren Konzentrationen mit fortgeschrittener Immunsuppression assoziiert und können eine Rolle bei der Entwicklung von HAND spielen.

Das Vorhandensein einiger ZNS-Biomarker, wie beispielsweise erhöhte Niveaus von S100B, PDGF-AA, BDNF und sRAGE waren mit verminderten Wahrscheinlichkeiten einer leichten neurokognitiven Störung oder einer HIV-assoziierten Demenz verbunden und könnte auch eine protektive Rolle bei der Entwicklung von HAND darstellen.⁸³

In dieser Studie mit 78 HIV- seropositive Patienten aus Rakai, Uganda zeigten proinflammatorische CSF Zytokine, Chemokine und neurodegenerative Biomarker erhöhte Konzentrationen bei erweiterter Immunsuppression. Es wurde darauf hingewiesen, dass diese bei der Entwicklung von HAND von Bedeutung sein können und speziell, dass das Vorhandensein von ZNS Biomarkern einen protektiven Effekt auf die Entstehung von HAND hat. Kennzeichen einer fortschreitenden unbehandelten HIV-Infektion mit folgender möglicher Immunschwäche waren typischerweise der Rückgang der Anzahl und Funktionalität der T-Zellen.⁸³

In einer weiteren Studie bei HIV-infizierten Patienten mit kognitiven Beeinträchtigungen konnte Lithium, hinsichtlich der Sicherheit und Verträglichkeit, als sicheres Medikament eingestuft werden. Zudem deuten die Ergebnisse der Neurobiologie auf eine Verbesserung der HIV-assoziierten Schäden im zentralen Nervensystem hin. Die Autoren der Studie sahen weitere Untersuchungen von Lithium als Begleitbehandlung für Patienten mit HAND ebenfalls als gerechtfertigt an.⁶⁴

In Bezug auf die Sicherheit, Verträglichkeit und Wirksamkeit von Lithium, konnte in einer einarmigen, offenen, 24-wöchigen Pilotstudie bei Patienten mit HAND, die sich seit mindestens 24 Wochen einer stabilen antiretroviralen Therapie unterzogen haben, eine verbesserte neuropsychologischen Leistung gezeigt werden. Allerdings ist diese Studie keine kontrollierte Studie gewesen, so dass hier zwischen Learning-Effekten (wie sie in unserer Studie klar zu sehen gewesen sind) und einem möglichen therapeutische Effekt von Lithium nicht unterschieden werden konnte. Des Weiteren war die Therapie mit Lithium gut verträglich, es gab keine Nebenwirkungen der Stufe 3 oder 4 und es wurden keine vorzeitigen Unterbrechungen registriert.⁸⁸ Die Autoren der Studie berichteten über keine negativen Effekte von Lithium auf die CD4-Zellzahl, zeigten in der Publikation allerdings auch keine Rohdaten, sondern lediglich einen p-Wert mit 0.2, sodass an dieser Stelle nicht sicher ausgeschlossen werden konnte, dass Lithium wirklich keinen Effekt auf CD4+ T-Zellzahl hat.

Die Aktivierungsmarker CD38+ und HLADR auf den CD4+ und CD8+T-Zellen korrelierten in einer anderen Studie zwar nicht mit dem GDS, zeigt jedoch unter Co-Infektion im T-Zell-Kompartiment eine signifikant erhöhte Expression der Aktivierungsmarker. Das deutete wiederum darauf hin, dass eine Co-Infektion mit einer INF-Monozytenaktivierung vom Typ 1 assoziiert war. Diese Monozytenaktivierung korrelierte selbst bei Probanden mit kontrollierter HIV-Infektion mit kognitiven Beeinträchtigungen. Somit können laut Studie coinfizierte und HIV-unterdrückte Patienten mit einer niedrigen Viruslast, unter erneuter Immunaktivierung als bevorzugte Kandidaten fungieren, da sie möglicherweise von einer erfolgreichen Anti-HCV-Therapie profitieren können.⁸⁹

In unserem vorgestellten Studienkollektiv konnte kein signifikanter Unterschied in der Immunaktivierung (CD38+/HLADR+) der CD8+ T-Zellen zwischen Patienten, die Lithium zusätzlich zu ihrer HAART-Therapie einnahmen und den Patienten, die kein Lithium zu ihrer HAART Therapie einnahmen, gezeigt werden. Es ist jedoch bereits bekannt, dass Lithium einen immunmodulierenden Effekt hat.⁹⁰

Dennoch gab es widersprüchliche Ergebnisse bezüglich der immunmodulierenden Aktivität von Lithium. Einzelne Studien berichteten von einem Anstieg proinflammatorischer Cytokine, andere dagegen zeigten, dass Lithium die Produktion proinflammatorischer Cytokine entweder nicht beeinflusst oder herabsenkt.⁹¹ Bei Patienten, die Lithium zur Therapie der bipolaren Störung einnahmen, konnte gezeigt werden, dass eine effektive Therapie mit einer Reduktion der durch die Immunaktivierung erhöhten, Zytokine einherging⁹⁰.

Ein Vergleich früherer Ergebnisse zu der hier vorgestellten Studie ist schwierig, da unseres Wissens nach, der Einfluss von Lithium auf die Immunaktivierung von CD8 positiven Zellen vorher noch nicht untersucht wurde. Als methodische Schwäche konnte das neurologische Impairment gesehen werden, das zu Beginn nicht hoch genug war und man möglicherweise aufgrund des niedrigen Impairments keine Effekte erkennen konnte.

Gemäß der in unserer Studie gewonnenen Daten ist ein Einsatz von Lithium bei Patienten mit HAND zunächst nicht angezeigt. Allerdings sollten weiterführende Studien dieses genauer untersuchen. Als Beispiel kann hier der Schwerpunkt auf Patienten mit stärkerem Impairment gelegt und diese unter einer Lithium-Therapie untersucht werden. Des Weiteren sollte auf eine Vermeidung des Learning-Effekts geachtet werden und daher umfangreichere Tests ohne Wiedererkennungseffekt zu kognitivem Impairment der Patienten wiederholt werden.

Der Schwerpunkt weiterer Studien sollte besonders auf der Sicherheit in Bezug auf die Entwicklung der CD4+ T-Zellen im Verlauf, mögliche „blips“ und der steigenden Viruslast unter auftretenden „blips“, liegen.

6. Zusammenfassung

6.1 Hintergrund

Patienten mit einer HIV-Infektion werden mit antiretroviralen Medikamenten therapiert, um die Krankheitsprogression zu verhindern. Bei Patienten mit HIV-assoziierten neurokognitiven Defiziten soll unabhängig von der CD4+ T-Zellzahl, eine Therapie zwingend erfolgen, um die HIV-Replikation zu hemmen und klinische HIV-induzierte Symptome zu verbessern. Für HIV-assoziierte neurokognitive Störungen als Folge einer Infektion mit HIV gibt es jedoch noch keine ausreichende Therapie.

6.2 Methoden

In dieser Arbeit wurden PBMC, Serum- und Liquorproben von Teilnehmern einer placebokontrollierten klinischen Studie analysiert, in der die Wirksamkeit einer Lithium-Therapie bei HIV-Patienten mit HAND untersucht wurde (Pan African Clinical Trials Registry (PACTR), identifier PACTR201310000635418). Die Studienteilnehmer erhielten für 24 Wochen zusätzlich zu ihrer antiretroviralen Medikation Lithiumcarbonat bzw. Placebo. Die Einschlusskriterien waren eine mindestens sechs Monaten bestehende antiretrovirale Therapie bei unterdrückter Viruslast und eine mittelschwere bis schwere Manifestation der HIV-assoziierten neurokognitiven Störung (HAND).

Die Studie wurde in Primary Care Kliniken des öffentlichen Sektors in Kapstadt, Südafrika, durchgeführt. Als primärer Wirksamkeitsendpunkt wurde die Veränderung des Global Deficit Scores (GDS) von Beginn der Studie bis zum Ende der 24. Woche festgelegt. Es hatten insgesamt 66 Patienten an der Studie teilgenommen, davon bekamen 32 Patienten das Medikament Lithiumcarbonat und 34 Patienten ein Placebo.

Den Patienten wurden zu den Zeitpunkten Baseline (V3) und 24. Woche (V12) Blut- und CSF-Proben entnommen. In der vorliegenden Arbeit wurden die Proben mittels Durchflusszytometrie und ELISA untersucht. Aus eingefrorenen PBMC wurde mit Hilfe einer CD38/HLADR-Färbung die Immunaktivierung von T-Lymphozyten bestimmt, sowie mit Hilfe einer CD19/CD27-Färbung der Anteil von memory-B-Zellen bestimmt. Mittels ELISA wurde die Konzentration von Human Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) oder Dopamin (DA) in Serum, Plasma und CSF bestimmt. Die Daten wurden mit dem GDS sowie weiteren Progressionsmarkern der HIV-Infektion wie Viruslast und CD4+ Zellzahl korreliert.

6.3 Ergebnisse

Von den 66 Teilnehmern, die die Studie begonnen haben, schlossen insgesamt 61 Teilnehmer ab, darunter hatten 30 Patienten Lithiumcarbonat und 31 Patienten ein Placebo eingenommen. Das Durchschnittsalter lag bei 40 Jahren und die mittlere CD4+ T-Zellzahl umfasste 500 Zellen pro ml. Die mediane Veränderung des GDS zwischen Studienbeginn und Woche 24 betrug bei Lithium und Placebo -0.57 (95% Konfidenzintervall [CI] -0.77; -0.32) bzw. -0.56 (-0.69; -0.34) mit einer mittleren Differenz von -0.054 (95% CI -0.26; 0.15) und $p = 0.716$. Die Konzentrationen des Standard 1H-MRS-Metaboliten wiesen zwischen den Behandlungsarmen vergleichsweise ähnliche Ergebnisse auf. Es traten sechs schwerwiegende unerwünschte Ereignisse auf, aber keines wurde in Zusammenhang mit dem Studienmedikament betrachtet. Zudem wurde Lithium gut vertragen.

Das Hauptergebnis der Lithium-Studie beschrieb die Verteilung des GDS innerhalb der Placebo-, und der Lithium-Therapie-Subgruppe. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass im zeitlichen Verlauf von V3 zu V12 ein signifikanter Abfall des GDS innerhalb der Placebo-, sowie innerhalb der Lithium-Gruppe beobachtet werden konnte, wohingegen bei den Gruppen untereinander, Lithium versus Placebo, zu den jeweiligen Zeitpunkten V3 sowie V12, ähnliche Werte gemessen werden konnten und sich daher die Lithium-, und die Placebo-Gruppe nicht signifikant voneinander unterschieden.

Die Konzentration von BDNF im Plasma fiel im Laufe der Lithium-Therapie signifikant ab und im CSF traten keine signifikanten Unterschiede auf. Die Behandlung mit Lithium hatte keinen Einfluss auf die Immunaktivierung der CD8+ T-Zellen und es zeigte sich keine positive Korrelation zwischen Dopamin im CSF und dem GDS zum Zeitpunkt V3. Zum Zeitpunkt V12 korrelierte jedoch Dopamin im CSF positiv mit dem GDS und die CD38/HLADR Immunaktivierung von CD8+ T-Zellen korrelierte positiv mit der HIV-Viruslast bei Patienten, die unter antiretroviraler Therapie eine spontane Virusreplikation (*blip*) gezeigt haben. Insgesamt war ein Trend erkennbar, dass Patienten mit *blip* eine höhere Immunaktivierung zeigen, als Patienten ohne *blip*. Weiterhin zeigte sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen der CD4+ T-Zell Verschiebung von der Baseline bis V12 und der spontanen Virusreplikation. Die Gruppen „*blip*“ und „*no blip*“ unterschieden sich im Zusammenhang mit einer CD4+ T-Zell Verschiebung, von der Baseline bis V12, nicht signifikant voneinander. Es wurde kein signifikanter Unterschied der CD4+ T-Zellenanzahl (Zellen/ μ l) und CD4+ T-Zell Verschiebung innerhalb der Placebo-Therapie-Subgruppe von V3 bis V12 beobachtet, wohingegen in der Lithium-Therapie-Subgruppe ein signifikanter Abfall im zeitlichen Verlauf von V3 zu V12 gemessen werden konnte. Es zeigten sich vier spontane Virusreplikationen unter Lithium-Gabe gegenüber zwei *blips* unter Placebo Gabe, jedoch stellte sich diese Häufung als nicht signifikant dar.

6.4 Diskussion

Die Patienten mit HAND, die zusätzlich zu einer antiretroviralen Therapie eine medikamentöse Behandlung mit Lithium erhielten, haben dieses klinisch gut vertragen. Jedoch konnte keine Verbesserung in Bezug auf neurokognitive Beeinträchtigungen für die Studienteilnehmer beobachtet werden. Aus den in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnissen ließ sich zudem ableiten, dass ein signifikanter Abfall des GDS im zeitlichen Verlauf von V3 zu V12 innerhalb der Placebo-, und Lithium- Gruppe, sowie eine Verringerung der BDNF Konzentration im Plasma zu verzeichnen war. Insgesamt war ein Trend erkennbar, dass Patienten mit *blip* eine höhere Immunaktivierung zeigten, als Patienten ohne *blip*. Jedoch hatte die Behandlung mit Lithium keinen Einfluss auf die Immunaktivierung der CD8+ T-Zellen. Des Weiteren zeigte sich unter der Lithium-Therapie ein signifikanter Abfall der CD4+ Zellzahlen.

7. Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

AAN	American Academy of Neurology
AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrom
ANI	Asymptomatic neurocognitive impairment
ANPD	Asymptomatische neuropsychologische Defizite
ART	Antiretrovirale Therapie
AZT	Azidothymidin
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
BSA	Bovines Serum Albumin
CD	Cluster of differentiation
CMI	zellvermittelte Immunantwort

CPE	CNS Penetration Effectiveness
CSF	Cerebrospinal fluid
CTT	Color Trail Test
DA	Dopamin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ELISA	Enzym-linked Immunosorbent Assay
FA	Formaldehyd
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FBS	Fetal Bovine Serum
GALT	Gut Associated Lymphatic Tissue
GDS	Global Deficit Score
GSK-3 β	Glykogensynthase-Kinase-3 beta
HAD	HIV-assozierte Demenz
HAND	HIV-assozierte neurokognitive Defizite
HIV	Human immune deficiency virus
HLA-DR	Human Leukocyte Antigen - antigen D Related
IL	Interleukin
IMP	Inositolmonophosphat
LDS	Lithiumdodecylsulfat
mTPBS	mouse Tonicity Phosphate Buffered Saline
NK	Natural Killer
NNRTI	Nicht-Nukleosid-Reverse-Transkriptase-Inhibitor

NRTI	Nukleosid-Reverse-Transkriptase-Inhibitor
PASAT	Paced Auditory Serial Addition Test
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PI	Protease-Inhibitor
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PKC α	Protein Kinase C alpha
RPMI	Zellkulturmedium, erstmals am Roswell Park Memorial Institute entwickelt
RT	Raumtemperatur
SCWT	Stroop Color Word Test
TNF	Tumornekrosefaktor
VEGF	Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
WAIS-III	Wechsler Adult Intelligence Scale-Third Edition

7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Elektrogeräte.....	16
Tabelle 2: Verwendete Plastikmaterialien	17
Tabelle 3: Verwendete Glasmaterialien	17
Tabelle 4: Verwendete Verbrauchmaterialien	17
Tabelle 5: Verwendete Chemikalien.....	18
Tabelle 6: Verwendete Lösungen und Puffer	19
Tabelle 7: Verwendete Antikörper (B-Zell Subsets)	19
Tabelle 8: T-Zell-Aktivierung.....	20

7.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Einfluss von Lithium auf den Global Deficit Score (GDS).....	25
Abbildung 2: Einfluss von Lithium auf Immunaktivierung und neurochemische Marker.	26
Abbildung 3: Werte im CSF: BDNF in CSF (A); DA in CSF (B) vs. Placebo (V3, V12) und Lithium (V3, V12).	27
Abbildung 4: Biomarker für HAND im Blut: CD8+, CD38+, HLADR+ (A); CD27+ (B); BDNF in Plasma (C); DA in CSF (D) vs. GDS.	29
Abbildung 5: Biomarker für HAND im CSF: DA in CSF in V3 (A); DA in CSF in V12 (B) vs. GDS.....	30
Abbildung 6: Biomarker (CD8+, CD38+/HLADR+) im Blut vs. Viruslast (A) und <i>blip/no blip</i> (B).	32
Abbildung 7: CD4 Change vs. Viruslast (A) und <i>no blip/blip</i> (B).....	34
Abbildung 8: CD4+ Count (A); CD4 + Change (B) versus Placebo und Lithium.	36
Abbildung 9: Tabelle „blip/ no blip“ und Viruslast unter Placebo vs. Lithium.....	38

8. Literaturverzeichnis

1. World Health Organization. Number of people (all ages) living with HIV. Global Health Observatory (GHO) data (accessed 2019 Jan 27).
2. UNAIDS. aidsinfo. (<https://www.unaids.org/en>).
3. Löffler G, Petrides PE. Biochemie und Pathobiochemie, Mit 233 Tabellen. 6th ed. Berlin, Heidelberg, New York, Barcelona, Budapest, Hongkong, London, Mailand, Paris, Singapur, Tokio: Springer, 1998.
4. Hileman CO, Funderburg NT. Inflammation, Immune Activation, and Antiretroviral Therapy in HIV. *Curr HIV/AIDS Rep* 2017;14:93–100.
5. Appay V, Kelleher AD. Immune activation and immune aging in HIV infection. *Curr Opin HIV AIDS* 2016;11:242–9.
6. Stecher M, Schommers P, Schmidt D, et al. Antiretroviral treatment indications and adherence to the German-Austrian treatment initiation guidelines in the German ClinSurv HIV Cohort between 1999 and 2016. *Infection* 2019;47:247–55.
7. Sethi AK, Celentano DD, Gange SJ, Moore RD, Gallant JE. Association between adherence to antiretroviral therapy and human immunodeficiency virus drug resistance. *Clin Infect Dis* 2003;37:1112–8.
8. Severe P, Juste MAJ, Ambroise A, et al. Early versus standard antiretroviral therapy for HIV-infected adults in Haiti. *N Engl J Med* 2010;363:257–65.
9. Lampe FC, Gatell JM, Staszewski S, et al. Changes over time in risk of initial virological failure of combination antiretroviral therapy: a multicohort analysis, 1996 to 2002. *Arch Intern Med* 2006;166:521–8.
10. Bannister WP, Kirk O, Gatell JM, et al. Regional changes over time in initial virologic response rates to combination antiretroviral therapy across Europe. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2006;42:229–37.
11. Daar ES. Novel approaches to HIV therapy. *F1000Res* 2017;6:759.
12. Krebs SJ, Ananworanich J. Immune activation during acute HIV infection and the impact of early antiretroviral therapy. *Curr Opin HIV AIDS* 2016;11:163–72.

- 13.** Egger M, May M, Chene G, et al. Prognosis of HIV-1-infected patients starting highly active antiretroviral therapy: a collaborative analysis of prospective studies. *Lancet* 2002;360:119–29.
- 14.** Gueler A, Moser A, Calmy A, et al. Life expectancy in HIV-positive persons in Switzerland: matched comparison with general population. *AIDS* 2017;31:427–36.
- 15.** Teeraananchai S, Kerr SJ, Amin J, Ruxrungtham K, Law MG. Life expectancy of HIV-positive people after starting combination antiretroviral therapy: a meta-analysis. *HIV Med* 2017;18:256–66.
- 16.** Kaufmann GR, Elzi L, Weber R, et al. Interruptions of cART limits CD4 T-cell recovery and increases the risk for opportunistic complications and death. *AIDS* 2011;25:441–51.
- 17.** Barbour JD, Ndhlovu LC, Xuan Tan Q, et al. High CD8+ T cell activation marks a less differentiated HIV-1 specific CD8+ T cell response that is not altered by suppression of viral replication. *PLoS One* 2009;4:e4408.
- 18.** Günthard HF, Saag MS, Benson CA, et al. Antiretroviral Drugs for Treatment and Prevention of HIV Infection in Adults: 2016 Recommendations of the International Antiviral Society-USA Panel. *JAMA* 2016;316:191–210.
- 19.** Imran M, Manzoor S, Saalim M, et al. HIV-1 and hijacking of the host immune system: the current scenario. *APMIS* 2016;124:817–31.
- 20.** Younas M, Psomas C, Reynes J, Corbeau P. Immune activation in the course of HIV-1 infection: Causes, phenotypes and persistence under therapy. *HIV Med* 2016;17:89–105.
- 21.** Douek DC. Immune activation, HIV persistence, and the cure. *Top Antivir Med* 2013;21:128–32.
- 22.** Zonios DI, Falloon J, Bennett JE, et al. Idiopathic CD4+ lymphocytopenia: natural history and prognostic factors. *Blood* 2008;112:287–94.
- 23.** Lin RY, Nygren EJ, Valinsky JE, Ralph HE. T cell immunophenotypes and DR antigen expression in intravenous drug users. Relationship to human immunodeficiency virus serology. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1988;87:263–8.

24. Hazenberg MD, Stuart JW, Otto SA, et al. T-cell division in human immunodeficiency virus (HIV)-1 infection is mainly due to immune activation: a longitudinal analysis in patients before and during highly active antiretroviral therapy (HAART). *Blood* 2000;95:249–55.
25. Berman MA, Sandborg CI, Calabia BS, Andrews BS, Friou GJ. Interleukin 1 inhibitor masks high interleukin 1 production in acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). *Clin Immunol Immunopathol* 1987;42:133–40.
26. Pasquereau S, Kumar A, Herbein G. Targeting TNF and TNF Receptor Pathway in HIV-1 Infection: from Immune Activation to Viral Reservoirs. *Viruses* 2017;9:64. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28358311>).
27. Dalgleish AG, O'Byrne KJ. Chronic immune activation and inflammation in the pathogenesis of AIDS and cancer. *Adv Cancer Res* 2002;84:231–76.
28. Mellors JW, Munoz A, Giorgi JV, et al. Plasma viral load and CD4+ lymphocytes as prognostic markers of HIV-1 infection. *Ann Intern Med* 1997;126:946–54.
29. Antinori A, Arendt G, Becker JT, et al. Updated research nosology for HIV-associated neurocognitive disorders. *Neurology* 2007;69:1789–99. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4472366/>).
30. Arendt G. Diagnostik und Therapie HIV-1-assoziierter neurologischer Erkrankungen, Leitlinie für Diagnostik und Therapie in der Neurologie, 2012. (https://www.dgn.org/images/red_leitlinien/LL_2012/pdf/030-044I_S1_HIV-1_assozierte_Erkrankungen_2013_verlaengert.pdf).
31. Eggers C. HIV-1 associated encephalopathy and myelopathy [HIV-1-assozierte Enzephalopathie und Myelopathie]. *Nervenarzt* 2000;71:677–84.
32. Clifford DB. HIV-associated neurocognitive disorder. *Curr Opin Infect Dis* 2017;30:117–22.
33. Cysique LAJ, Maruff P, Brew BJ. Antiretroviral therapy in HIV infection: are neurologically active drugs important? *Archives of Neurology* 2004;61:1699–704.
34. Arendt G. Neurologische und neuropsychiatrische Aspekte der HIV-Infektion: Grundlagen, Diagnostik und Therapie. Kohlhammer, 2007.

35. Griffin TZ. The HAND Database: a gateway to understanding the role of HIV in HIV-associated neurocognitive disorders. SpringerLink (Online service).
36. Carey CL, Woods SP, Gonzalez R, et al. Predictive validity of global deficit scores in detecting neuropsychological impairment in HIV infection. *J Clin Exp Neuropsychol* 2004;26:307–19.
37. Jones BN, Teng EL, Folstein MF, Harrison KS. A New Bedside Test of Cognition for Patients with HIV Infection. *Ann Intern Med* 1993;119:1001–4.
38. Kalbe E, Kessler J, Calabrese P, et al. DemTect: a new, sensitive cognitive screening test to support the diagnosis of mild cognitive impairment and early dementia. *Int J Geriatr Psychiatry* 2004;19:136–43.
39. Tüdös Z, Hok P, Hrdina L, Hlušík P. Modality effects in paced serial addition task: Differential responses to auditory and visual stimuli. *Neuroscience* 2014;272:10–20. (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0306452214003698>).
40. Gielen J, Wiels W, van Schependom J, et al. The effect of task modality and stimulus frequency in paced serial addition tests on functional brain activity. *PLoS One* 2018;13:e0194388-e0194388. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29543871>).
41. Brandt J. The hopkins verbal learning test: Development of a new memory test with six equivalent forms. *Clinical Neuropsychologist* 1991;5:125–42.
42. Bailey KC, Soble JR, Bain KM, Fullen C. Embedded Performance Validity Tests in the Hopkins Verbal Learning Test—Revised and the Brief Visuospatial Memory Test—Revised: A Replication Study. *Arch Clin Neuropsychol* 2017;33:895–900.
43. Shirani A, Newton BD, Okuda DT. Finger tapping impairments are highly sensitive for evaluating upper motor neuron lesions. *BMC Neurol* 2017;17:55. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28327094>).
44. Arnold G, Boone KB, Lu P, et al. SENSITIVITY AND SPECIFICITY OF FINGER TAPPING TEST SCORES FOR THE DETECTION OF SUSPECT EFFORT. *Clin Neuropsychol* 2005;19:105–20.
45. D. Austin, J. McNames, K. Klein, H. Jimison, M. Pavel. A Statistical Characterization of the Finger Tapping Test: Modeling, Estimation, and Applications. *IEEE Journal of Biomedical and Health Informatics* 2015;19:501–7.

46. Matthews CG, Klove H. Instruction manual for the adult neuropsychology test battery. Madison, WI: University of Wisconsin Medical School 1964;36.
47. Erdodi L, Seke K, Shahein A, Tyson B, Sagar S, Roth R. Low scores on the Grooved Pegboard Test are associated with invalid responding and psychiatric symptoms. *Psychology & Neuroscience* 2017;10:325–44.
48. Wechsler D. Manual for the Wechsler Adult Intelligence Scale. Oxford, England: Psychological Corp, 1955.
49. Wechsler D. WAIS-iii. Psychological Corporation San Antonio, TX, 1997.
50. Kaplan E, Fein D, Morris R, Delis D. Manual for the WAIS-R as a neuropsychological instrument. New York: Psychological Corporation 1991.
51. Kreiner DS, Ryan JJ. Memory and Motor Skill Components of the WAIS-III Digit Symbol-Coding Subtest. *Clin Neuropsychol* 2001;15:109–13.
52. D'Elia L, Satz P, Uchiyama CL, White T. Color trails test. PAR Odessa, FL, 1996.
53. Rabelo IS'A, Pacanaro SV, Rossetti MdO, et al. Color Trails Test: a Brazilian normative sample. *Psychology & Neuroscience* 2010;3:93–9.
(http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1983-32882010000100012&nrm=iso).
54. Stroop JR. Studies of interference in serial verbal reactions. *Journal of Experimental Psychology* 1935;18:643–62.
55. Scarpina F, Tagini S. The Stroop Color and Word Test. *Front Psychol* 2017;8:557.
(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28446889>).
56. Kanmogne GD, Fonsah JY, Tang B, et al. Effects of HIV on executive function and verbal fluency in Cameroon. *Sci Rep* 2018;8:17794.
(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30542105>).
57. Gläscher J, Adolphs R, Tranel D. Model-based lesion mapping of cognitive control using the Wisconsin Card Sorting Test. *Nat Commun* 2019;10:20.
(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30604744>).
58. Meyers JE, Meyers KR. Rey Complex Figure Test and recognition trial professional manual. Psychological Assessment Resources, 1995.

- 59.** Sapozhnikova A, Smith BL. Assessment Intervention Using the Rey–Osterrieth Complex Figure Test: A Clinical Illustration. *Journal of Personality Assessment* 2017;99:503–9.
- 60.** Ardila A, Ostrosky-Solís F, Bernal B. Cognitive testing toward the future: The example of Semantic Verbal Fluency (ANIMALS). *International Journal of Psychology* 2006;41:324–32.
- 61.** Blackstone, K., Moore, D. J., Franklin, D. R., Clifford, D. B., Collier, A. C., Marra, C. M., ... Heaton, R. K. Defining Neurocognitive Impairment in HIV: Deficit Scores versus Clinical Ratings, 2012. (<http://doi.org/10.1080/13854046.2012.694479>).
- 62.** Arendt G, Grauer O, Hahn K, Maschke M, Obermann M, Husstedt IW. Neues bei HIV und Neuro-Aids [Update HIV-Infection and Neuro-Aids]. *Akt Neurol* 2015;42:445–55.
- 63.** Forlenza OV, De-Paula VJR, Diniz BSO. Neuroprotective Effects of Lithium: Implications for the Treatment of Alzheimer’s Disease and Related Neurodegenerative Disorders. *ACS Chemical Neuroscience* 2014;5:443–50. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4063497/>).
- 64.** Schifitto G, Zhong J, Gill D, et al. Lithium therapy for HIV-1 Associated Neurocognitive Impairment. *Journal of neurovirology* 2009;15:176–86. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2747099/>).
- 65.** Compton MT, Nemeroff CB. The treatment of bipolar depression. *J Clin Psychiatry* 2000;61 Suppl 9:57–67.
- 66.** Forlenza OV, Diniz BS, Radanovic M, Santos FS, Talib LL, Gattaz WF. Disease-modifying properties of long-term lithium treatment for amnesic mild cognitive impairment: randomised controlled trial. *British Journal of Psychiatry* 2011;198:351–6. (<https://www.cambridge.org/core/article/diseasemodifying-properties-of-longterm-lithium-treatment-for-amnesic-mild-cognitive-impairment-randomised-controlled-trial/C673342DBC81E80462318BF208B9A8F7>).
- 67.** Hooper C, Killick R, Lovestone S. The GSK3 hypothesis of Alzheimer's disease. *J Neurochem* 2008;104:1433–9.

- 68.** Pasquali L, Busceti CL, Fulceri F, Paparelli A, Fornai F. Intracellular pathways underlying the effects of lithium. *Behav Pharmacol* 2010;21:473–92.
- 69.** Kirshenboim N, Plotkin B, Shlomo SB, Kaidanovich-Beilin O, Eldar-Finkelman H. Lithium-mediated phosphorylation of glycogen synthase kinase-3beta involves PI3 kinase-dependent activation of protein kinase C-alpha. *J Mol Neurosci* 2004;24:237–45.
- 70.** Freland L, Beaulieu J-M. Inhibition of GSK3 by lithium, from single molecules to signaling networks. *Front Mol Neurosci* 2012;5:14.
(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22363263>).
- 71.** Diniz BS, Teixeira AL. Brain-Derived Neurotrophic Factor and Alzheimer's Disease: Physiopathology and Beyond. *NeuroMolecular Medicine* 2011;13:217–22.
- 72.** Nunes PV, Forlenza OV, Gattaz WF. Lithium and risk for Alzheimer's disease in elderly patients with bipolar disorder. *British Journal of Psychiatry* 2007;190:359–60.
- 73.** Macdonald A, Briggs K, Poppe M, Higgins A, Velayudhan L, Lovestone S. A feasibility and tolerability study of lithium in Alzheimer's disease. *Int J Geriatr Psychiatry* 2008;23:704–11.
- 74.** Leyhe T, Eschweiler GW, Stransky E, et al. Increase of BDNF serum concentration in lithium treated patients with early Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 2009;16:649–56.
- 75.** Schifitto G, Zhong J, Gill D, et al. Lithium therapy for human immunodeficiency virus type 1-associated neurocognitive impairment. *Journal of neurovirology* 2009;15:176–86.
- 76.** Decloedt EH, Freeman C, Howells F, et al. Moderate to severe HIV-associated neurocognitive impairment: A randomized placebo-controlled trial of lithium. *Medicine* 2016;95:e5401.
- 77.** Abnova. Dopamin Elisa-Protokoll.
(www.abnova.com/protocol_pdf/KA1887.pdf).
- 78.** Abcam Elisa. (<https://www.abcam.com/human-bdnf-elisa-kit-ab99978.html>).
- 79.** BD Biosciences. FACSCalibur, 2019. (wwwbdbiosciences.com).

- 80.** Medistat.
(<https://www.medistat.de/glossar/zweistichprobenverfahren/wilcoxon-test-fuer-paardifferenzen/>).
- 81.** Caberlotto L, Carboni L, Zanderigo F, et al. Differential effects of glycogen synthase kinase 3 (GSK3) inhibition by lithium or selective inhibitors in the central nervous system. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2013;386:893–903.
- 82.** Sousa RT de, van de Bilt, Martinus T, Diniz BS, et al. Lithium increases plasma brain-derived neurotrophic factor in acute bipolar mania: a preliminary 4-week study. *Neurosci Lett* 2011;494:54–6.
- 83.** Abassi M, Morawski BM, Nakigozi G, et al. Cerebrospinal fluid biomarkers and HIV-associated neurocognitive disorders in HIV-infected individuals in Rakai, Uganda. *Journal of neurovirology* 2017;23:369–75.
- 84.** Kiwanuka N, Robb M, Laeyendecker O, et al. HIV-1 viral subtype differences in the rate of CD4+ T-cell decline among HIV seroincident antiretroviral naive persons in Rakai district, Uganda. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2010;54:180–4.
- 85.** Moir S, Malaspina A, Ho J, et al. Normalization of B cell counts and subpopulations after antiretroviral therapy in chronic HIV disease. *J Infect Dis* 2008;197:572–9.
- 86.** Puertas MC, Salgado M, Moron-Lopez S, et al. Effect of lithium on HIV-1 expression and proviral reservoir size in the CD4+ T cells of antiretroviral therapy suppressed patients. *AIDS* 2014;28:2157–9.
- 87.** Deeks SG, Kitchen CMR, Liu L, et al. Immune activation set point during early HIV infection predicts subsequent CD4+ T-cell changes independent of viral load. *Blood* 2004;104:942–7.
- 88.** Letendre SL, Woods SP, Ellis RJ, et al. Lithium improves HIV-associated neurocognitive impairment. *AIDS* 2006;20:1885–8.
(https://journals.lww.com/aidsonline/Fulltext/2006/09110/Lithium_improves_HIV_associated_neurocognitive.12.aspx).

- 89.** Rempel H, Sun B, Calosing C, Abadjian L, Monto A, Pulliam L. Monocyte activation in HIV/HCV coinfection correlates with cognitive impairment. *PLoS One* 2013;8:e55776.
- 90.** Rapaport MH, Guylai L, Whybrow P. Immune parameters in rapid cycling bipolar patients before and after lithium treatment. *Journal of Psychiatric Research* 1999;33:335–40.
(<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022395699000072>).
- 91.** Petersein C, Sack U, Mergl R, et al. Impact of lithium alone and in combination with antidepressants on cytokine production in vitro. *Journal of Neural Transmission* 2015;122:109–22. (<https://doi.org/10.1007/s00702-014-1328-6>).
