

Aus der
Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen
Abteilung Kinderheilkunde I mit Poliklinik
(Schwerpunkt: Allgemeine Pädiatrie, Hämatologie und
Onkologie)

**Die anti-inflammatorische pulmonale Therapie bei Cystischer
Fibrose-Patienten mittels Amitriptylin und Placebo - Teil
einer prospektiven, randomisierten, doppel-verblindeten,
placebokontrollierten, multizentrischen Phase III-Studie**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Kiefer, Lea Alice

2022

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Dr. A. Hector
2. Berichterstatter: Professor Dr. P. Rosenberger

Tag der Disputation: 27.04.2022

JR

Abkürzungsverzeichnis

A. fumigatus	Aspergillus fumigatus
Abb.	Abbildung
AC	Saure Ceramidase
ASM	Saure Sphingomyelinase
CF	Cystische Fibrose
CFTR	Cystic fibrosis Transmembrane Conductance Regulator
CNA-Agar	Colistin-Nalodixin-Säure-Agar
CRP	C-reaktives Protein
CT	Computertomographie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dihiothreitol
E. coli	Escherichia coli
EKG	Elektrokardiogramm
ENaC	Epithelial Natrium Channel
Endo-Agar	Lactose-Fuchsin-Sulfit-Agar
FEV1	Forciertes expiratorisches Einsekundenvolumen
FIASMA	Functional inhibitor of acid sphingomyelinase
FVC	Funktionelle Vitalkapazität
IL	Interleukin
ITT	Intention to treat
KBE	Kolonie-bildende Einheit
LCI	Lung Clearance Index
MEF	Maximal expiratory flow
ML	Milliliter
MRSA	Methicillin-resistenter Staphylococcus aureus
P. aeruginosa	Pseudomonas aeruginosa
PBS	Phosphate buffered saline
pH	Potentia hydrogenii
PP	Per protocol
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies

S. aureus

Staphylococcus aureus

S. maltophilia

Stenotrophomonas maltophilia

Tab.

Tabelle

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Mukoziliäre Membran der Cystischen Fibrose	11
Abbildung 2: Entwicklung Lungenfunktion bei CF-Patienten	17
Abbildung 3: Allgemeine Strukturformel von Sphingomyelin.....	18
Abbildung 4: Schematische Darstellung des Ceramidsignalwegs.	20
Abbildung 5: Ansatzpunkte Amitriptylins	22
Abbildung 6: Ablauf der APA-Phase-III-Studie.....	39
Abbildung 7: Verlauf der geplanten und erfolgten Patienten-Rekrutierung	40
Abbildung 8: Verlauf FEV ₁ % der ITT-Gruppe	42
Abbildung 9: Verlauf FEV ₁ % der PP-Gruppe.....	43
Abbildung 10: Verlauf der FVC % der PP-Gruppe	44
Abbildung 11: Verlauf der MEF 25-75 (%) der PP-Gruppe.....	44

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Ergebnisse Vorstudien anhand der Primären Endpunkte.....	24
Tabelle 2: Studienablauf	27
Tabelle 3: Klinische Untersuchungen	32
Tabelle 4: Patientenausgangsbedingungen.....	40
Tabelle 5: Gründe für Nichtaufnahme in die Studie	41
Tabelle 6: Differenz der FEV ₁ % zwischen Baseline und Woche 8	42
Tabelle 7: Resultate der Leukozytenkonzentration.....	46
Tabelle 8: Resultate der <i>P.aeruginosa</i> -Kolonien (CFU/ml) kumulativ	47
Tabelle 9 Anzahl der Patienten mit mindestens einer pulmonalen Exazerbation	48
Tabelle 10: Körpergewicht.....	49
Tabelle 11: Selbsteinschätzung der Lebensqualität	50
Tabelle 12: Nebenwirkungsprofil der Patienten.....	51
Tabelle 13: Diskontinuität der Medikamenteneinnahme	51

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	4
Abbildungsverzeichnis	6
Tabellenverzeichnis.....	6
1 Einleitung	9
1.1 Cystische Fibrose	9
1.1.1 Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulatur (CFTR).....	9
1.1.2 Krankheitsbild	11
1.1.3 Diagnostik	12
1.1.4 Therapie und Supportivmaßnahmen	12
1.2 CF-Lungenerkrankung	13
1.2.1 Pulmonale bakterielle Besiedlung.....	15
1.2.2 Lungenfunktion als Verlaufsparmeter.....	16
1.3 Ceramide	17
1.3.1 Ceramidmetabolismus.....	17
1.3.2 Konzept: Ceramide und CF-Lungenerkrankung.....	18
1.3.3 Inhibition der Ceramid-Synthese	20
1.4 Amitriptylin als Studienmedikation und Wirkungsweise auf Ceramide.....	21
1.5 Vorbereitende klinische Studien	22
1.6 Zielsetzung der vorliegenden Studie	25
2 Material und Methoden	26
2.1 Studiendesign	26
2.2 Patientenkollektiv.....	28
2.3 Studienmedikation: Amitriptylin	29
2.3.1 Nebenwirkungen und Abbruchkriterien.....	30
2.4 Zielparameter	31
2.4.1 Primärer Zielparameter	31
2.4.2 Sekundäre Zielparameter.....	31
2.5 Untersuchungsmethoden der Studie.....	32
2.5.1 Klinische Untersuchungsmethoden.....	32
2.5.2 Laborchemische Methoden	33
2.5.3 Mikrobiologische Methoden	34
2.5.4 Labortechnische Verfahren	35
2.6 Statistische Methoden	36
2.6.1 Randomisierung und Datenmanagement	36
2.6.2 Statistische Evaluation	36
3 Ergebnisse	38
3.1 Patienten.....	38
3.2 Primärer Zielparameter: FEV ₁ -Differenz.....	41
3.3 Sekundäre Zielparameter.....	43
3.3.1 Weitere Lungenfunktionsparameter.....	43

3.3.2	Leukozytenkonzentration	45
3.3.3	P. aeruginosa-Quantifizierung.....	46
3.3.4	Pulmonale Exazerbationen.....	47
3.3.5	Körpergewicht.....	48
3.3.6	Quality of Life.....	49
3.3.7	Nebenwirkungen	50
4	Diskussion	52
4.1	Patientencharakteristika	52
4.2	Primärer Zielparameter: FEV ₁ -Differenz und Lungenfunktionsparameter.....	53
4.3	Sekundäre Zielparameter.....	54
4.4	Nebenwirkungen	59
4.5	Ausblick: Antiinflammatorische Therapieoptionen bei CF	60
4.6	Limitationen der Studie.....	62
4.7	Schlussfolgerung	63
5	Zusammenfassung.....	65
6	Summary	67
7	Literaturverzeichnis.....	69
8	Erklärung zum Eigenanteil.....	82
9	Danksagung.....	83

1 Einleitung

1.1 Cystische Fibrose

Die Cystische Fibrose ist innerhalb der kaukasischen Population die häufigste lebensverkürzende autosomal-rezessiv erbliche, klinisch vorwiegend die Lunge betreffende Multi-system-Erkrankung (Gan et al., 1995, Rowe et al., 2005). In Europa spricht man von einer Inzidenz von etwa 1 zu 2500 Lebendgeburten und einer Heterozygotenfrequenz von 1 zu 25 (Ratjen and Doring, 2003). Datenregister Deutschlands zählen 8000 Cystische-Fibrose-Patienten, von denen inzwischen mehr als 50 % das Erwachsenenalter erreicht haben (Koningsbruggen-Rietschel and E.Rietschel, 2017). Die in Deutschland verwendete Bezeichnung Mukoviszidose entstand aus der Beobachtung des typischen zähen Sekrets der Atemwege (Collins, 1992). Jahrzehnte später kam es dann zur Entdeckung des mutierten Gens, welches den defekten Chlorid-Kanal, den Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulatur (CFTR)-Kanal kodiert (Collins, 1992). Dies führte zum verbesserten Verständnis der Pathophysiologie mit konsekutiver Etablierung neuer Therapiestrategien (Collins, 1992). Weiterhin gilt diese Entdeckung als ein wichtiger Ansatzpunkt aktueller Forschung (Lee et al., 2005). Pulmonale Infektionen, exokrine Pankreasinsuffizienz und eine erhöhte Schweiß-Chloridkonzentration gehören zu gängigen Manifestationen der Cystischen Fibrose-Erkrankung (Ratjen and Doring, 2003). Dabei ist die Lungenbeteiligung mit einer ausgeprägten Inflammation, der Besiedlung mit pathogenen Keimen und Entstehung von Bronchiektasien hauptursächlich für Morbidität und Mortalität (Gibson et al., 2003). Trotz des Anstiegs der durchschnittlichen Lebenserwartung Betroffener auf 45 Jahre für im Jahr 2018 geborene CF-Patienten (Deutsches Mukoviszidose Register 2018) und einer weiteren Zunahme der Lebenserwartung in Europa, leiden Betroffene weiterhin unter erheblichen Limitationen (Burgel et al., 2015). Ein vertieftes Verständnis der Pathophysiologie der CF-Erkrankung, die Optimierung und das Etablieren neuer Therapieformen sind weiterhin von großer Notwendigkeit.

1.1.1 Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulatur (CFTR)

Das *CFTR*-Gen befindet sich auf der Position 7q21-34 des langen Arms des Chromosom 7 (Elborn, 2016, Wainwright et al., 1985). Das CFTR-Protein ist als ABC-Transporter ein transmembranärer Transporter (Barasch et al., 1991, Vankeerberghen et al., 2002,

Fulmer et al., 1995, Wei et al., 1995). Als Chlorid-Kanal wird er in vielen verschiedenen Geweben exprimiert und verfügt über regulatorische Funktionen wie beispielsweise: Ansäuerung intrazellulärer Organellen, intrazellulärer Vesikeltransport, Natrium-Transport und Steuerung anderer Chloridkanäle (Barasch et al., 1991, Vankeerberghen et al., 2002, Fulmer et al., 1995, Wei et al., 1995, Schwiebert et al., 1995). Die Cystic-Fibrosis-Mutation-Database geht von über 2000 verschiedenen Mutationen im *CFTR*-Gen mit potentieller Ursache für den klinischen Phänotyp aus (Elborn, 2016). Zur häufigsten Mutation zählt F508del, wobei ungefähr 45% der Patienten homozygot für dieses Allel sind (Rowe et al., 2005, Kalman et al., 1994). Es gibt sechs Mutationsklassen (Elborn, 2016). Davon sind die meisten *Missense*-Mutationen, aber auch *Frameshift*-, *Splicing*-, *Nonsense*-Mutationen wurden beschrieben. Davon sind 15 % nicht mit der Krankheit assoziiert. Bei Mutationen der Klasse I, II und III hat der CFTR-Kanal keine Restfunktion. Diese führen zu einem schweren Phänotyp. Die Mutationsklassen IV, V und VI haben eine Restfunktion im CFTR-Protein und führen zu einer milden Lungenerkrankung und Pankreasinsuffizienz (Elborn, 2016). Grund für die teilweise inkonsequente Kohärenz von Geno- und Phänotyp sind vermutlich Gen-Modifier und epigenetische Faktoren (Aron et al., 1999). Die CFTR-Dysfunktion mündet in einer Unfähigkeit der Epithelzellen, Chlorid und Bikarbonat zu sezernieren, was die Natrium-Resorption über den epithelialen Natrium-Kanal ENaC einschränkt. Es entsteht ein erhöhter Wassereinstrom in das respiratorische Epithel, was zu dessen Dehydratation führt. Konsekutiv kommt es zu einer pH-Wert-Verminderung der flüssigen Atemtraktsoberfläche, deren Ablösung und Reduktion der mukoziliärer Clearance (Boucher, 2007, Garland et al., 2013, Hoegger et al., 2014, Keiser et al., 2015, Legssyer et al., 2006, Meyer et al., 2009) (vgl. Abb.1).

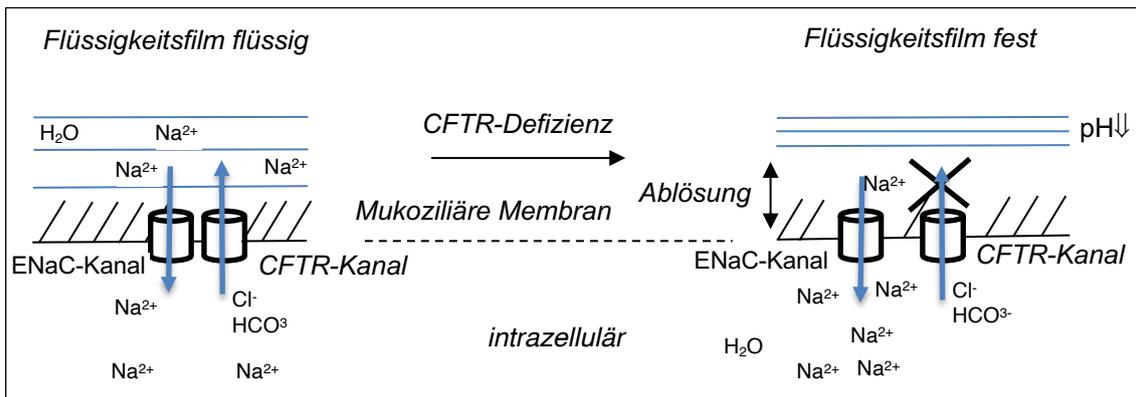


Abbildung 1: Mukoziliäre Membran der Cystischen Fibrose

Der Chloridtransport ist beeinträchtigt und es sammelt sich Natrium, geleitet über den ENaC-Kanal, intrazellulär an. Wasser diffundiert passiv durch die Membran. Die Oberfläche dehydriert und löst sich von der Mukoziliären Membran ab. CFTR: Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, *Cl*: Chlorid, ENaC: epithelialer Natrium-Kanal, HCO_3^- : Bikarbonat, H_2O : Wasser, Na^{2+} : Natrium

1.1.2 Krankheitsbild

Die Symptome der Cystischen Fibrose entstehen hauptsächlich durch den beeinträchtigten NaCl-Transport und der dadurch veränderten Osmolarität der mukoziliären Membran im Lumen sekretierender Organe, welche letztlich zur Obstruktion und Atrophie führt (Hoegger et al., 2014, Keiser et al., 2015). Die Ansammlung tritt in Organen auf, welche den CFTR-Kanal enthalten. Es sind die Lunge, der Pankreas, die Leber, der Darm, die Schweißdrüsen, die Haut und die Geschlechtsorgane betroffen (Ratjen and Doring, 2003, Vernooij-van Langen et al., 2015). Gastrointestinale Symptome präsentieren sich als ein aufgetriebenes Abdomen, Flatulenz und Fettstühle (Wilschanski and Durie, 1998). Die exokrine Pankreasinsuffizienz führt zur Maldigestion und dadurch zur Gedeihstörung. Weiterhin entsteht aufgrund der progressiven Pankreasdestruktion mit Untergang der Inselzellen im Verlauf immer häufiger ein Cystic-Fibrosis-related-Diabetes-mellitus CFRD (Moran, 2000, Elborn, 2016). Das frühe postpartale Zeichen des Mekoniumileus tritt bei 10% der Patienten auf (Sathe and Houwen, 2017). Seltener sind Hautveränderungen, wie die Acrodermatitis enteropathica, als Ausdruck eines Zinkmangels (Zedek et al., 2008). Es leiden über 95% der männlichen Patienten an Infertilität (Dodge, 1995, Taussig et al., 1972). Langfristige Komplikationen der CF-Patienten sind zudem Depression und Angststörungen (Quittner et al., 2014). Die individuellen Krankheitsausprägung steht zudem unter dem Einfluss des sozioökonomischen Umfelds des Patienten (Cutting, 2015).

1.1.3 Diagnostik

Neugeborenen-Screening Programme, welche in Deutschland seit 2016 zum Standard gehören, führten zum Anstieg der Diagnosen vor Präsentation des klinischen Erscheinungsbildes (Ratjen and Doring, 2003). Der hohe Stellenwert der Diagnose wird durch die Unterschiede der altersabhängigen klinischen Ausprägung deutlich (Farrell et al., 2001, Konstan et al., 2003a). Zur Diagnosestellung der CF muss ein diagnostischer Hinweis, sowie der Nachweis einer CFTR-Fehlfunktion gestellt werden. Ein positives Neugeborenen-Screening, Geschwister mit nachgewiesener Cystischer Fibrose oder ein klinisches Symptom geben Hinweise, ob eine CF-Erkrankung besteht (Vernooij-van Langen et al., 2012, Naehrlich et al., 2013). Der Pilocarpin-Iontophorese-Test und eine molekulargenetische Untersuchung führen schließlich zur sicheren Diagnose (Farrell et al., 2008, Naehrlich et al., 2014). Auch nasale Potentialdifferenzmessung oder intestinale Kurzschlussstrommessung erlauben das Feststellen charakteristischer Abnormitäten und können so die Diagnose unterstützen (Naehrlich et al., 2014).

1.1.4 Therapie und Supportivmaßnahmen

Behandlungserfolge können durch interdisziplinäre Zusammenarbeit multiprofessioneller Teams, Compliance des Patienten, einer engmaschigen Überwachung und Angliederung an CF-Zentren erreicht werden (Kerem, 2017). Strategien der Hydrierung der Lungenoberfläche mit hypertonen Natriumchlorid-Lösungen oder Mannitol zählen zur Basistherapie. Sie führen zur kurzfristigen symptomatischen Verbesserung und verringern die Anzahl der Lungenexazerbationen (Elkins et al., 2006). Eine weitere sekretolytische Maßnahmen ist zum Beispiel Dornase-alpha, welches extrazellulär akkumulierte DNA spaltet (Konstan and Ratjen, 2012). Weiterhin wird N-acetyl-L-cystein eingesetzt, welches eine mukolytische Wirkung hat und die Konzentration intrazelluläre antioxidativen Glutathione steigert (Conrad et al., 2015). Physikalische Maßnahmen wie Physiotherapie und Vibrationswesten unterstützen die Lösung des Schleims und verbessern so die mukoziliäre Clearance (Edmondson and Davies, 2016). Eine optimale Ernährung ist mit vollwertiger, fetthaltiger Kost, Enzym- und Vitaminpräparaten fester Bestandteil der Therapie (Munck, 2010, Borowitz et al., 2005). Antibiotische Therapien werden in verschiedenen Kontexten verwendet: zur Prophylaxe, Eradikation von Infektionen, Suppression chronischer Infektionen und zur Behandlung pulmonaler Exazerbationen (Edmondson

and Davies, 2016, O'Sullivan and Flume, 2009, Mogayzel et al., 2014). Inzwischen ist es gelungen kausale Therapien anzubieten, welche am defekten CFTR-Protein und der Inflammation ansetzen (Edmondson and Davies, 2016). Ivacaftor, als sog. CFTR-Potentiator steigert die Restfunktion des CFTR-Kanals bei sog. Gating-Mutationen, wie beispielsweise G551D und bei gleichzeitiger Gabe von CFTR-Korrektoren wie z.B. Lumacaftor auch bei F508del (Rowe et al., 2017, Moss et al., 2015, Wainwright et al., 2015). Im August 2020 wurde *Kaftrio* eine Triple-Kombination aus einem CFTR-Modulator (VX-445 bzw. VX-659), sowie Tezacaftor/Ivacaftor zugelassen. Studienergebnisse demonstrierten nach Einnahme dieser Dreifachkombination eine deutlich gebesserte Lungenfunktion (Keating et al., 2018). Als antiinflammatorische Therapie ist bislang lediglich Ibuprofen empfohlen (Mogayzel et al., 2013). Als ultimo ratio gilt die Transplantation bei Organversagen und ein palliatives Management (Bennett et al., 2001, Liou et al., 2001).

1.2 CF-Lungenerkrankung

Die Pathogenese der CF-Lungenerkrankung ist weiterhin nicht komplett verstanden. Beginn und Fortschreiten der klinischen Manifestationen der CF-Lungenerkrankung sind sehr variabel. Dabei führen eine Beeinträchtigung der mukoziliären *Clearance*, die Dysregulation von Abwehrmechanismen, das Ungleichgewicht zwischen Inflammation und Abheilung, pulmonale Infektionen im Verlauf zu einem Kreislauf mit dem Resultat der pulmonalen Destruktion (Bragonzi et al., 2017, Ratjen and Doring, 2003, Rowe et al., 2005). Bereits im frühen Kindesalter konnten CT-graphisch Lufteinschlüsse (Air-Trapping), mukosale Obstruktionen, Bronchiektasien, sowie eine Erhöhung inflammatorischer Marker und polymikrobieller Keimbesiedlung in Atemwegsproben, nachgewiesen werden (Sly et al., 2013b, Rosenow et al., 2015, Gangell et al., 2011). Infektion und Inflammation erhalten sich und die Elimination von potentiell pathogenen Erregern wird unmöglich (Armstrong et al., 1997, Armstrong et al., 1995, Armstrong et al., 2005).

Durch die CFTR-Dysfunktion kommt es zu Veränderungen der Eigenschaften der Atemwegsoberflächenflüssigkeit (Collawn and Matalon, 2014). Die Viskositäts-Zunahme der Schleimschicht bedingt einen eingeschränkten Abtransport von Partikeln und Krankheits-

erregern (Collawn and Matalon, 2014). Zudem kommt es zum Verschluss kleiner Atemwege. Die CF-Lungen bieten so, durch die Entstehung sauerstoff-armer Areale, gute Wachstumsbedingungen für *P. aeruginosa* (Worlitzsch et al., 2002, Gibson et al., 2003). Auch der durch die CFTR-Dysfunktion azidotisch veränderte pH-Wert der mukoziliären Membran beeinflusst die Bakterieneliminierung, durch beispielsweise die Inaktivierung antimikrobieller Peptide (Song et al., 2006, Abou Alaiwa et al., 2014, Pezzulo et al., 2012). Die verminderte Sekretion Bikarbonats führt zur zusätzlichen Verfestigung der mukoziliären Membran, wobei bislang keine antiinflammatorische Wirkung dessen bekannt ist (Gustafsson et al., 2012, Garcia et al., 2009, De Lisle, 2009).

Die neutrophilen Granulozyten sind die ersten Immunzellen, welche in die Lungen migrieren (Mall and Hartl, 2014). Hat sich die chronische Infektion etabliert, gelingt es den Neutrophilen Granulozyten dennoch nicht mehr diese zu kontrollieren (Cohen and Prince, 2012, Hayes et al., 2011, Laval et al., 2016). Zudem wurde eine abgeschwächte Bakterieneliminierung, in von CF-Patienten isolierten Monozyten und Makrophagen beobachtet (Munder and Tummler, 2015). Die neutrophilen Granulozyten aktivieren und setzen Enzyme frei und schädigen so das Lungengewebe (Sly et al., 2013a, Nauseef and Borregaard, 2014). Neutrophile Granulozyten gesteuerte Proteasen (z.B. Cathepsin S, Matrix-Metalloproteinase) und die neutrophile Elastase unterstützen außerdem die Entstehung der pulmonalen Bronchiektasien (Elborn, 2016, Sagel et al., 2012, Sly et al., 2013a).

BAL-basierte Studien konnten nachweisen, dass die CF-Lungenerkrankung bereits früh beginnt und mit erhöhten Konzentrationen proinflammatorischer Zytokine einhergeht (z.B. IL-8) (Sly et al., 2013b, Sly et al., 2009). Neben der vielen Immunzellen sind auch Zytokine vorhanden, welche die Immunantwort unterstützen (Turner et al., 2014). In Sputum von CF-Patienten konnten, auch während stabiler pulmonaler Symptomatik, proinflammatorische Zytokine (z.B. IL-8, IL-6, TNF- α , IL-1 β , IL-17, IL-23, G-CSF) in erhöhten Konzentrationen nachgewiesen werden. Gleichzeitig waren die Konzentrationen antiinflammatorische Zytokine (z.B. IL-10) vermindert (Bonfield et al., 1995, Sagel et al., 2007, Kube et al., 2001, Osika et al., 1999, Saba et al., 2002). Auch die Infektion mit

P. aeruginosa kann die Produktion einiger Zytokine in bronchialen Epithelzellen anregen (Ratjen et al., 2016, Kube et al., 2001, Raoust et al., 2009).

Im Rahmen der Arrest-CF-Studie wurden folgende Risikofaktoren für das Auftreten von Bronchiektasien eruiert: Mekoniumileus, Respiratorische Symptome, freie Neutrophile in der BAL, sowie „gas-trapping“ (Sly et al., 2013b). Mastzellen und Makrophagen sind in fetalen Lungengewebe CF-defizienter Mäuse präsent und fördern die Entstehung der pulmonalen Fibrose (Hubeau et al., 2001b). Nach Beginn der Entwicklung bronchiektatischer Veränderungen, persistieren diese bei ungefähr 75% aller jungen Kinder trotz bestmöglicher Therapie (Mott et al., 2012). Krankheit und Tod durch die Cystische Fibrose sind bedingt durch die progressive destruktive Lungenerkrankung mit Bronchiektasie und konsekutiven respiratorischem Versagen (Sly et al., 2013a, Sly and Wainwright, 2017). Das Auftreten pulmonaler Exazerbationen geht mit einer Beeinträchtigung der Lebensqualität und des Langzeitüberlebens einher (Goss et al., 2002, Goss et al., 2003, Goss, 2019). Akute virale Infektionen spielen dabei eine Rolle (Hiatt et al., 1999, Goss, 2019). Zudem wurde *P. aeruginosa* in hohen Konzentrationen, insbesondere während Exazerbationen, nachgewiesen (Regelmann et al., 1990, Smith et al., 1988, Ramsey et al., 1999).

1.2.1 Pulmonale bakterielle Besiedlung

P. aeruginosa ist als Nasskeim in Flüssigkeiten, beispielsweise in sanitären Anlagen und sogar in destilliertem Wasser anzutreffen und gilt als potenziell pathogener Erreger in Kliniken. Die Patienten-Kontamination vollzieht sich hauptsächlich durch die Umwelt und Kontakt zu anderen Patienten (Kosorok et al., 1998, Renders et al., 1997). Dreiviertel der erwachsenen CF-Patienten sind mit *P. aeruginosa* infiziert (Sanders and Fink, 2016). Durch seine Pathogenität trägt er maßgeblich zur CF-Pneumopathie bei (Malhotra et al., 2019). Charakteristisch ist ein livider grüner Eiter im Sputum. In Kulturen stellt sich *P. aeruginosa* als pink rosa mit süßlichem, lindenblütenartigem Geruch dar. Allerdings gibt es auch nicht-kultivierbare *P. aeruginosa*-Stämme (Mangiaterra et al., 2018). Mukoiden *P. aeruginosa*-Stämmen wird insgesamt eine größere pathogene Rolle als nicht-mukoiden Stämme zugesprochen (Li et al., 2005). Bakterienstämme, welche CF-Lungen früh kolonisieren, sind unter anderem *Staphylococcus (S.) aureus* und *Haemophilus (H.) influenzae*. *Methicillin-resistenter S. aureus (MRSA)*. *P. aeruginosa* und *Burkholderia (B.)*

cepacia kolonisieren CF-Lungen erst in späteren Stadien. Infektionen sind bis zur Chronifizierung von intermittierenden Perioden deutlicher Verbesserung begleitet (Surette, 2014). Gram-negative Keime wie *Stenotrophomonas (St.) maltophilia* oder *Achromobacter spp.* sind als typische Pathogene identifiziert worden (Waters and Smyth, 2015, Sherrard et al., 2014, Parkins and Floto, 2015). Nicht-tuberkulöse Mykobakterien, Pilzarten und Viren zeigen eine erhöhte Prävalenz (Floto and Haworth, 2015, Sherrard et al., 2014, Huang and LiPuma, 2016, Gilligan, 1991). Dabei war *Aspergillus (A.) fumigatus* in einer Studie mit einem erhöhten Risiko für eine *P. aeruginosa*-Besiedlung verbunden (Hector et al., 2016). Studien zeigen mit Next-Generation-Sequencing-Methoden sogar ein noch größeres Spektrum bakterieller Besiedlung (Knowles et al., 1995, Flotte and Laube, 2001). Ein breiteres Bakterienspektrum scheint dabei auch günstiger für den klinischen Verlauf zu sein (O'Neill et al., 2015).

1.2.2 Lungenfunktion als Verlaufsparemeter

Aufgrund des kontinuierlichen Fortschreitens der Lungendestruktion und Verschlechterung der Lungenfunktion bedarf es als diagnostischen Standard der Lungenfunktionsprüfung (Knudson et al., 1983). Das Forcierte expiratorische Einsekundenvolumen (FEV_1), als häufig erhobener Parameter, ist ein validierter prognosebestimmender Faktor (Stanojevic and Ratjen, 2016). Einige Studien zeigen eine bessere Verwertbarkeit des Lung Clearance Index (LCI)-Verlaufsparemers bei CF, welcher bisher vor allem bei Kindern bzw. milder Lungenerkrankung verwendet wird (Kasi et al., 2019). Die akute Abnahme der Lungenfunktion sollte immer als Notfall gewertet werden, was sich anhand des besseren Outcomes hospitalisierter und adäquat behandelter CF- Patienten zeigt (Morgan et al., 2017, Sly and Wainwright, 2017). Kommt es zu einem Abfall der FEV_1 , besteht bei nicht akut durchgeführter entsprechender Therapie das Risiko, dass die Verschlechterung bestehen bleibt (Sly and Wainwright, 2017).

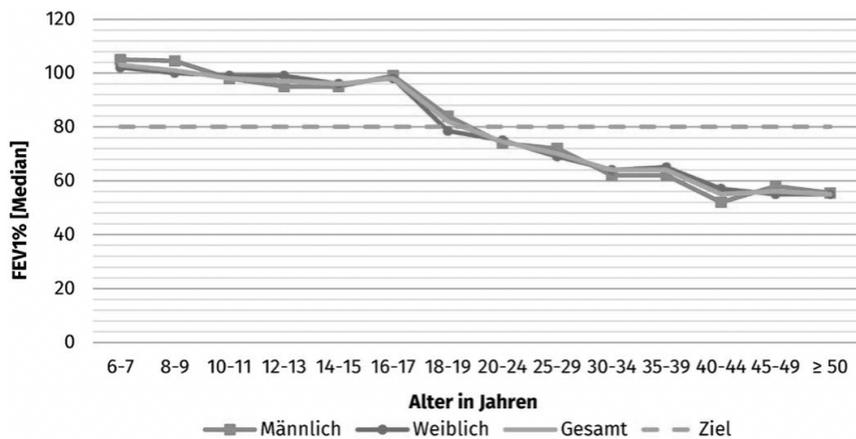


Abbildung 2: Entwicklung Lungenfunktion bei CF-Patienten

FEV₁%-Werte (Median) im Vergleich zum Alter (in Jahren). FEV₁: Forciertes expiratorisches Einsekundevolumen. (Abbildung aus muko.info, 06.02.2020).

1.3 Ceramide

Forschungsergebnisse führten zur Erkenntnis, dass Ceramide eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der CF-Lungenerkrankung spielen. Im Respirationstrakt *CFTR*-defizienter Mäuse konnte eine Ceramidakkumulation und ein Zusammenhang zur pulmonalen Inflammation und Infektion festgestellt werden (Teichgraber et al., 2008, Becker et al., 2010d). Die Bedeutung für die Entwicklung der CF-Lungenerkrankung konnte in mehreren Studien unabhängig voneinander bestätigt werden (Brodie et al., 2010, Bodas et al., 2011a, Bodas et al., 2011b, Riethmuller et al., 2009, Ulrich et al., 2010, Pewzner-Jung et al., 2014, Becker et al., 2010b).

1.3.1 Ceramidmetabolismus

Sphingolipide sind ein wichtiger Bestandteil der Biomembran eukaryotischer Zellen und haben Funktionen als bioaktives Signalmolekül mit Ceramid als ein zentrales Metabolit (Kitatani et al., 2008). Die saure Sphingomyelinase (ASM) und Ceramide agieren in verschiedenen biologischen Systemen und sind an der Regulation der Apoptose, Infektionen, zellulärer Differenzierung, Lungenwachstum, Lungenerhaltung und Reperaturmechanismen beteiligt (Gulbins and Kolesnick, 2003, Tibboel et al., 2014). Ceramide bestehen aus einer langen Sphingosinbase, Sphingosin mit einer Aminobindung zu einer von vielen verschiedenen Acylgruppen (Kitatani et al., 2008) (vgl. Abb.3). Es gibt drei Entstehungswege, welche auf eine Schlüsselrolle der Ceramide in Regulierungs- und Steuerungsprozesse deuten (Kitatani et al., 2008). Ceramide können *de novo* aus Palmitoyl-

coA und Serin über die Hydrolyse der Sphingomyeline und über den Abbau glykolysierter Sphingolipide gebildet werden (Kitatani et al., 2008). Die ASM fungiert als Enzym im Lipidstoffwechsel, welches in Lysosomen Sphingomyelin zu Ceramid spaltet. Sie arbeitet bei einem pH-Optimum von 4,5. Die saure Ceramidase (AC) spaltet Ceramid zu Sphingosin, welches als Sphingosin-1-Phosphat antiapoptotisch wirkt (Kornhuber et al., 2010).

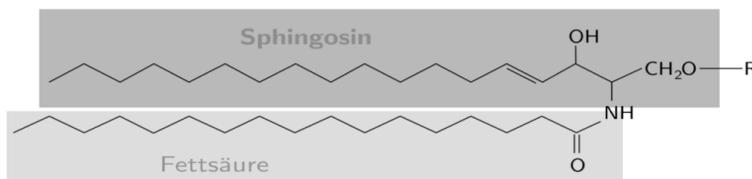


Abbildung 3: Allgemeine Strukturformel von Sphingomyelin

Tauscht man den Rest mit einer Wasserstoffgruppe aus entsteht Ceramid. *R*: Rest (aus wikibooks.de, Stand: 06.02.2020)

1.3.2 Konzept: Ceramide und CF-Lungenerkrankung

Der CFTR-Kanal ist unter anderem für das pH-Milieu in Zellorganellen und Lysosomen verantwortlich. Die CFTR-Dysfunktion führt zur intrazellulären Alkalisierung (Barasch et al., 1991, Di et al., 2006). Die Veränderung des pH-Werts führt zur Abnahme der ASM-Aktivität, welche als Enzym einen pH-Optimum bei 4,5 hat (Kitatani et al., 2008, Kornhuber et al., 2010). Teichgräber et al. vermuteten daher einen Zusammenhang zwischen der CFTR-Dysfunktion und des Sphingolipidstoffwechsels, als neues pathophysiologisches Konzept bei CF. Forschungsergebnisse ergaben Erkenntnissen über Zusammenhänge der Sphingolipide, insbesondere der Ceramide und der CF. Die Ceramidkonzentration in bronchialen Epithelzellen zeigte sich deutlich erhöht und ging mit einer erhöhten Inflammation einher (Teichgraber et al., 2008, Becker et al., 2010c, Brodlie et al., 2010, Becker et al., 2010a).

Die Ceramidakkumulation wird möglicherweise durch einen Anstieg des pH-Wertes von 4,5 auf 6,0 in sekretorischen Lysosomen CFTR-defizienter Zellen vermittelt (Di et al., 2006). Die pH-Änderung führt zu einer Verminderung der Aktivität der AC um ca. 90% und Verringerung der Aktivität der ASM um ca. 35%. (He et al., 2003, Zhang et al., 2010) Dieses Ungleichgewicht der Enzyme führt zu einer relativen Überproduktion der Ceramide. In Übereinstimmung damit wurde entdeckt, dass auch Sphingosin, als Abbauprodukt in CFTR-defizienten Bronchialepithelzellen vermindert nachzuweisen war (Becker

et al., 2010c, Becker et al., 2018). Teichgräber et al. wiesen im *Cftr*-defizienten Mausmodell nach, dass Ceramide altersabhängig im Respirationstrakt und in intrazellulären Vesikeln akkumulieren bevor eine Infektion auftritt (Teichgräber et al., 2008, Valdivieso et al., 2016, Hao et al., 2015).

Zudem bewirkt die Zunahme der Ceramide, eine Anordnung dieser in membranäre Makrodomänen. Die Wechselwirkungen der Bestandteile der Zellmembran (Glycerophospholipide, Sphingolipide und Cholesterin) untereinander führt zu deren Segregation in verschiedene Phasen, sodass sich Glycerophospholipide in einer flüssigeren ungeordneteren Phase befinden (Singer and Nicolson, 1972, Harder and Simons, 1997, Verkade and Simons, 1997, van Meer et al., 2008). Ceramide ordnen sich in der Biomembran als plasmamembranäre Mikrodomänen, als Art *Lipid rafts* an. Deren Fusion zu mehreren Mikrometer messenden, fluoreszenzmikroskopisch nachweisbaren Makrodomänen, führt zu Veränderungen der Membraneigenschaften (Grassme et al., 2001, Holopainen et al., 1998, Gulbins and Kolesnick, 2003, Grassme et al., 2013). Durch Membranfaltung verdichten und akkumulieren Rezeptoren. Dies führt wiederum zur Signalverstärkung und Aktivierung verschiedener immunologischer Oberflächenmerkmale. Durch die luminale Anreicherung β 1-Integrins wird die AC-Expression vermindert und Ceramide vermindert abgebaut (Grassme et al., 2017). Auch bakterielle Infektionen mit *P. aeruginosa* aktivieren die ASM-Aktivität im Zusammenhang mit der körpereigenen Immunabwehr (Grassme et al., 2013).

Erhöhte Ceramidkonzentration in Studien an bronchialen Epithelzellen *Cftr*-defizienter Mäuse lösten Zelltodinduktion, DNA-Freisetzung und eine chronische Inflammation aus. Zudem wurde eine hohe Anfälligkeit CFTR-defizienter Mäusen für Infektionen mit *P. aeruginosa* beobachtet (Teichgräber et al., 2008, Becker et al., 2010d, Brodlie et al., 2010, Grassmé et al., 2003) (vgl. Abb. 4). Eine Ceramidakkumulation wurde auch in nasalen Flimmerepithelzellen, Makrophagen und Lungentransplantationsmaterial von CF-Patienten festgestellt, was nahelegte, dass die Beobachtungen auch bei Menschen mit CF eine Rolle spielen (Brodlie et al., 2010, Bodas et al., 2011a, Bodas et al., 2011b, Riethmuller et al., 2009, Ulrich et al., 2010, Pewzner-Jung et al., 2014, Becker et al., 2010b). Es wurde vermutet, dass eine Hemmung der ASM zur Reduktion der Ceramidkonzentration und dadurch verbesserten Lungenfunktion führt (Teichgräber et al., 2008).

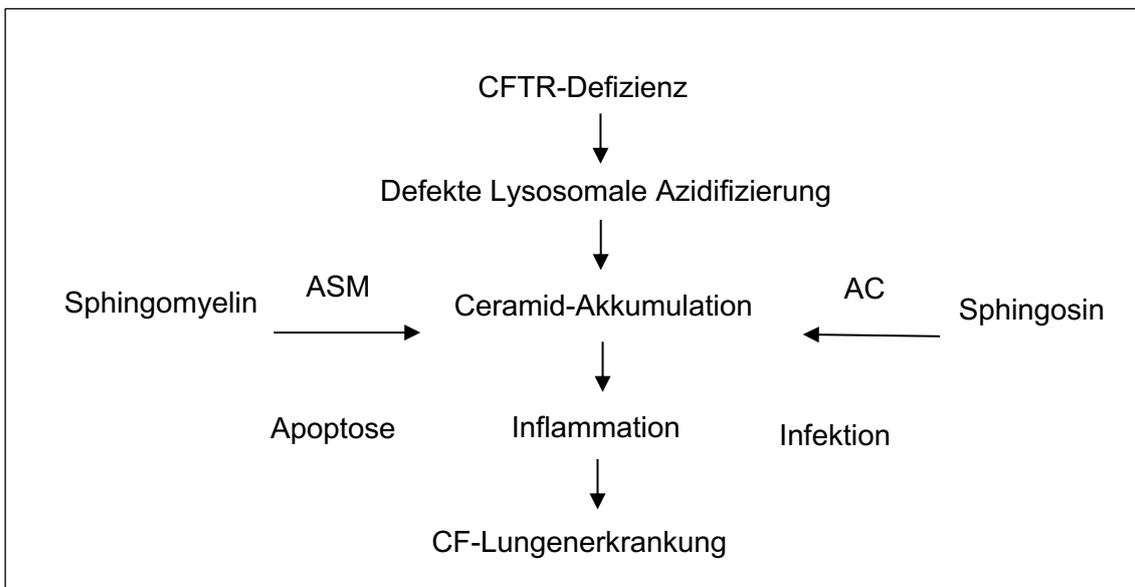


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Ceramidsignalwegs.

Aufgrund der CFTR-Defizienz und Ungleichgewicht der Enzyme ASM und AC kommt es zur Ceramidakkumulation. Konsequenzen sind Inflammation, Apoptose und Infektion. Dies führt letztlich zur CF-Lungenerkrankung. *AC*: Saure Ceramidase, *ASM*: Saure Sphingomyelinase, *CF*: Cystische Fibrose, *CFTR*: Cystic fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (modifiziert nach (Schuchman, 2016, Verkman, 2009))

1.3.3 Inhibition der Ceramid-Synthese

Durch den partiellen genetischen Defekt der ASM in *Cftr*-defizienten Mäusen oder deren pharmakologischen Behandlung mit ASM-Inhibitoren normalisierte sich die Ceramidkonzentration in pulmonalen Epithelzellen (Becker et al., 2010b). Funktionelle Inhibitoren der ASM, wie trizyklische Antidepressiva, wirken vermutlich über deren Proteolyse und der daraus resultierenden Inaktivierung (Hurwitz et al., 1994, Kornhuber et al., 2010). In Studien am CF-Mausmodell normalisierte die Inhibition der ASM, Steigerung der AC-Aktivität, Behandlung der *Cftr*^{KO} oder *Cftr*^{MHH} Mäuse (*Cftr*-defiziente Mäuse) mit Amitriptylin oder einer Generation mit *Cftr*^{KO} *Smpd1*^{+/-} Mäusen (*Cftr*-defiziente Mäuse mit partiellem Knock-out der ASM) die pulmonale Ceramidkonzentration (Teichgraber et al., 2008). Die Ceramidreduktion führte zur Abnahme der Entzündungszellen und der Zytokinfreisetzung (Becker et al., 2010b). Eine Normalisierung der pulmonalen Ceramidkonzentration verringerte die DNA-Ablagerungen in der Lunge und der Trachea. Die Infektion durch *P. aeruginosa* nach nasaler Applikation war deutlich geringer bei mit ASM-Inhibitoren behandelten *Cftr*-defizienten Mäusen. Eine

mögliche Erklärung ist hier die reduzierte DNA-Freisetzung, welche als Adhäsionspunkt für Bakterien dient (Teichgraber et al., 2008).

1.4 Amitriptylin als Studienmedikation und Wirkungsweise auf Ceramide

Der Wirkstoff Amitriptylin gehört zur Klasse der trizyklischen Antidepressiva (Karow, 2012). Der Einsatz kann beim Auftreten depressiver Störungen, bei chronischen Schmerzzuständen und bei Spannungskopfschmerzen zur medikamentösen Prophylaxe indiziert sein (Ashina et al., 2008). Hinzu kommt die Anwendung bei Fibromyalgien, Schlafstörungen und im Rahmen des Reizdarmsyndroms (Lawson, 2017). Die Wirkungsweise beruht auf unselektiver Hemmung der Wiederaufnahme der monoaminergen Neurotransmittern Serotonin, Dopamin und Noradrenalin aus dem synaptischen Spalt im zentralen Nervensystem. Die im Dünndarm aufgenommenen trizyklischen Antidepressiva, werden in der Leber durch CYP-Isoenzyme metabolisiert (Karow, 2012). Das Nebenwirkungsprofil ist dosisabhängig und hauptsächlich durch die anticholinerge und antihistaminerge Wirkung Amitriptylins bedingt. Zu beachten ist die sedierende und orthostatische Wirkung bei geringer Dosierung (Nelson, 2009, Anderson et al., 2008). Kontraindikationen sind Überempfindlichkeit gegen den Wirkstoff oder enthaltende Hilfsstoffe, die Anwendung bei Kindern und Jugendlichen, Schwangerschaft, kardialen Vorerkrankungen, vegetativen Störungen, die gleichzeitige Einnahme von Medikamenten mit demselben Nebenwirkungsprofil oder auf Cytochrom-P450-Enzymkomplex wirkende Medikamente (Anderson et al., 2008, Cohen et al., 2000, Karow, 2012).

Der Effekt des trizyklischen Antidepressivums Despiramin auf das Prozessieren der lysosomalen ASM wurde durch Studien an Kulturen humaner Epithel-Fibroblasten nachgewiesen. Die Zugabe Despiramins löst eine schnelle intrazelluläre Degradierung der ASM aus und führt zur Abnahme oder Verlust der entsprechenden Enzymaktivität (Hurwitz et al., 1994, Kornhuber et al., 2008). Amphiphile kationische Substanzen induzieren eine Ablösung des ASM-Proteins von der inneren Membran des Lysosoms und fungieren dadurch als funktionelle Inhibitoren der ASM. Substanzen, welche diese physikochemischen Eigenschaften erfüllen und als funktionelle Inhibitoren wirken werden Functional-Inhibitor-of-Acid -Sphingomyelinase (FIASMA) genannt. Sie differieren stark in ihren molekularen Strukturen und klinischen Indikationen. Sie haben meist eine geringe

toxische Wirkung. Viele der Substanzen werden in Studien zu Alzheimer, Depressionen oder Krebstherapien untersucht (Kornhuber et al., 2010, Kornhuber et al., 2008).

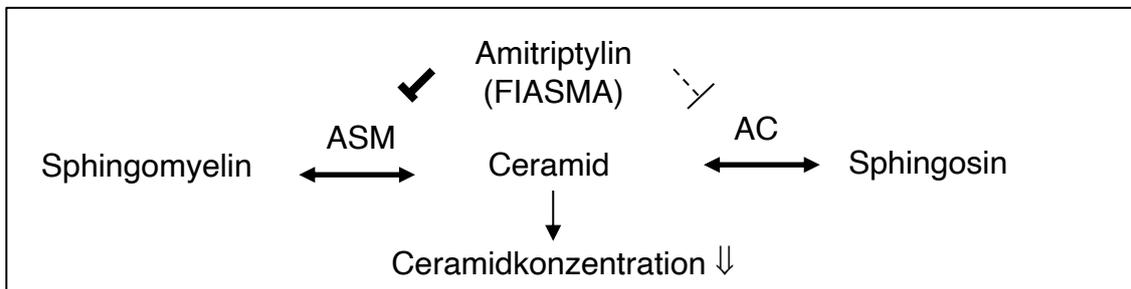


Abbildung 5: Ansatzpunkte Amitriptylins

Wirkungsort Amitriptylins (Teil der Gruppe der FIASMA). Exemplarisch ist die Hemmung der ASM und die Entthemmung der AC dargestellt, wodurch weniger Ceramid gebildet und gleichzeitig bestehendes abgebaut wird. *AC*: Sauer Ceramidase, *ASM*: Saure Sphingomyelinase. *FIASMA*: Functional Inhibitors of the Acid Sphingomyelinase (modifiziert nach (Kornhuber et al., 2010))

1.5 Vorbereitende klinische Studien

Phase-I-Studie - Basierend auf der Annahme des durch Amitriptylin hervorgerufenen Schutzes der *Cftr*-defizienten Maus vor pulmonalen Infektionen und Inflammation, erfolgte eine kleine klinische Crossover-Studie mit vier CF-Patienten. Es erfolgte jeweils die Behandlung mit Amitriptylin oder einem Placebopräparat. Bei drei von vier Patienten mit Amitriptylin-Therapie (2 x 37,5 mg) wurde nach 14 Tagen Therapie eine Steigerung der Lungenfunktion FEV_1 (+16,7 %; $p=0,006$) beobachtet. Es war kein Zuwachs unter Placebo-Therapie (FEV_1 : -1,8 %) zu verzeichnen (Riethmuller et al., 2009).

Phase-IIa- Studie (Sicherheit und Dosisfindung) - Die positiven Resultate der Pilotstudie führten zur Initiierung der Phase-IIa-Crossover-Studie mit 19 Patienten. Diese sollte die vorteilhaften Effekte Amitriptylins auf die CF in einer größeren Patientenpopulation als sicher einstufen, den Mechanismus des Geschehens nachweisen, sowie die Dosis der maximalen Wirkung und minimalen Nebenwirkungen ermitteln (25 mg pro Tag, 50 mg pro Tag, 75 mg pro Tag). Amitriptylin wurde gut vertragen und keine schweren unerwünschten Nebenwirkungen wurden registriert. Von 80 beschriebenen Nebenwirkungen waren 35 Nebenwirkungen vermutlich medikamentöse Nebenwirkungen. Zwei bekannte Nebenwirkungen Amitriptylins, nämlich Xerostomie und Müdigkeit wurden häufiger in der

Amitriptylingruppe im Vergleich zur Placebogruppe beobachtet, waren aber meist vorübergehend. Die Patienten wurden in Gruppen randomisiert, die das Placebo oder 25 mg, 50 mg bzw. 75 mg Amitriptylin täglich erhielten. Nach 14 Tagen Behandlung verbesserte sich unter 25 mg Amitriptylin täglich der primäre Endpunkt FEV₁ signifikant in der Amitriptylingruppe im Vergleich zur Placebogruppe (FEV₁: +5.0% verglichen mit der Placebogruppe p=0.048). In den Patientengruppen, welche höherer Dosen Amitriptylin einnahmen, wurden keine signifikanten Unterschiede beobachtet (50 mg oder 70 mg täglich) (Riethmuller et al., 2009).

Phase-IIb-Studie (Verifizierung des Wirkmechanismus) - Um die Ergebnisse der Phase-IIa-Studie zu verifizieren, folgte zwischen 2009 und 2011 eine randomisierte Kohortenstudie mit 40 CF-Patienten. Um einen stabileren Blutspiegel zu erreichen und nur sehr milde oder keine Nebenwirkungen zu erhalten, wurde eine Dosis von 25 mg Amitriptylin zweimal täglich gewählt. Nach 28 Tagen Behandlung verbesserte sich der primäre Endpunkt, die FEV₁- Differenz, im Vergleich zur Placebogruppe um 6,3 %; p = 0,08 in der ITT-Gruppe (36 von 40 CF-Patienten) und um 8,5%; p=0,013 in der PP-Gruppe (29 von 40 Patienten). Es wurden 50 Nebenwirkungen bei 36 Patienten beobachtet, von denen 30 Nebenwirkungen möglicherweise durch die Medikation ausgelöst wurden. Die Xerostomie und Müdigkeit traten signifikant häufiger in der Amitriptylingruppe im Vergleich zur Placebogruppe auf, waren aber transient. Andere typische Nebenwirkungen wurden in der Phase-IIb-Studie, vermutlich aufgrund geringerer Dosierung, nicht beobachtet. Schlussendlich führte diese Studie zur Hypothese, dass Amitriptylin als verträgliche und effiziente Therapie bei der CF-Lungen-Erkrankung mit einer Dosis von zweimal 25 mg täglich verwendet werden kann (Nahrlich et al., 2013).

Tabelle 1: Ergebnisse Vorstudien anhand der Primären Endpunkte

Vorstudie	Ergebnisse
I	FEV ₁ : +16,7 %; p=0,006*
IIa	FEV ₁ : +5,0 %; p=0,048†
IIb	FEV ₁ : +8,5 %; p= 0,013‡

* Nach 14 Tagen mit 37,5 mg Amitriptylin-Therapie eine Verbesserung in der Amitriptylingruppe. † Nach 14 Tagen Behandlung verbesserte sich der primäre Endpunkt FEV₁ unter Therapie mit 25 mg Amitriptylin im Vergleich zur Placebogruppe. ‡ Nach 28 Tagen Behandlung verbesserte sich der primäre Endpunkt FEV₁ unter Therapie mit 25 mg Amitriptylin im Vergleich zur Placebogruppe der PP-Analyse. FEV₁: Forciertes expiratorisches Einsekundenvolumen, *Pilot*: Pilotstudie, *PP*: Per Protocol, *IIa*: Phase-IIa-Studie, *IIb*: Phase-IIb-Studie

Anwendungsbeobachtungs-Studie - Nach den Phase-II-Studien wurde ein Teil der Patienten mit zweimal täglich 25 mg Amitriptylin im Rahmen einer Routinebehandlung behandelt. Diese Patienten wurden nach einem, zwei und drei Jahren nach kontinuierlicher Einnahme von Amitriptylin beobachtet und mit den Patienten verglichen, die nicht behandelt wurden. Von 59 CF-Patienten erhielten 20 Patienten Amitriptylin für ein oder mehrere Jahre und 14 Patienten konnten für ein oder mehrere Jahre ohne Amitriptylin-Behandlung unter Routinetherapiebedingungen analysiert werden. Analysiert wurden die besten FEV₁-Messungen in einem Jahr und der Durchschnitt der Gewichtsmessungen pro Jahr. Nach drei Jahren Behandlung nahm FEV₁ in der Amitriptylin-Population (n=5) signifikant (MW ± SD) um 7,7±8%, p=0,050, und das Gewicht um 7,3±3,8kg, p=0,016, zu, während FEV₁ in der Placebogruppe um 1,0±1,3%, p=0,075, abnahm und das Gewicht um 0,4±1,5kg, p=0,29, zunahm (n=5). Es wurde vermutet, dass Amitriptylin Ceramid in Lungenzellen reduziert, dadurch zur signifikanten FEV₁ Erhöhung führte und einen positiven Einfluss auf die Gewichtszunahme hat (Adams et al., 2016).

1.6 Zielsetzung der vorliegenden Studie

Die vorliegende Arbeit beschreibt eine randomisierte, doppelverblindete, Placebo-kontrollierte, multizentrische Phase-III-Studie, mit welcher der Effekt Amitriptylins im Vergleich zum Placebopräparat gezeigt werden sollte. Sollten die Daten der Phase-IIa und Phase-IIb-Studie bestätigt werden, wird es möglich sein, für CF-Patienten eine neue prognoseverbessernde Behandlungsstrategie anzubieten. Wir überprüften folgende Hypothesen:

- Es wird einen signifikanten Unterschied in den Messwerten des primären und der sekundären Endpunkte zwischen der Amitriptylingruppe und Placebogruppe nach 16 Wochen Behandlung geben.
- Amitriptylin reduziert die Ceramidkonzentration in Epithelzellen der Bronchien.
- Amitriptylin-Behandlung reduziert bronchialen Zelltod und reduziert die konsekutive DNA-Anreicherung im Epithel des Respirationstraktes. Dies unterstützt die Elimination des Bakteriums *P. aeruginosa* in der Lunge und wird als *P. aeruginosa*-Kolonien im Trachealsekret gemessen.
- Amitriptylin normalisiert die Inflammation in CF-Lungen und wird als Leukozytenkonzentration im Trachealsekret und Serum gemessen.
- Amitriptylin reduziert die systemische und lokale Inflammation und wird als Konzentration der Zytokine im Plasma und Trachealsekret gemessen.
- Aufgrund dieser Effekte bewirkt Amitriptylin eine Steigerung der Lungenfunktion der CF-Patienten, welche in FEV₁ gemessen wird.

2 Material und Methoden

2.1 Studiendesign

Diese Studie wurde als prospektive, randomisierte, placebokontrollierte, doppelverblindete, multizentrische Kohortenstudie, welche Jugendliche sowie erwachsene CF-Patienten mit chronischer bakterieller pulmonaler Besiedlung miteinbezog, geplant.

Es erfolgte eine Randomisierung und wir teilten die Probanden in einem Verhältnis von eins zu eins auf eine Gruppe, welche Amitriptylin als Verumpräparat erhielt und eine Gruppe, welche ein Placebopräparat aus Maisstärke erhielt, auf. Jeder Patient erhielt das jeweilige Präparat über einem Zeitraum von 16 Wochen. Die Patienten wurden mittels der Software Rand List auf die beiden Arme zufällig verteilt und die Zuteilung durch das jeweilige Zentrum durchgeführt. Zusätzlich wurde die Randomisierung anhand des gemessenen Baseline FEV₁-Wert über 80% und unter 80% innerhalb des jeweiligen Zentrums stratifiziert. Die Randomisierung-Listen wurden von nicht an der klinischen Studie beteiligten Personen über die Software Rand List vorbereitet.

Die Studiendauer war mit 18 Monaten für die Rekrutierung und 24 Monaten für die Komplettierung der Studie angesetzt, wurde insgesamt auf 48 Monate verlängert und dann ohne Erreichen der geplanten Patientenzahl von 102 vorzeitig beendet. Die individuelle Partizipation an der Studie pro Proband wurde mit mindestens 18 Wochen angesetzt. Alle Patienten sollten über 16 Wochen das jeweilige Präparat erhalten.

Im Folgenden zeigt sich der APA-Prüfplan mit Informationen über den geplanten Verlauf der Phase-III-Studie.

Tabelle 2: Studienablauf

Zeitpunkt Methode	Screening	Baseline	Während der Studie				Follow-up
<i>Visite</i>	1	2	3	4	5	6	7
<i>Tag</i>	-14 bis -7	0	15-17	28±3	56±5	112±5	140±7
<i>Einverständnis</i>	•						
<i>Inklusionskr.¹</i>	•	•					
<i>Exklusionskr.²</i>	•	•					
<i>Demographie</i>	•						
Vitalparameter							
<i>Herzfrequenz</i>	•	•	•	•	•	•	
<i>Blutdruck</i>	•	•	•	•	•	•	
<i>Größe</i>	•	•		•	•	•	
<i>Gewicht</i>	•	•		•	•	•	
Labor							
<i>Hämatologie³</i>	•	•	•	• ¹¹	•	• ¹¹	•
<i>Klinische Chemie⁴</i>	•	•	•	• ¹¹	•	• ¹¹	•
<i>SS-Test⁵</i>		•					
<i>PK-Sample⁶</i>					•		
<i>CYP2D6⁷</i>					•		
<i>Sputum</i>	•	•	•	•	•	•	
Diagnostik							
<i>EKG⁸</i>	•		•				
<i>Spirometrie</i>	•	•	•	•	•	•	•
<i>LCI⁹</i>		•			•	•	
Begleitmedikation							
<i>Antibiotika</i>				•			
<i>Inhalativa</i>				•			
<i>Andere</i>				•			
Studienmedikation							
<i>Einnahme¹⁰</i>				•			
<i>Nebenwirkungen</i>				•			
<i>Studienende</i>							•
<i>Bestätigung</i>							•

1. Inklusionskriterien, 2. Exklusionskriterien, 3. Hämatologie: Leukozyten, Hämoglobin, Hämatokrit, Thrombozyten, 4. Klinische Chemie: CRP, Kreatinin, Urea, ALT, AST, GGT, Blutgasanalyse, 5. Schwangerschaftstest: im Blut oder Urin, 6. Amitriptylin und Nortriptylin Konzentration-Bestimmung im Serum 7. CYP2D6 Molekulargenetische Untersuchung 8. Echokardiographie 9. Lung Clearance Index 10. Administration der Studienmedikation: 2x/Tag. Tag 1-4: 1 x 12,5 mg abends, Tag 5-8 2 x 12,5 mg, Tag 9-12 12,5 mg morgens und 25 mg abends. Tag 13-112 zweimal 25 mg. 11. fakultativ: wenn akute Exazerbation (aus dem Prüfplan der vorliegenden Studie)

2.2 Patientenkollektiv

Alle Patienten wurden über mögliche Nebenwirkungen und Komplikationen der Verum-Medikation vom jeweiligen Prüfarzt informiert und aufgeklärt. Alle Patienten sollten nach Abgabe der Einverständniserklärung vom Prüfarzt untersucht werden, um deren Eignung zu bestimmen. Anhaltspunkte dafür waren die in diesem Abschnitt aufgeführten Inklusions- und Exklusionskriterien. Alle Patienten, welche die Inklusionskriterien erfüllten und gleichzeitig keines der Exklusionskriterien erfüllten, konnten an der Studie teilnehmen, sobald die persönliche oder elterliche Einverständniserklärung abgegeben wurde. Im Folgenden sind die Ein- und Ausschlusskriterien aufgeführt.

Einschlusskriterien:

1. Verifizierte Cystische Fibrose
2. Patientenalter: 14 Jahre oder älter
3. Patientengewicht über 35 kg
4. FEV₁ höher als 25% und geringer als 100% (gemessen zweimal in 3 Monaten)
5. Patienten mit pulmonaler Keimbesiedlung
6. Keine akute pulmonale Symptomatik
7. Lungenfunktionstestungen sollten durchführbar sein
8. Eine komplette Medikamenteneinnahme ist ohne Einschränkungen durchführbar
9. Die Einverständniserklärung wurde gegeben

Ausschlusskriterien:

1. Die FEV₁-Verminderung betrug zwischen Screening und Baseline über 10 %
2. Klinische Verschlechterung mit Symptomen der Exazerbation
3. Veränderung des CRP-Wertes bzw. eine Steigerung von über 50% während des Screenings
4. Glaukom, Krampfanfälle, Herzinsuffizienz oder Depressionen, die bekannt sind
5. Long-QT-Syndrom oder eine QTc Zeit, die länger als 450 ms ist.

6. Intravenöse antibiotische Behandlung, die innerhalb von 2 Wochen vor Beginn der Studie benötigt wurde
7. Hochdosierte Steroid-Therapie von über 10 mg
8. On-and-off Therapie mit Tobramycin innerhalb der letzten 2 Wochen
9. Partizipation von Patienten in anderen Studien
10. Das Vorliegen einer Schwangerschaft

2.3 Studienmedikation: Amitriptylin

Das Studienmedikament Amitriptylin ist bereits auf seine Effektivität geprüft, da es im Bereich des psychiatrischen Erkrankungsspektrums zugelassen ist. In der vorbereitenden Studienphase II zeigte sich eine Wirksamkeit in allen Behandlungsarmen. Abschließend konnte festgehalten werden, dass die höchste Wirksamkeit mit der Dosierung von 25 mg täglich und 50 mg täglich gegeben war. Sogenannte „Poor Metabolizer“ mit einem positiv getesteten *CYP2D6*-Genotyp, mussten in der Phase-III-Studie nicht ausgeschlossen werden, da die unerwünschten Nebenwirkungen in der Studienphase II minimal ausfielen und somit nicht als Ausschlusskriterium aufgenommen werden musste. Aufgrund einer höheren Rate des Auftretens von Müdigkeit und Xerostomie, die sich in Phase-IIa und Phase-IIb als Nebenwirkungen präsentierten, wurde die Dosis über 2 Wochen bis zum Erreichen der Zieldosis von 2x25 mg täglich schrittweise erhöht.

Die Einnahme des Placebo-Präparats erfolgte analog zum Amitriptylin-Behandlungsplan. In den ersten beiden Wochen wurde entsprechend die Dosis von 25 mg täglich und nach zwei Wochen eine Dosis von 50 mg täglich eingenommen.

Die Herstellung und Verteilung der Studienmedikation an die teilnehmenden Apotheken erfolgten über die Apotheke der Universität Ulm (Dr. Maier). Die Verpackung, Verblindung, Beschriftung und Aufbewahrung der Medikation entsprach dem §10 des AMG. Gemäß der Randomisierungsliste waren diese Informationen nur der Apotheke bekannt. Die jeweiligen Kapseln enthielten eine Füllung von 12,5 mg oder 25 mg. Die Verteilung erfolgte nach der Beschriftung mit Patientenummer und Zentrum und wurde entsprechend dokumentiert.

2.3.1 Nebenwirkungen und Abbruchkriterien

Nebenwirkungen wurden in vorbereitenden Studien und Experimenten, vor allem bei der Behandlung depressiver Erkrankungen, beobachtet. Lebensbedrohliche Ereignisse wurden erst ab einer Tagesdosis von über 150 mg täglich beobachtet. Sehr häufige Nebenwirkungen sind hauptsächlich in der frühen Phase bei Dosen von 75 bis 150 mg täglich zu beobachten. Klinische Kontrollen der Vitalparameter, Blutanalyse, EKG und Leberfunktionswerten sollten erfolgen. In der Studienphase IIa zeigten sich bereits einige Nebenwirkungen, wobei nicht alle Symptome durch Amitriptylin verursacht wurden. Als schwere Symptome wurden innerhalb des 25 mg Studienarms zweimalig Exazerbationen und einmalig Kopfschmerzen dokumentiert. Die Xerostomie zeigte sich bei 83% der Patienten und Müdigkeit trat bei 75% der Patienten auf und waren jeweils transient. Die Symptome im Rahmen der Studie wurden abgefragt und in einem Tagebuch (erstellt von CPCS Tübingen) dokumentiert. Die Patienten hatten jederzeit die Möglichkeit das Auftreten von Nebenwirkungen zu melden.

Terminationskriterien waren nicht tolerierbare Nebenwirkungen. Diese waren definiert als Herzrhythmusstörungen, Leberfunktionsstörungen, Agranulozytose, Glaukom, Dyskinesien, Polyneuropathie, Alveolitis, Kardiomyopathie und Krampfleiden. Das Neuaufreten einer pulmonalen Komplikation wie Pneumothoraces, endotracheale oder endobronchiale Hämorrhagien, pulmonale Exazerbation mit zwei oder mehr der folgenden Kriterien: Veränderung der Sputummenge, Farbe, vermehrtes Husten, erhöhtes allgemeines Unwohlsein, Fatigue, Lethargie, Anorexia, Gewichtsverlust, verminderte pulmonale Funktion über 10% oder radiographisch nachweisbare Veränderungen und Dyspnoe-Zunahme. Außerdem führten Infektionen der unteren Atemwege, wenn ein Krankenhausaufenthalt oder eine intravenöse antibiotische Therapie nötig war, zum Pausieren der Studienmedikation. Generell sollte ein Studienausschluss beim Auftreten von Ereignissen, die die Patientengesundheit gefährden, erfolgen. Jegliche Begleitmedikation, die medizinisch nötig war, war während der Studienteilnahme erlaubt. Allerdings unter Berücksichtigung, dass die Interaktion mit gewissen Antibiotika das QT-Intervall verlängert. War aufgrund einer pulmonalen Exazerbation dennoch eine Therapie mit Antibiotika der Gruppe der Chinolone oder Makrolide nötig, sollte die Studienmedikations-Einnahme pausiert werden, um schwere Nebenwirkungen zu vermeiden.

2.4 Zielparameter

2.4.1 Primärer Zielparameter

Der primäre Zielparameter ist die absolute Differenz der Baseline-Messung und Messung der achten Woche der Lungenfunktion in FEV₁ zwischen der Verum- und der Placebogruppe.

2.4.2 Sekundäre Zielparameter

1. Aufrechterhaltung der erreichten FEV₁ –Werte der Verumgruppe zwischen Woche 8 und Woche 16.
2. Absolute und relative FEV₁ als % nach Woche 4, 8 und 16 im Vergleich zur Baseline, wenn nicht zuvor verwendet.
3. Alle anderen Lungenfunktionsparameter (FVC, MEF 25-75 und LCI) nach Woche 4,8 und 16.
4. Die Konzentration der Ceramide im Sputum.
5. Die Konzentration proinflammatorischer Zytokine, Veränderungen im Gehalt des antiinflammatorischen IL-10 im Trachealsekret.
6. Die DNA- und Granulozytenkonzentration im Sputum.
7. Bakterielle Besiedlung im Sputum.
8. Anzahl an Exazerbationen des Oberen und Unteren Respirationstrakt (zwei und mehr der folgenden Kriterien: Änderung im Sputum-Volumen, Sputum-Farbe, erhöhte Hustenfrequenz, gesteigerte Malaise, Fatigue, Lethargie oder Anorexie, Gewichtsverlust oder Senkung der Lungenfunktion von 10 % oder mehr oder radiographische Veränderungen, erhöhte Dyspnoe).
9. Inzidenz von Abbruch der Behandlung aufgrund wahrgenommener Nebenwirkungen.
10. Gewichtsveränderungen
11. Quality-of-Life-Fragebogen

2.5 Untersuchungsmethoden der Studie

2.5.1 Klinische Untersuchungsmethoden

Alle Patienten wurden nach den Inklusions- und Exklusionskriterien, welche auch klinische Untersuchungsmethoden beinhalteten (vgl. Tab. 3) durch das jeweilige teilnehmende Zentrum beurteilt und mussten die persönliche oder elterliche Einverständniserklärung abgeben. Nachdem die Beurteilung und die Aufnahme in die Studie erfolgten, wurde die Medikamenteneinnahme mit täglich um jeweils 9 und 21 Uhr festgelegt. Lungenfunktionstest und Sputum-Analysen wurden im Rahmen jeder Visite durchgeführt.

Tabelle 3: Klinische Untersuchungen

Rekrutierung Visite 1 (-14 bis -7)						
<i>Inklusionskriterien, Exklusionskriterien, Einverständniserklärung, Laborchemie, EKG</i>						
Behandlung*	V2 (0)	V3 (15- 17)	V4 (28 +/- 3)	V5 (56 +/- 5)	V6 (112 +/- 5)	Follow-up (140+/-7)
<i>Therapie</i>	x	x	x	x	x †	
<i>Vitalparameter</i>	x	x	x	x	x	
<i>Spirometrie</i>	x	x	x	x	x	x
<i>Sputumprobe</i>	x	(x)	x	x	x	
<i>Blutprobe</i>	x	x	(x)	x	x	
<i>EKG</i>		x				

Klinische Untersuchungen im zeitlichen Ablauf während der Phase-III-Studie. Die Tabelle gibt einen zeitlichen Überblick über die Häufigkeit der erfolgten klinischen Untersuchungen. Visite mit Angabe des Zeitpunktes in Tagen unter Visite. †Stopp der Gabe der Studienmedikation. V: Visite, x: obligat, (x): fakultativ

2.5.1.1 Lungenfunktionstestung

Die Verbesserung der Lungenfunktion als primärer Zielparameter der Studie wurde an allen Behandlungstagen dokumentiert. Zur Beurteilung des Behandlungserfolges galt der FEV₁-Wert. Zusätzliche Messgrößen waren die FVC, Vitalkapazität und die MEF 25-75. Die Lungenfunktionsmessung führte das jeweilige Studienzentrum durch. An der Kinderklinik der Universität Tübingen erfolgten die Messungen an einem Bodyplethysmographen der Firma Jäger (Höchberg, Deutschland).

2.5.1.2 Vitalparameter

Da unter der Einnahme Amitriptylins Veränderungen der Herzfrequenz als auch orthostatische Regulationsstörungen zu beobachten sind, wurden während jeder Visite der Blutdruck- und Herzfrequenz bestimmt und dokumentiert.

2.5.1.3 Gewicht

Die Erfassung des Körpergewichts über den gesamten Zeitraum der Studie als Verlaufparameter. Dies geschah aufgrund der Annahme, dass bei sich erholender Lungenfunktion, eine Reduktion der Atemarbeit erfolgt und in einer Gewichtszunahme resultiert und somit als indirekter Therapieerfolg gedeutet werden kann. Andererseits ist die Gewichtszunahme, eine Folge der Appetitsteigerung, als bekannte Nebenwirkung Amitriptylins einzuordnen.

2.5.1.4 Elektrokardiogramm

An Tag 15 bis 17 (Visite 3) erfolgte eine Elektrokardiographie, um unter anderem im Rahmen einer Amitriptylin-Behandlung auftretende Herzrhythmusstörungen oder Kardiomyopathien auszuschließen.

2.5.2 Laborchemische Methoden

2.5.2.1 Blut-Serum

An Tag 0 (Visite 2), 15 bis 17 (Visite 3), 56 (Visite 5) und 112 (Visite 6) wurde den Patienten 12 ml Blut entnommen und dieses 10 Minuten bei 3500 U/min zentrifugiert. 1 ml des erhaltenen Serums wurde zur Bestimmung der Leukozytenkonzentration separiert, 2 ml zur Bestimmung der klinischen Parameter: CRP, Kreatinin, Harnstoff, GOT, GPT. Weitere 2 ml des Serums wurden unverzüglich bei – 20°C für eine spätere kollektive Bestimmung der Zytokine IL-6, IL-8, IL-10 aufbewahrt.

2.5.2.2 Sputum

Im Rahmen jeder Visite erfolgte die Entnahme Sputums für die *P. aeruginosa*-Quantifizierung, zur Bestimmung der Zytokine IL-8 und IL-10 (fakultativ IL-1 β , IL-6 und TNF- α) und der Leukozytenanzahl. Die Patienten sollten, um eine notwendige Menge von 1,5 ml zu erhalten, mit 5,85%-iger Kochsalzlösung vor Abnahme inhalieren.

2.5.2.3 Urin

Zum Ausschluss einer Schwangerschaft sollten alle weiblichen Studienteilnehmerinnen im gebärfähigen Alter eine Urinprobe abgeben. Der entsprechende Test mittels eines standardisierten Schwangerschaftstreifen erfolgte an Visite 1 und spätestens vor Beginn der Studienmedikationseinnahme an Visite 2.

2.5.3 Mikrobiologische Methoden

2.5.3.1 *P. aeruginosa*-Quantifizierung

Im Rahmen der Visite 2, 4 und 5 fand eine quantitative Erhebung der pulmonalen bakterielle Besiedlung statt. Als sekundärer Endpunkt diente die Quantifizierung des Bakteriums *P. aeruginosa*, welcher als pulmonaler Problemkeim im Rahmen der Krankheitspathogenese eine entscheidende prognostische Rolle spielt. Ergänzend sind als häufige pathogene Keime der pulmonalen Besiedelung *S. aureus*, *H. influenza*, *St. maltophilia*, *Achromobacter xylosoxidans*, *Proteus mirabilis*, *S. epidermidis* und *E. coli* bestimmt worden. Begleitend tritt häufig eine mykotische Begleitinfektion mit *Candida albicans* und *Aspergillus fumigatus* auf, welche wir dokumentierten.

2.5.3.2 Ablauf

Das gewonnene Sputum verdünnten wir zu jeder Visite im Verhältnis 1:10. Als Verdünnungsflüssigkeit verwendeten wir DTT. Jeweils 1 ml und insgesamt 5 ml des verdünnten Sputums wurde in entsprechende Eppendorf-Cups pipettiert. Im nächsten Schritt erstellten wir drei weitere Verdünnungsreihen (V1-V3) für die Ausplattierung auf Agarnährböden (CNA-Platte und Endo-Platte). Hierfür galt V0 als die erste Verdünnung mit 1:10. Die folgenden Reihen vermischten wir mit jeweils 10 µl der entsprechenden Verdünnung mit 990 µl PBS. Dadurch erstellten wir eine Verdünnungsreihe mit einem Faktor von 10^2 bis 10^6 . Es folgte die Beimpfung mittels der manuellen Glasspateltechnik, jeweils einer Endo-Platte und einer CNA-Blutagar-Platte mit jeweils 92 µl der jeweiligen Verdünnung. Im Anschluss erfolgte die Inkubation in einem Brutschrank bei 37°C. Die Auswertung der Kolonisation fand nach 48 Stunden statt.

2.5.3.3 Auswertung

Zunächst wurden die Erreger per Blickdiagnose und dem zugehörigen Bestätigungstest identifiziert. Zur Verifizierung des *P. aeruginosa*, welcher auf der Endoplatte leicht violett bis pink erscheint, wurde ein Oxidase-Test (Firma Merck, Bactident Oxidase Teststäbchen) verwendet. Ergänzend half der typische süßliche lindenblütenartige Geruch zur Identifizierung. Zu jedem Zeitpunkt unterschieden und dokumentierten wir die nicht-mukoide und mukoide *P. aeruginosa*-Variante, wobei die mukoide mit einer schleimigen Schicht bedeckt und durch konfluierendes, farblich helleres und größeres Koloniewachstum gekennzeichnet ist. Zur Verifizierung des auf der CNA-Blutagarplatte wachsenden *S. aureus*, welcher mittelgroß, weiß-gelblich, rund mit Hof, sowie einer Betahämolyse imponiert, verwendeten wir den Clumping-Faktor-Test (Firma Merck, Bactident Staph. Plus) sowie den Katalase Test (Firma Merck, Bactident Catalase). Die Kolonien-bildenden-Einheiten KBE wurden in der niedrigst möglichen Verdünnung quantifiziert, um Verdünnungsfehler zu vermeiden. Die pulmonale Besiedlung durch Pilze der Hefepilzgruppe, beispielsweise *Candida*, und der Sprosspilze wie *A. fumigatus* wurde dokumentiert, jedoch nicht quantifiziert.

2.5.4 Labortechnische Verfahren

2.5.4.1 Leukozytenkonzentrationsbestimmung

Die Bestimmung der Leukozyten im Sputum erfolgte im Hämatologie-Labor der Kinderklinik der Universität Tübingen mithilfe des Blutbildanalysegeräts ADVIA 120 der Firma Bayer Technicon/Siemens. Dabei wurde dem Messfühler des Geräts das hergestellte verdünnte Sputum (siehe 2.9.1) eingeführt. Die Ergebnisse wurden ausgedruckt und dokumentiert.

2.5.4.1.1 Ceramidexpression und Zytokin-Assay

Für das labortechnische Verfahren zur Messung der Ceramidkonzentration wurde der Versuchsaufbau geplant, jedoch nicht durchgeführt, da die Studie bereits geschlossen wurde. Die Messung der pro- und antiinflammatorischen Zytokine wurde nach Studienabschluss durchgeführt.

2.6 Statistische Methoden

2.6.1 Randomisierung und Datenmanagement

Die Randomisierung wurde blockiert und erfolgte nach Zentrum und Baseline der FEV₁ (< 80% vs. ≥ 80%). Das Vorbereiten der entsprechenden Listen erfolgte unter Anwendung von permutierten Blöcken randomisierter Länge durch die Software RandList (DataInf GmbH Tübingen). Die Organisation der Daten war unter Verantwortung der CPCS IV und wurde anhand des Planes V1.1 vom 15.06.2018 durchgeführt.

Für das Monitoring war die ZKS Tübingen verantwortlich und wurde mittels der Monitoring Manual Version 1.2, 04.04.2016 durchgeführt. Die Datenbank schloss am 12 Juni 2019. Die Studiendaten wurden anhand secuTrial® 4.9.1.10, und bis zum Datenschluss zur Version 5.5.0.14 (interActive Systems GmbH, Berlin) aktualisiert.

2.6.2 Statistische Evaluation

Für die Gesamtbeurteilung erfolgte die Auswertung der Ergebnisse aller ursprünglich eingeschlossenen Patienten, auch wenn Abweichungen des Prüfplans auftraten, anhand des Intention-to-treat (ITT)-Prinzips. Der primäre Zielparameter wurde anhand des Per-Protocol (PP)-Prinzips analysiert. Dabei kam es zur Betrachtung der Ergebnisse der Patienten, welche dem Behandlungszyklus des Prüfplans folgten. Dies bedeutete, dass Patienten, welche diesem nicht entsprachen, nicht mitberücksichtigt wurden. Daten von Patienten, welche über einen Zeitraum von vier Wochen keine Lungenfunktionsprüfung durchführen konnten, wurden von der statistischen Auswertung des primären Zielparameters FEV₁, ausgeschlossen. Diese konnten, soweit sie nach zwei Wochen eine Vollständigkeit der Untersuchungsergebnisse erreichten, wieder miteingeschlossen werden. Als Ergänzung zum Studienprotokoll und der statistischen Analyse wurde, unter Beachtung der ICH E9 statistischen Prinzipien für klinische Studien, die Analyse des primären Endpunktes verteilt auf Zentrum und FEV₁-Baseline anhand linearer Modelle durchgeführt. Gemäß des Studienprotokolls sollten 102 Patienten mit jeweils 51 Patienten pro Studienarm eingeschlossen werden um die Hypothese, dass die Behandlung Amitriptylins in einer FEV₁% - Differenz von mindesten 3.8% oder höher in der Verumgruppe, verglichen mit der Placebogruppe nach 8 Wochen im Vergleich zur Baseline, resultiert. Die ITT-Population war die Basis für die Konfirmationsanalyse des primären Endpunktes. Die Resultate des primären Endpunktes innerhalb der ITT-Population sollten als bewiesen gelten

im Falle, dass die Verum-und Placebogruppe einen p-Wert unter 0,05 zeigen. Alle anderen Analysen wurden in einer deskriptiven Methode durchgeführt. Die Analyse des primären Endpunktes und Tabellen der sekundären Endpunkte wurden basierend auf der PP-Population erstellt. Die Resultate der sekundären Endpunkte innerhalb der ITT-Population und alle Resultate der PP-Population dienten zur Erstellung neuer Hypothesen. In der Studie war der primäre Endpunkt abhängig von der FEV₁ der Baseline und der FEV₁ nach acht Wochen. Wenn die Baseline oder die Werte der achten Wochen fehlten, wurden die Patienten aus der Analyse ausgeschlossen. Sekundäre Parameter wurden analysiert und fehlende Daten nicht ersetzt. Analysen, welche die primären Endpunkte betreffen, wurden anhand des Student-T-Test ausgewertet. Statistische Analysen der sekundären Endpunkte wurde vorgenommen, wenn die Tabellen zeigten, dass eine klinisch relevante Differenz vorhanden war. Insgesamt erfolgten die Analysen gemäß dem statistischen Analyse-Plans.

3 Ergebnisse

3.1 Patienten

Die Rekrutierung der in diese Studie eingeschlossenen Patienten wurde in einem Zeitraum von 29 Monaten vom 20. August 2015 bis zum 19. Januar 2018 an sechs Zentren Deutschlands (Tübingen, Essen, Jena, Gießen, München, Frankfurt) durchgeführt. Die Aufnahme von Patienten in die Studie erfolgte anhand von Inklusions- und Exklusionskriterien. Bei einer Anzahl von 79 Patienten, anstatt der geplanten 102 Patienten, wurde die Rekrutierung vorzeitig gestoppt (vgl. Abb. 7). 42 der Patienten wurden der Verumgruppe und 37 Patienten der Placebogruppe zugeteilt. Die Randomisierung erfolgte zufällig. Insgesamt wurden 86 Patienten gescreent. Davon wurden sieben ausgeschlossen. Einige Gründe für einen Ausschluss aus der Studie wurden dokumentiert und sind in Tabelle fünf aufgeführt. Alle Patienten erhielten die geplante Studienmedikation, allerdings nicht alle in der vorgesehenen Dosis. Von den 79 Patienten wurden drei Patienten nachträglich aus der Studie ausgeschlossen, da keine Daten der Untersuchungen vorlagen. Somit wurden 76 (96%) der behandelten Patienten analysiert. Zwei der nachträglich ausgeschlossenen Patienten waren der Verumgruppe zugeteilt und einer der Patienten der Placebogruppe, sodass die Verumgruppe letztendlich 40 Patienten und die Placebogruppe 36 Patienten beinhaltete. Sechs Patienten hielten an vier aufeinanderfolgenden Tagen oder zwei Tage vor dem Bestimmen des primären Endpunktes die Medikamenteneinnahme nicht ordnungsgemäß ein und wurden daher aus der PP-Population ausgeschlossen. Dies betraf vier Patienten der Verumgruppe und zwei Patienten der Placebogruppe. Folglich umfasste die PP-Population der Verumgruppe 36 Patienten und die der Placebogruppe 34 Patienten. Nach dem PP-Prinzip wurden somit insgesamt 70 Patienten (89% der ursprünglichen Anzahl) analysiert. Gemäß des ITT-Prinzips mussten in der ITT-Analyse keine Patienten ausgeschlossen werden.

Die folgende Abbildung (Abb. 6) liefert einen Überblick über den Ablauf der Studie.

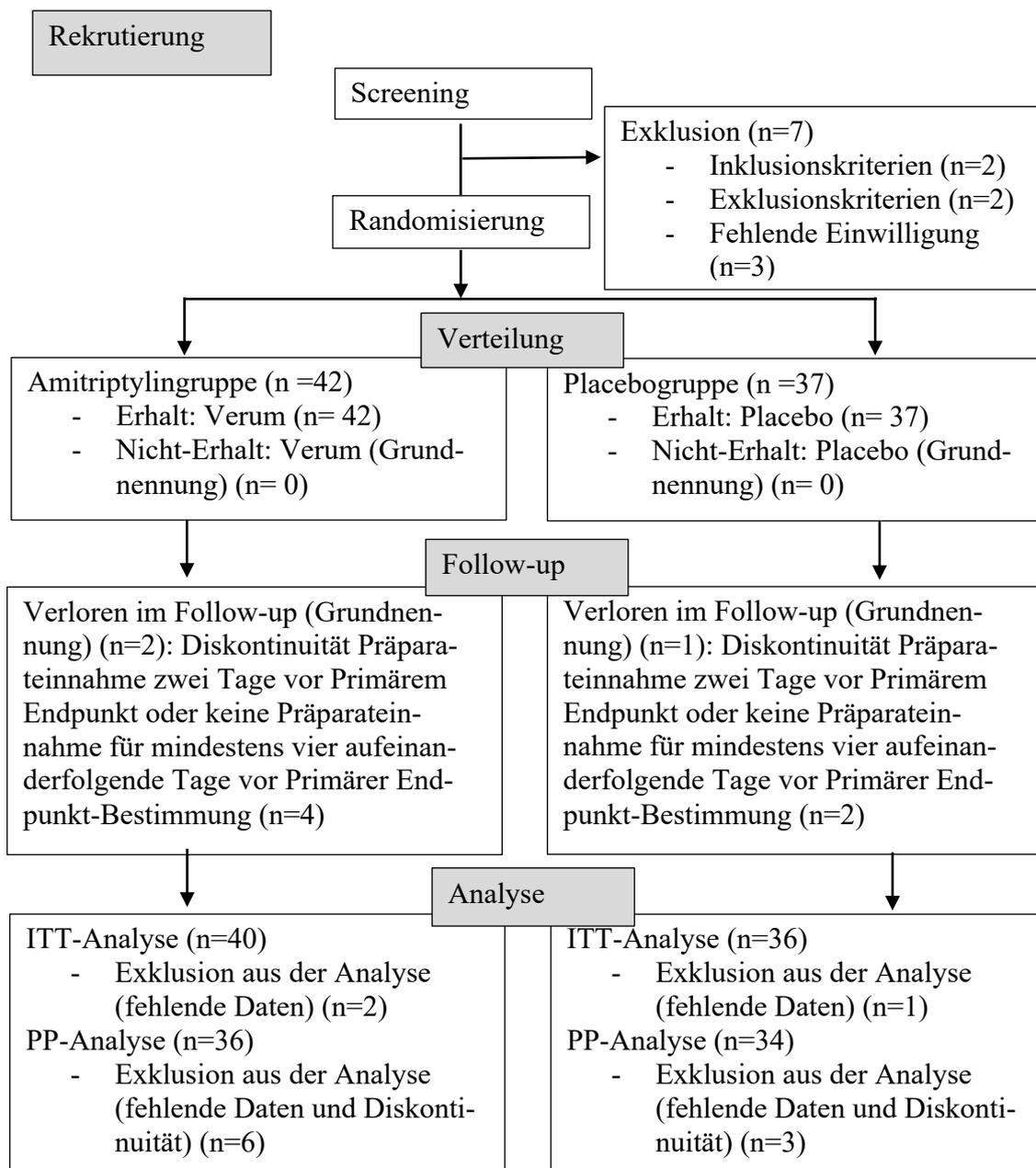


Abbildung 6: Ablauf der APA-Phase-III-Studie

86 Patienten wurden geprüft. Sieben Patienten wurden ausgeschlossen. Jeweils zwei Patienten, da die Inklusionskriterien nicht erfüllt oder die Exklusionskriterien erfüllt wurden. Drei Patienten lehnten eine Teilnahme ab. Es gab zwei Studiengruppen. Die Amitriptylingruppe und die Placebogruppe. In der Amitriptylingruppe wurden die Nachuntersuchungen bei zwei Patienten und in der Placebogruppe bei einem Patienten nicht mehr durchgeführt. Die ITT-Analyse der Amitriptylingruppe schloss 40 Patienten ein. Die PP-Analyse erfolgte mit 36 Patienten (Ausschluss: sechs Patienten). Die ITT-Analyse der Placebogruppe bestand aus 36 Patienten. Die PP-Analyse erfolgte mit 34 Patienten (Ausschluss drei Patienten). *ITT*: Intention to treat, *PP*: Per protocol, *n*= Patientenzahl.

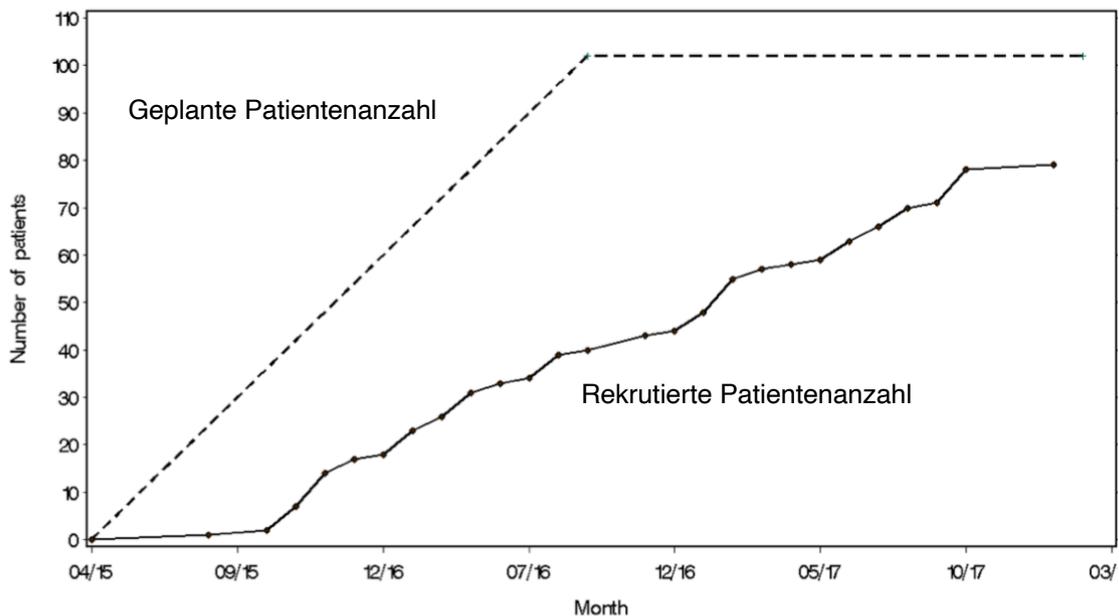


Abbildung 7: Verlauf der geplanten und erfolgten Patienten-Rekrutierung

Die Graphik bildet die geplante und die erfolgte Rekrutierung der Patientenzahl im Bezug zur Zeit (Monate/Jahre) ab.

Das durchschnittliche Alter betrug bei insgesamt 34 weiblichen und 45 männlichen Teilnehmenden 28,52 Jahre. Im Vergleich der Amitriptylin- und Placebogruppe zeigten sich anhand der grundlegenden Ausgangsbedingungen wie Alter, Geschlecht, Größe, Gewicht, Lungenfunktion, *P. aeruginosa*-Infektion keine signifikanten Unterschiede (vgl. Tab. 4).

Tabelle 4: Patientenausgangsbedingungen

Eigenschaften	Amitriptylingruppe	Placebogruppe
Alter (Jahre)*	27,62 ± 12,01	29,54 ± 12,03
Geschlecht (%) †:		
- männlich	42,9	73
- weiblich	57,1	27
Größe (cm)*	167,31 ± 9,27	170,76 ± 8,51
Gewicht (kg)*	60,26 ± 13,60	61,35 ± 9,74
BMI (kg/m ²)*	21,31 ± 2,83	21,02 ± 2,89
FEV ₁ %*	68,04 ± 20,58	64,39 ± 21,42
PSA-K (CFU/ml)*	3,17 ± 1,82	3,78 ± 2,42

*Alle Werte als Mittelwert ± Standardabweichung aufgelistet; Größe, Gewicht, BMI, FEV₁, PSA-Kolonien, jeweils Baseline-Werte angegeben. †Die Geschlechterverteilung ist in Prozent angegeben. BMI: Body-Mass-Index, FEV₁: Forciertes expiratorisches Einsekundenvolumen, PSA-K: Pseudomonas aeruginosa-Kolonien

Tabelle 5: Gründe für Nichtaufnahme in die Studie

Gründe für Nichtaufnahme in die Studie*

Zu hoher FEV₁ (119%)

Patient hat sich nicht mehr gemeldet

Patient ist zweimal nicht erschienen

Keine Studienteilnahme aufgrund von Zeitmangel

Exazerbation

Absetzen von Ciprofloxacin nicht möglich

Inklusionskriterien nicht erfüllt

*Genannt von den Studienzentren Tübingen, Bochum, München und Frankfurt. FEV₁: Forciertes expiratorisches Einsekundenvolumen

3.2 Primärer Zielparameter: FEV₁-Differenz

Als primärer Zielparameter der Studie wurde die Differenz der Baseline-Messung und Messung der achten Woche (Visite 5) der Lungenfunktion FEV₁ zwischen der Verum- und der Placebogruppe festgelegt. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde die Darstellung in Prozentwerten (%) gewählt und zur Auswertung das geometrische Mittel verwendet. Um den Wert der FEV₁% auch bei fehlender Visite 5 (Woche acht) bestimmen zu können wurde die Beobachtung von Visite 4 (Woche 4) in der Verumgruppe zweimalig, in der Placebogruppe einmalig für die Visite 5 übernommen.

Es kam zu einer Abnahme der FEV₁% zwischen Baseline und der achten Woche (Visite 5) in beiden Studiengruppen, tendenziell noch stärker innerhalb der Verumgruppe (p=0,64). Die Ergebnisse der Analyse der PP-Gruppe entsprechen dabei den Ergebnissen der Analyse der ITT-Gruppe (vgl. Tab. 6 und Abb.8).

Diese Analyse ergab, dass FEV₁% in der Verumgruppe durchschnittlich um 2,23% abnahm und in der Placebogruppe um 1,34% (p = 0,64) abnahm. (vgl. Tab. 7). Schichtanalysen resultierten darin, dass die verschiedenen Zentren (p =0,43) oder FEV₁% der Baseline (p = 0,94) keinen Einfluss auf den primären Endpunkt hatten. Wurden die Studienarme an Zentren und FEV₁% Baseline angepasst, so zeigten sich annähernd die gleichen p-Werte wie in der Analyse ohne Schichtung.

Tabelle 6: Differenz der FEV₁% zwischen Baseline und Woche 8

Behandlungsgruppe	ITT		PP	
	n	MW ± SD	n	MW ± SD
Amitriptylin	40	-2,23 ± 9,64	36	-2,14 ± 10,03
Placebo	46	-1,34 ± 6,85	34	-0,86 ± 6,25
Alle	76	-1,81 ± 8,40	70	-1,52 ± 8,56
T-Test	p=0,6424		p=0,5306	

Die Lungenfunktion wurde anhand der FEV₁-Differenz der Baseline und 8 Wochen zwischen der Amitriptylin- und Placebogruppe beurteilt. Die Werte sind als arithmetische Mittelwerte (MV) ± Standardabweichung (SD) dargestellt. Es bestehen keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen der Amitriptylin- und Placebogruppe. Die Ergebnisse der ITT-Analyse entsprechen denen der PP-Analyse. *ITT*: Intention to treat, *PP*: Per protocol, *n*: Patientenzahl

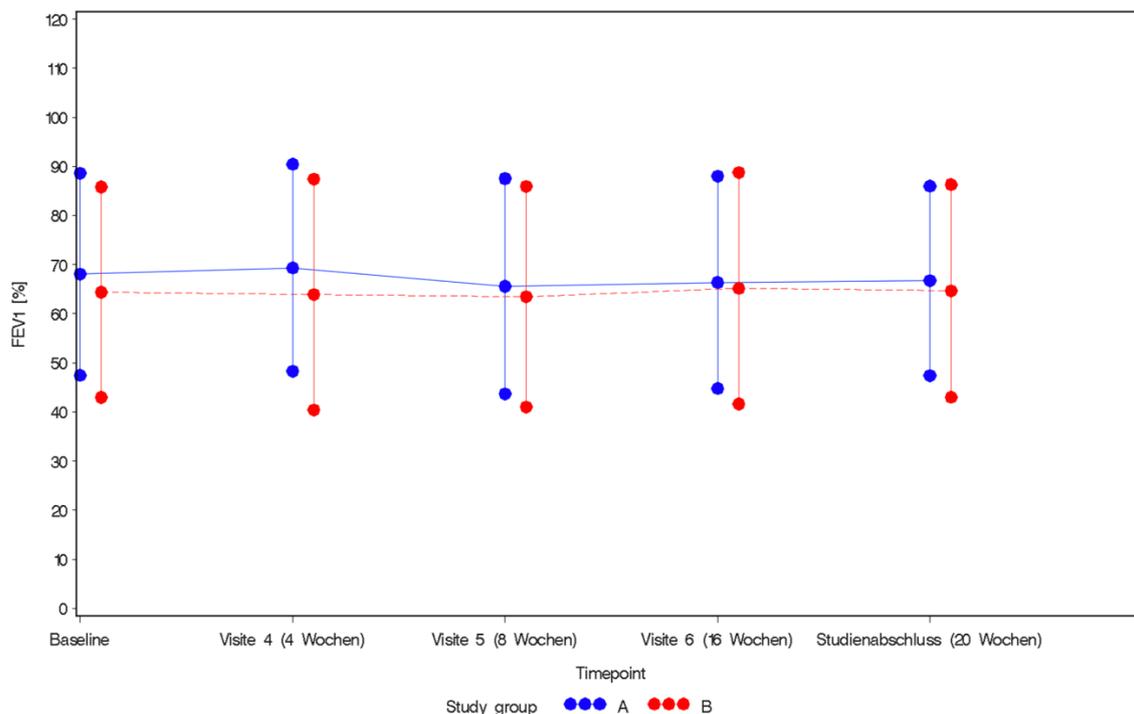


Abbildung 8: Verlauf FEV₁% der ITT-Gruppe

Mittelwerte mit den zugehörigen Standardabweichungen der FEV₁ % der ITT-Gruppe im Bezug zu den Zeitpunkten Baseline, Woche 4, 8, 16 und zum Studienabschluss.

A/blau: Amitriptylingruppe, *B/rot*: Placebogruppe, *FEV₁*: Forciertes expiratorisches Einsekundenvolumen, *ITT*: Intention to treat

3.3 Sekundäre Zielparameter

3.3.1 Weitere Lungenfunktionsparameter

Als sekundärer Zielparameter wurde die Aufrechterhaltung des FEV₁- Wertes bis zur Woche 8 (Visite 5) und Woche 16 (Visite 6) in der Verumgruppe gewählt. In Woche 8 und 16 zeigten sich tendenziell niedrigere Mittelwerte der FEV₁% als beim Ausgangswert innerhalb der Amitriptylingruppe. Die Placebogruppe wies relativ konstante Werte auf. Der absolute und relative FEV₁-Anstieg im Vergleich der Baseline zu Woche 4, 8 und 16 zeigte tendenzielle, aber keine signifikanten Differenzen.

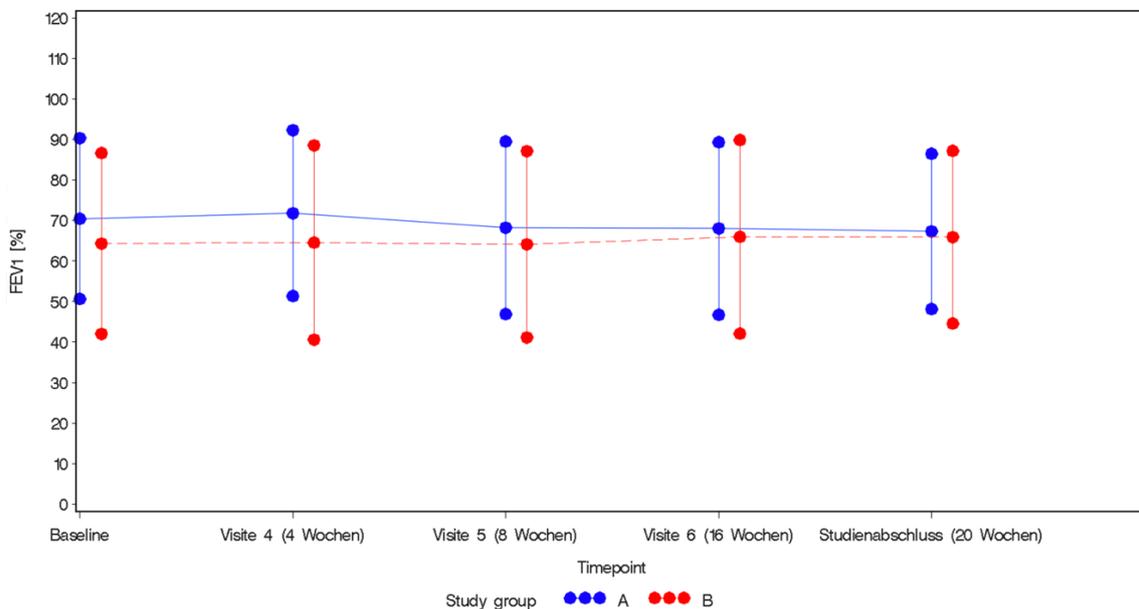


Abbildung 9: Verlauf FEV₁% der PP-Gruppe

Mittelwerte mit den zugehörigen Standardabweichungen von FEV₁% der PP-Gruppe im Bezug zu den Zeitpunkten Baseline, Woche 4, 8, 16 und dem Studienabschluss. *A/blau*: Amitriptylingruppe, *B/rot*: Placebogruppe, *FEV₁*: Forciertes expiratorisches Einsekundenvolumen, *PP*: Per protocol

Alle anderen erhobenen Lungenfunktionsparameter (FVC, MEF₂₅, MEF₂₅₋₇₅) ergaben nach Woche 4, 8 und 16 (Visite 4, 5 und 6) im Vergleich zur Baseline keine signifikanten Unterschiede. In der Analyse der absoluten und relativen FVC zeigte sich ein Absinken der Mittelwerte im Vergleich zur Baseline (vgl. Abb. 10).

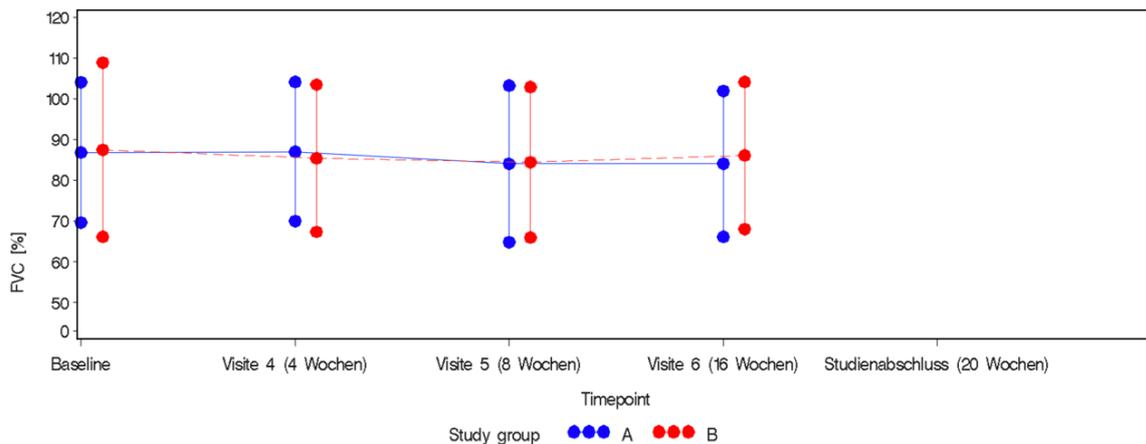


Abbildung 10: Verlauf der FVC % der PP-Gruppe

Mittelwerte und zugehörige Standardabweichungen der FVC % im Bezug zur Baseline, Woche 4, 8, 16 und zum Studienabschluss der PP-Analyse. Die Ergebnisse der ITT-Analyse entsprechen denen der PP-Analyse. *A/blau*: Amitriptylingruppe, *B/rot*: Placebogruppe, *FVC*: Forcierte Vitalkapazität, *PP*: Per protocol

Die erhobenen Werte der absoluten und relativen MEF 25-75 verliefen in beiden Studiengruppen weitgehend konstant zwischen Baseline und Woche 16 (Visite 5). Es ergaben sich leichte Variationen zwischen den einzelnen Ergebnissen. Die Werte der absoluten und relativen MEF 25-75 nahmen innerhalb beider Gruppen geringfügig, aber nicht signifikant ab (vgl. Abb. 11).

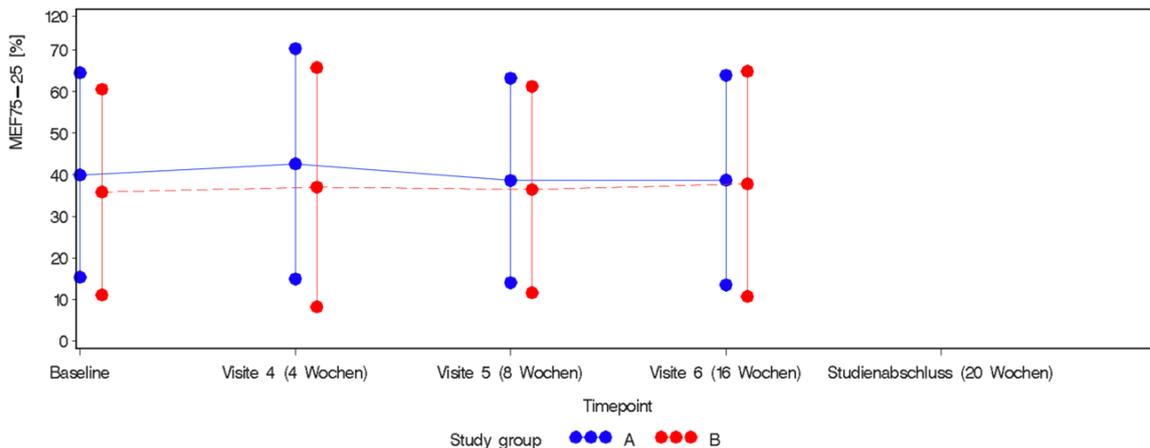


Abbildung 11: Verlauf der MEF 25-75 (%) der PP-Gruppe

Mittelwerte und zugehörige Standardabweichungen des MEF 25-75 in Prozent im Bezug zur Baseline, Woche 4, 8, 16 und zum Studienabschluss der PP-Analyse. Die Ergebnisse der ITT-Analyse entsprechen denen der PP-Analyse. *A*: Amitriptylingruppe, *B*: Placebogruppe, *MEF 25-75*: Mittlere Atemstromstärke, wenn noch 25/50/75% Vitalkapazität in der Lunge sind, *PP*: Per protocol

Die Messungen der LCI wurden nicht bei allen Patienten vorgenommen und zeigten keine signifikante Verbesserung in der Analyse. Über den gesamten Zeitraum verteilt waren über 20% der Daten der LCI nicht vorhanden.

3.3.2 Leukozytenkonzentration

Die Leukozytenzahl wurde zum Studienbeginn (Baseline) und nach Woche 4, 8 und 16 (Visite 4, 5 und 6) bestimmt. Es fehlten dabei mehr als 20% der Daten. In der Betrachtung der Leukozytenkonzentration der ITT-Analyse fällt in der Verumgruppe eine deutliche Zunahme in Visite 4 ($68,51 \pm 78,77 \text{ } 10^3/\mu\text{l}$) und Visite 5 ($83,12 \pm 137,78 \text{ } 10^3/\mu\text{l}$) verglichen zur Baseline ($6,91 \pm 10,76 \text{ } 10^3/\mu\text{l}$) auf. Dieser Höchstpunkt wird gefolgt von dem abnehmend Wert in Visite 6 ($57,73 \pm 75,86 \text{ } 10^3/\mu\text{l}$), welcher immer noch deutlich erhöht im Vergleich zur Baseline ist. In der Placebogruppe verlaufen die Werte von der Baseline an kontinuierlich zunehmend (Baseline $4,76 \pm 3,25 \text{ } 10^3/\mu\text{l}$, Visite 4 $19,21 \pm 24,70 \text{ } 10^3/\mu\text{l}$, Visite 5 $36,65 \pm 47,37 \text{ } 10^3/\mu\text{l}$, Visite 6 $52,35 \pm 63,13 \text{ } 10^3/\mu\text{l}$). In Betrachtung der maximalen Werte ergibt sich der Höchstwert der Verumgruppe mit $558,40 \text{ } 10^3/\mu\text{l}$ in Visite 5. Der Maximalwert der Placebogruppe hingegen liegt mit $227,60 \text{ } 10^3/\mu\text{l}$ in Visite 6. Die Werte der PP-Analyse entsprechen den Werten der ITT-Analyse (vgl. Tab. 7).

Tabelle 7: Resultate der Leukozytenkonzentration**Leukozytenkonzentration ($10^3/\mu\text{l}$) ***

Behandlungsgruppe		ITT		PP	
		<i>n</i>	<i>MW</i> ± <i>SD</i>	<i>n</i>	<i>MW</i> ± <i>SD</i>
Amitriptylin	<i>Baseline</i>	28	6,91±10,76	24	7,10±11,58
	<i>Visite 4</i>	24	68,51±78,77	21	62,60±73,83
	<i>Visite 5</i>	25	83,12±137,78	23	88,20±142,72
	<i>Visite 6</i>	19	53,73±75,86	17	58,17±79,18
Placebo	<i>Baseline</i>	33	4,76±3,25	30	4,87±3,26
	<i>Visite 4</i>	24	19,21±24,70	23	17,13±23,01
	<i>Visite 5</i>	30	36,65±47,37	28	38,96±48,24
	<i>Visite 6</i>	23	52,35±63,13	21	54,73±65,18

Leukozytenkonzentration in $10^3/\mu\text{l}$ im Sputum zu den Zeitpunkten Baseline und Visite 4, 5 und 6 (entsprechen Woche 4,8 und 16) der ITT-Analyse und PP-Analyse. Die Werte sind als arithmetische Mittelwerte (MV) ± Standardabweichung (SD) dargestellt. Es bestehen keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen der Amitriptylin- und Placebogruppe. *ITT*: Intention to treat, *PP*: Per protocol, *n*: Patientenzahl

3.3.3 *P. aeruginosa*-Quantifizierung

Die chronische bakterielle Kolonisation (CFU) im Sputum, angegeben in CFU/ml, wurde nach Woche 4, 8 und 16 (Visite 4,5 und 6) mit den Werten der Baseline verglichen. Mehr als 20% der Daten sind nicht vorhanden. Anhand der erhobenen Werte lässt sich in der Verumgruppe im Bezug zur Baseline ($3,17 \pm 1,82$ CFU/ml) eine Abnahme der Werte feststellen (Visite 4 $2,93 \pm 2,02$ CFU/ml, Visite 5 $3,02 \pm 1,59$ CFU/ml, Visite 6 $2,45$ CFU/ml). Auch die Placebogruppe verzeichnet abnehmende Werte im Vergleich der Baseline ($4,15$ CFU/ml) mit den jeweiligen Visiten (Visite 4 $2,15$ CFU/ml, Visite 5 $3,39 \pm 1,73$ CFU/ml, Visite 6 $3,91 \pm 2,55$ CFU/ml). Somit kann im Studienarm Verumgruppe eine nicht signifikante Abnahme der CFU verzeichnet werden. Im Studienarm Placebogruppe zeigt sich zunächst eine nicht signifikante Abnahme der CFU mit Zunahme der CFU bis zum Ausgangswert bei Visite 6 (Baseline $3,78 \pm 2,42$ CFU/ml, Visite 4 $1,96 \pm 0,50$ CFU/ml, Visite 5 $3,39 \pm 2,61$ CFU/ml, Visite 6 $3,91 \pm 2,55$ CFU/ml).

Betrachtet man die maximalen Werte der CFU der Verumgruppe, so entsprechen die Werte der Visiten 4,5 und 6 (mit $6,56$ CFU/ml, $6,60$ CFU/ml und $6,67$ CFU/ml) nahezu

den Ausgangsbedingungen (Baseline 6,70 CFU/ml). In der Placebogruppe ergaben sich mit 8,80 CFU/ml höhere maximal erreichte Werte zum Zeitpunkt der Baseline als in der Verumgruppe. Die Maximalwerte dieser Gruppe waren in Visite 4 und 5 (mit 2,33 und 7,70 CFU/ml) geringer als die Baseline, der Wert der Visite 6 war jedoch um 0,10 CFU/ml höher als die Baseline (Visite 6: 8,90 CFU/ml) (vgl. Tab. 8).

Tabelle 8: Resultate der *P.aeruginosa*-Kolonien (CFU/ml) kumulativ

Behandlungsgruppe		PSA (CFU/ml) *			
		ITT		PP	
		<i>n</i>	<i>MW</i> ± <i>SD</i>	<i>n</i>	<i>MW</i> ± <i>SD</i>
Amitriptylin	<i>Baseline</i>	11	3,17±1,82	9	3,17±1,98
	<i>Visite 4</i>	8	2,93±2,02	6	3,09±2,30
	<i>Visite 5</i>	14	3,04±1,59	13	3,02±1,65
	<i>Visite 6</i>	9	2,45±1,73	9	2,45±1,73
Placebo	<i>Baseline</i>	9	3,78±2,42	7	4,15±2,65
	<i>Visite 4</i>	6	1,96±0,50	5	2,15±0,21
	<i>Visite 5</i>	6	3,39±2,61	6	3,39±2,61
	<i>Visite 6</i>	8	3,91±2,55	7	4,15±2,5

Chronische bakteriellen Kolonisation (CFU) (kumulativ) im Sputum zum Zeitpunkt der Baseline und bei Visite 4,5 und 6 (entsprechen Woche 4,8 und 16) der ITT- und PP-Analyse. Die Werte sind als arithmetische Mittelwerte (MV) ± Standardabweichung (SD) dargestellt. Es bestehen keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen der Amitriptylin- und Placebogruppe. *ITT*: Intention to treat, *PP*: Per protocol, *n*: Patientenzahl

3.3.4 Pulmonale Exazerbationen

Die Patientenzahl mit mindestens einer pulmonalen Exazerbation nach 8 Wochen (Visite 5) und 16 Wochen (Visite 6) verglichen zur Anzahl der Exazerbationen zur Baseline, war in der Verumgruppe im Vergleich zur Placebogruppe in der ITT-Analyse auf das doppelte erhöht (zehn Patienten mit mindestens einer Exazerbation in der Amitriptylingruppe und fünf Patienten in der Placebogruppe nach Woche 8 und 16). In der PP-Analyse traten bei zwei Patienten mehr in der Verumgruppe im Vergleich zur Placebogruppe

Exazerbationen auf. Bei sechs Patienten trat mindestens eine Exazerbation in der Amitriptylingruppe und bei vier Patienten in der Placebogruppe auf. Insgesamt kam es zu einem seltenen Auftreten von pulmonalen Exazerbationen.

Tabelle 9 Anzahl der Patienten mit mindestens einer pulmonalen Exazerbation

Behandlungsgruppe		Anzahl der Exazerbationen*			
		ITT		PP	
		<i>n</i>	<i>nE</i>	<i>n</i>	<i>nE</i>
Amitriptylin	<i>Baseline</i>	42	-	36	-
	<i>Visite 5</i>	37	5	33	3
	<i>Visite 6</i>	37	5	33	3
Placebo	<i>Baseline</i>	36	1	33	1
	<i>Visite 5</i>	33	4	31	3
	<i>Visite 6</i>	36	1	33	1

Pulmonale Exazerbationen (mit Antibiose behandelte pulmonale Infektionen) zum Zeitpunkt der Baseline, Visite 5 und 6 (entsprechen Woche 8 und 16) der ITT- und PP-Analyse. *ITT*: Intention to treat, *PP*: Per protocol, *n*: Patientenzahl, *nE*: Anzahl der Patienten mit mindestens einer Exazerbation.

3.3.5 Körpergewicht

Die Erfassung des Körpergewichts erfolgte im Rahmen der regelmäßigen Kontrollen. Die Baseline des Körpergewichts zwischen der Amitriptylin- und Placebogruppe war anhand der Mittelwerte mit Standardabweichung vergleichbar (Baseline Amitriptylingruppe: $60,26 \pm 13,60$ kg; Baseline Placebogruppe: Baseline $61,35 \pm 9,74$ kg). Es wurden allerdings größere Unterschiede von 7 kg des minimalen und maximalen Körpergewichts der Baseline verzeichnet (Minimum Amitriptylingruppe: Baseline 43 kg; Minimum Placebogruppe: Baseline 36 kg). Das Körpergewicht verzeichnete eine Zunahme in der Amitriptylingruppe von 0,93 kg zwischen Baseline und Visite 6 (Baseline $60,26 \pm 13,60$ kg, Visite 5 $60,97 \pm 15,38$ kg, Visite 6 $61,19 \pm 14,30$ kg). In der Placebogruppe konnte eine Gewichtsabnahme von 0,7 kg zwischen Baseline und Visite 6 beobachtet werden (Baseline $61,35 \pm 9,74$ kg, Visite 5 $59,97 \pm 9,67$ kg, Visite 6 $60,65 \pm 9,75$ kg) (vgl. Tab

Tabelle 10: Körpergewicht

		Gewicht (kg)				
		<i>n</i>	<i>MW±SD</i>	<i>SD</i>	<i>Min</i>	<i>Max</i>
Amitriptylin	<i>Baseline</i>	42	60,26±13,60	13,60	43,00	113,00
	<i>Visite 5</i>	38	60,97±15,38	15,38	43,00	114,00
	<i>Visite 6</i>	37	61,19±14,30	14,30	45,00	114,00
Placebo	<i>Baseline</i>	37	61,35±9,74	9,74	36,00	87,00
	<i>Visite 5</i>	36	59,97±9,67	9,67	35,00	88,00
	<i>Visite 6</i>	34	60,65±9,75	9,75	34,00	87,00

Auflistung der Ergebnisse des Körpergewichts= Gewicht (kg) zum Zeitpunkt der Baseline und bei Visite 5 und 6 (entspreche Woche 8 und 16). Die Werte sind als arithmetische Mittelwerte (MV) ± Standardabweichung (SD) dargestellt. *n*: Patientenzahl, *Min*: Minimalwert, *Max*: Maximalwert

3.3.6 Quality of Life

Zur Abschätzung der Lebensqualität der Studienteilnehmenden wurde der „Quality of Life“- Fragebogen (CFQ-R-Fragebogen zu LQ bei CF für Patienten ab 14 Jahre, Autoren: Quittner, Modi, Watrous, Messer 2000 CFQ-R Teen/Adult, German Version) adaptiert an Cystische Fibrose-Erkrankte erhoben. Es konnten in beiden Studiengruppen nach 8 Wochen (Visite 5) und 16 Wochen (Visite 6) im Vergleich zur Baseline keine signifikanten Veränderungen festgestellt werden. Allerdings zeigte sich in der Verumgruppe in der Selbsteinschätzung gemäß dem CFQ-R Fragebogen eine Abnahme der Angabe „sehr gut“ (Baseline 22,22% „sehr gut“, Visite 5 8,82 % „sehr gut“, Visite 6 17,65% „sehr gut“). Im Vergleich kam es in der Selbsteinschätzung der Lebensqualität in der Placebogruppe zu einer Zunahme der Angabe „sehr gut“ (Baseline 11,76% „sehr gut“, Visite 5 23,53% „sehr gut“, Visite 6 15,63% „sehr gut“ (vgl. Tab. 12). Die Ergebnisse der ITT-Analyse entsprechen annähernd denen der PP-Analyse (Ergebnisse der ITT-Analyse sind nicht dargestellt).

Tabelle 11: Selbsteinschätzung der Lebensqualität

		Selbsteinschätzung Lebensqualität							
		<i>Sehr gut</i>		<i>Eher gut</i>		<i>Eher schlecht</i>		<i>Sehr schlecht</i>	
		<i>n</i>	<i>%</i>	<i>n</i>	<i>%</i>	<i>n</i>	<i>%</i>	<i>n</i>	<i>%</i>
Amitriptylin	<i>Baseline</i>	8	22,22	22	61,11	6	16,67	-	-
	<i>Visite 5</i>	3	8,82	23	67,65	7	20,59	1	2,94
	<i>Visite 6</i>	6	17,65	24	70,59	4	11,76	-	-
Placebo	<i>Baseline</i>	4	11,76	22	64,71	7	20,59	1	2,94
	<i>Visite 5</i>	8	23,53	13	38,24	12	35,29	1	2,94
	<i>Visite 6</i>	5	15,63	19	59,38	6	18,75	2	6,25

Selbsteinschätzung anhand des CFQ-R-Fragebogens zu den Zeitpunkten Baseline, Visite 5 und 6 der PP-Analyse. *n*: Patientenanzahl

3.3.7 Nebenwirkungen

Insgesamt zeigte sich die Anzahl an Nebenwirkungen innerhalb der Verumgruppe mit 165 dokumentierten Ereignissen deutlich höher als die der Placebogruppe mit 102 dokumentierten Ereignissen. In der Amitriptylingruppe wurde bei 33 von 42 Patienten (79%) das Auftreten von einer oder mehr der bekannten Nebenwirkungen berichtet, während in der Placebogruppe bei 13 von 39 Patienten (33%) das Auftreten von Nebenwirkungen berichtet wurde. In der Placebogruppe wurden 19 Nebenwirkungen als bekannte medikamentöse Nebenwirkungen deklariert. In der Verumgruppe wurden 68 medikamentöse Nebenwirkungen beobachtet. Es kam zum Auftreten einer schweren Nebenwirkung, welche wieder vollständig abklang, im Zusammenhang mit der Medikamenteneinnahme. Die häufigsten dokumentierten Nebenwirkungen der Verumgruppe waren Müdigkeit (42%) und Xerostomie (44,9%). Viermalig (5,8%) trat in der Verumgruppe das Ereignis einer Herzrhythmusstörung auf. In der Placebogruppe kam es am häufigsten zum Auftreten von Müdigkeit (63,2%), gefolgt von dem Auftreten der Xerostomie (26,3%) und Obstipation (10,5%). Herzrhythmusstörungen traten in der Placebogruppe nicht auf. Andere Nebenwirkungen, wie exemplarisch Schwindel, Hypotonie, Tremor, Dyskinesien und das Glaukom traten nicht auf. Eine Diskontinuität der Medikamenteneinnahme aufgrund von Ne-

benwirkungen erfolgte häufiger in der Verum- als in der Placebogruppe (dreimalig innerhalb der Verumgruppe und einmalig innerhalb der Placebogruppe in der PP-Analyse und sechsmal innerhalb der Verumgruppe und einmalig innerhalb der Placebogruppe in der ITT-Analyse). Es wurden keine unerwarteten schwerwiegenden Nebenwirkungen beobachtet.

Tabelle 12: Nebenwirkungsprofil der Patienten

	Art der Nebenwirkung (Anzahl und Prozent)			
	Xerostomie	Müdigkeit	HRST	Obstipation
Amitriptylin	31 (44,9%)	29 (42%)	4 (5,8%)	5 (7,2%)
Placebo	3 (26,3%)	12 (63,2%)	-	2 (10,5%)

Auftreten von Nebenwirkungen, Anzahl der Häufigkeit des Auftretens und angegeben in Prozentwerte anteilig. HRST: Herzrhythmusstörungen

Tabelle 13: Diskontinuität der Medikamenteneinnahme

	Diskontinuität der Therapie aufgrund von Nebenwirkungen			
	ITT		PP	
	<i>n</i>	<i>nD</i>	<i>n</i>	<i>nD</i>
Amitriptylin	33	6	33	3
Placebo	13	1	13	1

Auftreten von Diskontinuität der Medikamenteneinnahme im Zusammenhang mit aufgetretenen Nebenwirkungen der ITT- und PP-Analyse. *ITT*: Intention to treat, *PP*: Per Protocol, *n* = Patientenzahl. *nD*= Anzahl der Patienten, welche die Medikamenteneinnahme beendeten

4 Diskussion

In der vorliegenden klinischen Studie überprüften wir die Wirksamkeit von Amitriptylin bei CF und ob Amitriptylin als neues antiinflammatorisches lungenfunktionsverbesserndes Medikament bei CF eingesetzt werden kann. Die vorherigen Studien ergaben eine Verbesserung der Lungenfunktionsparameter, Abnahme der mikrobiellen Kolonisation, Abnahme der Ceramidkonzentration und eine Zunahme des Gewichts (Teichgraber et al., 2008, Becker et al., 2010d, Riethmuller et al., 2009, Nahrlich et al., 2013, Adams et al., 2016). Entsprechend der Vorstudien gingen wir davon aus, dass Ceramidakkumulation zu einem unkontrollierten Zelltod führt und dadurch der Inhalt der Zellen (DNA, Proteasen, Oxidantien) freigesetzt wird. Diese freigesetzte Zell-DNA erhöht die mukosale Viskosität und führt konsekutiv zu einer Verminderung der mukoziliären Clearance. Gleichzeitig spalten vermehrt *P. aeruginosa* Proteasen Rezeptoren, welche für die Elimination der Bakterien wichtig sind und so die Persistenz von *P.aeruginosa* dessen Persistenz unterstützen (Hartl et al., 2007). Aufgrund der deutlichen Lungenfunktionsbesserung in den klinischen Vorstudien nahmen wir an, dass diese Verbesserung auf der Normalisierung der Ceramidkonzentration in pulmonalen Epithelzellen basiert und ein deutlicher Vorteil der Verumgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe wurde angenommen (Teichgraber et al., 2008, Adams et al., 2016, Nahrlich et al., 2013). Die Sicherstellung eines dauerhaften, nebenwirkungsarmen Therapiekonzepts ist essenziell, um Progress der CF-Erkrankung zu verhindern und stellt für alle Beteiligten eine Herausforderung dar.

4.1 Patientencharakteristika

Anhand der Patientendaten und der im Methodikteil beschriebenen In-und Exklusionskriterien wurden insgesamt 86 Patienten für die Studie gescreent. 79 Patienten wurden, anstatt 102 geplanten Patienten, in unsere Studie eingeschlossen. Die geplante Patientenzahl geht auf die Powerberechnung basierend auf den Ergebnissen der Phase-IIb-Studie zurück (Nahrlich et al., 2013). Über den Rekrutierungs- und Screeningprozess sind wenig Daten vorhanden, sodass nicht eindeutig beantwortet werden kann, warum weniger Patienten als geplant rekrutiert wurden und weshalb deutlich weniger Patienten im Vergleich zur Phase-IIb-Studie im Rahmen des Screenings ausgeschlossen wurden (Nahrlich et al., 2013). Ein Grund für den verminderten Ausschluss im Rahmen des Screeningprozesses, könnte die Anpassung des Einschlusskriteriums der FEV₁-Werte sein. In der Phase IIb-

Studie sollte der FEV₁- Wert zwischen 30 und 90% liegen und wurde in der vorliegenden Phase III-Studie auf 25 bis 100% angepasst. Daraus ergibt sich eine größere Varianz der Lungenfunktion. Riethmüller et al. nahmen an, dass vor allem Patienten mit milder oder mittelschwerer Lungenbeteiligung von der Amitriptylin-Therapie profitieren (Riethmüller et al., 2009). Nicht im Einklang mit dieser Annahme schloss die vorliegende Studie neben Patienten mit schwererer Lungenbeteiligung aber auch Patienten mit einem besseren pulmonalen Verlauf ein. Insgesamt wies das Patientenkollektiv der vorliegenden Studie dennoch vergleichbare Ausgangsbedingungen zum Patientenkollektiv der Phase-IIb-Studie auf (Adams et al., 2016, Nahrlich et al., 2013). Unsere Ergebnisse sind daher auch vergleichbar mit Resultaten für ähnliche Kohorten. Zudem sind gemessenen und berichteten Schwankungen des klinischen Bildes am ehesten auf die interindividuelle Heterogenität des klinischen Phänotyps zurückzuführen (Weiler and Drumm, 2013, Ratjen et al., 2015). Letztlich kam es zu einem vorzeitigen Studienstopp, da eine deutlich zu langsame Rekrutierung erfolgte, wodurch sich die Gesamtdauer der Studie deutlich verlängerte. Diese Verlängerung wurde als unethisch eingeschätzt, da Patienten dadurch entsprechend lange auf Resultate warten müssen. Von größerem Einfluss sind vermutlich zu viele konkurrierende Studien mit beispielweise hochwirksamen CFTR-Modulatoren. Auch wenn weitere Zentren im Verlauf der Studie aktiviert wurden, konnte die Rekrutierungsaktivität nicht verbessert werden. Der Versuch weitere Zentren zu akquirieren war nicht erfolgreich. Dadurch konnte die geplante Patientenzahl gemäß Powerberechnung nicht erreicht werden.

4.2 Primärer Zielparame-ter: FEV₁-Differenz und Lungenfunktionsparameter

Angepasst an die Ergebnisse der Vorstudien, lag das primäre Ziel in der Ermittlung der absoluten FEV₁-Abweichung zwischen Amitriptylin versus Placebo nach acht Wochen (Adams et al., 2016, Nahrlich et al., 2013). Dabei wurde kein signifikanter Unterschied der Lungenfunktion zwischen der Amitriptylin- und Placebogruppe beobachtet. Die Ergebnisse der Phase-III-Studie ergaben eine Differenz von 0,9% zum Nachteil der Verumgruppe. Dementsprechend wiesen weitere Lungenfunktionsparametern (FEV₁, MEF 25, MEF25-75, LCI), weder signifikante Verbesserungen noch positive Tendenzen auf. Im Vergleich wurde in der vorherigen Studie-IIb beobachtet, dass eine vierwöchige Behandlung mit Amitriptylin eine signifikant positive Veränderung der Lungenfunktion (FEV₁)

erreicht (Nahrlich et al., 2013). Die Anwendungsbeobachtungs-Studie wies ebenso einer signifikante Verbesserung der Lungenfunktion nach (Adams et al., 2016). Ursächlich für Abnahme der Lungenfunktion innerhalb der Verumgruppe der vorliegenden Studie, könnten unentdeckte schlechtere klinische Ausgangslagen, unentdeckte virale pulmonale Infektionen oder die bekannte interindividuelle Heterogenität des Phänotyps (Weiler and Drumm, 2013) sein. Zu berücksichtigen ist hier die Bewertung des verwendeten Messverfahrens der Lungenfunktionsdiagnostik, welche standardisiert ist (Knudson et al., 1983, Stanojevic and Ratjen, 2016). Besonders die LCI wurde in Studien als eine sensitivere reproduzierbare Methode bewertet, um die Funktion der peripheren Atemwege, die *Pseudomonas*-Kolonisation und das Therapieansprechen zu beurteilen (Fretzayas et al., 2019, Stanojevic et al., 2017, Kasi et al., 2019). Die Ergebnisse der FEV₁-Werte unserer Studie waren mit denen der LCI vergleichbar, was die Wahl des primären Endpunkts bestätigt und mit Ergebnissen andere Studien vergleichbar macht (Grosse-Onnebrink et al., 2013, Neill et al., 2011). Da die Lungenfunktion beider Studiengruppen vergleichbar war, ist zwar der erwartete positive Effekt Amitriptylins ausgeblieben, jedoch ist auch von keinem nachteiligen Effekt Amitriptylins auszugehen. Eine zu starke Antiinflammation, welche die Erregerabwehr beeinträchtigen könnte, ist demnach unwahrscheinlich. Die Therapie wurde ausschließlich an Patienten (Jugendliche und jungen Erwachsene) durchgeführt, welche freiwillig teilnahmen. Dadurch ist es möglich, dass durch fortgeschrittene Erkrankung bei diesen Patienten die positiven Effekte der Behandlung nicht ausreichend sind, um klinisch messbare Ergebnisse zu zeigen. Insofern bleibt fraglich inwiefern die ausbleibende Verbesserung der Lungenfunktion, als Misserfolg der Studie gewertet werden kann. Anhand der Ergebnisse der Lungenfunktion ist jedoch aktuell von keiner relevanten klinischen Wirksamkeit auszugehen.

4.3 Sekundäre Zielparameter

In der Phase-IIb-Studie wurde eine Abnahme der Ceramidkonzentration beobachtet. Diese trat allerdings in beiden Studienarmen auf, sodass eine eingeschränkte Aussagekraft bestand. Durch ein größeres Patientenkollektiv und die Bestimmung anhand nasaler Epithelzellen sollte bestätigt werden, dass die Normalisierung der pulmonalen Ceramidkonzentrationen durch die Behandlung mit Amitriptylin erreicht wird und konsekutiv die

Lungenfunktionsverbesserung folgt (Teichgraber et al., 2008, Nahrlich et al., 2013). Anhand einiger unabhängigen Studien ließ sich diese Annahme bereits bestätigen (Brodie et al., 2010, Bodas et al., 2011a, Bodas et al., 2011b, Riethmuller et al., 2009, Ulrich et al., 2010, Pewzner-Jung et al., 2014, Becker et al., 2010b, Teichgraber et al., 2008, Valdivieso et al., 2016, Hao et al., 2015). Auf Basis dieser Annahmen ist folgender Rückschluss möglich: bei der ausgebliebenen Verbesserung der Lungenfunktion, erfolgte vermutlich keine ausreichende Ceramidreduktion oder wenn doch keine klinisch messbare Wirksamkeit bestand. Eine erhöhte Anfälligkeit für bakterielle Infektionen, welche durch zu starken Funktionsverlust der ASM ausgelöst werden kann, ist unwahrscheinlich, da es nur zu einer geringfügigen Abnahme der *P. aeruginosa*-Kolonien kam (Adams et al., 2016, Teichgraber et al., 2008, Grassmé et al., 2003). Aufgrund nicht vorliegender Ergebnisse bleibt fraglich, ob Amitriptylin die Ceramidkonzentration in Epithelzellen der Bronchien reduzierte.

Um zusätzliche Aussagen über die lokale Immunreaktion in CF-Lungen zu gewinnen und das Hypothesenkonzept der vorliegenden Studie zu beweisen, erfolgte die Messung der Leukozytenkonzentration im Sputum. Die ergänzende Bestimmung der Zytokine erfolgte erst nach Abschluss der Studie und wurde deshalb bei der Auswertung der vorliegenden Arbeit nicht berücksichtigt. Eine bronchiale Anreicherung der Leukozyten und proinflammatorischer Zytokine, sowie deren Reduktion durch die Hemmung der Ceramidsynthese mittels Amitriptylin wurde in vorherigen Studien beobachtet (Teichgraber et al., 2008, Becker et al., 2010c). Die Ergebnisse der Phase-IIb-Studie demonstrierten bereits keine signifikante Abnahme der proinflammatorischen Zytokine: IL-1 β , IL-8 und IL-10 (Nahrlich et al., 2013). Die vorliegende Studie sollte diese Beobachtung anhand eines größeren Kollektivs überprüfen. Da sich keine Verbesserung der Lungenfunktion nachweisen ließ, kann lediglich vermutet werden, dass kein klinisch-sichtbarer oder messbarer Einfluss derer auf die CF-Lungenerkrankung bestanden hat.

Entgegen unserer Annahme verzeichneten wir in der vorliegenden Studie eine Steigerung der Leukozytenkonzentration im Sputum in der Verum- und der Placebogruppe. In der Verumgruppe kam es im Verlauf zu einer Abnahme der Leukozytenkonzentration, welche im Vergleich zur Baseline jedoch weiterhin deutlich erhöht war. Die Ausgangswerte der Leukozytenkonzentrationen beider Studiengruppen waren vergleichbar. In der Phase-

IIB-Studie zeigte sich eine deutliche Differenz der Leukozytenzahl zum Vorteil der Verumgruppe. Allerdings ist zu beachten, dass die Granulozytenzahl in der Phase-IIB-Studie bereits vor der ersten Medikationsgabe stark differierte, außerdem unvollständige Datensätze und eine breite Streuung der Messwerte bestanden, sodass die Ergebnisse als eingeschränkt aussagekräftig gewertet wurden (Nahrlich et al., 2013). Auch in der vorliegenden Studie verzeichneten wir eine starke Streuung der Messwerte. Schwankungen können durch die Immunreaktion und deren Beeinflussung durch intrinsische und extrinsische Einflussfaktoren (Giacalone et al., 2020) bedingt sein. Die Zunahme der Leukozyten innerhalb beider Studiengruppen deuten darauf hin, dass Amitriptylin die Inflammation in CF-Lungen nicht normalisierte. Interessanterweise zeigte sich eine Abnahme der *P. aeruginosa*-Kolonien in der Verumgruppe bei gleichzeitig bestehenden hohen Leukozytenkonzentrationen. Da keine klinische Signifikanz bestand und vorwiegend nachgewiesen wurde, dass trotz erhöhter Leukozyten-Konzentrationen diese nicht mehr in der Lage sind, bakterielle Infektionen zu bekämpfen, ist diese Beobachtung am ehesten auf natürliche Schwankungen zurückzuführen (Stoltz et al., 2015, Cabrini et al., 2020, Laval et al., 2016, Hayes et al., 2011).

P. aeruginosa ist, als bekanntes pathogenes Bakterium in CF-Lungen, durch seine Fähigkeiten immunologische Reaktionen zu aktivieren besonders gefährlich (Malhotra et al., 2019). In der vorliegenden Arbeit zeigte sich ein Abwärtstrend bei der pulmonalen Besiedlung mit *P. aeruginosa* in der Amitriptylingruppe. In der Placebogruppe konnten wir anfänglich ebenso eine Abnahme verzeichnen, jedoch kam es im Verlauf zu einer Zunahme der *P. aeruginosa*-Kolonien bis auf die des Ausgangswertes. Ein Zusammenhang mit der beschriebenen Wirksamkeit Amitriptylins bezüglich der pulmonalen Besiedlung mit *P. aeruginosa* ist anhand der vorliegenden Ergebnisse nur eingeschränkt beurteilbar (Becker et al., 2010c). Gegen eine ausreichende Wirksamkeit Amitriptylins sprechen die Ergebnisse der Lungenfunktion, sowie die initiale Abnahme der *P. aeruginosa*-Kolonien in beiden Studiengruppen. Ein Zusammenhang des verminderten Zelltods, verminderter DNA-Freisetzung und dadurch verminderter Anheftung von *P. aeruginosa*, wurde bereits von Teichgräber et al. demonstriert (Teichgräber et al., 2008). Sollte ein verminderter Zelltod zur verminderten DNA-Freisetzung geführt haben, kann ein Zusammenhang zur

zeitweisen Reduktion der Kolonien vermutet werden. Die Messung der DNA-Konzentration erfolgte nicht, sodass keine richtungsweisenden Ergebnisse vorhanden sind. Letztlich sind Rückschlüsse über mögliche Ursachen anhand der vorliegenden Daten nicht ausreichend möglich. Die nicht-signifikante Reduktion der *P. aeruginosa*-Kolonien lässt lediglich darauf schließen, dass die Amitriptylin-Behandlung den Zelltod der bronchialen Epithelzellen nicht oder nicht ausreichend reduzierte, was zu einer größeren DNA-Anreicherung im Respirationstrakt führte und daher die Anheftung und Vermehrung des Bakteriums *P. aeruginosa* unterstützte.

Einer der wichtigsten Faktoren im Verlauf der CF-Erkrankung ist das Auftreten pulmonaler Exazerbationen. Während Exazerbationen konnte in Studien *P. aeruginosa* in hohen Konzentrationen nachgewiesen werden (Regelmann et al., 1990, Smith et al., 1988, Ramsey et al., 1999). Die Anzahl der Exazerbationen war in der Verumgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe geringfügig erhöht und kam insgesamt selten vor. Zusätzliche Sputumproben könnten Hinweise geben, ob im Rahmen dieser Exazerbationen womöglich erhöhte Konzentrationen des Keims *P. aeruginosa* bestanden haben. Zu berücksichtigen sind bei der Bewertung der Ergebnisse, dass akute virale Infektionen als häufige Auslöser für pulmonalen Exazerbationen gelten (Hiatt et al., 1999, Goss, 2019). Da Exazerbationen mit einer schlechteren Lebensqualität und Lebenserwartung assoziiert sind (Stanojevic and Ratjen, 2016), kann dies auf einen Nachteil der Behandlung mit Amitriptylin hinweisen. Dagegen spricht wiederum der nicht signifikante Unterschied der Endpunkte beider Studiengruppen, sowie der annähernd vergleichbare Verlauf der Lungenfunktion beider Studiengruppen. Abschließend bleibt unbeantwortet, ob die Exazerbationen im Zusammenhang mit einer ausbleibenden oder unzureichenden Wirksamkeit, akuten viralen Infektionen oder klinisch unentdeckten Ausgangsbedingungen stehen. Bei ausbleibender Verbesserung der Lungenfunktion und Reduktion der Inflamationsparameter hat zumindest keine Wirkung Amitriptylins in dem Ausmaß stattgefunden, als dass diese das Auftreten pulmonaler Exazerbationen vermindern konnte.

Interessanterweise demonstrieren die Ergebnisse eine, allerdings nicht signifikante, Gewichtszunahme der Amitriptylingruppe und einer Gewichtsabnahme innerhalb der Placebogruppe. Ermittelt wurde dieser sekundäre Zielparameter, da es in der Phase-IIb- und

der Anwendungsbeobachtungs-Studie zu einer signifikanten Gewichtszunahme unter Amitriptylintherapie kam (Nahrlich et al., 2013, Adams et al., 2016). Bei natürlichen Schwankungen des Körpergewichts (Orsama et al., 2014), ist die beobachtete Gewichtszunahme so gering, dass sie auf diese zurückzuführen sein könnte. Auch der Einfluss der chronischen Malnutrition und vermehrter Kalorienbedarf bei schlechter Lungenfunktion, wie in Studien gezeigt wurde (Zemel et al., 2000, Corey et al., 1988), könnte den möglichen Einfluss Amitriptylins überwiegen. Die vermutete Verbesserung der Lungenfunktion mit resultierender Abnahme des Kalorienverbrauchs ist nicht eingetreten. Daraus kann gefolgert werden, dass der erwartete sekundäre Therapieeffekt ausblieb. Somit lässt sich die Frage, inwiefern die Gewichtszunahme der Vorstudien auf diesen zurückzuführen war, auch durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, nicht beantworten. Gemäß den Ergebnissen der Anwendungsbeobachtungs-Studie ergab die Analyse die Annahme, dass womöglich eine Wirkung auf intestinale Epithelzellen Amitriptylins besteht (Adams et al., 2016). Ein Einfluss Amitriptylins auf gastrointestinale Inflammation wurde in Studien bereits vermutet und könnte dadurch einen positiven Effekt auf das Gewicht haben (Kurek et al., 2013, Duan and Nilsson, 2009). Genaue Wirkmechanismen sind dabei bislang noch nicht ausreichend erforscht. Weitere Studien werden hierfür benötigt. Da die verabreichte Dosis (zweimal 25 mg pro Tag) unterhalb der üblichen Dosis (150 bis 300 mg pro Tag) lag, ist eine Gewichtszunahme als Nebenwirkung unwahrscheinlich. Bekräftigt wird dies dadurch, dass keine Appetitzunahme, als eine bekannte Nebenwirkung Amitriptylins, berichtet wurde. Schlussendlich bleibt die Frage offen, ob die Zunahme des Gewichts auf die Nebenwirkungen Amitriptylins auf natürlichen Gewichtsschwankungen, Ausbleiben des erwarteten sekundären Therapieerfolgs, oder die bislang noch unzureichend erforschte Wirkung Amitriptylins auf intestinale Epithelzellen, zurückzuführen ist.

Es konnte keine signifikante Auswirkung auf die Lebensqualität nachvollzogen werden. Zu beobachten war in der vorliegenden Studie allerdings eine Abnahme der Angabe „sehr gut“ bei der Einschätzung des Gesundheitszustandes in der Verumgruppe. Im Vergleich dazu nahm die Angabe in der Placebogruppe zu. So kam es zu einer geringfügigen Abnahme des Allgemeinbefindens unter der Amitriptylintherapie. Dabei gilt zu beachten,

dass CF-Patienten generell ein erhöhtes Risiko haben, an Depression und Angststörungen zu erkranken (Quittner et al., 2014). Auch die erhöhte Anzahl von Exazerbationen in der Verumgruppe im Vergleich zur Placebogruppe, kann zur Verschlechterung des Wohlbefindens geführt haben, da pulmonale Exazerbationen mit einer Einschränkung der Lebensqualität verbunden sind (Goss et al., 2002, Goss et al., 2003, Goss, 2019). Außerdem führt Xerostomie, als bekannte Nebenwirkung Amitriptylins, zur zusätzlichen Einschränkung der Lebensqualität (Millsop et al., 2017). Ebenso korrelierte die Wahrnehmung des Wohlbefindens der Patienten in einer Studie mit schwerer Müdigkeit, sogar mehr als mit klinisch gemessenen Parametern (z. B. FEV₁) (Nap-van der Vlist et al., 2018). Schlussendlich ist ein Zusammenhang mit der ausbleibenden klinischen Wirksamkeit Amitriptylins, des damit verbundenen Progresses der Erkrankung mit der Einschränkung der Lebensqualität zu vermuten.

4.4 Nebenwirkungen

Trotz des geringen Auftretens an Nebenwirkungen in Vorstudien und einer Eindosierungsphase Amitriptylins, beobachteten wir in dieser Studie eine große Anzahl an Nebenwirkungen. Von den 165 beobachteten Nebenwirkungen in der Amitriptylingruppe, wurden 68 Nebenwirkungen als medikamentöse Nebenwirkungen eingestuft. In der Placebogruppe wurden von 102 Nebenwirkungen, 19 als medikamentöse Nebenwirkungen eingestuft. Die bekannten Nebenwirkungen Müdigkeit und Xerostomie wurden am häufigsten genannt. Diese traten bereits in Vorstudien vermehrt auf. Das Auftreten von Herzrhythmusstörungen wurde viermalig in der Amitriptylingruppe und kein einziges Mal in der Placebogruppe, berichtet. Als Auslöser kann auch hierfür Amitriptylin angenommen werden. Andere bekannte Nebenwirkungen wurden nicht beobachtet. Das vermehrte Auftreten von Nebenwirkungen im Vergleich zur Phase-IIb-Studie kann auf das größere Patientenkollektiv und den längeren Einnahmezeitraum zurückgeführt werden. Dabei war das Auftreten von Nebenwirkungen nicht häufiger, verglichen mit den bereits beobachteten Häufigkeiten unter Therapie mit Amitriptylin innerhalb der Indikation (Riediger et al., 2017, Kroenke et al., 2009). Eine verminderte Lungenfunktion könnte ebenso zur beobachteten und dokumentierten Müdigkeit geführt haben (Nap-van der Vlist et al., 2018, Troosters et al., 2009). Das Auftreten der schwerwiegenden medikamentösen Nebenwir-

kung in der Verumgruppe kann unter anderem durch den gesteigerten Metabolismus, welcher bei CF-Patienten vermutet wird, bedingt sein (Parker et al., 1997). Da die beobachtete schwerwiegende Nebenwirkung transient war, ist keine Einschränkung der Patientensicherheit gegeben. Folglich kann gemäß den Annahmen und Ergebnissen der Vorstudien die Einnahme von Amitriptylin bei CF-Patienten weiterhin als sicher eingestuft werden.

4.5 Ausblick: Antiinflammatorische Therapieoptionen bei CF

Untersuchungen antiinflammatorischer Therapiemöglichkeiten erfolgen seit mehreren Jahren (Cantin et al., 2015). In der vorliegenden Studie wurde Amitriptylin auf seine antiinflammatorische Wirkung getestet. Dabei konnte die Verbesserung der Lungenfunktion oder Inflammation, wie sie in den Vorstudien beobachtet wurde, nicht bestätigt werden. Dennoch zeigten die Ergebnisse auch eine geringe Abnahme der *P. aeruginosa*-Keimzahl und eine geringe Gewichtszunahme, wenngleich die Veränderungen statistisch nicht signifikant waren. Zu beachten gilt, dass Ceramide als *Lipid rafts* in Zellmembranen auch für die Immunabwehr von *P. aeruginosa* essentiell sind (Grassmé et al., 2003). Insgesamt scheint der negative Einfluss der intrazellulären Ceramidakkumulation zu überwiegen, was erneut bestätigt wurde in dem durch die Behandlung von rekombinanten Atemwegsepithelzellen mit rekombinanter humaner sauren Ceramidase rhAC eine Reduktion der Infektion und Entzündung erfolgte (Gardner et al., 2020). Im Vergleich zur Behandlung mit Amitriptylin ist hier die Möglichkeit einer noch gezielteren Behandlung gegeben, wodurch zum einen eine verbesserte Wirksamkeit, zum anderen auch weniger systemische Nebenwirkungen zu erwarten sind. Da diese Therapieoption bislang noch nicht *in vivo* eingesetzt worden ist, sind zukünftige Ergebnisse zu abzuwarten. Auch eine Inhalation von Sphingosin führte zur direkten Eliminierung von Pathogenen (Becker et al., 2018). Gerade die Inhalation, wodurch eine systemische Wirkung und somit etwaige Nebenwirkungen vermieden werden können, bietet in dieser Hinsicht einen Vorteil gegenüber dem Studienmedikament Amitriptylin. Der Einsatz der rhAC, als auch von Sphingosinen, welche bei an der Verhinderung der Infektion und Inflammation ansetzen, haben das Potential neue Therapieoptionen zu werden und sollten daher zukünftig Gegenstand weiterer experimenteller als auch klinischer Forschung sein.

Die neutrophilen Granulozyten sind die dominanten Immunzellen, welche die CF-Lungen infiltrieren und denen es unmöglich ist trotz hoher Konzentration die bakterielle Infektion zu beheben (Stoltz et al., 2015, Cabrini et al., 2020, Laval et al., 2016, Hayes et al., 2011). Die Behandlung mit Amitriptylin zeigte bisher keine signifikante Konzentrationsminderung. Entgegen unserer Annahme beobachteten wir sogar eine Konzentrationssteigerung der Leukozyten in der vorliegenden Studie. Es bestanden hohe Konzentrationen und eine ausbleibende Besserung der Lungenfunktion. Die Ergebnisse unterstützen die Annahme, dass die Neutrophilen Granulozyten, als auch die Neutrophile Elastase, welche mitverantwortlich die CF-Lungenerkrankung sind, als antiinflammatorischer Ansatzpunkt gewertet werden sollten (Laval et al., 2016, Makam et al., 2009, Kruger et al., 2015). So wurden Neutrophile Elastase-Inhibitoren bereits getestet, wobei die Schwierigkeit in einer ausreichenden Hemmung derer bestand (Causer et al., 2020) Es ist auch umstritten, ob eine Reduktion tatsächlich zur Verbesserung der Symptome führt, da die Immunzellen essentiell für die Abwehr bakterieller Infektionen sind (Cockx et al., 2018). Außerdem spielen viele weitere Immunzellen (z.B. Makrophagen, Lymphozyten, Mastzellen, eosinophile Leukozyten) eine Rolle in der pulmonalen Inflammation und könnten als ergänzende Ansatzpunkte dienen (McDonald et al., 1992, Yoshimura et al., 1991, Hubeau et al., 2001a, Sagel et al., 2007). Beispielsweise wurde im Rahmen der Kolonisation von CF-Lungen mit *A. fumigatus*, welcher die Anfälligkeit für Infektionen mit *P. aeruginosa* erhöht, eine Eosinophilie nachgewiesen (Hector et al., 2016, Koutsokera et al., 2020, Balfour-Lynn and Elborn, 2002, Morgan et al., 1999). Entgegen unserem pathophysiologischen Konzept konnte in anderen Studien eine Erhöhung der Ceramidkonzentration die CF-Lungenerkrankung verbessern (Guilbault et al., 2009, Guilbault et al., 2008, Wojewodka et al., 2011). Bei antiinflammatorischen Therapiekonzepten besteht die Gefahr, dass Infektionen nicht ausreichend bekämpft werden können (Cockx et al., 2018, Grassmé et al., 2003). Unsere Ergebnisse konnten leider keine zusätzlichen Hinweise geben, in welchem Gewicht Pro- und Antiinflammation zueinanderstehen sollten, um einen Therapierfolg zu erzielen und gleichzeitig eine adäquate Immunabwehr zu gewährleisten. Könnte die Annahme bestätigt werden, dass die Amitriptylin-Therapie vor allem bei Patienten in frühen Erkrankungsstadien eine Wirksamkeit hat, könnte eine eher präventive Wirkung Amitriptylins diskutiert werden. So könnte Amitriptylin noch bevor ein nicht mehr kontrollierbares Ungleichgewicht entsteht, eingesetzt werden. Doch was der ideale

Zeitpunkt bzw. Krankheitszustand wäre ist bisher nicht bekannt. Auch sollte sichergestellt werden, dass bei einem solchem Ansatz keine Nachteile für die Patienten entstehen.

Aktuell gibt es nur wenige etablierte antiinflammatorische Therapien bei CF. Hierzu zählt im Wesentlichen das hochdosierte Ibuprofen, welches sich bereits als antiinflammatorische Therapieoption bei CF etabliert, einen antimikrobiellen Effekt hat (Shah et al., 2018) und möglicherweise die Progression der Lungenerkrankung aufhalten kann (Lands and Stanojevic, 2019). Auch beim Antibiotikum Azithromycin konnte ein antiinflammatorischer Effekt (Haydar et al., 2019), Reduktion inflammatorischer Marker (Ratjen et al., 2012) und eine Verminderung der Anzahl der pulmonalen Exazerbationen nachgewiesen werden (Mayer-Hamblett et al., 2018). Amitriptylin könnte als Antidepressivum eine Wirkung bei CF haben, da diese bekanntermaßen häufig mit Depression und Angststörung assoziiert ist (Quittner et al., 2016). Allerdings lag die verwendete Dosierung in dieser Studie deutlich unterhalb des wirksamen Bereichs bei der Behandlung im Rahmen von Depressionen. In höherer Dosierung könnte hier ein Effekt erzielt werden und als Antidepressivum wirksam sein. Auch die bekannte Nebenwirkung der Appetitsteigerung, welche auch in der bei Depressionen verwendeten Dosierung auftritt, ist bei der CF von Vorteil, da viele Patienten durch die chronische Energiedefizienz von Unterernährung betroffen sind (Elborn and Bell, 1996, Konstan et al., 2003b, Sharma et al., 2001).

4.6 Limitationen der Studie

Die vorliegende Studie hat Limitationen, welche die Aussagekraft einschränken und die Wahrscheinlichkeit für Störfaktoren erhöhen. Die in unserer Studie angestrebte Patientenanzahl wurde nicht erreicht. Dies bedeutet eine Einschränkung der Aussagekraft durch verminderte Relativierung interindividueller Heterogenität. Das Konzept wurde an einem Patientenkollektiv ab 14 Jahren angewandt, weswegen nicht mit Sicherheit gefolgert werden kann, ob die Ergebnisse auch auf Patienten unter 14 Jahren übertragbar sind. Eine weitere Limitation besteht durch das Auftreten typischer Nebenwirkungen des Amitriptylins. Dadurch war es Prüfern eventuell möglich zu vermuten, ob ein Patient zur Verum- oder zur Placebogruppe gehörte. Zu diesen kommen weitere Störfaktoren, wie die Verlängerung der Studie, hinzu. Dadurch ist nicht auszuschließen, dass z.B. generelle Veränderungen der Patientenversorgung das Therapiekonzept beeinflusst haben. Weitere

Limitationen ergeben sich bei der Datenerhebung durch manuelle Arbeitsschritte. Dazu zählen Verdünnungsverfahren bei der Quantifizierung der *P. aeruginosa*-Kolonien, welche zugunsten einer besseren Auswertbarkeit durchgeführt wurden, die eine nicht-homogene Verteilung bedingen kann. Störfaktoren bei der Auswertung der Daten sind fehlende Dokumentation des Selektionsprozesses, wodurch ein Selektionsbias nicht ausgeschlossen werden kann. Auch aufgrund unvollständiger Datensätze, durch z.B. nicht-verwertbares Probenmaterial und den digitalen Übertragungsprozess bestand eine eingeschränkte statistische Verwertbarkeit dieser Ergebnisse. Als weiterer Punkt ist hier die nicht erfolgte Messung von Sekundärparametern (z.B. Ceramidexpression, Zytokinkonzentration und DNA-Konzentration) zu nennen. Dadurch entsteht eine Einschränkung bei der Bewertung der Ergebnisse. Da die Ergebnisse des primären Zielparameters jedoch eindeutig waren ist von keinem starken Einfluss auszugehen.

4.7 Schlussfolgerung

Ziel dieser Studie war die Bestätigung des Wirkprinzips der antiinflammatorischen Therapie mittels Amitriptylin in klinischer Anwendung. Die Bestätigung der vielversprechenden Ergebnisse der Vorstudien mit statistisch signifikantem und klinischem Anstieg der FEV₁-Werte unter Therapie von zweimal 25 mg Amitriptylin täglich konnte nicht erfolgen. Weitere sekundäre Zielparameter zeigten keine positiven Tendenzen.

Trotz vielversprechender Ergebnisse der Vorstudien konnte in der vorliegenden Arbeit das Hypothesenkonzept nicht fortgeführt werden. Dadurch konnte nicht zur Zulassung eines neuen relativ nebenwirkungsarmen antiinflammatorischen Therapeutikums beigetragen werden. Gemäß der Annahme des Studienprotokolls der vorliegenden Studie, sollte das Ausbleiben der Verbesserung der Lungenfunktion nicht als Misserfolg gewertet werden, da die Studie durch die Freiwilligkeit und durch Inklusionskriterien bedingt, lediglich Patienten in fortgeschrittenen Krankheitsstadien einschloss, wodurch die Amitriptylin-Behandlung abgeschwächt wurde. Allerdings zeigten auch indirekte Parameter (*P. aeruginosa*-Konzentration, Leukozytenkonzentration, Gewicht) keine oder nur geringfügige Verbesserungen. Um demzufolge den ausbleibenden Therapieerfolg abschließend zu beurteilen, könnte eine neue Studie mit jüngeren Patienten und Patienten mit besserer Lungenfunktion initiiert werden. Die CF-Lungenerkrankung ist weiterhin ein

nicht ausreichend behobenes Problem und neue antiinflammatorische Therapien sind ein weiterhin unzureichend gedeckter Bedarf von CF-Behandlungskonzepten.

5 Zusammenfassung

Die Cystische Fibrose (CF) ist innerhalb der kaukasischen Bevölkerung die häufigste autosomal-rezessiv vererbte, letal verlaufende Erkrankung und wird durch Mutationen im *CFTR*-Gen verursacht. Charakteristisch sind chronische pulmonale Infektionen, eine progressive Lungenfunktionsverschlechterung, und dadurch frühe Morbidität und Mortalität Betroffener.

Die *CFTR*-Dysfunktion, welche eine Hyperaktivität der Sauren Sphingomyelinase (ASM) bedingt, führt zur Ceramidakkumulation in bronchialen Epithelzellen. Forschungsergebnisse führten zur Erkenntnis, dass Ceramide eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der CF-Lungenerkrankung spielen können. In Makrophagen und im Respirationstrakt *CFTR*-defizienter Mäuse konnte eine Ceramidakkumulation und ein Zusammenhang mit Inflammation und Infektion festgestellt werden. Die Bedeutung für die Entwicklung der CF-Lungenerkrankung konnte in Studien unabhängig voneinander bestätigt werden. Dies führte zur Annahme, dass Amitriptylin eine antiinflammatorische Wirkung auf die CF-Lungenerkrankung hat, indem es die ASM hemmt. Diese Annahme konnte in den darauffolgenden Phase-I, IIa, IIb-Studie bestätigt werden. Das Ziel der vorliegenden Studie war die klinische Wirksamkeit Amitriptylins zu bestätigen.

Die Studie war Teil einer randomisierte, placebokontrollierten, doppelverblindete, multizentrische Phase-III-Studie. Die Patienten erhielten je nach zugeteilter Studiengruppen zweimal täglich 25 mg Amitriptylin bzw. Placebo bis Tag 98. Als primärer Endpunkt wurde die Differenz der FEV₁ nach 8 Wochen im Vergleich der Placebo- zur Verumgruppe bestimmt. Sekundäre Endpunkte waren weitere Lungenfunktionsparameter, die pulmonale Besiedlung mit *Pseudomonas aeruginosa*, Granulozytenkonzentrationen, Gewichtsveränderungen sowie die Auswirkungen auf die Lebensqualität.

Es wurden 76 Patienten zwischen August 2015 bis Juni 2019 eingeschlossen. Die statistische Auswertung ergab keinen signifikanten Effekt auf die Lungenfunktion (Differenz von 0,9%, $p = 0.6$). Die Analyse zeigte, dass innerhalb der Verumgruppe die Lungenfunktion FEV₁% durchschnittlich um -2,23% abnahm und innerhalb der Placebogruppe

um -1.34% ($p = 0.64$) abnahm. Die Ergebnisse der PP-Gruppe entsprachen den Ergebnissen der ITT-Gruppe. Weitere sekundäre Zielparameter zeigten keine positiven Tendenzen und keine statistisch signifikanten Veränderungen. In der Amitriptylingruppe wurden bei 33 von 42 Patienten (79%) Nebenwirkungen und in der Placebogruppe bei 13 von 39 Patienten (33%) Nebenwirkungen berichtet.

Die richtungsweisenden Ergebnisse der Vorstudien zur Etablierung des Amitriptylins als antiinflammatorische Therapie bei Cystischen Fibrose-Patienten konnten in unserer Phase-III nicht bestätigt werden. Die pathophysiologische Basis dieser Studie kann weiterhin als wichtiger therapeutischer Ansatzpunkt durch die Behandlung mit rekombinanter humaner sauren Ceramidase oder Inhalation mit Sphingosin, welche durch ihre antiinflammatorische Wirkung das Potential haben die Morbidität der Cystischen Fibrose zu reduzieren.

6 Summary

Cystic fibrosis (CF) is the most common autosomal-recessive inherited lethal disease within the caucasian population, caused by mutations in the *CFTR* gene. It is characterized by chronic pulmonary infections, progressive lung function deterioration, and consequent early morbidity and mortality in affected individuals.

CFTR dysfunction results in hyperactivity of acid sphingomyelinase (ASM) and therefore into ceramide accumulation in bronchial epithelial cells. Research led to findings that ceramide might play a critical role in the pathogenesis of CF lung disease. Ceramide accumulation and a link to inflammation and infection were found in macrophages and in the respiratory tract of *Cftr*-deficient mice. Its potential relevance in the development of CF lung disease was independently confirmed in several studies. This led to the assumption that amitriptyline has an anti-inflammatory effect on the CF lung disease by inhibition of ASM, which was confirmed in subsequent phase I, IIa, IIb studies. The aim of the present study was to confirm the clinical efficacy of amitriptyline and provide a new therapeutic strategy.

The study was part of a randomized, placebo-controlled, double-blind, multi-center phase III trial. Patients received 25 mg of amitriptyline twice daily until day 98, depending on the assigned study group. Amitriptyline was given in at lower doses until day 14. The primary endpoint was the difference in FEV₁ after 8 weeks between the two study groups. Secondary endpoints included other pulmonary function parameters, pulmonary colonization with *Pseudomonas aeruginosa*, sputum granulocyte concentrations, weight changes, and impact on quality of life.

76 patients were included between August 2015 and June 2019. Patients received 25 mg of amitriptyline or placebo twice daily until day 98, according to assigned study groups. Statistical analysis showed no significant positive effect on lung function with the treatment of amitriptyline compared to placebo (difference of 0.9%, $p = 0.6$). Analysis showed that within the verum group, lung function FEV₁% decreased on average by -2.23% and within the placebo group by -1.34% ($p = 0.64$). The results of the PP analysis were similar to those of the ITT analysis. Other secondary outcome parameters showed

no positive trends and no statistically significant changes. In the amitriptyline group, side effects were reported in 33 of 42 patients (79%) and in the placebo group in 13 of 39 patients (33%).

The landmark results of previous studies establishing amitriptyline as an anti-inflammatory therapy in cystic fibrosis patients could not be confirmed in our Phase III study. The pathophysiological basis of this study may further serve as an important therapeutic target, by treatment option with recombinant human acid ceramidase or inhalation with sphingosine, which have the potential to reduce the morbidity of cystic fibrosis by their anti-inflammatory effects.

7 Literaturverzeichnis

- ABOU ALAIWA, M. H., BEER, A. M., PEZZULO, A. A., LAUNSPACH, J. L., HORAN, R. A., STOLTZ, D. A., STARNER, T. D., WELSH, M. J. & ZABNER, J. 2014. Neonates with cystic fibrosis have a reduced nasal liquid pH; a small pilot study. *J Cyst Fibros*, 13, 373-7.
- ADAMS, C., ICHEVA, V., DEPPISCH, C., LAUER, J., HERRMANN, G., GRAEPLER-MAINKA, U., HEYDER, S., GULBINS, E. & RIETHMUELLER, J. 2016. Long-Term Pulmonal Therapy of Cystic Fibrosis-Patients with Amitriptyline. *Cell Physiol Biochem*, 39, 565-72.
- ANDERSON, I. M., FERRIER, I. N., BALDWIN, R. C., COWEN, P. J., HOWARD, L., LEWIS, G., MATTHEWS, K., MCALLISTER-WILLIAMS, R. H., PEVELER, R. C., SCOTT, J. & TYLEE, A. 2008. Evidence-based guidelines for treating depressive disorders with antidepressants: a revision of the 2000 British Association for Psychopharmacology guidelines. *J Psychopharmacol*, 22, 343-96.
- ARMSTRONG, D. S., GRIMWOOD, K., CARLIN, J. B., CARZINO, R., GUTIERREZ, J. P., HULL, J., OLINSKY, A., PHELAN, E. M., ROBERTSON, C. F. & PHELAN, P. D. 1997. Lower airway inflammation in infants and young children with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 156, 1197-204.
- ARMSTRONG, D. S., GRIMWOOD, K., CARZINO, R., CARLIN, J. B., OLINSKY, A. & PHELAN, P. D. 1995. Lower respiratory infection and inflammation in infants with newly diagnosed cystic fibrosis. *BMJ*, 310, 1571-2.
- ARMSTRONG, D. S., HOOK, S. M., JAMSEN, K. M., NIXON, G. M., CARZINO, R., CARLIN, J. B., ROBERTSON, C. F. & GRIMWOOD, K. 2005. Lower airway inflammation in infants with cystic fibrosis detected by newborn screening. *Pediatr Pulmonol*, 40, 500-10.
- ARON, Y., POLLA, B. S., BIENVENU, T., DALL'AVA, J., DUSSER, D. & HUBERT, D. 1999. HLA class II polymorphism in cystic fibrosis. A possible modifier of pulmonary phenotype. *Am J Respir Crit Care Med*, 159, 1464-8.
- ASHINA, S., LIPTON, R. B. & BIGAL, M. E. 2008. Treatment of comorbidities of chronic daily headache. *Curr Treat Options Neurol*, 10, 36-43.
- BALFOUR-LYNN, I. M. & ELBORN, J. S. 2002. "CF asthma": what is it and what do we do about it? *Thorax*, 57, 742-8.
- BARASCH, J., KISS, B., PRINCE, A., SAIMAN, L., GRUENERT, D. & AL-AWQATI, Q. 1991. Defective acidification of intracellular organelles in cystic fibrosis. *Nature*, 352, 70-3.
- BECKER, K. A., GRASSME, H., ZHANG, Y. & GULBINS, E. 2010a. Ceramide in *Pseudomonas aeruginosa* infections and cystic fibrosis. *Cell Physiol Biochem*, 26, 57-66.
- BECKER, K. A., RIETHMULLER, J., LUTH, A., DORING, G., KLEUSER, B. & GULBINS, E. 2010b. Acid sphingomyelinase inhibitors normalize pulmonary ceramide and inflammation in cystic fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 42, 716-24.
- BECKER, K. A., RIETHMULLER, J., SEITZ, A. P., GARDNER, A., BOUDREAU, R., KAMLER, M., KLEUSER, B., SCHUCHMAN, E., CALDWELL, C. C., EDWARDS, M. J., GRASSME, H., BRODLIE, M. & GULBINS, E. 2018. Sphingolipids as targets for inhalation treatment of cystic fibrosis. *Adv Drug Deliv Rev*, 133, 66-75.
- BECKER, K. A., RIETHMULLER, J., ZHANG, Y. & GULBINS, E. 2010c. The role of sphingolipids and ceramide in pulmonary inflammation in cystic fibrosis. *Open Respir Med J*, 4, 39-47.
- BECKER, K. A., TUMMLER, B., GULBINS, E. & GRASSME, H. 2010d. Accumulation of ceramide in the trachea and intestine of cystic fibrosis mice causes inflammation and cell death. *Biochem Biophys Res Commun*, 403, 368-74.
- BENNETT, L. E., KECK, B. M., HERTZ, M. I., TRULOCK, E. P. & TAYLOR, D. O. 2001. Worldwide thoracic organ transplantation: a report from the UNOS/ISHLT international registry for thoracic organ transplantation. *Clin Transpl*, 25-40.

- BODAS, M., MIN, T., MAZUR, S. & VIJ, N. 2011a. Critical modifier role of membrane-cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-dependent ceramide signaling in lung injury and emphysema. *J Immunol*, 186, 602-13.
- BODAS, M., MIN, T. & VIJ, N. 2011b. Critical role of CFTR-dependent lipid rafts in cigarette smoke-induced lung epithelial injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 300, L811-20.
- BONFIELD, T. L., PANUSKA, J. R., KONSTAN, M. W., HILLIARD, K. A., HILLIARD, J. B., GHNAIM, H. & BERGER, M. 1995. Inflammatory cytokines in cystic fibrosis lungs. *Am J Respir Crit Care Med*, 152, 2111-8.
- BOROWITZ, D., DURIE, P. R., CLARKE, L. L., WERLIN, S. L., TAYLOR, C. J., SEMLER, J., DE LISLE, R. C., LEWINDON, P., LICHTMAN, S. M., SINAASAPPEL, M., BAKER, R. D., BAKER, S. S., VERKADE, H. J., LOWE, M. E., STALLINGS, V. A., JANGHORBANI, M., BUTLER, R. & HEUBI, J. 2005. Gastrointestinal outcomes and confounders in cystic fibrosis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 41, 273-85.
- BOUCHER, R. C. 2007. Airway surface dehydration in cystic fibrosis: pathogenesis and therapy. *Annu Rev Med*, 58, 157-70.
- BRAGONZI, A., HORATI, H., KERRIGAN, L., LORE, N. I., SCHOLTE, B. J. & WELDON, S. 2017. Inflammation and host-pathogen interaction: Cause and consequence in cystic fibrosis lung disease. *J Cyst Fibros*.
- BRODLIE, M., MCKEAN, M. C., JOHNSON, G. E., GRAY, J., FISHER, A. J., CORRIS, P. A., LORDAN, J. L. & WARD, C. 2010. Ceramide is increased in the lower airway epithelium of people with advanced cystic fibrosis lung disease. *Am J Respir Crit Care Med*, 182, 369-75.
- BURGEL, P.-R., BELLIS, G., OLESEN, H. V., VIVIANI, L., ZOLIN, A., BLASI, F. & ELBORN, J. S. 2015. Future trends in cystic fibrosis demography in 34 European countries. *European Respiratory Journal*, 46, 133.
- CABRINI, G., RIMESSI, A., BORGATTI, M., LAMPRONTI, I., FINOTTI, A., PINTON, P. & GAMBARI, R. 2020. Role of Cystic Fibrosis Bronchial Epithelium in Neutrophil Chemotaxis. *Frontiers in immunology*, 11, 1438-1438.
- CANTIN, A. M., HARTL, D., KONSTAN, M. W. & CHMIEL, J. F. 2015. Inflammation in cystic fibrosis lung disease: Pathogenesis and therapy. *J Cyst Fibros*, 14, 419-30.
- CAUSER, A. J., SHUTE, J. K., CUMMINGS, M. H., SHEPHERD, A. I., GRUET, M., COSTELLO, J. T., BAILEY, S., LINDLEY, M., PEARSON, C., CONNETT, G., ALLENBY, M. I., CARROLL, M. P., DANIELS, T. & SAYNOR, Z. L. 2020. Circulating biomarkers of antioxidant status and oxidative stress in people with cystic fibrosis: A systematic review and meta-analysis. *Redox Biol*, 32, 101436.
- COCKX, M., GOUWY, M., VAN DAMME, J. & STRUYF, S. 2018. Chemoattractants and cytokines in primary ciliary dyskinesia and cystic fibrosis: key players in chronic respiratory diseases. *Cellular & molecular immunology*, 15, 312-323.
- COHEN, H. W., GIBSON, G. & ALDERMAN, M. H. 2000. Excess risk of myocardial infarction in patients treated with antidepressant medications: association with use of tricyclic agents. *Am J Med*, 108, 2-8.
- COHEN, T. S. & PRINCE, A. 2012. Cystic fibrosis: a mucosal immunodeficiency syndrome. *Nat Med*, 18, 509-19.
- COLLAWN, J. F. & MATALON, S. 2014. CFTR and lung homeostasis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 307, L917-23.
- COLLINS, F. S. 1992. Cystic fibrosis: molecular biology and therapeutic implications. *Science*, 256, 774-9.
- CONRAD, C., LYMP, J., THOMPSON, V., DUNN, C., DAVIES, Z., CHATFIELD, B., NICHOLS, D., CLANCY, J., VENDER, R., EGAN, M. E., QUITTELL, L., MICHELSON, P., ANTONY, V., SPAHR, J., RUBENSTEIN, R. C., MOSS, R. B., HERZENBERG, L. A., GOSS, C. H. & TIROUVANZIAM, R. 2015. Long-term treatment with oral N-acetylcysteine: affects lung

- function but not sputum inflammation in cystic fibrosis subjects. A phase II randomized placebo-controlled trial. *J Cyst Fibros*, 14, 219-27.
- COREY, M., MCLAUGHLIN, F. J., WILLIAMS, M. & LEVISON, H. 1988. A comparison of survival, growth, and pulmonary function in patients with cystic fibrosis in Boston and Toronto. *Journal of Clinical Epidemiology*, 41, 583-591.
- CUTTING, G. R. 2015. Cystic fibrosis genetics: from molecular understanding to clinical application. *Nat Rev Genet*, 16, 45-56.
- DE LISLE, R. C. 2009. Pass the bicarb: the importance of HCO₃⁻ for mucin release. *The Journal of Clinical Investigation*, 119, 2535-2537.
- DI, A., BROWN, M. E., DERIY, L. V., LI, C., SZETO, F. L., CHEN, Y., HUANG, P., TONG, J., NAREN, A. P., BINDOKAS, V., PALFREY, H. C. & NELSON, D. J. 2006. CFTR regulates phagosome acidification in macrophages and alters bactericidal activity. *Nat Cell Biol*, 8, 933-44.
- DODGE, J. A. 1995. Male fertility in cystic fibrosis. *Lancet*, 346, 587-8.
- DUAN, R. D. & NILSSON, A. 2009. Metabolism of sphingolipids in the gut and its relation to inflammation and cancer development. *Prog Lipid Res*, 48, 62-72.
- EDMONDSON, C. & DAVIES, J. C. 2016. Current and future treatment options for cystic fibrosis lung disease: latest evidence and clinical implications. *Ther Adv Chronic Dis*, 7, 170-83.
- ELBORN, J. S. 2016. Cystic fibrosis. *Lancet*, 388, 2519-2531.
- ELBORN, J. S. & BELL, S. C. 1996. Nutrition and survival in cystic fibrosis. *Thorax*, 51, 971-2.
- ELKINS, M. R., ROBINSON, M., ROSE, B. R., HARBOUR, C., MORIARTY, C. P., MARKS, G. B., BELOUSOVA, E. G., XUAN, W., BYE, P. T. & NATIONAL HYPERTONIC SALINE IN CYSTIC FIBROSIS STUDY, G. 2006. A controlled trial of long-term inhaled hypertonic saline in patients with cystic fibrosis. *N Engl J Med*, 354, 229-40.
- FARRELL, P. M., KOSOROK, M. R., ROCK, M. J., LAXOVA, A., ZENG, L., LAI, H. C., HOFFMAN, G., LAESSIG, R. H. & SPLAINGARD, M. L. 2001. Early diagnosis of cystic fibrosis through neonatal screening prevents severe malnutrition and improves long-term growth. Wisconsin Cystic Fibrosis Neonatal Screening Study Group. *Pediatrics*, 107, 1-13.
- FARRELL, P. M., ROSENSTEIN, B. J., WHITE, T. B., ACCURSO, F. J., CASTELLANI, C., CUTTING, G. R., DURIE, P. R., LEGRYS, V. A., MASSIE, J., PARAD, R. B., ROCK, M. J., CAMPBELL, P. W., 3RD & CYSTIC FIBROSIS, F. 2008. Guidelines for diagnosis of cystic fibrosis in newborns through older adults: Cystic Fibrosis Foundation consensus report. *J Pediatr*, 153, S4-S14.
- FLOTO, R. A. & HAWORTH, C. S. 2015. The growing threat of nontuberculous mycobacteria in CF. *J Cyst Fibros*, 14, 1-2.
- FLOTTE, T. R. & LAUBE, B. L. 2001. Gene therapy in cystic fibrosis. *Chest*, 120, 124S-131S.
- FRETZAYAS, A., DOUROS, K., MOUSTAKI, M. & LOUKOU, I. 2019. Applications of lung clearance index in monitoring children with cystic fibrosis. *World J Clin Pediatr*, 8, 15-22.
- FULMER, S. B., SCHWIEBERT, E. M., MORALES, M. M., GUGGINO, W. B. & CUTTING, G. R. 1995. Two cystic fibrosis transmembrane conductance regulator mutations have different effects on both pulmonary phenotype and regulation of outwardly rectified chloride currents. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 6832-6.
- GAN, K. H., GEUS, W. P., BAKKER, W., LAMERS, C. B. & HEIJERMAN, H. G. 1995. Genetic and clinical features of patients with cystic fibrosis diagnosed after the age of 16 years. *Thorax*, 50, 1301-4.
- GANGELL, C., GARD, S., DOUGLAS, T., PARK, J., DE KLERK, N., KEIL, T., BRENNAN, S., RANGANATHAN, S., ROBINS-BROWNE, R., SLY, P. D. & AREST, C. F. 2011. Inflammatory responses to individual microorganisms in the lungs of children with cystic fibrosis. *Clin Infect Dis*, 53, 425-32.

- GARCIA, M. A. S., YANG, N. & QUINTON, P. M. 2009. Normal mouse intestinal mucus release requires cystic fibrosis transmembrane regulator–dependent bicarbonate secretion. *The Journal of Clinical Investigation*, 119, 3497-3497.
- GARDNER, A. I., HAQ, I. J., SIMPSON, A. J., BECKER, K. A., GALLAGHER, J., SAINT-CRIQ, V., VERDON, B., MAVIN, E., TRIGG, A., GRAY, M. A., KOULMAN, A., MCDONNELL, M. J., FISHER, A. J., KRAMER, E. L., CLANCY, J. P., WARD, C., SCHUCHMAN, E. H., GULBINS, E. & BRODLIE, M. 2020. Recombinant Acid Ceramidase Reduces Inflammation and Infection in Cystic Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 202, 1133-1145.
- GARLAND, A. L., WALTON, W. G., COAKLEY, R. D., TAN, C. D., GILMORE, R. C., HOBBS, C. A., TRIPATHY, A., CLUNES, L. A., BENCHARIT, S., STUTTS, M. J., BETTS, L., REDINBO, M. R. & TARRAN, R. 2013. Molecular basis for pH-dependent mucosal dehydration in cystic fibrosis airways. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110, 15973-8.
- GIACALONE, V. D., DOBOSH, B. S., GAGGAR, A., TIROUVANZIAM, R. & MARGAROLI, C. 2020. Immunomodulation in Cystic Fibrosis: Why and How? *International journal of molecular sciences*, 21, 3331.
- GIBSON, R. L., BURNS, J. L. & RAMSEY, B. W. 2003. Pathophysiology and management of pulmonary infections in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 168, 918-51.
- GILLIGAN, P. H. 1991. Microbiology of airway disease in patients with cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev*, 4, 35-51.
- GOSS, C. H. 2019. Acute Pulmonary Exacerbations in Cystic Fibrosis. *Seminars in respiratory and critical care medicine*, 40, 792-803.
- GOSS, C. H., OTTO, K., AITKEN, M. L. & RUBENFELD, G. D. 2002. Detecting *Stenotrophomonas maltophilia* does not reduce survival of patients with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 166, 356-61.
- GOSS, C. H., RUBENFELD, G. D., OTTO, K. & AITKEN, M. L. 2003. The effect of pregnancy on survival in women with cystic fibrosis. *Chest*, 124, 1460-8.
- GRASSME, H., HENRY, B., ZIOBRO, R., BECKER, K. A., RIETHMULLER, J., GARDNER, A., SEITZ, A. P., STEINMANN, J., LANG, S., WARD, C., SCHUCHMAN, E. H., CALDWELL, C. C., KAMLER, M., EDWARDS, M. J., BRODLIE, M. & GULBINS, E. 2017. beta1-Integrin Accumulates in Cystic Fibrosis Luminal Airway Epithelial Membranes and Decreases Sphingosine, Promoting Bacterial Infections. *Cell Host Microbe*, 21, 707-718 e8.
- GRASSME, H., JEKLE, A., RIEHLE, A., SCHWARZ, H., BERGER, J., SANDHOFF, K., KOLESNICK, R. & GULBINS, E. 2001. CD95 signaling via ceramide-rich membrane rafts. *J Biol Chem*, 276, 20589-96.
- GRASSMÉ, H., JENDROSSEK, V., RIEHLE, A., VON KÜRTHY, G., BERGER, J., SCHWARZ, H., WELLER, M., KOLESNICK, R. & GULBINS, E. 2003. Host defense against *Pseudomonas aeruginosa* requires ceramide-rich membrane rafts. *Nature Medicine*, 9, 322-330.
- GRASSME, H., RIETHMULLER, J. & GULBINS, E. 2013. Ceramide in cystic fibrosis. *Handb Exp Pharmacol*, 265-74.
- GROSSE-ONNEBRINK, J., STEHLING, F., OLIVIER, M. & MELLIES, U. 2013. The lung clearance index correlates with markers of pulmonary deterioration in patients with cystic fibrosis. *European Respiratory Journal*, 42, P3606.
- GUILBAULT, C., DE SANCTIS, J. B., WOJEWODKA, G., SAEED, Z., LACHANCE, C., SKINNER, T. A. A., VILELA, R. M., KUBOW, S., LANDS, L. C., HAJDUCH, M., MATOUK, E. & RADZIOCH, D. 2008. Fenretinide Corrects Newly Found Ceramide Deficiency in Cystic Fibrosis. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 38, 47-56.
- GUILBAULT, C., WOJEWODKA, G., SAEED, Z., HAJDUCH, M., MATOUK, E., DE SANCTIS, J. B. & RADZIOCH, D. 2009. Cystic Fibrosis Fatty Acid Imbalance Is Linked to Ceramide Deficiency and Corrected by Fenretinide. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 41, 100-106.

- GULBINS, E. & KOLESNICK, R. 2003. Raft ceramide in molecular medicine. *Oncogene*, 22, 7070-7.
- GUSTAFSSON, J. K., ERMUND, A., AMBORT, D., JOHANSSON, M. E. V., NILSSON, H. E., THORELL, K., HEBERT, H., SJÖVALL, H. & HANSSON, G. C. 2012. Bicarbonate and functional CFTR channel are required for proper mucin secretion and link cystic fibrosis with its mucus phenotype. *Journal of Experimental Medicine*, 209, 1263-1272.
- HAO, Y., CHEUNG, C. S., YIP, W. C. & KO, W. H. 2015. Nobiletin Stimulates Chloride Secretion in Human Bronchial Epithelia via a cAMP/PKA-Dependent Pathway. *Cell Physiol Biochem*, 37, 306-20.
- HARDER, T. & SIMONS, K. 1997. Caveolae, DIGs, and the dynamics of sphingolipid-cholesterol microdomains. *Curr Opin Cell Biol*, 9, 534-42.
- HARTL, D., LATZIN, P., HORDIJK, P., MARCOS, V., RUDOLPH, C., WOISCHNIK, M., KRAUSSETSCHMANN, S., KOLLER, B., REINHARDT, D., ROSCHER, A. A., ROOS, D. & GRIESE, M. 2007. Cleavage of CXCR1 on neutrophils disables bacterial killing in cystic fibrosis lung disease. *Nature Medicine*, 13, 1423-1430.
- HAYDAR, D., CORY, T. J., BIRKET, S. E., MURPHY, B. S., PENNYPACKER, K. R., SINAI, A. P. & FEOLA, D. J. 2019. Azithromycin Polarizes Macrophages to an M2 Phenotype via Inhibition of the STAT1 and NF- κ B Signaling Pathways. *J Immunol*, 203, 1021-1030.
- HAYES, E., POHL, K., MCELVANEY, N. G. & REEVES, E. P. 2011. The cystic fibrosis neutrophil: a specialized yet potentially defective cell. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 59, 97-112.
- HE, X., OKINO, N., DHAMI, R., DAGAN, A., GATT, S., SCHULZE, H., SANDHOFF, K. & SCHUCHMAN, E. H. 2003. Purification and characterization of recombinant, human acid ceramidase. Catalytic reactions and interactions with acid sphingomyelinase. *J Biol Chem*, 278, 32978-86.
- HECTOR, A., KIRN, T., RALHAN, A., GRAEPLER-MAINKA, U., BERENBRINKER, S., RIETHMUELLER, J., HOGARDT, M., WAGNER, M., PFLEGER, A., AUTENRIETH, I., KAPPLER, M., GRIESE, M., EBER, E., MARTUS, P. & HARTL, D. 2016. Microbial colonization and lung function in adolescents with cystic fibrosis. *Journal of Cystic Fibrosis*, 15, 340-349.
- HIATT, P. W., GRACE, S. C., KOZINETZ, C. A., RABOUDI, S. H., TREECE, D. G., TABER, L. H. & PIEDRA, P. A. 1999. Effects of viral lower respiratory tract infection on lung function in infants with cystic fibrosis. *Pediatrics*, 103, 619-26.
- HOEGGER, M. J., FISCHER, A. J., MCMENIMEN, J. D., OSTEDGAARD, L. S., TUCKER, A. J., AWADALLA, M. A., MONINGER, T. O., MICHALSKI, A. S., HOFFMAN, E. A., ZABNER, J., STOLTZ, D. A. & WELSH, M. J. 2014. Impaired mucus detachment disrupts mucociliary transport in a piglet model of cystic fibrosis. *Science*, 345, 818-22.
- HOLOPAINEN, J. M., SUBRAMANIAN, M. & KINNUNEN, P. K. 1998. Sphingomyelinase induces lipid microdomain formation in a fluid phosphatidylcholine/sphingomyelin membrane. *Biochemistry*, 37, 17562-70.
- HUANG, Y. J. & LIPUMA, J. J. 2016. The Microbiome in Cystic Fibrosis. *Clin Chest Med*, 37, 59-67.
- HUBEAU, C., LORENZATO, M., COUETIL, J. P., HUBERT, D., DUSSE, D., PUCHELLE, E. & GAILLARD, D. 2001a. Quantitative analysis of inflammatory cells infiltrating the cystic fibrosis airway mucosa. *Clin Exp Immunol*, 124, 69-76.
- HUBEAU, C., PUCHELLE, E. & GAILLARD, D. 2001b. Distinct pattern of immune cell population in the lung of human fetuses with cystic fibrosis. *J Allergy Clin Immunol*, 108, 524-9.
- HURWITZ, R., FERLINZ, K. & SANDHOFF, K. 1994. The tricyclic antidepressant desipramine causes proteolytic degradation of lysosomal sphingomyelinase in human fibroblasts. *Biol Chem Hoppe Seyler*, 375, 447-50.

- KALMAN, Y. M., KEREM, E., DARVASI, A., DEMARCHI, J. & KEREM, B. 1994. Difference in frequencies of the cystic fibrosis alleles, delta F508 and W1282X, between carriers and patients. *Eur J Hum Genet*, 2, 77-82.
- KAROW, L.-R. 2012. *Allgemeine und spezielle Pharmakologie*.
- KASI, A. S., WEE, C. P., KEENS, T. G. & SALINAS, D. B. 2019. Abnormal Lung Clearance Index in Cystic Fibrosis Screen Positive, Inconclusive Diagnosis (CFSPID) Children with Otherwise Normal FEV1. *Lung*.
- KEATING, D., MARIGOWDA, G., BURR, L., DAINES, C., MALL, M. A., MCKONE, E. F., RAMSEY, B. W., ROWE, S. M., SASS, L. A., TULLIS, E., MCKEE, C. M., MOSKOWITZ, S. M., ROBERTSON, S., SAVAGE, J., SIMARD, C., VAN GOOR, F., WALTZ, D., XUAN, F., YOUNG, T., TAYLOR-COUSAR, J. L. & GROUP, V. X. S. 2018. VX-445-Tezacaftor-Ivacaftor in Patients with Cystic Fibrosis and One or Two Phe508del Alleles. *N Engl J Med*, 379, 1612-1620.
- KEISER, N. W., BIRKET, S. E., EVANS, I. A., TYLER, S. R., CROOKE, A. K., SUN, X., ZHOU, W., NELLIS, J. R., STROEBELE, E. K., CHU, K. K., TEARNEY, G. J., STEVENS, M. J., HARRIS, J. K., ROWE, S. M. & ENGELHARDT, J. F. 2015. Defective innate immunity and hyperinflammation in newborn cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-knockout ferret lungs. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 52, 683-94.
- KEREM, E. 2017. Cystic fibrosis: Priorities and progress for future therapies. *Paediatr Respir Rev*, 24, 14-16.
- KITATANI, K., IDKOWIAK-BALDYS, J. & HANNUN, Y. A. 2008. The sphingolipid salvage pathway in ceramide metabolism and signaling. *Cell Signal*, 20, 1010-8.
- KNOWLES, M. R., HOHNEKER, K. W., ZHOU, Z., OLSEN, J. C., NOAH, T. L., HU, P. C., LEIGH, M. W., ENGELHARDT, J. F., EDWARDS, L. J., JONES, K. R. & ET AL. 1995. A controlled study of adenoviral-vector-mediated gene transfer in the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis. *N Engl J Med*, 333, 823-31.
- KNUDSON, R. J., LEBOWITZ, M. D., HOLBERG, C. J. & BURROWS, B. 1983. Changes in the normal maximal expiratory flow-volume curve with growth and aging. *Am Rev Respir Dis*, 127, 725-34.
- KONINGSBRUGGEN-RIETSCHER, S. V. & E. RIETSCHER 2017. Mukoviszidose. Erkrankung auf dem Weg zur personalisierten Therapie. *Monatsschr Kinderheilkd*.
- KONSTAN, M. W., BUTLER, S. M., WOHL, M. E., STODDARD, M., MATOUSEK, R., WAGENER, J. S., JOHNSON, C. A., MORGAN, W. J., INVESTIGATORS & COORDINATORS OF THE EPIDEMIOLOGIC STUDY OF CYSTIC, F. 2003a. Growth and nutritional indexes in early life predict pulmonary function in cystic fibrosis. *J Pediatr*, 142, 624-30.
- KONSTAN, M. W., BUTLER, S. M., WOHL, M. E. B., STODDARD, M., MATOUSEK, R., WAGENER, J. S., JOHNSON, C. A. & MORGAN, W. J. 2003b. Growth and nutritional indexes in early life predict pulmonary function in cystic fibrosis. *The Journal of Pediatrics*, 142, 624-630.
- KONSTAN, M. W. & RATJEN, F. 2012. Effect of dornase alfa on inflammation and lung function: potential role in the early treatment of cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*, 11, 78-83.
- KORNHUBER, J., TRIPAL, P., REICHEL, M., MUHLE, C., RHEIN, C., MUEHLBACHER, M., GROEMER, T. W. & GULBINS, E. 2010. Functional Inhibitors of Acid Sphingomyelinase (FIASMs): a novel pharmacological group of drugs with broad clinical applications. *Cell Physiol Biochem*, 26, 9-20.
- KORNHUBER, J., TRIPAL, P., REICHEL, M., TERFLOTH, L., BLEICH, S., WILTFANG, J. & GULBINS, E. 2008. Identification of new functional inhibitors of acid sphingomyelinase using a structure-property-activity relation model. *J Med Chem*, 51, 219-37.
- KOSOROK, M. R., JALALUDDIN, M., FARRELL, P. M., SHEN, G., COLBY, C. E., LAXOVA, A., ROCK, M. J. & SPLAINGARD, M. 1998. Comprehensive analysis of risk factors for acquisition of

- Pseudomonas aeruginosa* in young children with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol*, 26, 81-8.
- KOUTSOKERA, A., CORRIVEAU, S., SYKES, J., CORIATI, A., CORTES, D., VADAS, P., CHAPARRO, C., MCINTYRE, K., TULLIS, E. & STEPHENSON, A. L. 2020. Omalizumab for asthma and allergic bronchopulmonary aspergillosis in adults with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*, 19, 119-124.
- KROENKE, K., KREBS, E. E. & BAIR, M. J. 2009. Pharmacotherapy of chronic pain: a synthesis of recommendations from systematic reviews. *Gen Hosp Psychiatry*, 31, 206-19.
- KRUGER, P., SAFFARZADEH, M., WEBER, A. N. R., RIEBER, N., RADSAK, M., VON BERNUTH, H., BENARAF, C., ROOS, D., SKOKOWA, J. & HARTL, D. 2015. Neutrophils: Between host defence, immune modulation, and tissue injury. *PLoS pathogens*, 11, e1004651-e1004651.
- KUBE, D., SONTICH, U., FLETCHER, D. & DAVIS, P. B. 2001. Proinflammatory cytokine responses to *P. aeruginosa* infection in human airway epithelial cell lines. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 280, L493-L502.
- KUREK, K., ŁUKASZUK, B., PIOTROWSKA, D. M., WIESIOŁEK, P., CHABOWSKA, A. M. & ZENDZIAN-PIOTROWSKA, M. 2013. Metabolism, physiological role, and clinical implications of sphingolipids in gastrointestinal tract. *BioMed research international*, 2013, 908907-908907.
- LANDS, L. C. & STANOJEVIC, S. 2019. Oral non-steroidal anti-inflammatory drug therapy for lung disease in cystic fibrosis. *The Cochrane database of systematic reviews*, 9, CD001505-CD001505.
- LAVAL, J., RALHAN, A. & HARTL, D. 2016. Neutrophils in cystic fibrosis. *Biol Chem*, 397, 485-96.
- LAWSON, K. 2017. A Brief Review of the Pharmacology of Amitriptyline and Clinical Outcomes in Treating Fibromyalgia. *Biomedicines*, 5.
- LEE, B., HAAGENSEN, J. A., CIOFU, O., ANDERSEN, J. B., HOIBY, N. & MOLIN, S. 2005. Heterogeneity of biofilms formed by nonmucoic *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol*, 43, 5247-55.
- LEGSSYER, R., HUAUX, F., LEBACQ, J., DELOS, M., MARBAIX, E., LEBECQUE, P., LISON, D., SCHOLTE, B. J., WALLEMACQ, P. & LEAL, T. 2006. Azithromycin reduces spontaneous and induced inflammation in DeltaF508 cystic fibrosis mice. *Respir Res*, 7, 134.
- LI, Z., KOSOROK, M. R., FARRELL, P. M., LAXOVA, A., WEST, S. E., GREEN, C. G., COLLINS, J., ROCK, M. J. & SPLAINGARD, M. L. 2005. Longitudinal development of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* infection and lung disease progression in children with cystic fibrosis. *JAMA*, 293, 581-8.
- LIOU, T. G., ADLER, F. R., CAHILL, B. C., FITZSIMMONS, S. C., HUANG, D., HIBBS, J. R. & MARSHALL, B. C. 2001. Survival effect of lung transplantation among patients with cystic fibrosis. *JAMA*, 286, 2683-9.
- MAKAM, M., DIAZ, D., LAVAL, J., GERNEZ, Y., CONRAD, C. K., DUNN, C. E., DAVIES, Z. A., MOSS, R. B., HERZENBERG, L. A., HERZENBERG, L. A. & TIROUVANZIAM, R. 2009. Activation of critical, host-induced, metabolic and stress pathways marks neutrophil entry into cystic fibrosis lungs. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 5779-83.
- MALHOTRA, S., HAYES, D., JR. & WOZNAK, D. J. 2019. Cystic Fibrosis and *Pseudomonas aeruginosa*: the Host-Microbe Interface. *Clin Microbiol Rev*, 32.
- MALL, M. A. & HARTL, D. 2014. CFTR: cystic fibrosis and beyond. *Eur Respir J*, 44, 1042-54.
- MANGIATERRA, G., AMIRI, M., DI CESARE, A., PASQUAROLI, S., MANSO, E., CIRILLI, N., CITTERIO, B., VIGNAROLI, C. & BIAVASCO, F. 2018. Detection of viable but non-culturable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis by qPCR: a validation study. *BMC Infect Dis*, 18, 701.

- MAYER-HAMBLETT, N., RETSCH-BOGART, G., KLOSTER, M., ACCURSO, F., ROSENFELD, M., ALBERS, G., BLACK, P., BROWN, P., CAIRNS, A., DAVIS, S. D., GRAFF, G. R., KERBY, G. S., ORENSTEIN, D., BUCKINGHAM, R., RAMSEY, B. W. & GROUP, O. S. 2018. Azithromycin for Early Pseudomonas Infection in Cystic Fibrosis. The OPTIMIZE Randomized Trial. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 198, 1177-1187.
- MCDONALD, T. V., NGHIEM, P. T., GARDNER, P. & MARTENS, C. L. 1992. Human lymphocytes transcribe the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene and exhibit CF-defective cAMP-regulated chloride current. *J Biol Chem*, 267, 3242-8.
- MEYER, M., HUAUX, F., GAVILANES, X., VAN DEN BRULE, S., LEBECQUE, P., LO RE, S., LISON, D., SCHOLTE, B., WALLEMACQ, P. & LEAL, T. 2009. Azithromycin reduces exaggerated cytokine production by M1 alveolar macrophages in cystic fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 41, 590-602.
- MILLSOP, J. W., WANG, E. A. & FAZEL, N. 2017. Etiology, evaluation, and management of xerostomia. *Clinics in Dermatology*, 35, 468-476.
- MOGAYZEL, P. J., JR., NAURECKAS, E. T., ROBINSON, K. A., BRADY, C., GUILL, M., LAHIRI, T., LUBSCH, L., MATSUI, J., OERMANN, C. M., RATJEN, F., ROSENFELD, M., SIMON, R. H., HAZLE, L., SABADOSA, K., MARSHALL, B. C. & CYSTIC FIBROSIS FOUNDATION PULMONARY CLINICAL PRACTICE GUIDELINES, C. 2014. Cystic Fibrosis Foundation pulmonary guideline. pharmacologic approaches to prevention and eradication of initial Pseudomonas aeruginosa infection. *Ann Am Thorac Soc*, 11, 1640-50.
- MOGAYZEL, P. J., JR., NAURECKAS, E. T., ROBINSON, K. A., MUELLER, G., HADJILIADIS, D., HOAG, J. B., LUBSCH, L., HAZLE, L., SABADOSA, K. & MARSHALL, B. 2013. Cystic fibrosis pulmonary guidelines. Chronic medications for maintenance of lung health. *Am J Respir Crit Care Med*, 187, 680-9.
- MORAN, A. 2000. Cystic fibrosis-related diabetes: an approach to diagnosis and management. *Pediatr Diabetes*, 1, 41-8.
- MORGAN, W. J., BUTLER, S. M., JOHNSON, C. A., COLIN, A. A., FITZSIMMONS, S. C., GELLER, D. E., KONSTAN, M. W., LIGHT, M. J., RABIN, H. R., REGELMANN, W. E., SCHIDLOW, D. V., STOKES, D. C., WOHL, M. E. B., KAPLOWITZ, H. & WYATT, M. M. 1999. Epidemiologic study of cystic fibrosis: Design and implementation of a prospective, multicenter, observational study of patients with cystic fibrosis in the U.S. and Canada. *Pediatric Pulmonology*, 28, 231-241.
- MORGAN, W. J., WAGENER, J. S., PASTA, D. J., MILLAR, S. J., VANDEVANTER, D. R., KONSTAN, M. W., SCIENTIFIC ADVISORY GROUP, I. & COORDINATORS OF THE EPIDEMIOLOGIC STUDY OF CYSTIC, F. 2017. Relationship of Antibiotic Treatment to Recovery after Acute FEV1 Decline in Children with Cystic Fibrosis. *Ann Am Thorac Soc*, 14, 937-942.
- MOSS, R. B., FLUME, P. A., ELBORN, J. S., COOKE, J., ROWE, S. M., MCCOLLEY, S. A., RUBENSTEIN, R. C., HIGGINS, M. & GROUP, V. X. S. 2015. Efficacy and safety of ivacaftor in patients with cystic fibrosis who have an Arg117His-CFTR mutation: a double-blind, randomised controlled trial. *Lancet Respir Med*, 3, 524-33.
- MOTT, L. S., PARK, J., MURRAY, C. P., GANGELL, C. L., DE KLERK, N. H., ROBINSON, P. J., ROBERTSON, C. F., RANGANATHAN, S. C., SLY, P. D. & STICK, S. M. 2012. Progression of early structural lung disease in young children with cystic fibrosis assessed using CT. *Thorax*, 67, 509.
- MUNCK, A. 2010. Nutritional considerations in patients with cystic fibrosis. *Expert Rev Respir Med*, 4, 47-56.
- MUNDER, A. & TUMMLER, B. 2015. Origins of cystic fibrosis lung disease. *N Engl J Med*, 372, 1574.
- NAEHRICH, L., BALLMANN, M., DAVIES, J., DERICHS, N., GONSKA, T., HJELTE, L., VAN KONIGSBRUGGEN-RIETSCHEL, S., LEAL, T., MELOTTI, P., MIDDLETON, P., TUMMLER, B.,

- VERMEULEN, F., WILSCHANSKI, M. & GROUP, E. D. N. W. 2014. Nasal potential difference measurements in diagnosis of cystic fibrosis: an international survey. *J Cyst Fibros*, 13, 24-8.
- NAHRLICH, L., MAINZ, J. G., ADAMS, C., ENGEL, C., HERRMANN, G., ICHEVA, V., LAUER, J., DEPPISCH, C., WIRTH, A., UNGER, K., GRAEPLER-MAINKA, U., HECTOR, A., HEYDER, S., STERN, M., DORING, G., GULBINS, E. & RIETHMULLER, J. 2013. Therapy of CF-patients with amitriptyline and placebo--a randomised, double-blind, placebo-controlled phase IIb multicenter, cohort-study. *Cell Physiol Biochem*, 31, 505-12.
- NAP-VAN DER VLIST, M. M., BURGHARD, M., HULZEBOS, H. J., DOELEMEN, W. R., HEIJERMAN, H. G. M., VAN DER ENT, C. K. & NIJHOF, S. L. 2018. Prevalence of severe fatigue among adults with cystic fibrosis: A single center study. *Journal of Cystic Fibrosis*, 17, 368-374.
- NAUSEEF, W. M. & BORREGAARD, N. 2014. Neutrophils at work. *Nat Immunol*, 15, 602-11.
- NEILL, K., BRADLEY, J. M., TUNNEY, M. & ELBORN, J. S. 2011. S44 Lung clearance index (LCI) and FEV₁ correlate equally with treatment burden as measured by cystic fibrosis questionnaire-revised (CFQ-R). *Thorax*, 66, A23.
- NELSON, J. 2009. Tricyclic and tetracyclic drugs. *American Psychiatric Publishing*.
- O'NEILL, K., BRADLEY, J. M., JOHNSTON, E., MCGRATH, S., MCILREAVEY, L., ROWAN, S., REID, A., BRADBURY, I., EINARSSON, G., ELBORN, J. S. & TUNNEY, M. M. 2015. Reduced bacterial colony count of anaerobic bacteria is associated with a worsening in lung clearance index and inflammation in cystic fibrosis. *PLoS One*, 10, e0126980.
- O'SULLIVAN, B. P. & FLUME, P. 2009. The clinical approach to lung disease in patients with cystic fibrosis. *Semin Respir Crit Care Med*, 30, 505-13.
- ORSAMA, A.-L., MATTILA, E., ERMES, M., VAN GILS, M., WANSINK, B. & KORHONEN, I. 2014. Weight rhythms: weight increases during weekends and decreases during weekdays. *Obesity facts*, 7, 36-47.
- OSIKA, E., CAVAILLON, J. M., CHADELAT, K., BOULE, M., FITTING, C., TOURNIER, G. & CLEMENT, A. 1999. Distinct sputum cytokine profiles in cystic fibrosis and other chronic inflammatory airway disease. *Eur Respir J*, 14, 339-46.
- PARKER, A. C., PRITCHARD, P., PRESTON, T., SMYTH, R. L. & CHOONARA, I. 1997. Enhanced drug metabolism in young children with cystic fibrosis. *Archives of disease in childhood*, 77, 239-241.
- PARKINS, M. D. & FLOTO, R. A. 2015. Emerging bacterial pathogens and changing concepts of bacterial pathogenesis in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*, 14, 293-304.
- PEWZNER-JUNG, Y., TAVAKOLI TABAZAVAREH, S., GRASSMÉ, H., BECKER, K. A., JAPTOK, L., STEINMANN, J., JOSEPH, T., LANG, S., TUEMMLER, B., SCHUCHMAN, E. H., LENTSCH, A. B., KLEUSER, B., EDWARDS, M. J., FUTERMAN, A. H. & GULBINS, E. 2014. Sphingoid long chain bases prevent lung infection by *Pseudomonas aeruginosa*. *EMBO Mol Med*, 6, 1205-14.
- PEZZULO, A. A., TANG, X. X., HOEGGER, M. J., ABOU ALAIWA, M. H., RAMACHANDRAN, S., MONINGER, T. O., KARP, P. H., WOHLFORD-LENANE, C. L., HAAGSMAN, H. P., VAN EIJK, M., BANFI, B., HORSWILL, A. R., STOLTZ, D. A., MCCRAY, P. B., JR., WELSH, M. J. & ZABNER, J. 2012. Reduced airway surface pH impairs bacterial killing in the porcine cystic fibrosis lung. *Nature*, 487, 109-13.
- QUITTNER, A. L., ABBOTT, J., GEORGIPOULOS, A. M., GOLDBECK, L., SMITH, B., HEMPSTEAD, S. E., MARSHALL, B., SABADOSA, K. A., ELBORN, S., INTERNATIONAL COMMITTEE ON MENTAL, H. & GROUP, E. T. S. 2016. International Committee on Mental Health in Cystic Fibrosis: Cystic Fibrosis Foundation and European Cystic Fibrosis Society consensus statements for screening and treating depression and anxiety. *Thorax*, 71, 26-34.

- QUITTNER, A. L., GOLDBECK, L., ABBOTT, J., DUFF, A., LAMBRECHT, P., SOLE, A., TIBOSCH, M. M., BERGSTEN BRUCEFORS, A., YUKSEL, H., CATASTINI, P., BLACKWELL, L. & BARKER, D. 2014. Prevalence of depression and anxiety in patients with cystic fibrosis and parent caregivers: results of The International Depression Epidemiological Study across nine countries. *Thorax*, 69, 1090-7.
- RAMSEY, B. W., PEPE, M. S., QUAN, J. M., OTTO, K. L., MONTGOMERY, A. B., WILLIAMS-WARREN, J., VASILJEV, K. M., BOROWITZ, D., BOWMAN, C. M., MARSHALL, B. C., MARSHALL, S. & SMITH, A. L. 1999. Intermittent administration of inhaled tobramycin in patients with cystic fibrosis. Cystic Fibrosis Inhaled Tobramycin Study Group. *N Engl J Med*, 340, 23-30.
- RAOUST, E., BALLOY, V., GARCIA-VERDUGO, I., TOUQUI, L., RAMPHAL, R. & CHIGNARD, M. 2009. Pseudomonas aeruginosa LPS or flagellin are sufficient to activate TLR-dependent signaling in murine alveolar macrophages and airway epithelial cells. *PLoS One*, 4, e7259.
- RATJEN, F., BELL, S. C., ROWE, S. M., GOSS, C. H., QUITTNER, A. L. & BUSH, A. 2015. Cystic fibrosis. *Nat Rev Dis Primers*, 1, 15010.
- RATJEN, F. & DORING, G. 2003. Cystic fibrosis. *Lancet*, 361, 681-9.
- RATJEN, F., SAIMAN, L., MAYER-HAMBLETT, N., LANDS, L. C., KLOSTER, M., THOMPSON, V., EMMETT, P., MARSHALL, B., ACCURSO, F., SAGEL, S. & ANSTEAD, M. 2012. Effect of azithromycin on systemic markers of inflammation in patients with cystic fibrosis uninfected with Pseudomonas aeruginosa. *Chest*, 142, 1259-1266.
- RATJEN, F., WATERS, V., KLINGEL, M., MCDONALD, N., DELL, S., LEAHY, T. R., YAU, Y. & GRASEMANN, H. 2016. Changes in airway inflammation during pulmonary exacerbations in patients with cystic fibrosis and primary ciliary dyskinesia. *Eur Respir J*, 47, 829-36.
- REGELMANN, W. E., ELLIOTT, G. R., WARWICK, W. J. & CLAWSON, C. C. 1990. Reduction of sputum Pseudomonas aeruginosa density by antibiotics improves lung function in cystic fibrosis more than do bronchodilators and chest physiotherapy alone. *Am Rev Respir Dis*, 141, 914-21.
- RENDERS, N. H., SIJMONS, M. A., VAN BELKUM, A., OVERBEEK, S. E., MOUTON, J. W. & VERBRUGH, H. A. 1997. Exchange of Pseudomonas aeruginosa strains among cystic fibrosis sibilings. *Res Microbiol*, 148, 447-54.
- RIEDIGER, C., SCHUSTER, T., BARLINN, K., MAIER, S., WEITZ, J. & SIEPMANN, T. 2017. Adverse Effects of Antidepressants for Chronic Pain: A Systematic Review and Meta-analysis. *Frontiers in neurology*, 8, 307-307.
- RIETHMULLER, J., ANTHONYSAMY, J., SERRA, E., SCHWAB, M., DORING, G. & GULBINS, E. 2009. Therapeutic efficacy and safety of amitriptyline in patients with cystic fibrosis. *Cell Physiol Biochem*, 24, 65-72.
- ROSENOW, T., OUDRAAD, M. C., MURRAY, C. P., TURKOVIC, L., KUO, W., DE BRUIJNE, M., RANGANATHAN, S. C., TIDDENS, H. A., STICK, S. M. & AUSTRALIAN RESPIRATORY EARLY SURVEILLANCE TEAM FOR CYSTIC, F. 2015. PRAGMA-CF. A Quantitative Structural Lung Disease Computed Tomography Outcome in Young Children with Cystic Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 191, 1158-65.
- ROWE, S. M., MCCOLLEY, S. A., RIETSCHEL, E., LI, X., BELL, S. C., KONSTAN, M. W., MARIGOWDA, G., WALTZ, D., BOYLE, M. P. & GROUP, V. X. S. 2017. Lumacaftor/ivacaftor Treatment of Patients with Cystic Fibrosis Heterozygous for F508del-CFTR. *Ann Am Thorac Soc*, 14, 213-219.
- ROWE, S. M., MILLER, S. & SORSCHER, E. J. 2005. Cystic fibrosis. *N Engl J Med*, 352, 1992-2001.

- SABA, S., SOONG, G., GREENBERG, S. & PRINCE, A. 2002. Bacterial Stimulation of Epithelial G-CSF and GM-CSF Expression Promotes PMN Survival in CF Airways. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 27, 561-567.
- SAGEL, S. D., CHMIEL, J. F. & KONSTAN, M. W. 2007. Sputum biomarkers of inflammation in cystic fibrosis lung disease. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 4, 406-417.
- SAGEL, S. D., WAGNER, B. D., ANTHONY, M. M., EMMETT, P. & ZEMANICK, E. T. 2012. Sputum biomarkers of inflammation and lung function decline in children with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 186, 857-65.
- SANDERS, D. B. & FINK, A. K. 2016. Background and Epidemiology. *Pediatr Clin North Am*, 63, 567-84.
- SATHE, M. & HOUWEN, R. 2017. Meconium ileus in Cystic Fibrosis. *J Cyst Fibros*, 16 Suppl 2, S32-S39.
- SCHUCHMAN, E. H. 2016. Acid ceramidase and the treatment of ceramide diseases: The expanding role of enzyme replacement therapy. *Biochim Biophys Acta*, 1862, 1459-71.
- SCHWIEBERT, E. M., EGAN, M. E., HWANG, T. H., FULMER, S. B., ALLEN, S. S., CUTTING, G. R. & GUGGINO, W. B. 1995. CFTR regulates outwardly rectifying chloride channels through an autocrine mechanism involving ATP. *Cell*, 81, 1063-73.
- SHAH, P. N., MARSHALL-BATTY, K. R., SMOLEN, J. A., TAGAEV, J. A., CHEN, Q., RODESNEY, C. A., LE, H. H., GORDON, V. D., GREENBERG, D. E. & CANNON, C. L. 2018. Antimicrobial Activity of Ibuprofen against Cystic Fibrosis-Associated Gram-Negative Pathogens. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 62, e01574-17.
- SHARMA, R., FLOREA, V. G., BOLGER, A. P., DOEHNER, W., FLOREA, N. D., COATS, A. J., HODSON, M. E., ANKER, S. D. & HENEIN, M. Y. 2001. Wasting as an independent predictor of mortality in patients with cystic fibrosis. *Thorax*, 56, 746-50.
- SHERRARD, L. J., TUNNEY, M. M. & ELBORN, J. S. 2014. Antimicrobial resistance in the respiratory microbiota of people with cystic fibrosis. *Lancet*, 384, 703-13.
- SINGER, S. J. & NICOLSON, G. L. 1972. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, 175, 720-31.
- SLY, P. D., BRENNAN, S., GANGELL, C., DE KLERK, N., MURRAY, C., MOTT, L., STICK, S. M., ROBINSON, P. J., ROBERTSON, C. F., RANGANATHAN, S. C. & AUSTRALIAN RESPIRATORY EARLY SURVEILLANCE TEAM FOR CYSTIC, F. 2009. Lung disease at diagnosis in infants with cystic fibrosis detected by newborn screening. *Am J Respir Crit Care Med*, 180, 146-52.
- SLY, P. D., GANGELL, C. L., CHEN, L., WARE, R. S., RANGANATHAN, S., MOTT, L. S., MURRAY, C. P. & STICK, S. M. 2013a. Risk Factors for Bronchiectasis in Children with Cystic Fibrosis. *New England Journal of Medicine*, 368, 1963-1970.
- SLY, P. D., GANGELL, C. L., CHEN, L., WARE, R. S., RANGANATHAN, S., MOTT, L. S., MURRAY, C. P., STICK, S. M. & INVESTIGATORS, A. C. 2013b. Risk factors for bronchiectasis in children with cystic fibrosis. *N Engl J Med*, 368, 1963-70.
- SLY, P. D. & WAINWRIGHT, C. E. 2017. Preserving Lung Function: The Holy Grail in Managing Cystic Fibrosis. *Ann Am Thorac Soc*, 14, 833-835.
- SMITH, A. L., REDDING, G., DOERSHUK, C., GOLDMANN, D., GORE, E., HILMAN, B., MARKS, M., MOSS, R., RAMSEY, B., RUBIO, T. & ET AL. 1988. Sputum changes associated with therapy for endobronchial exacerbation in cystic fibrosis. *J Pediatr*, 112, 547-54.
- SONG, Y., SALINAS, D., NIELSON, D. W. & VERKMAN, A. S. 2006. Hyperacidity of secreted fluid from submucosal glands in early cystic fibrosis. *Am J Physiol Cell Physiol*, 290, C741-9.
- STANOJEVIC, S., DAVIS, S. D., RETSCH-BOGART, G., WEBSTER, H., DAVIS, M., JOHNSON, R. C., JENSEN, R., PIZARRO, M. E., KANE, M., CLEM, C. C., SCHORNICK, L., SUBBARAO, P. & RATJEN, F. A. 2017. Progression of Lung Disease in Preschool Patients with Cystic Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 195, 1216-1225.

- STANOJEVIC, S. & RATJEN, F. 2016. Physiologic endpoints for clinical studies for cystic fibrosis. *Journal of Cystic Fibrosis*, 15, 416-423.
- STOLTZ, D. A., MEYERHOLZ, D. K. & WELSH, M. J. 2015. Origins of cystic fibrosis lung disease. *N Engl J Med*, 372, 1574-5.
- SURETTE, M. G. 2014. The cystic fibrosis lung microbiome. *Ann Am Thorac Soc*, 11 Suppl 1, S61-5.
- TAUSSIG, L. M., LOBECK, C. C., KATTWINKEL, J. & DI SANT'AGNESE, P. A. 1972. Fertility in males with cystic fibrosis. *Lancet*, 1, 850.
- TEICHGRABER, V., ULRICH, M., ENDLICH, N., RIETHMULLER, J., WILKER, B., DE OLIVEIRA-MUNDING, C. C., VAN HEECKEREN, A. M., BARR, M. L., VON KURTHY, G., SCHMID, K. W., WELLER, M., TUMMLER, B., LANG, F., GRASSME, H., DORING, G. & GULBINS, E. 2008. Ceramide accumulation mediates inflammation, cell death and infection susceptibility in cystic fibrosis. *Nat Med*, 14, 382-91.
- TIBBOEL, J., REISS, I., DE JONGSTE, J. C. & POST, M. 2014. Sphingolipids in lung growth and repair. *Chest*, 145, 120-128.
- TROOSTERS, T., LANGER, D., VRIJSEN, B., SEGERS, J., WOUTERS, K., JANSSENS, W., GOSSELINK, R., DECRAMER, M. & DUPONT, L. 2009. Skeletal muscle weakness, exercise tolerance and physical activity in adults with cystic fibrosis. *European Respiratory Journal*, 33, 99.
- TURNER, M. D., NEDJAI, B., HURST, T. & PENNINGTON, D. J. 2014. Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. *Biochim Biophys Acta*, 1843, 2563-2582.
- ULRICH, M., WORLITZSCH, D., VIGLIO, S., SIEGMANN, N., IADAROLA, P., SHUTE, J. K., GEISER, M., PIER, G. B., FRIEDEL, G., BARR, M. L., SCHUSTER, A., MEYER, K. C., RATJEN, F., BJARNSHOLT, T., GULBINS, E. & DÖRING, G. 2010. Alveolar inflammation in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*, 9, 217-27.
- VALDIVIESO, Á. G., CLAUZURE, M., MASSIP-COPIZ, M. & SANTA-COLOMA, T. A. 2016. The Chloride Anion Acts as a Second Messenger in Mammalian Cells - Modifying the Expression of Specific Genes. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 38, 49-64.
- VAN MEER, G., VOELKER, D. R. & FEIGENSON, G. W. 2008. Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9, 112-24.
- VANKEERBERGHEN, A., CUPPENS, H. & CASSIMAN, J. J. 2002. The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator: an intriguing protein with pleiotropic functions. *J Cyst Fibros*, 1, 13-29.
- VERKADE, P. & SIMONS, K. 1997. Robert Feulgen Lecture 1997. Lipid microdomains and membrane trafficking in mammalian cells. *Histochem Cell Biol*, 108, 211-20.
- VERKMAN, P. M. H. A. S. 2009. Defective acidification as a cause of cystic fibrosis lung disease: reexamination of a recurring hypothesis. *American Journal of Physiology*, Vol.296.
- VERNOOIJ-VAN LANGEN, A., DOMPELING, E., YNTEMA, J. B., ARETS, B., TIDDENS, H., LOEBER, G. & DANKERT-ROELSE, J. 2015. Clinical evaluation of the Nanoduct sweat test system in the diagnosis of cystic fibrosis after newborn screening. *Eur J Pediatr*, 174, 1025-34.
- VERNOOIJ-VAN LANGEN, A. M., LOEBER, J. G., ELVERS, B., TRIEPELS, R. H., GILLE, J. J., VAN DER PLOEG, C. P., REIJNTJENS, S., DOMPELING, E., DANKERT-ROELSE, J. E. & GROUP, C. S. 2012. Novel strategies in newborn screening for cystic fibrosis: a prospective controlled study. *Thorax*, 67, 289-95.
- WAINWRIGHT, B. J., SCAMBLER, P. J., SCHMIDTKE, J., WATSON, E. A., LAW, H. Y., FARRALL, M., COOKE, H. J., EIBERG, H. & WILLIAMSON, R. 1985. Localization of cystic fibrosis locus to human chromosome 7cen-q22. *Nature*, 318, 384-5.
- WAINWRIGHT, C. E., ELBORN, J. S., RAMSEY, B. W., MARIGOWDA, G., HUANG, X., CIPOLLI, M., COLOMBO, C., DAVIES, J. C., DE BOECK, K., FLUME, P. A., KONSTAN, M. W., MCCOLLEY,

- S. A., MCCOY, K., MCKONE, E. F., MUNCK, A., RATJEN, F., ROWE, S. M., WALTZ, D., BOYLE, M. P., GROUP, T. S. & GROUP, T. S. 2015. Lumacaftor-Ivacaftor in Patients with Cystic Fibrosis Homozygous for Phe508del CFTR. *N Engl J Med*, 373, 220-31.
- WATERS, V. & SMYTH, A. 2015. Cystic fibrosis microbiology: Advances in antimicrobial therapy. *J Cyst Fibros*, 14, 551-60.
- WEI, L. Y., STUTTS, M. J., HOFFMAN, M. M. & ROEPE, P. D. 1995. Overexpression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in NIH 3T3 cells lowers membrane potential and intracellular pH and confers a multidrug resistance phenotype. *Biophys J*, 69, 883-95.
- WEILER, C. A. & DRUMM, M. L. 2013. Genetic influences on cystic fibrosis lung disease severity. *Front Pharmacol*, 4, 40.
- WILSCHANSKI, M. & DURIE, P. R. 1998. Pathology of pancreatic and intestinal disorders in cystic fibrosis. *J R Soc Med*, 91 Suppl 34, 40-9.
- WOJEWODKA, G., DE SANCTIS, J. B. & RADZIOCH, D. 2011. Ceramide in Cystic Fibrosis: A Potential New Target for Therapeutic Intervention. *Journal of Lipids*, 2011, 674968.
- WORLITZSCH, D., TARRAN, R., ULRICH, M., SCHWAB, U., CEKICI, A., MEYER, K. C., BIRRER, P., BELLON, G., BERGER, J., WEISS, T., BOTZENHART, K., YANKASKAS, J. R., RANDELL, S., BOUCHER, R. C. & DORING, G. 2002. Effects of reduced mucus oxygen concentration in airway Pseudomonas infections of cystic fibrosis patients. *J Clin Invest*, 109, 317-25.
- YOSHIMURA, K., NAKAMURA, H., TRAPNELL, B. C., CHU, C. S., DALEMANS, W., PAVIRANI, A., LECOCQ, J. P. & CRYSTAL, R. G. 1991. Expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene in cells of non-epithelial origin. *Nucleic Acids Res*, 19, 5417-23.
- ZEDEK, D., MORRELL, D. S., GRAHAM, M., GOODMAN, D. & GROBEN, P. 2008. Acrodermatitis enteropathica-like eruption and failure to thrive as presenting signs of cystic fibrosis. *J Am Acad Dermatol*, 58, S5-8.
- ZEMEL, B. S., JAWAD, A. F., FITZSIMMONS, S. & STALLINGS, V. A. 2000. Longitudinal relationship among growth, nutritional status, and pulmonary function in children with cystic fibrosis: analysis of the Cystic Fibrosis Foundation National CF Patient Registry. *J Pediatr*, 137, 374-80.
- ZHANG, Y., LI, X., GRASSMÉ, H., DÖRING, G. & GULBINS, E. 2010. Alterations in ceramide concentration and pH determine the release of reactive oxygen species by Cftr-deficient macrophages on infection. *J Immunol*, 184, 5104-11.

8 Erklärung zum Eigenanteil

Diese Arbeit wurde in der Kinderklinik der Universitätsklinikums Tübingen unter Betreuung von Dr. Hector, durchgeführt.

Die Studie wurde durch Prof. Dr. Riethmueller, Prof. Dr. Gulbins, Dr. Icheva, Dr. Engels konzipiert. Die Datenerhebung erfolgte durch mich und das Team des CPCS.

Die statistische Auswertung und die Erstellung der abgebildeten Diagramme erfolgten durch mich und Dr. Engels.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben, wörtlich sowie inhaltlich übernommene Textstellen als solche gekennzeichnet zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Berlin, den

Lea Alice Kiefer

9 Danksagung

Mein Herzlicher Dank gehört zuallererst Professor Dr. med. Joachim Riethmüller für die Überlassung des Themas sowie seiner ausgezeichneten Betreuung. Auch an erster Stelle herzlichen Dank an Herrn Dr. med. Andreas Hector für die genauso exzellente Weiterbetreuung nach dem tragischen Tod von Professor Dr. med. Joachim Riethmüller.

Weiterhin vielen Dank an Eva Freitag für die hervorragende Einarbeitung in die laboratorischen Untersuchungsabläufe sowie Viviane Bender und dem Team des CPCS für die wunderbare Zusammenarbeit. Großen Dank auch an Dr. rer. nat. Costja Adams, welcher mich stets im Labor unterstützte und bei Fragen weiterhalf.

Großen Dank gebührt selbstverständlich auch allen Patienten, ohne deren Teilnahme der Ablauf der Studie nicht möglich gewesen wäre.

Ebenso möchte ich meiner Familie und Freunden, ganz besonders Luisa Sauter danken, welche mich stets motiviert und unterstützt haben meine Dissertationsschrift zu verfassen.

Von Herzen danke ich mich außerdem meinen Eltern, welche mich mein ganzes Studium unterstützt, ermöglicht haben und auch die stetige Stütze im Leben sein werden.

Die Schlussworte gebühren noch einmal Professor Joachim Riethmüller, welcher viel zu früh von uns ging und uns allen hier als großartiger Arzt, sehr geschätzter Kollege und großartiger Mensch fehlt. Er wird für mich immer Vorbild bezüglich des Engagements für seine Patienten sein.

