

## 2. Patienten, Material und Methoden

### 2.1. Patienten

Die Patienten wurde als konsekutive Kohorte aus der HIV-Tagesklinik der II. Medizinischen Klinik des Virchow-Klinikums (jetzt: Humboldt-Universität zu Berlin) rekrutiert. Die labortechnischen Untersuchungen erfolgten im Rahmen einer Routine-Blutentnahme. Alle Patienten gaben ihr mündliches Einverständnis für die Entnahme von Material für die vorliegende Untersuchung. Zudem erfolgte eine ausführliche Anamneseerhebung sowie ein gründlicher körperlicher Status zur Detektion etwaiger HIV-assoziiertes Komplikationen.

Alle untersuchten Individuen hatten eine gesicherte HIV-Infektion und waren älter als 18 Jahre. Keine der untersuchten Frauen war zum Untersuchungszeitpunkt schwanger, keiner der Patienten wurde mit immunsuppressiven Pharmaka behandelt.

Für die antiretrovirale Therapie standen zum Untersuchungszeitpunkt lediglich Kombinationen von nukleosidischen Reverse Transkriptase-Hemmern zur Verfügung. Diese wurde von 105 der 110 untersuchten Patienten eingenommen.

### 2.2. Kollektivbildung

Aufgrund der vorliegenden immunologischen Daten sowie der klinischen kategorisierung der HIV-Infektion durch die Centers for Disease Control and Prevention ([62] Tabelle 1) wurden die Patienten in die nachstehenden Gruppen unterteilt:

- |    |                             |                                  |
|----|-----------------------------|----------------------------------|
| 1. | geringer Immundefekt        | CD4+ T-Lymphozyten > 0.5/nl      |
| 2. | mäßiger Immundefekt         | CD4+ T-Lymphozyten 0.2 – 0.5/nl  |
| 3. | schwerer Immundefekt        | CD4+ T-Lymphozyten < 0.2/nl      |
| A. | klinische latente Infektion | klinische Kategorie A (CDC 1993) |
| B. | AIDS-related complex        | klinische Kategorie B (CDC 1993) |
| C. | AIDS                        | klinische Kategorie C (CDC 1993) |

Tabelle 1. Stadieneinteilung der HIV-Infektion nach CDC 1993

	<i>Klinische Kategorie</i>		
	<i>A</i>	<i>B</i>	<i>C</i>
<i>Immunologisches Stadium</i>	akute Infektion Latenzstadium	symptomatische Infektion, nicht AIDS	AIDS-definierende Krankheiten
<i>CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten (&gt; 0.5/nl)</i>	A1	B1	C1
<i>CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten (0.2 - 0.5/nl)</i>	A2	B2	C2
<i>CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten (&lt; 0.2/nl)</i>	A3	B3	C3

Daneben erfolgte für die statistische Auswertung eine Kategorisierung der Patienten nach epidemiologischen Parametern (Alter, Geschlecht, Risiko für HIV-Infektion), distinkten klinischen Krankheitsbildern (Immunthrombozytopenie, neurologische Manifestationen) sowie dem Nachweis von Autoantikörpern bzw. anderen Markern der humoralen Immunität (polyklonale Gammopathie).

### 2.3. Probengewinnung

#### 2.3.1. Serumproben

Serum (10 ml) wurde im Rahmen einer venösen Blutentnahme gewonnen. Nach 30 Minuten Lagerung bei Raumtemperatur erfolgte die weitere Verarbeitung.

### 2.3.2. EDTA-Vollblut

EDTA-Blut (10 ml) wurde im Rahmen einer venösen Blutentnahme gewonnen. Nach maximal 30 Minuten Lagerung bei Raumtemperatur erfolgte die weitere Verarbeitung.

## 2.4. Probenverarbeitung

### 2.4.1. Verarbeitung der Serumproben

Das Serum wurde durch Zentrifugation (3000 U/min. bei Raumtemperatur) der geronnenen Vollblutprobe gewonnen. Aliquots von jeweils 1 ml wurden vorsichtig pipettiert und dann bis zur weiteren Verarbeitung bei  $-70^{\circ}\text{C}$  tiefgefroren.

Die Aliquots wurden kurz vor dem Gebrauch aufgetaut und schonend auf Zimmertemperatur erwärmt. Keine Probe wurde mehr als einmal aufgetaut.

Folgende Bestimmungen wurden durchgeführt:

- A. Bestimmungen der humoralen Immunität und spezifische Antikörperuntersuchungen:
1. Immunglobulin A nephelometrisch
  2. Immunglobulin G nephelometrisch
  3. Immunglobulin M nephelometrisch
  4. Nachweis von Antinukleären Antikörpern (ANA) mittels indirekter Immunfluoreszenztechnik (iIFT) auf Hep2-Zellen (ANA-Screening) mit Überprüfung des Fluoreszenzmusters
  5. Nachweis von Anti-Mitochondrialen Antikörpern mittels ELISA
  6. Nachweis von Anti-Cardiolipin- und Anti-Phosphatidylserin-Antikörpern mittels ELISA
  7. Gesamt-Eiweiss und Serum-Elektrophorese
  8. Lues-Antikörper mittels Treponema Pallidum-Hämagglutinationstest (TPHA), Cardiolipin-Mikroflockungstest (VDRL/CMT)

- B. Bestimmungen von immunologischen Surrogatmarkern:
  - 9. Bestimmung von Serum-Neopterin (EIA)
  - 10. Bestimmung von Serum- $\beta_2$ -Microglobulin (RIA)
- C. Bestimmungen virologischer Parameter:
  - 11. HIV-1 p24-Antigen mittels Antigen-capture ELISA (Beckman Coulter, USA)

#### **2.4.2. Verarbeitung des EDTA-Blutes**

Das in EDTA-Röhrchen abgenommene Vollblut wurde in zwei Portionen aufgeteilt. Aus der ersten erfolgte die Bestimmung des Blutbildes mittels konventionellem Hämatocytometers.

Mit der zweiten EDTA-Probe wurden die durchflusszytometrische Untersuchungen vorgenommen.

#### **2.4.3. Durchflusszytometrie**

Alle durchflusszytometrischen Untersuchungen wurden an einem FACScan Cytometer (Becton-Dickinson, Heidelberg) durchgeführt. Das Gerät ist mit einem 488 nm Argon-Ionen-Laser und drei Photomultiplier-Elektroden, die Fluorochrom-Filter für die Wellenlängen 530 nm (Grünfluoreszenz), 585 nm (Rotfluoreszenz) sowie 650 nm (Orange-fluoreszenz) besitzen, ausgerüstet.

Kompensation der Geräteeinstellungen sowie das Setup der Photomultiplier wurden täglich mittels ungefärbter, FITC- und PE-markierter Beads durchgeführt. Die Kompensation des dritten Photomultipliers wurde mit einer Isotypen-spezifischen Kontrolle (Cy5-Isotype matched Control [Medac AG, Hamburg]) unter Ausgleich der Rotfluoreszenz eingestellt.

Die Kalibration erfolgte mit Calibrite<sup>®</sup>-Microbeads (Becton-Dickinson, Heidelberg) und einer speziellen vorinstallierten Software (Autocomp<sup>®</sup> [Becton-Dickinson, Heidelberg]).

Die Analyse der im List mode abgespeicherten Rohdaten erfolgte mit dem FACScan research Software-Paket oder dem LysisSoftware-Paket (beide Becton-Dickinson, Heidelberg).

Die folgenden Antikörper-Konjugationen fanden Anwendung (Tabelle 2).

**Tabelle 2b. Antikörper-Konjugationen und Ansätze.**

<i>Set</i>	<i>Antikörper 1</i>	<i>Konjugat</i>	<i>Antikörper 2</i>	<i>Konjugat</i>	<i>Antikörper 3</i>	<i>Konjugat</i>
<b>1</b>	anti-CD45	-FITC	anti-CD14	-PE	--	--
<b>2</b>	control $\gamma_1$	-FITC	control $\gamma_{2a}$	-PE	Isotype control	-Cy5
<b>3</b>	control $\gamma_{2a}$	-FITC	control $\gamma_1$	-PE	Isotype control	-Cy5
<b>4</b>	anti-CD4	-FITC	anti-CD8	-PE	anti-CD3	-Cy5
<b>5</b>	anti-CD5	-FITC	anti-CD19	-PE	anti-CD3	-Cy5
<b>6</b>	anti- $\kappa$	-FITC	anti- $\lambda$	-PE	anti-CD19	-Cy5

Die Messungen wurden nach der sogenannten Vollblutlyse-Methode durchgeführt. Dieses bedeutet, dass zunächst die Konjugation der Antikörper an die Targetzellen im unbehandelten Vollblut erfolgte. Danach wurden die Erythrozyten lysiert und die verbleibenden weißen Zellen gewaschen und schließlich analysiert. Die einzelnen Arbeitsschritte gliedern sich wie folgt auf:

1. 100  $\mu$ l Vollblut vorsichtig in ein Polypropylen-Röhrchen überführen
2. 20  $\mu$ l des jeweiligen Antikörper-Sets hinzugeben und kräftig mischen
3. 30 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur
4. Hinzufügen von 2 ml Lyse-Reagenz und mischen
5. 10 Minuten Inkubation abgedunkelt bei Raumtemperatur
6. Zentrifugieren (5 Minuten, 300 g), danach Dekantieren
7. Waschen mit mit 2 ml PBS-Albumin
8. Zentrifugieren (5 Minuten, 300 g), danach Dekantieren
9. Hinzufügen von 200  $\mu$ l PBS-Albumin und sofort messen

Zur besseren Detektion der gewünschten Zellpopulation wurde nach Messung der Sets 1 und 2 ein Live-Gate auf die Lymphozyten-Population im Vorwärtslicht- und Streulicht-Kanal gesetzt. Dieses wurde mittels eines sog. Leukogate korrigiert, in dem die Population der CD14<sup>+</sup> Zellen (Monozyten) im Gate bestimmt wurde. Es wurden nur Messungen verwendet, bei denen die Zahl der CD14<sup>+</sup> Zellen <5% der gesamten im Gate analysierten Population betrug.

Zur Berechnung der markierten Zellpopulationen und zur Reduzierung des systematischen Fehlers durch verbleibende monozytäre Zellen wurde ein mathematischer Korrekturfaktor bei jeder Messung eingeführt:

$$\% \text{ Ak-positive Zellen} \times (1 - \% \text{ CD14}^+ \text{ Zellen}/100) = \%_{\text{korr}} \text{ Ak-positive Zellen}$$

Es wurden 5000 - 7500 Zellen der Zielpopulation gemessen und als Rohdaten zur weiteren Verarbeitung gespeichert.

Absolutwerte für die jeweiligen Zellpopulationen wurden aus den mit dem Hämatocytometer erhobenen absoluten Lymphozytenzahlen derselben Blutprobe berechnet.

Folgende Zellpopulationen und -indizes wurden bestimmt:

CD45 <sup>+</sup> Leukozyten	Pan-Leukozyten	zum Gating
CD14 <sup>+</sup> Leukozyten	reife Monozyten	zum Gating
CD3 <sup>+</sup> Lymphozyten	Pan-T-Zellen	absolut und relativ
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> Lymphozyten	T-Helfer-Zellen	absolut und relativ
CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> Lymphozyten	T-Suppressor-Zellen	absolut und relativ
CD3 <sup>+</sup> CD5 <sup>+</sup> Lymphozyten	T-Zell-Subpopulation	absolut und relativ
CD19 <sup>+</sup>	Pan-B-Zellen	absolut und relativ
CD19 <sup>+</sup> κ <sup>+</sup> Lymphozyten	B-Zellen (Kappa-Leichtketten +)	absolut und relativ
CD19 <sup>+</sup> λ <sup>+</sup> Lymphozyten	B-Zellen (Lambda-Leichtketten +)	absolut und relativ
CD19 <sup>+</sup> CD5 <sup>+</sup> Lymphozyten	B1a-Lymphozyten	
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> / CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> - Ratio		
CD19 <sup>+</sup> κ <sup>+</sup> / CD19 <sup>+</sup> λ <sup>+</sup> - Ratio		

## 2.5. Material- und Medienliste

### 2.5.1. Durchflusszytometrie

FASCCan Durchflusszytometer	Becton Dickinson, USA
Falcon 2053 test tubes	Becton Dickinson, USA
Albumin, bovines	Sigma, USA, 102H034A
PBS (phosphate-buffered saline)	Becton Dickinson, USA, 349524
Calibrite Beads	Becton Dickinson, USA, 349502
FACS lysing solution	Becton Dickinson, USA , 349202
FACS Flow	Becton Dickinson, USA , 342003

**Tabelle 3. Verwandte Antikörper, Konjugationen und Hersteller**

<i>Antikörper</i>	<i>Konjugat</i>	<i>Isotyp</i>	<i>Hersteller</i>
Control $\gamma_{2a}$	-FITC	IgG <sub>2a</sub>	Becton Dickinson, Heidelberg
Control $\gamma_{2a}$	-PE	IgG <sub>2a</sub>	Becton Dickinson, Heidelberg
Control $\gamma_1$	-FITC	IgG <sub>1</sub>	Becton Dickinson, Heidelberg
Control $\gamma_1$	-PE	IgG <sub>1</sub>	Becton Dickinson, Heidelberg
Isotype control	-Cy5	IgG <sub>1</sub>	Medac, Hamburg
Anti-CD45	-FITC	IgG <sub>1</sub>	Becton Dickinson, Heidelberg
Anti-CD14	-PE	IgG <sub>2a</sub>	Becton Dickinson, Heidelberg
Anti-CD3	-Cy5	IgG <sub>1</sub>	Medac, Hamburg
Anti-CD4	-FITC	IgG <sub>1</sub>	Medac, Hamburg
Anti-CD8	-PE	IgG <sub>1</sub>	Becton Dickinson, Heidelberg
Anti-CD19	-PE	IgG <sub>1</sub>	Becton Dickinson, Heidelberg
Anti-CD19	-PerCP	IgG <sub>1</sub>	Becton Dickinson, Heidelberg
Anti-CD5	-FITC	IgG <sub>2a</sub>	Becton Dickinson, Heidelberg
anti- $\kappa$	-FITC	IgG <sub>1</sub>	Becton Dickinson, Heidelberg
anti- $\lambda$	-PE	IgG <sub>1</sub>	Becton Dickinson, Heidelberg

### **2.5.2. HIV-1 p24-Antigen-Enzymimmunoassay**

Zur Anwendung kam der p24 Antigen-ELISA von Beckman Coulter Diagnostics mit der optionalen Immunkomplex-Dissoziation. Hierbei werden die im Patientenserum vorhandenen HIV-1 p24-Antigen enthaltenden Immunkomplexe mittels eines spezifischen Lyse-Reagenz dissoziiert, was zu einer erhöhten Sensitivität des Tests führt.

## **2.6. Statistische Aufarbeitung der Daten**

Sämtliche statistischen Analysen sowie die graphische Darstellung derselben erfolgten mit Hilfe des SPSS für Windows (Versionen 6.12 bis 8.01) Softwarepaketes.

Die deskriptive Statistik beinhaltet Mittelwert und Median, Spannbreite sowie bei normalverteilten Variablen die Standardabweichungen. Die Normalverteilung einer Variablen wurde mit der Kolgomorov-Smirnow Analyse (Signifikanzkorrektur mit der Methode modifiziert nach Lillefors) überprüft.

Korrelationen zwischen klinischen und laborchemischen Parametern mit den Ergebnissen der durchflußzytometrischen Daten wurden mit dem 2-seitigen Spearman's rank rank sum correlation coefficient berechnet. Unterschiede zwischen den einzelnen Patientengruppen wurden mittels Mann-Whitney U test und Kruskal-Wallis 1-Weg ANOVA für unabhängige Stichproben analysiert. Abschätzungen des relativen Risikos wurden für die Assoziation klinischer Krankheitszustände oder Symptome mit einzelnen Laborvariablen berechnet und mittels Fisher's exaktem Test (2-seitig) auf Signifikanz überprüft. Kaplan-Meier-Überlebenskurven wurden für einzelne Variablen berechnet. Ein  $p < 0.05$  wurde als statistisches Signifikanzniveau für alle Tests gefordert, nach Möglichkeit der statistischen Test und der verwandten Variablen wurden die exakten 2-seitigen p-Werte berechnet.