

**Anti-inflammatorische pulmonale Therapie von  
CF-Patienten mittels Amitriptylin und Placebo -  
eine prospektive, randomisierte, doppel-verblindete, placebo-kontrollierte,  
multizentrische Phase IIb-Studie**

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

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

**vorgelegt von  
Lauer, Josefine Elisabeth Maria  
2015**

Dekan: Professor Dr. med. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: PD Dr. J. Riethmüller

2. Berichterstatter: Prof. Dr. P. Rosenberger

Meinen Eltern

**Abkürzungsverzeichnis**

A. fumigatus	Aspergillus fumigatus
Abb.	Abbildung
AC	Saure Ceramidase
AK	Antikörper
ASM	Saure Sphingomyelinase
ATP	Adenosintriphosphat
bzw.	beziehungsweise
CF	Zystische Fibrose (engl. cystic fibrosis)
CFTR	Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
CI	Konfidenzintervall
CNA-Agar	Colistin-Nalodixin-Säure-Agar
CRP	C-reaktives Protein
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
EKG	Elektrokardiogramm
Endo-Agar	Lactose-Fuchsin-Sulfit-Agar
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FEV <sub>1</sub>	Funktionelle Einsekundenkapazität
FIASMA	Functional inhibitors of acid sphingomyelinase
FVC	Funktionelle Vitalkapazität
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
H/S	HEPES/Saline
IL	Interleukin
IRT	Immunoreactive trypsinogen
ITT	Intention to treat
KBE	Kolonien bildende Einheit
MALDI	Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation

MEF	Maximal expiratory flow
ml	Milliliter
MRSA	Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
MW	Mittelwert
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PBS	Phosphate buffered saline
Pg	Pikogramm
PP	Per protocol
Rpm	Umdrehungen pro Minute
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SD	Standard deviation
<i>S. maltophilia</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
spp.	Species pluralis
Tab.	Tabelle
u.a.	unter anderem
vs.	versus

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Zystische Fibrose (CF)</b>	<b>1</b>
1.1.1 Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR)	2
1.1.2 Klinische Symptome und Verlauf	5
1.1.3 Diagnostik	8
1.1.4 Therapie	9
<b>1.2 CF-Lungenerkrankung</b>	<b>11</b>
1.2.1 Sonderstellung <i>P. aeruginosa</i>	11
1.2.2 Pathophysiologische Konzepte der CF-Lungenerkrankung	13
<b>1.3 Ceramid</b>	<b>16</b>
1.3.1 Stoffwechsel und zelluläre Funktion	16
1.3.2 Bildung von Ceramid-Makrodomänen und ihre Bedeutung	18
1.3.3 Potentielle Mechanismen der Ceramid-Akkumulation bei CF	19
1.3.4 Inhibition der Ceramid-Synthese im Mausmodell und ihre Auswirkungen	22
<b>1.4 Amitriptylin</b>	<b>24</b>
1.4.1 Amitriptylin in der klinischen Praxis	25
1.4.2 Amitriptylin und CF	28
<b>1.5 Klinische Studien zum Thema</b>	<b>31</b>
1.5.1 Pilotstudie mit Amitriptylin	31
1.5.2 Phase IIa-Studie (Sicherheit und Dosisfindung)	31
<b>1.6 Ziel und Inhalt der vorliegenden Arbeit: Phase IIb-Studie (Verifizierung des Wirkmechanismus)</b>	<b>32</b>
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>34</b>
<b>2.1 Studiendesign</b>	<b>34</b>
<b>2.2 Studienaufbau</b>	<b>35</b>
<b>2.3 Patienten</b>	<b>37</b>
2.3.1 Patientenkollektiv	37

2.3.2	Ein- und Ausschlusskriterien	37
2.3.3	Individuelle Abbruchkriterien	38
2.3.4	Begleitende Therapie	38
<b>2.4</b>	<b>Studienmedikation</b>	<b>38</b>
2.4.1	Prüfpräparat	39
2.4.2	Placebopräparat	39
2.4.3	Nebenwirkungen	39
<b>2.5</b>	<b>Zielparameter</b>	<b>39</b>
2.5.1	Primärer Zielparameter	40
2.5.2	Sekundäre Zielparameter	40
<b>2.6</b>	<b>Statistisches Verfahren</b>	<b>41</b>
<b>2.7</b>	<b>Studienbedingte klinische und laboratorische Untersuchungen</b>	<b>42</b>
2.7.1	Lungenfunktion (Spirometrie)	42
2.7.2	Gewicht	42
2.7.3	Vitalparameter	42
2.7.4	Elektrokardiogramm (EKG)	43
2.7.5	Blut (Serum)	43
2.7.6	Trachealsekret (Sputum)	43
2.7.7	Epithelzellen	43
2.7.8	Urin	44
<b>2.8</b>	<b>Labortechnische Verfahren</b>	<b>44</b>
2.8.1	Ceramidexpression	44
2.8.2	Zytokin-Assay	45
2.8.3	Mikrobiologie	48
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>51</b>
<b>3.1</b>	<b>Patienten</b>	<b>51</b>
<b>3.2</b>	<b>Primärer Zielparameter: FEV<sub>1</sub>-Differenz</b>	<b>53</b>
<b>3.3</b>	<b>Sekundärer Zielparameter: Ceramidexpression</b>	<b>55</b>
<b>3.4</b>	<b>Weitere sekundäre Zielparameter</b>	<b>56</b>
<b>3.5</b>	<b>Nebenwirkungen</b>	<b>59</b>

<b>4. Diskussion</b>	<b>62</b>
4.1 Patienten	63
4.2 Primärer Zielparameter: FEV <sub>1</sub> -Differenz	64
4.3 Sekundärer Zielparameter: Ceramidexpression	64
4.4 Weitere sekundäre Zielparameter	65
4.5 Nebenwirkungen	67
4.6 Schlussfolgerung und Ausblick	68
<b>5. Zusammenfassung</b>	<b>70</b>
<b>6. Literaturverzeichnis</b>	<b>72</b>
<b>7. Danksagung</b>	<b>80</b>



# 1. Einleitung

## 1.1 Zystische Fibrose (CF)

Zystische Fibrose (abgekürzt „CF“ von englisch *cystic fibrosis*) ist mit rund 200 Neuerkrankungen im Jahr eine der häufigsten autosomal-rezessiv vererbten Stoffwechselerkrankungen in Deutschland ([www.muko.info.de](http://www.muko.info.de)). Trotz intensiver Behandlung sterben die betroffenen Menschen frühzeitig, meist infolge der sich durch rezidivierende bakterielle Lungeninfektionen entwickelnden Lungeninsuffizienz. Die Lebenserwartung an CF erkrankter Menschen ist jedoch in den vergangenen Jahrzehnten, dank stetigem Erkenntnisgewinn bezüglich molekularbiologischer Ursachen und die sich daraus entwickelten neuen Therapieansätzen, enorm gestiegen. Sie beträgt heute laut des Qualitätssicherungsberichts Mukoviszidose 2013 im Durchschnitt 42 Jahre (Sens et al. 2013). Während erkrankte Patienten vor zwei Jahrzehnten im Jugendalter starben, kann man mittlerweile davon ausgehen, dass ein heute mit CF geborenes Kind 50 Jahre und älter werden kann (Dodge et al. 2007). Zu dieser positiven Entwicklung trägt zudem die Möglichkeit des Neugeborenen**screenings** bei, welches eine sehr frühe Diagnose und konsekutiv eine frühzeitige Behandlung ermöglicht (Sims et al., 2007).

CF ist eine Erkrankung vornehmlich der kaukasischen Bevölkerung. In der EU und den USA ist 1 von 2500 Kindern betroffen (Ratjen et al., 2003). Mit einem Gefälle in Richtung Südost tritt sie Schätzungen zufolge in Japan beispielsweise noch mit einer Inzidenz von 1 zu 350 000 auf (Yamashiro et al., 1997).

**Tab. 1.1:** Ethnische Zugehörigkeit der CF-Patienten in Deutschland

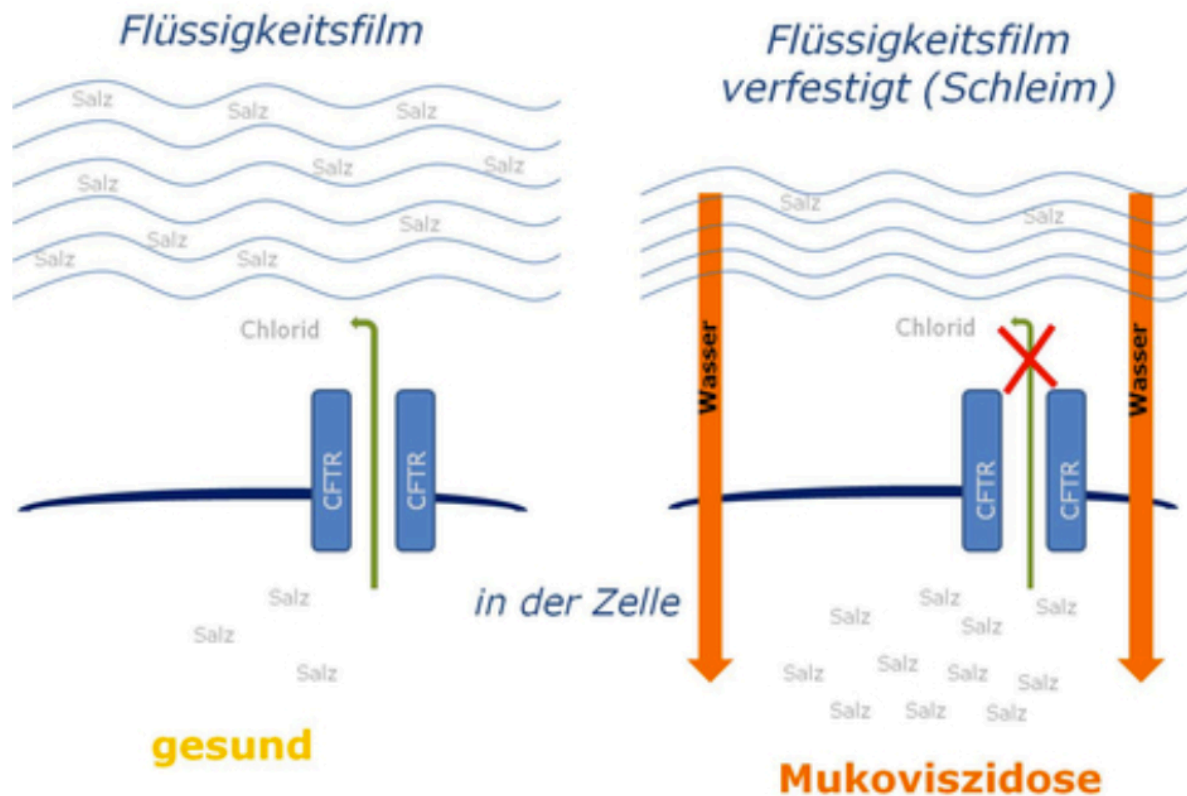
(Berichtsband Qualitätssicherung Mukoviszidose 2012)

	<b>Patienten (n)</b>	<b>Relativer Anteil (%)</b>
<b>Kaukasisch</b>	8.292	91,5
<b>Türkisch</b>	284	3,1
<b>Asiatisch</b>	14	0,2
<b>Afrikanisch</b>	14	0,2
<b>Andere</b>	27	0,3
<b>Ohne Angaben</b>	427	4,6
<b>Gesamt</b>	<b>9.058</b>	<b>100,0</b>

### 1.1.1 Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR)

CF liegt die Mutation eines Gens zugrunde, welches für CFTR, ein vornehmlich als Chloridkanal fungierendes Protein, kodiert wird. Das CFTR-Molekül wird in verschiedenen Geweben exprimiert. Es findet sich hauptsächlich in der apikalen Epithelzellmembran exokriner Drüsen, wo es Chloridionen aus der Zelle hinaus transportiert. Bei einem Gendefekt wird CFTR entweder nicht exprimiert oder die Anionenkanäle weisen je nach Mutation mehr oder weniger gravierende Funktionsdefizite auf. Die Konsequenz ist eine ungleiche Ionenverteilung über die Zellmembran, das heißt, es befinden sich viele Ionen in der Zelle und wenige im Sekret. Dem Sekret wird aufgrund der in einer Zelle herrschenden osmotischen Kräfte Wasser entzogen, sodass das von den mukösen Drüsen abgesonderte Sekret zähflüssig wird. Die Ausführungsgänge der Drüsen verstopfen und atrophieren langfristig. Die Auswirkung zeigt sich insbesondere im Respirationstrakt in Form von rezidivierenden Lungenentzündungen, im Gastrointestinaltrakt durch Malnutrition und Pankreasinsuffizienz, als auch in gestörter Fertilität und veränderter Schweißsekretion. Im Deutschen trägt die Krankheit aus diesem Grund auch den Namen „Mukoviszidose“ (von lat. *mucus*=Schleim und *viscidus*=zäh, klebrig).

Der CFTR-Chloridkanal befindet sich auch in Endothelzellen, Makrophagen und Lymphozyten, sowie in der Membran intrazellulärer Organellen (Becker et al., 2009).



**Abb. 1.1:** Veränderung des Flüssigkeitsfilms bei genetisch defektem CFTR-Kanal

Bei defektem CFTR-Kanal, wie es bei Mukoviszidose der Fall ist, ist der Chloridtransport aus der Zelle gestört, sodass sich Salz in der Zelle ansammelt. Das Wasser diffundiert passiv über die Zellmembran, um den Ionenkonzentrationsunterschied innerhalb und außerhalb der Zelle auszugleichen (Osmose). Der salzarmen Schleimhaut an der Zelloberfläche wird somit Wasser entzogen, sodass der Flüssigkeitsfilm trockener wird und sich zu zähem Schleim verfestigt (rechtes Bild) ([www.muko.info.de](http://www.muko.info.de)).

Neben seiner Hauptfunktion als Chloridkanal werden dem CFTR-Molekül vielfältige regulatorische Funktionen zugeschrieben, unter anderem beim epithelialen Natriumtransport, bei der Steuerung von ATP-Kanälen, der Regulierung des intrazellulären Vesikeltransports, der Steuerung anderer Chloridkanäle und der Ansäuerung intrazellulärer Organellen (Schwiebert et al., 1995; Stutts et al., 1995; Vankeerberghen et al., 2002; Barasch et al., 1991). Letztere Funktion, im Speziellen bei der Regulation des pH-Milieus in Lysosomen, ist für das Verständnis der vorliegenden Arbeit von besonderer Bedeutung und wird in Kapitel 1.4.3 erklärt.

Seit der Entdeckung 1998 (Kerem et al., 1998; Riordan et al., 1998) sind mittlerweile über 1950 verschiedene Mutationen im CFTR-Gen bekannt (Fanen et al., 2014), nur wenige sind darunter jedoch von funktioneller Relevanz (siehe Tabelle 1.2). Die häufigste Mutation trägt den Namen Phe508del und bezeichnet das Fehlen der Aminosäure Phenylalanin an Position 508 am langen Arm des Chromosoms 7 (Locus7q31.2). Die genetische Störung gehört zur Mutationsklasse II, das heißt, der Transport des Proteins ins Endoplasmatische Retikulum, wo die Prozessierung stattfindet, ist gestört. Phe508del ist verantwortlich für circa zwei Drittel aller Mukoviszidose-Fälle in Nordeuropa und den USA (O'Sullivan et al., 2009). Zwar variiert die vorherrschende CF-Mutation innerhalb der kaukasischen Bevölkerung, keine andere Genveränderung kommt jedoch mit einer Häufigkeit von mehr als 5% vor (Lao et al., 2003).

**Tab. 1.2:** Mutationshäufigkeit in Deutschland

(Berichtsband Qualitätssicherung Mukoviszidose 2011)

	Häufigkeit (n)	Relative Häufigkeit (%)
ΔF508	8.910	67,5
G551D	196	1,4
G542X	212	1,6
R553X	240	1,8
W1282X	62	0,5
R347P	139	1,0
N1303K	223	1,7
dI507	19	0,1
1717-1G → A	94	0,7
A455E	12	0,1
S549N	3	<0,1
621+1G → T	21	0,2
R117H	64	0,4
2184dA	23	0,2
R1162X	39	0,3
3849+10Kb c → T	101	0,7
Andere	1.167	8,8
Nicht identifiziert	1.606	12,1
Gesamt	13.206	100,0

### 1.1.2 Klinische Symptome und Verlauf

Der klinische Verlauf und die Ausprägung der Symptome sind individuell sehr verschieden und hängen von der Art der Genmutation ab. Alle Organe, in denen der CFTR-Kanal vorkommt, sind potentiell betroffen. Es handelt sich dabei insbesondere um Lunge und Bronchien, Bauchspeicheldrüse und Darm, Leber und Gallenwege, Haut und Geschlechtsorgane.

### 1.1.2.1 Gastrointestinale Symptome

In mehr als 10% der Fälle fallen betroffene Kinder bereits im Neugeborenenalter durch einen Mekoniumileus auf, das heißt einen obstruktiven Darmverschluss, ausgelöst durch den ersten zähen Stuhl (Rosenstein et al., 1980). Auch können bei Neugeborenen ein verzögerter Abbau des Bilirubins, eine so genannte prolongierte Hyperbilirubinämie und selten intestinale Verschlüsse oder Fehlanlagen, welche als Atresien bezeichnet werden, ein Hinweis auf die Erkrankung sein. Die meisten Kinder (85-90%) zeigen jedoch spätestens während des ersten Lebensjahres Symptome der Mukoviszidose: Fettstühle, Flatulenz und Gedeihstörungen sind Zeichen einer Pankreasinsuffizienz. Das verdauungsenzymhaltige Pankreassekret wird bei einem CFTR-Defekt zähflüssig und ist Ursache für die Obstruktion der Ausführungsgänge mit konsekutivem Selbstverdau des Organs. Damit ist zum einen die exokrine Funktion der Bauchspeicheldrüse gestört mit der Folge, dass keine Verdauungsenzyme mehr im Darm ankommen, zum anderen wird nach und nach auch die endokrine Funktion beeinträchtigt. 40-50% der Erwachsenen mit CF entwickeln durch den Untergang der hormonproduzierenden Langerhans-Inseln einen so genannten *Cystic fibrosis-related diabetes mellitus* (CFRD) (Moran et al., 2009).

Während Mangelernährung ursprünglich hauptverantwortlich für die hohe Sterblichkeit im Säuglingsalter war, ist dieses Problem heute dank Pankreasenzym- und Vitaminersatz therapierbar geworden (Borowitz et al., 2002). Die Aufnahme von fettlöslichen Vitaminen (Vitamine A, D, E und K) ist dennoch gestört, was zu diversen Folgeerscheinungen wie Akrodermatitis, Anämie, Neuropathie, Blutungsneigung und Osteoporose führen kann.

Eine weitere Belastung, insbesondere für ältere Patienten, stellt eine chronische Obstipation bis hin zur intestinalen Obstruktion dar. Ursächlich dafür sind ein eingedickter Darminhalt und eine herabgesetzte Darmmotilität aufgrund zu geringer Lipasesubstitution.

Der CFTR-Kanal befindet sich auch in den intrahepatischen Gallenwegen, weshalb circa 5% der Patienten infolge einer Gallenwegsobstruktion eine Leberzirrhose entwickeln (Wilschanski et al., 2007).

### 1.1.2.2 Fortpflanzung

Männliche Patienten mit klassischer CF sind in 95% der Fälle infertil. Ursache ist eine kongenitale, bilaterale Aplasie des *Ductus deferens*. Die Spermienproduktion ist jedoch vorhanden und eine Vaterschaft durch künstliche Befruchtung somit möglich. Die Potenz ist nicht eingeschränkt, sodass ein normales Sexualleben möglich ist. Frauen sind von der Infertilität kaum betroffen.

### 1.1.2.3 Pulmonale Symptome

Auch wenn obige Symptome bereits eine deutliche gesundheitliche Einschränkung für die Patienten bedeuten, stehen die Auswirkungen der Stoffwechselerkrankung auf den Respirationstrakt im Vordergrund der Erkrankung. Der von den Drüsen im Bronchialsystem produzierte zähflüssige Schleim kann vom Flimmerepithel der Trachea und Bronchien nur schwer abtransportiert werden, sodass die Patienten häufig einen chronischen Husten und so genannte Bronchiektasien entwickeln. Der festgesetzte Schleim stellt einen guten Nährboden dar, in welchem sich Bakterien und Pilze festsetzen und rezidivierende, oft schwere und chronische Lungeninfektionen auslösen. Einen besonderen Stellenwert hat hier *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), welcher bei circa 80% aller CF-Patienten im Alter über 25 Jahren zu finden ist und mit hauptverantwortlich für die Degeneration der Lunge ist. Neben *P. aeruginosa* sind *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Burkholderia cepacia* und *Stenotrophomonas maltophilia* als häufige Krankheitserreger zu nennen, so wie *Candida spp.* und *Aspergillus fumigatus* (<http://www.cff.org>). Der chronische Entzündungszustand der Lunge führt zu einem fibrotischen Umbau der Lunge und folglich zu einer zunehmenden Lungeninsuffizienz.

Zusammenfassend stellen die akuten und chronischen Beeinträchtigungen der Lunge bei CF die vorherrschende Ursache für Hospitalisation und frühzeitigen Tod dar (Ziobro et al., 2013).

Die pathophysiologischen Ursachen der hohen Infektanfälligkeit der Lunge bei CF – insbesondere gegenüber *P. aeruginosa* – sind derzeit noch unklar und Gegenstand aktueller Forschung. Die wichtigsten Hypothesen hierzu sind im Kapitel „1.3 CF-Lungenerkrankung“ zusammengefasst.

### 1.1.3 Diagnostik

Zur Sicherung der Diagnose „Zystische Fibrose“ werden drei diagnostische "Bausteine" herangezogen: das Vorhandensein klinisch-phänotypischer Merkmale der Krankheit, positive laboratorisch-biochemische Tests und die genetische Untersuchung zum Beweis einer CFTR-Dysfunktion (Farrell et al., 2008).

Bei einer nachgewiesenen pathogenen Mutation im CFTR-Gen und zwei positiv ausfallenden Schweißtests kann bei CF-typischen Symptomen die Diagnose einer CF gestellt werden. Bei dem sogenannten Schweißtest handelt es sich um einen Test, welcher mittels Pilocarpin-Iontophorese den Chloridgehalt im Schweiß ermittelt. Bei Patienten mit Mukoviszidose wird im Vergleich zu Gesunden eine erhöhte Salzkonzentration im Schweiß gefunden, dabei gilt eine Chloridkonzentration von  $>60$  mmol/l als eindeutig pathologisch. Für Kinder unter sechs Monaten ist eine Chloridkonzentration von  $>30$  mmol/l für die Diagnose relevant, für ältere Kinder und Erwachsene spricht eine Konzentration von  $>40$  mmol/l für das dringende Vorliegen der Stoffwechselerkrankung (LeGrys et al., 2007). Seit der Standardisierung des Tests durch Gibson und Cooke (Gibson et al., 1959) stellt der Schweißtest den Goldstandard in der CF-Diagnostik dar, seine Durchführung und Aussagekraft wird jedoch laufend weiterentwickelt (Collie et al., 2014). Beweisend für die Erkrankung ist letztlich aber die positive Mutationsanalyse.

Eine weitere wichtige Diagnostikmethode ist das Neugeborenen*screening*. Dieses basiert auf einer quantitativen Analyse von immunreaktivem Trypsinogen (IRT) im Blut. Dieses pankreatische Enzym ist bei einer Schädigung der Bauchspeicheldrüse im Blut erhöht und deutet zunächst auf ein erhöhtes Risiko für die Erkrankung an CF hin. Zur Bestätigung der Verdachtsdiagnose muss daher ein Schweißtest angeschlossen werden. Routinemäßig wird das Neugeborenen*screening* erst in den Ländern Frankreich, Österreich, den Niederlanden, Polen und der Schweiz durchgeführt. Die Einführung eines deutschlandweiten Neugeborenen*screenings* wird derzeit im Gemeinsamen Bundesausschuss diskutiert (Nährlich et al., 2013).



### 1.1.4 Therapie

Dank sich laufend verbessernder Behandlungsmöglichkeiten ist die mittlere Lebenserwartung bei CF in den vergangenen vier Jahrzehnten, wie in Kapitel 1.1 beschrieben, drastisch gestiegen (Dodge et al., 2007). Dennoch stirbt die Mehrheit der Patienten nach wie vor an den Folgen der Lungeninsuffizienz. Der Schwerpunkt der CF-Therapie liegt daher darin, die Funktion der Lunge möglichst gut zu erhalten und damit die Entwicklung der Lungenerkrankung zu verlangsamen.

Grundpfeiler der Lungentherapie sind zum einen die Elimination des zähen Bronchialschleims mit Hilfe physiotherapeutischer Techniken, verschiedener sekretolytischer Inhalationstherapien und Drainageverfahren, zum anderen die gezielte antibiotische und anti-inflammatorische Behandlung der chronischen sowie akuten Atemwegsinfektionen.

Die Inhalationstherapie gewinnt unter den oben aufgeführten Therapiemöglichkeiten immer mehr an Bedeutung, da die auf die Lunge wirkenden Medikamente hochdosiert lokal appliziert werden können, ohne den restlichen Organismus zu belasten. Neben schleimlösenden (insbesondere DNase, hypertone Kochsalzlösung, Mannitol) und bronchienerweiternden ( $\beta$ -Sympathomimetika) Substanzen, kommen auch entzündungshemmende (Ibuprofen und Cortison) und inhalativ-antibiotische Medikamente zum Einsatz.

Zur Behandlung von chronischen *P. aeruginosa*-Infektionen werden beispielsweise die Antibiotika Tobramycin, Colistin und Aztreonam angewandt. Da nicht alle Antibiotika inhalativ verfügbar sind, wird die Inhalationstherapie häufig mit oralen Antibiotika kombiniert. Für die Behandlung akuter pulmonaler Exazerbationen hat sich darüber hinaus eine prinzipiell aggressive Therapie mittels intravenöser Applikation bewährt (O'Sullivan et al., 2009). Mehrere Untersuchungen zeigten unter Anwendung einheitlicher Standards (in der Regel eine Kombination aus einem  $\beta$ -Lactam und einem Aminoglycosid) eine positive Auswirkung auf Lungenfunktion und Lebenserwartung (Johnson et al., 2003; Smyth et al., 2008; Kraynack et al., 2007; Döring et al., 2000).

In Phasen starker Lungenfunktionseinschränkung mit Sauerstoffunterversorgung kann eine nicht-invasive Beatmung mittels Gesichtsmaske eingesetzt werden.

Eine Lungentransplantation ist als letzte Therapiemöglichkeit im Endstadium der CF-Lungenerkrankung in Betracht zu ziehen. Diese Option trägt das Potential einer deutlichen Verbesserung der Lebensqualität, die Operation birgt jedoch auch hohe Risiken, sodass die Entscheidung von vielen Aspekten abhängig gemacht und innerhalb des Versorgerteams gut diskutiert werden muss (Liou et al., 2007; Egan et al., 2008; Aurora et al., 2008). Die 5-Jahres-Überlebensrate nach Transplantation liegt bei Kindern unter 50%, bei Erwachsenen über 50%. Laut des *Registry of the International Society of Heart and Lung Transplantation 2007* sind über die Hälfte der Organempfänger 6 Jahre nach einer Lungentransplantation noch am Leben (Goldberg et al., 2007; Trulock et al. 2007).

Aufgrund eines Missverhältnisses zwischen gesteigertem Energiebedarf einerseits und gestörter Energiezufuhr andererseits, entsteht häufig ein Zustand der Mangelernährung. Als weiteren essentiellen Bestandteil der CF-Therapie ist daher die Ernährung der Patienten zu nennen, da der Ernährungszustand der Patienten eine entscheidende Rolle für die Entwicklung der Lungenerkrankung und letztlich die Lebenserwartung (Corey et al., 1988; Peterson et al., 2003) spielt. Neben einer vollwertigen, fetthaltigen Kost ist auf eine ausreichende Flüssigkeitszufuhr und einen Ausgleich des gesteigerten Salzverlustes zu achten. Bei Funktionsverlust der Bauchspeicheldrüse werden zu jeder Mahlzeit Verdauungsenzyme (Lipasen) eingenommen und die fettlöslichen Vitamine durch Vitaminpräparate ersetzt.

Bis vor zwei Jahren beschränkte sich die Behandlung der CF auf eine rein symptomatische Therapie. Seit 2012 ist das erste Medikament (Ivacaftor) zugelassen, welches durch Aktivierung des Chloridkanals den Salz-Wasser-Haushalt korrigiert und damit eine kausale Wirkungsweise hat (Whiting et al., 2014). Dieses Medikament wirkt jedoch nur bei Patienten, welche eine G551D-Mutation haben. Weitere mutationsspezifische Substanzen zur Korrektur und Potenzierung der Kanalfunktion sind in der Entwicklung (Fanen et al., 2014, Sermet-Gaudelus et al., 2013). Eine Heilung der Krankheit durch Gentherapie wird bislang nur experimentell erforscht (O'Sullivan et al. 2009; Walshaw, 2014).

Die erfolgreiche Behandlung der Mukoviszidose erfordert ein akribisches Management. Sie setzt das Mitwirken eines multiprofessionellen Teams voraus und fordert die

tägliche Bereitschaft und Motivation des Patienten und seines Umfeldes, die therapeutisch notwendigen Maßnahmen einzuhalten. Um eine engmaschige Überwachung des Krankheitsverlaufs zu gewährleisten, ist die Angliederung an ein CF-Zentrum oder eine Spezialambulanz vom Zeitpunkt der Diagnosestellung an von großer Wichtigkeit.

### 1.2 CF-Lungenerkrankung

In den nächsten Abschnitten soll genauer auf die pathophysiologischen Mechanismen eingegangen werden, welche CF als Lungenerkrankung zugrunde liegen. In diesem Zusammenhang werden zunächst die Besonderheiten von *P. aeruginosa* als opportunistischem, also einen für CF typischen, respiratorischen Keim dargestellt.

#### 1.2.1 Sonderstellung *P. aeruginosa*

*P. aeruginosa* (von lat. aerugo=Grünspan) ist ein grampositives, oxidasenegatives, stäbchenförmiges Bakterium. Die Namensgebung nimmt Bezug auf die grün-blaue Färbung des Eiters bei durch *P. aeruginosa* ausgelösten Infektionskrankheiten.

*P. aeruginosa* ist ein weit verbreiteter Nasskeim. Man findet ihn in feuchten Böden und Oberflächengewässern, sowie in sanitären Anlagen wie Toiletten, Duschen, Spülmaschinen und Waschbecken. Da er trotz spezifischer Behandlung auch in destilliertem Wasser, in Medikamenten, Dialysegeräten und selbst in Desinfektionsmittel überleben kann, spielt er eine bedeutende Rolle als Krankenhauskeim. Als nosokomialer Keim ist er für 10 % aller im Krankenhaus erworbener Infektionen verantwortlich und folglich für immungeschwächte bzw. immunsupprimierte Patienten besonders gefährlich. Neben Pneumonien kann er zu einer Vielzahl von Krankheiten führen, darunter Meningitis, Otitis externa („swimmer’s ear“), Enterokolitis, Harnwegs- und Wundinfektionen.

Seine Pathogenität beruht unter anderem auf seiner Fähigkeit zur Hämolyse und der Eigenschaft Pathogenitätsfaktoren wie Exotoxin A, Exoenzym S und U zu produzieren. Seine Elimination aus dem Respirationstrakt wird zudem erschwert durch Haftfimbrien,

welche es dem Bakterium ermöglichen, sich an Oberflächen festzusetzen. Zusätzlich bildet es eine kapselähnliche Hülle (Alginate), welches den Erreger vor Phagozyten und Antikörpern schützt.

*P. aeruginosa* nimmt bei der Erkrankung CF eine Sonderstellung ein, da sich nahezu alle Betroffenen im Verlauf mit diesem „Problemkeim“ infizieren. Burns und Kollegen zeigten, dass 98% der an CF erkrankten Kinder bereits im Alter von 3 Jahren eine serologische oder kulturelle Besiedelung mit *P. aeruginosa* hatten (Burns et al., 2001). Eine Chronifizierung erfolgt in der Regel rasch und führt langfristig zu irreversiblen sackförmigen Ausweitungen der Bronchien (Bronchiektasien) und fibrotischem Gewebeumbau. Lungenobstruktion und Lungenversagen sind noch immer für mindestens 80 % der CF-assoziierten Todesfälle verantwortlich (<http://www.cff.org>).

Durch den kombinierten Einsatz oraler, intravenöser und inhalativer Antibiotika ist meist eine vorübergehende Elimination des Bakteriums möglich (vergleiche 1.1.4), der vermehrte Einsatz von antibakteriellen Substanzen hat jedoch zur Entwicklung zahlreicher Resistenzen geführt und folglich eine immer „aggressivere“ und hochdosiertere Therapie notwendig gemacht (Döring et al., 2004). Für eine erfolgreiche Eradikation der pulmonalen *P. aeruginosa*-Besiedelung kommt erschwerend hinzu, dass in fortgeschrittenem Krankheitsstadium der Anteil minderbelüfteter Lungenareale zunimmt und sich damit die Angriffsfläche für inhalative Antibiotika verringert.

In Anbetracht dieser für die Bakterienbekämpfung einschränkenden Umstände wäre eine Behandlungsoption von großem Interesse, welche die Möglichkeit hätte, die Infektionsanfälligkeit gegenüber *P. aeruginosa* zu reduzieren.

Die Behandlung von CF-Patienten mit Amitriptylin, wie es in vorliegender Phase IIb - Studie erprobt wird, verfolgt diesen neuen Ansatz.

### **1.2.2 Pathophysiologische Konzepte der CF-Lungenerkrankung**

In der Lunge von CF-Patienten bilden sich durch die Schleimmengen sauerstoff-unterversorgte Areale, wodurch ideale Bedingungen für das Wachstum von *P. aeruginosa* gegeben sind. (Worlitzsch et al., 2002). Darüber hinaus sind die Abwehrmechanismen bei CF aus verschiedenen, teils angeborenen Gründen beeinträchtigt bzw. verändert. Die genauen pathogenetischen Zusammenhänge von CF-Erkrankung und enormer Anfälligkeit gegenüber *P. aeruginosa* sind jedoch noch unklar und Gegenstand kontinuierlicher gegenwärtiger Forschung.

Die wichtigsten Forschungsansätze werden im Folgenden zusammengefasst.

#### **1.2.2.1 Reduktion der Mukoziliären Clearance**

Eine Hypothese geht davon aus, dass durch die hohe Viskosität des Bronchialschleims die mukoziliäre *Clearance* der Lunge herabgesetzt wird. Dies bedeutet, dass für die Zilien des Lungenepithels der Transport des Sekrets aus der Lunge deutlich erschwert wird, sodass eine Mukusschicht zurück bleibt. Dies wiederum wird als Ursache für die rezidivierenden Infektionen diskutiert, da opportunistische Keime wie *P. aeruginosa* nicht mehr gerichtet mit dem Schleim eliminiert werden können, sondern sich stattdessen in diesem rasch vermehren. Förderlich für das ungestörte Wachstum von *P. aeruginosa* ist in diesem Zusammenhang die Entstehung von so genannten hypoxischen Nischen, welche ideale Lebensbedingungen für den Keim schaffen. Untersuchungen der Mukoziliären *Clearance* bei CF-Patienten lassen jedoch Fragen offen (Döring et al., 2009).

#### **1.2.2.2 Gestörte intrazelluläre Aufnahme von *P. aeruginosa***

Experimentelle Untersuchungen von Pier und Kollegen führten zu der Erkenntnis, dass das CFTR-Molekül eine Rolle bei der Aufnahme von *P. aeruginosa* in die Epithelzelle und damit für den intrazellulären Abbau des Erregers spielt (Pier et al., 1996). Sie konnten nachweisen, dass Lipopolisaccharide der äußeren Membran von *P. aeruginosa* an eine Sequenz bestehend aus 16 Aminosäuren (AA 103-117) des CFTR-Moleküls binden und damit die Internalisierung des Erregers in Epithelzellen ausgelöst wird. Bei defektem CFTR-Molekül ist dieser Weg der Eliminierung des Erregers gestört, und *P. aeruginosa* kann sich im Bronchiallumen vermehren (Pier et al., 2002). Die

Bedeutung dieser Hypothese ist jedoch noch nicht gänzlich geklärt, da in Folgestudien an CFTR-defizienten Mäusen gezeigt werden konnte, dass bestimmte *P. aeruginosa*-Stämme auch unabhängig von CFTR aufgenommen werden können (Schroeder et al., 2001).

### **1.2.2.3 Eingeschränkte Funktionsfähigkeit von Defensinen**

Eine Störung der CFTR-Kanalfunktion führt zu einer erhöhten Salzkonzentration im Bronchiallumen. Nach Goldman und Kollegen könnte diese Ionenverschiebung Ursache für eine eingeschränkte Funktionsfähigkeit von Defensinen (der Abwehr mikrobieller Erreger dienende Peptide) sein und wäre somit eine weitere Erklärung für die reduzierte Infektabwehr des Respirationstrakts (Goldman et al., 1997).

### **1.2.2.4 Gestörtes CD95-Rezeptor/CD95-Liganden-System**

Weiter führten Untersuchungen der Arbeitsgruppe um Grassmé zu Erkenntnissen bezüglich der herausragenden Rolle von CD95 bei der Induktion von Apoptose durch *P. aeruginosa*. Sowohl in vitro als auch in vivo konnte gezeigt werden, dass Pseudomonaden über ein endogenes CD95-Rezeptor/CD95-Liganden-System den Zelluntergang von infizierten Epithelzellen induzieren und damit für eine rasche Beendigung der Infektion sorgen (Grassmé et al., 2000). Bei Cystischer Fibrose ist dieser Mechanismus gestört. Anderen Untersuchungen zufolge kann darüber hinaus bestimmten genetischen Varianten des CD95-Rezeptors eine modulierende Rolle für die Manifestation von CF zugeschrieben werden (Kumar et al. 2008).

### **1.2.2.5 Reduzierte Aktivität lysosomaler Enzyme**

Ein weiterer Ansatzpunkt ist die Beobachtung, dass CFTR an der Ansäuerung des phagolysosomalen pH-Milieus beteiligt ist. Ein saures Milieu ist Voraussetzung für die optimale Aktivität der lysosomalen Enzyme in Makrophagen und Epithelzellen und damit entscheidend für den erfolgreichen Abbau phagozitierten Bakterien durch diese. In CF-Zellen ist die Enzymaktivität durch Verschiebung des pHs ins Alkalische reduziert und damit der optimale Abbau der Bakterien eingeschränkt (Barasch et al., 1991). Diese Hypothese wird jedoch noch kontrovers diskutiert (Haggie PM et al., 2007).

Weitere Auswirkungen der pH-Veränderung bei defekter CFTR-Funktion werden unter 1.3.3 im Zusammenhang mit Ceramiden diskutiert.

### **1.2.2.6 Ungleichgewicht von pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen**

Basierend auf Studien der letzten Jahre wird als eine der Hauptursachen für die hohe Infektanfälligkeit gegenüber *P. aeruginosa* ein intrabronchiales Ungleichgewicht pro- zu anti-inflammatorischer Zytokine diskutiert. In vitro als auch im Mausversuch konnte gezeigt werden, dass CFTR-defiziente Zellen des Respirationstraktes unter einer *P. aeruginosa*-Infektion im Vergleich zu gesunden Kontrollzellen vermehrt proinflammatorische Zytokine freisetzen, im Konkreten Interleukin (IL)-1, IL-8/KC, TNF-alpha und Mip-2 (Tirouvanziam et al., 2000; Heeckeren et al., 1997; Schultz et al., 2002). Die erhöhten proinflammatorischen Zytokine führen zu einer gesteigerten Aktivierung von NF-κB, was wiederum Inflammationsprozesse in Gang setzt.

Interessant ist hierbei die Beobachtung, dass IL-1 und IL-8/KC bei nicht-infizierten CF-Mäusen im Vergleich zu Mäusen ohne CF bereits vor einer Bakterieninfektion erhöht sind (Tabary O et al., 2001; Inoue et al., 1994), während IL-10, ein anti-inflammatorisch wirkendes Zytokin, sowohl unter basalen Bedingungen als auch nach Infektion mit *P. aeruginosa* unterhalb der Kontrollwerte liegt (Venkatakrishnan et al., 2000). Diese These, dass eine veränderte Konstitution des Immunsystems bei CF bereits angeboren ist, wird gestützt durch Untersuchungen an Neugeborenen und abortierten Feten mit CF, bei welchen in der bronchialen Lavage ebenfalls schon vor einer ersten nachweisbaren Infektion erhöhte Zytokinlevel als auch große Mengen neutrophiler Lymphozyten gefunden wurden (Khan et al., 1995).

### **1.2.2.7 Peribronchiale Akkumulation von DNA**

Eine andere Studie an Mäusen zeigte eine peribronchiale Akkumulation von DNA (Lethem et al., 1990; Teichgräber et al., 2008). Dieser Befund wird diskutiert als Folge des hohen Zelluntergangs von Epithel- und Abwehrzellen im Respirationstrakt. Eine DNA-Ansammlung kann wiederum zu einer Erhöhung der Schleimviskosität beitragen und damit zur Reduktion der Mukoziliären Clearance. Dieser Ansatz würde auch erklären, weshalb die Inhalation von Pulmozyme<sup>®</sup>, einer DNase (DNA-verdauende Substanz), eine effektive Behandlung bei CF darstellt (Fuchs et al., 1994). Darüber

hinaus ist davon auszugehen, dass die intraluminalen DNA-Fragmente als molekulare Bindungsstrukturen für *P. aeruginosa* dienen.

### **1.2.2.8 Epitheliale Ceramidakkumulation**

Für den Pathomechanismus der DNA-Freisetzung und ihre Konsequenzen sprechen auch die Daten von Teichgräber und Kollegen. Seine Arbeitsgruppe konnte an CFTR-defizienten Mäusen zeigen, dass eine Kanaldysfunktion zu einer Ceramidakkumulation in Epithelzellen des Tracheobronchial- und Intestinaltrakts führt (Teichgräber et al., 2008). Die folgenden Kapitel widmen sich der Entstehung dieser Ceramidansammlungen und ihrer Bedeutung für die Entwicklung der gravierenden Lungenveränderungen bei CF.

## **1.3 Ceramid**

Jüngste Forschungsdaten führten zu der Erkenntnis, dass Sphingolipide, im speziellen Ceramid, eine entscheidende Rolle für die pathophysiologischen Zusammenhänge bei CF spielen. Darauf soll im Nachfolgenden eingegangen werden.

Es konnte gezeigt werden, dass sich sowohl in Makrophagen als auch in Epithelzellen des Respirationstraktes CFTR-defizienter Mäuse Ceramid anhäuft, welches für verschiedene zellschädigende Wirkungen verantwortlich gemacht werden kann (Teichgräber et al., 2008; Becker et al., 2010; Zhang et al., 2010). Die Akkumulation von Ceramid bei Menschen mit CF und seine Bedeutung für die Entwicklung der Lungenerkrankung konnte kürzlich unabhängig von den einzelnen Arbeitsgruppen bestätigt werden (Brodie et al., 2010; Bodas et al., 2010, Bodas et al., 2011).

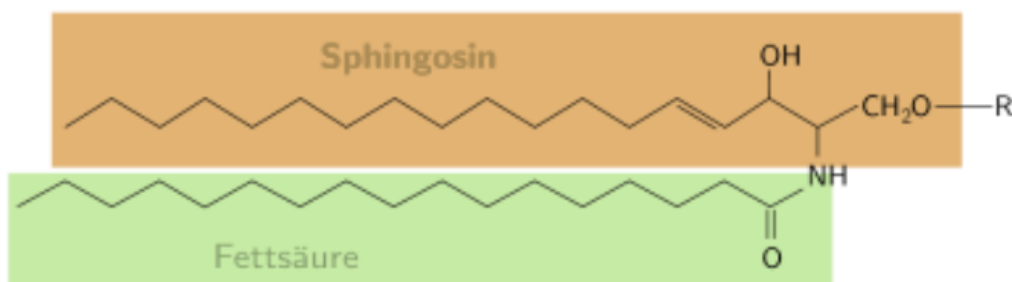
### **1.3.1 Stoffwechsel und zelluläre Funktion**

Vereinfachend dargestellt besteht die Biomembran eukaryoter Zellen im Wesentlichen aus einer Lipiddoppelschicht, welche sich aus amphiphilen Phospholipiden und Sphingolipiden und Cholesterol zusammensetzt (Hakomori, 1983). Die jeweils



hydrophilen Anteile richten sich in dieser Doppelschicht nach außen, während die hydrophoben Anteile (meist Kohlenstoffwasserketten) nach innen gerichtet sind.

Sphingolipide kommen in der Biomembran mit einem Anteil von 1-2 % vor. Ihr Grundgerüst bildet Sphingosin, ein ungesättigter Aminoalkohol, der über eine Doppelbindung zum einen mit einem langen Kohlenstoffschwanz und zusätzlich über die C2-Amingruppe mit Fettsäuren unterschiedlicher Länge verbunden ist (vergleiche Abbildung 1.2). Sphingolipide lassen sich nach dem an der C1-Hydroxy-Gruppe hängenden Rest „R“ in verschiedene Gruppen einteilen: Ceramid (R=Wasserstoff) und die sich daraus ableitenden Sphingophospholipide (Ceramid-1-Phosphat und Sphingomyelin) und Glycophospholipide (darunter Ganglioside, Sulfatide, Globoside und Cerebroside). Sphingomyelin ist unter ihnen der Hauptvertreter der Sphingolipide und trägt als Kopfgruppe Phosphorylcholin (Barenholz et al., 1980).

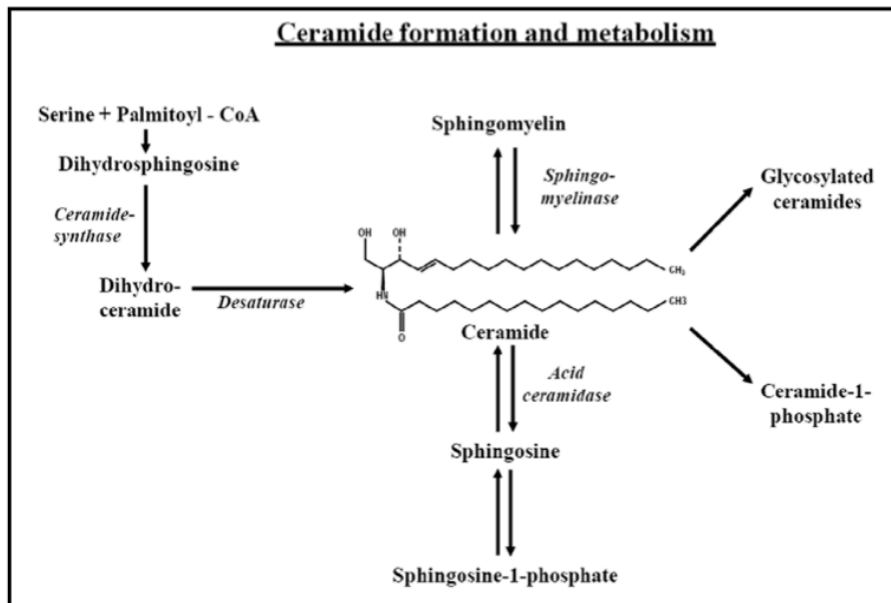


**Abb. 1.2:** Allgemeine Strukturformel der Sphingolipide

Allgemeine Struktur eines Sphingolipids, bestehend aus einem ungesättigten Aminoalkohol und einer über eine Amidgruppe (NH) gebundenen Fettsäure. Wird der Rest "R" durch ein Wasserstoffatom (H<sup>+</sup>) ausgetauscht, handelt es sich bei der Substanz um ein Ceramid (Wikibooks, Biochemie und Pathobiochemie, Stoffwechsel der Sphingophospholipide, 2014).

Als zentrales Molekül des Sphingolipid-Stoffwechsels wird Ceramid über verschiedene Wege entweder *de novo* synthetisiert oder beim Abbau komplexerer Sphingolipidmoleküle freigesetzt (Kolesnick et al., 2000; Okino et al., 2003; Ishibashi et al., 2007). Ein Kardinalweg dabei ist die durch verschiedene Sphingomyelinasen katalysierte Hydrolyse von Sphingomyelin zu Ceramid und Phosphorylcholin. Bislang sind mindestens acht verschiedene Sphingomyelinasen bekannt, welche aufgrund ihres pH-Optimums, ihrer Kofaktor-Abhängigkeit und ihrer subzellulären Lokalisation

klassifiziert werden (Birbes et al., 2002). Die am besten untersuchte Sphingomyelinase ist die saure Sphingomyelinase (ASM). Sie ist in Lysosomen lokalisiert, wo sie bei einem pH-Optimum von 4,5 agiert. Auf die Bedeutung dieses Enzyms im Zusammenhang mit CF wird im Abschnitt 1.3.3 genauer eingegangen.



**Abb. 1.3:** Ceramid-Bildung und Stoffwechsel

Ceramid wird gebildet entweder durch die Hydrolyse von Sphingomyelin, durch den Abbau glykosylierter Sphingolipide, durch *de novo*-Synthese aus Palmitoyl-CoA und Serin oder durch retrograde Aktivität der Sauren Ceramidase. Die entscheidenden Enzyme des Ceramid-Stoffwechsels sind *kursiv* dargestellt (aus Becker et al., 2010).

### 1.3.2 Bildung von Ceramid-Makrodomänen und ihre Bedeutung

Durch flexible Interaktionen zwischen den hydrophilen, nach außen gerichteten Kopfgruppen der Membranlipide ist die Zellmembran in der Regel flüssig, das heißt, Lipidmoleküle und Proteine bewegen sich frei in der Membranebene. Starke Wechselwirkungen insbesondere zwischen Sphingomyelin und Cholesterol innerhalb dieser flüssigen Phase führen zur spontanen Formation kleiner abgrenzbarer Lipiddomänen. Ihnen werden wichtige strukturegebende und signaltransduktorische Funktionen zugeschrieben (Simons et al., 1997). Stabilisiert werden diese „Lipidflöße“

vermutlich durch Cholesterol und seine chemischen Vorstufen, indem sie die entstehenden Lücken ausfüllen (Xu X et al., 2001, Megha et al., 2004 und 2006).

Die Bildung von Ceramid innerhalb der Zellmembran führt zu drastischen Änderungen dieser Membranstruktur und ihrer Eigenschaften. Aufgrund ihrer biophysikalischen Eigenschaften ist davon auszugehen, dass sich Ceramidmoleküle zu Mikrodomänen zusammenschließen, welche wiederum die Tendenz haben, zu Makrodomänen zu fusionieren. Wie fluoreszenzmikroskopisch dargestellt werden konnte, erreichen diese ceramidreichen Membranplattformen eine Größe von mehreren Mikrometern (Grassmé et al., 2001; Gulbins et al., 2003). Aktuelle Studienergebnisse lassen vermuten, dass diese „Plattformen“ in der Lage sind, Rezeptor- und Signalmoleküle innerhalb der Membran neu zu organisieren, indem sie diese einfassen und somit auf einer Fläche verdichten. Man kann davon ausgehen, dass diese Zusammenballung der Rezeptoren zu einer Verstärkung ihres Signals führen. Es ist demnach nicht verwunderlich, dass dieser Mechanismus durch verschiedenste Stimuli genutzt wird. So konnte die Formation von Ceramid-Makrodomänen nach Aktivierung verschiedener immunphänotypischer Oberflächenmerkmale von Zellen wie CD95 (Grassmé et al., 2001), CD40 (Grassmé et al., 2002), DR5 (Dumitru et al., 2006), FcγRII (Abdel Shakor et al., 2004), PAF-Rezeptor (Goggel et al., 2004) und CD14 (Pfeiffer et al., 2001), nach Infektion unter anderem mit *P. aeruginosa* (Becker et al., 2010), *S. aureus* (Esen et al., 2001), *N. gonorrhoeae* (Grassmé et al., 1997; Hauck et al., 2000), Masernvirus (Gassert et al., 2009) und Rhinovirus (Grassmé et al., 2005) und nach Einsatz verschiedener Stresstimuli wie  $\gamma$ -Strahlung (Santana et al., 1996), UV-Licht (Rotolo et al., 2005), Cisplatin (Lacour et al., 2004), Gemcitabin (Grammatikos et al., 2007), oder  $\text{Cu}^{2+}$ -Therapie (Lang et al., 2007) gezeigt werden.

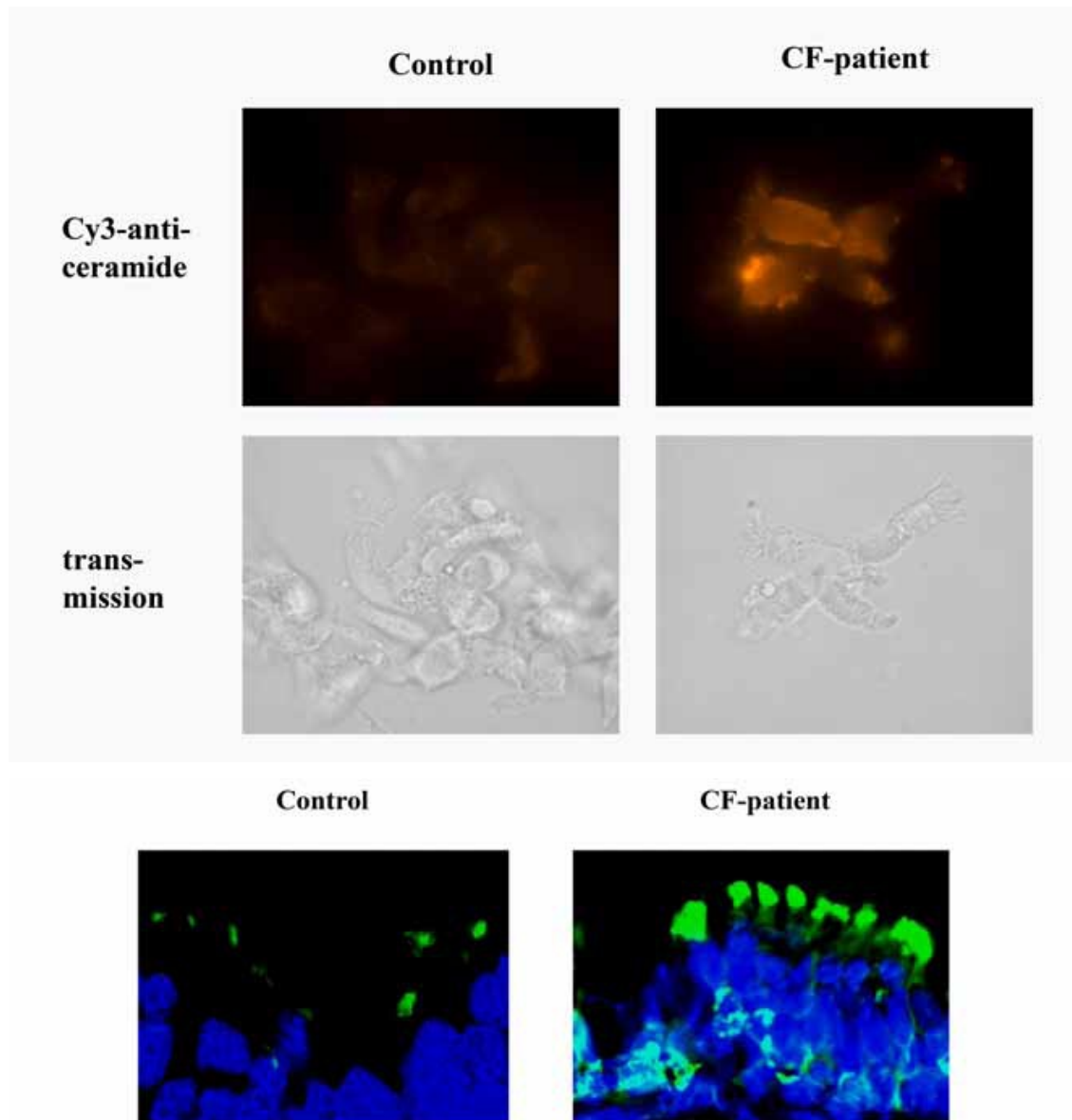
### **1.3.3 Potentielle Mechanismen der Ceramid-Akkumulation bei CF**

Das CFTR-Molekül gehört zu der Gruppe der ATP-bindenden ABC-Transporter und ist als solcher neben seiner Hauptfunktion als Chloridkanal am transmembranären Lipidtransport beteiligt (Borst et al., 2002; Boujaoude et al., 2001). Zudem ist bekannt, dass der CFTR-Chloridkanal über die Bereitstellung von  $\text{H}^+$ -Gegenionen mitverantwortlich ist für das pH-Milieu in der Zelle bzw. in den Lysosomen. Ein

gestörter transmembranöser Chloridtransport von extra- nach intrazellulär drosselt somit auch den parallel laufenden  $H^+$ -Transport, und das intralysosomale pH-Level verschiebt sich in Richtung alkalisch (Barasch et al., 1991; Di et al., 2006). Basierend auf diesem Vorwissen gelang es der Arbeitsgruppe von Teichgräber einen Zusammenhang herzustellen zwischen CFTR-Defekt und Sphingolipidstoffwechsel, welcher von pH-abhängigen Enzymen mit Aktivitätsoptimum im sauren Bereich reguliert wird (Teichgräber et al., 2008). Da Sphingolipiden eine entscheidende Rolle in der Regulation von Zelltod, der sogenannten Apoptose (Dbaibo et al., 1998; Gulbins et Kolesnick, 2003), NF $\kappa$ B-Aktivierung (Wiegmann et al., 1994) und Expression proinflammatorischer Zytokine (Grassmé et al., 2003) zugewiesen werden kann, lag die Folgerung nahe, dass ein aufgrund des erhöhten pH-Milieus veränderter Sphingolipidstoffwechsel eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der CF-Lungenerkrankung haben könnte.

Mittels FACS (*Fluorescence activates cell sorting*), einem Durchflusszytometrie-Verfahren zur Analyse von Zellen, konfokaler Mikroskopie und Elektronenmikroskopie, konnten Teichgräber und Kollegen in Lungenepithelzellen CFTR-defizienter Mäuse eine im Vergleich zu Wildtyp-Zellen erhöhte Ceramidkonzentration nachweisen (Teichgräber et al., 2008). Wesentlich war dabei, dass die Veränderung des Ceramidspiegels bei den CF-Mäusen altersabhängig war. Die Ceramidansammlung zeigte sich in einer größeren Anzahl ceramidhaltiger Vesikel, einer erhöhten Ceramidkonzentration innerhalb dieser Vesikel sowie einer erhöhten Konzentration von Ceramid in der apikalen Zellmembran.

In selbiger Studie wurden nasale und pulmonale Epithelzellen von CF-Patienten mit Anti-Ceramid-Antikörpern angefärbt und fluoreszenzmikroskopisch auf ihren Ceramidgehalt im Vergleich zu gesunden Kontroll-Patienten untersucht. Die Analyse ergab eine deutliche Anreicherung von Ceramid ausschließlich in den Epithelzellen der CF-Patienten (siehe Abbildung 1.4).



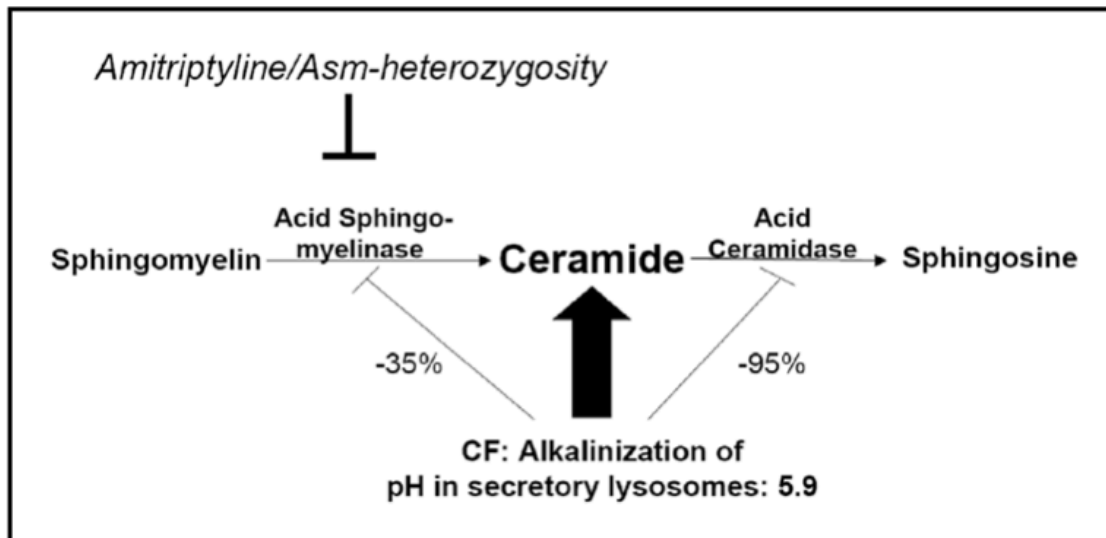
**Abb. 1.4:** Erhöhte Ceramid-Anreicherungen in nasalen und pulmonalen Epithelzellen bei CF-Patienten

Die fluoreszenzmikroskopische Analyse von nasalen Epithelzellen (obere Abb.) bzw. Lungengewebe (untere Abb.) von CF-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen und einem COPD-Patienten zeigte eine starke Anreicherung von Ceramid ausschließlich im Gewebe der Patienten mit CF. Die Kontrollfärbungen mit unerheblichen Cy3- oder Cy2-gekoppelten Antikörpern waren negativ (nicht gezeigt). Die Epithelzellen wurden mithilfe eines Leica Fluoreszenzmikroskop DMIRE2 bei einer Belichtungszeit von 140 ms (obere Abb.) ausgewertet, das Lungengewebe mittels eines Zeiss Axioplan Mikroskops bei einer Belichtungszeit von 200 ms (untere Abb.). Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis von 17 CF-Patienten und 15 gesunden Personen (obere Abb.) bzw. 3 Lungenproben (untere Abb.) (Teichgräber et al., 2008).

Wie oben beschrieben, wird Sphingomyelin im Wesentlichen von der ASM zu Ceramid und mittels der sauren Ceramidase (AC) weiter zu Sphingosin abgebaut. Beide Enzyme sind pH-abhängig und besitzen ihre optimale Funktionsfähigkeit im sauren Milieu. Bei einer intra-lysosomalen pH-Verschiebung von pH 4,5 zu mindestens pH 5,9, wie es für CFTR-defiziente alveolare Makrophagen gezeigt werden konnte (Di et al., 2006), vermindert sich die Aktivität der ASM um circa 35 %, während die Aktivität der AC um über 90 % zurück geht. Darüber hinaus scheint die AC bei einem pH von 5,9 umgekehrt zu funktionieren, das heißt, Ceramid zu synthetisieren statt dieses abzubauen (He et al., 2003; Zhang et al., 2010). Aus diesem Ungleichgewicht der beiden pH-sensitiven Enzyme ASM und AC resultiert eine Akkumulation von Ceramid und schließlich die netzartige Ausbildung ceramidreicher Makrodomänen mit oben genannten Konsequenzen (siehe Abbildung 1.5).

### **1.3.4 Inhibition der Ceramid-Synthese im Mausmodell und ihre Auswirkungen**

Mittels pharmakologischer und genetischer Blockade der ASM-Enzymaktivität konnte in oben beschriebenem Mausversuch von Teichgräber und Kollegen die pulmonale Ceramid-Synthese gedrosselt und damit eine Aussage über die Funktion von Ceramid-Ablagerungen in CFTR-defizienten Lungenepithelzellen gemacht werden. Dabei zeigte sich, dass bereits eine 50%-ige Reduktion der Enzymaktivität zu einem nahezu normalen Ceramid-Gehalt führt (Teichgräber et al., 2008). Als funktionelle Inhibitoren kamen trizyklische Antidepressiva wie Amitriptylin, Fluoxetin, Imipramin oder Trimipramin zum Einsatz, welche, wie im weiteren Verlauf gezeigt wird (siehe Kapitel 1.4.2.), auf indirektem Weg vermutlich eine Proteolyse der ASM einleiten und sie damit inaktivieren (Hurwitz et al., 1994, Kornhuber et al., 2008). Eine genetische Inhibierung des Enzyms wurde erreicht durch die Züchtung CFTR-defizienter und für ASM heterozygoter Mäuse.



**Abb. 1.5:** Ceramid-Akkumulation als therapeutischer Ansatzpunkt bei CF

Sphingomyelin wird von der sauren Sphingomyelinase (ASM) zu Ceramid und mittels der sauren Ceramidase (AC) weiter zu Sphingosin abgebaut. Bei CF kommt es zu einer intra-lysosomalen pH-Verschiebung von pH 4,5 zu mindestens pH 5,9. Die Aktivität der ASM vermindert sich um circa 35%, während die Aktivität der AC um über 90% zurückgeht. Aus diesem Ungleichgewicht der beiden pH-sensitiven Enzyme ASM und AC resultiert eine Akkumulation von Ceramid. Durch genetische oder pharmakologische Inhibition der ASM kann eine Normalisierung der Ceramidlevel erzielt und folglich die pulmonale Inflammation reduziert, die mukoziliäre Clearance verbessert und der Infektion mit *P. aeruginosa* vorgebeugt werden (Becker et al., 2010).

Die Auswirkung der reduzierten Ceramidkonzentration war in verschiedener Weise erstaunlich:

Die Ergebnisse zeigen, dass eine Normalisierung der pulmonalen Ceramid-Level zu geringeren DNA-Ablagerungen in Lunge und Trachea führt. Das lässt vermuten, dass ein hoher Ceramidgehalt in Respirationsepithelzellen deren Apoptose triggert und damit zu einer Reduktion der mukoziliären Clearance beiträgt (vergleiche Kapitel 1.2.2).

Weiter konnte beobachtet werden, dass die Inhibition der ASM die Infektanfälligkeit CFTR-defizienter Mäuse für *P. aeruginosa* senkt. Nach nasaler Applikation von *P. aeruginosa* war die Neigung bei behandelten CFTR-Mäusen eine Lungeninfektion zu entwickeln deutlich geringer als bei unbehandelten CFTR-Mäusen. Dieser Effekt könnte ebenfalls über die reduzierte DNA-Freisetzung erklärt werden, da freie DNA-Fragmente pulmonalen Bakterien vermutlich als Adhäsionsstellen dienen. Bestätigt wird diese Hypothese durch die Kenntnis, dass die Inhalation von DNase bei CF-

Patienten im selben Maße einer Lungeninfektion vorbeugt wie die genetische oder pharmakologische Senkung der Ceramid-Spiegel (Teichgräber et al., 2008).

Zudem spielt Ceramid offenbar eine wichtige Rolle in der Entwicklung eines chronischen Entzündungszustandes der Lunge, wie es bei CF der Fall ist. Die Lungen CFTR-defizienter Mäuse sind durch eine hohe peribronchiale Besiedelung von Makrophagen und Neutrophilen geprägt, zudem durch im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen erhöhten Konzentrationen proinflammatorischer Zytokine, wie IL-1 und KC/IL-8 (vergleiche Kapitel 1.2.2). Sowohl die Menge der Entzündungszellen als auch die Ausschüttung der Zytokine war nach Hemmung der ASM normalisiert (Becker et al., 2010; Becker et al., 2012). In kultivierten CFTR-defizienten Zellen konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass Amitriptylin auch die IL-6- und IL-1 $\beta$ -Level senkt und damit zu einer Minderung des Entzündungszustandes beiträgt. (Bodas et al., 2011).

Weiter soll hier eine kürzlich veröffentlichte Studie von Ziobro und Kollegen Erwähnung finden, welche Ceramid eine zentrale Rolle bei der Entstehung von peribronchialem Kollagen in CF-Mäusen zuschreibt. Heterozygotie für ASM bzw. eine Langzeitbehandlung mit Amitriptylin bzw. Fluoxetin, ein Antidepressivum der Klasse der Selektiven Serotonin-Wiederaufnahmehemmer (SSRI), beugte dieser Entwicklung vor (Ziobro et al., 2013).

Wir überprüften in vorliegender Studie, ob sich die in diesem Kapitel aufgeführten positiven Auswirkungen von Amitriptylin auf Infektanfälligkeit, chronischen pulmonalen Entzündungszustand und Lungenfibrose im Mausmodell auch auf Menschen mit CF übertragen lassen.

### **1.4 Amitriptylin**

Folgendes Kapitel widmet sich unserem Prüfpräparat Amitriptylin. Im ersten Teil wird seine bisherigen Anwendung, seine pharmakodynamischen Eigenschaften und die zu beachtenden Kontraindikationen und Nebenwirkungen (1.4.1), im zweiten Teil die zu



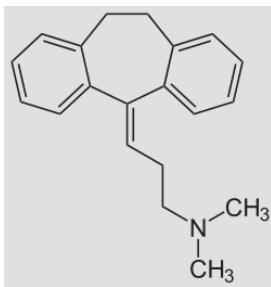
erwartende Wirkungsweise von Amitriptylin in der therapeutischen Anwendung bei Mukoviszidose (1.4.2) beschrieben.

### 1.4.1 Amitriptylin in der klinischen Praxis

Der Wirkstoff Amitriptylin ist einer der bekanntesten Arzneistoffe, welcher bei Depressionen und chronischen Schmerzen eingesetzt wird. Er gehört zu der Medikamentengruppe der trizyklischen Antidepressiva und damit zur ersten Generation von antidepressiven Wirkstoffen. Im Jahr 1962 wurde Amitriptylin offiziell auf dem Arzneimittelmarkt eingeführt und war bis zur Einführung der Serotonin-Wiederaufnahmehemmer das am häufigsten verordnete Antidepressivum weltweit.

Seine Wirkung im zentralen Nervensystem wird auf seine unselektive Hemmung der Wiederaufnahme von monoaminergen Neurotransmittern (vor allem Noradrenalin und Serotonin) aus dem synaptischen Spalt in die Präsynapse erklärt (siehe 1.4.1.4 Pharmakodynamik).

Durch seine jahrzehntelange Anwendung ist es gut untersucht und auf seine Verträglichkeit getestet.



**Abb. 1.6:** Strukturformel von Amitriptylin ([www.wikipedia.de](http://www.wikipedia.de))

#### 1.4.1.1 Indikationen

Ihre Hauptanwendung finden Amitriptylin-Präparate im Bereich depressiver Störungen, bevorzugt solcher, welche mit ängstlicher Unruhe und Agitiertheit einhergehen (Karow et Lang-Roth, 2006). Weiter ist Amitriptylin im Rahmen langfristiger Schmerzbehandlungen zugelassen. Dabei ist zu beachten, dass trizyklische

Antidepressiva keine analgetische Eigenwirkung besitzen, sondern durch Hervorrufen eines schmerzdistanzierenden Effektes eine Wirkungsverstärkung der Analgetika bewirken. Weiter gilt es als Mittel der ersten oder zweiten Wahl bei der vorbeugenden Migränetherapie und beim prophylaktischen Einsatz gegen Spannungskopfschmerzen (Bigal et al., 2008).

Außerhalb dieser arzneimittelrechtlich zugelassenen Anwendungsgebiete findet Amitriptylin im sogenannten Off-Label-Use Anwendung bei der Behandlung von Schlafstörungen (Becker et al., 2005), des Reizdarmsyndroms (Ford et al., 2009), der Fibromyalgie (Uceyler et al., 2005), sowie bei posttraumatischen Belastungsstörungen (Gaskell, 2005).

### **1.4.1.2 Kontraindikationen**

Als absolute Kontraindikationen für die therapeutische Verwendung von Amitriptylin gelten neben einer bekannten allergischen Überempfindlichkeit kardiale Vorerkrankungen wie koronare Herzkrankheit, Herzinsuffizienz und Erregungsüberleitungsstörungen, außerdem die Anwendung bei zerebralen Regulationsstörungen wie Epilepsie und Delir, sowie nach akuter Alkohol-, Barbiturat- und/oder Opiatvergiftung und bei akuter Manie.

Kontraindiziert ist zudem wegen der Gefahr unerwünschter Herzrhythmusstörungen die gleichzeitige Einnahme von Amitriptylin und Medikamenten mit einer Wirkung auf die intraventrikuläre Erregungsdauer (QT-Zeit). Dieses Risiko besteht auch bei der Anwendung von Medikamenten, welche eine Hypokaliämie verursachen oder hemmend auf den Cytochrom-P450-Enzymkomplex CYP3A4 und damit den Abbau von Amitriptylin in der Leber wirken.

Aufgrund additiver zentral dämpfender Effekte ist die Kombination mit sedierenden oder atemdepressiv wirkenden Substanzen (wie Barbiturate, Benzodiazepine, Hypnotika, Narkotika, Neuroleptika, Opioide, Muskelrelaxantien und Alkohol) zu vermeiden, bzw. zu überwachen.

Darüber hinaus gilt die Kombination von Amitriptylin und MAO-Hemmern aufgrund der Gefahr des unter Umständen lebensbedrohlichen Serotonin-Syndroms als streng kontraindiziert.

Als relative Kontraindikationen sind Glaukom, Prostatahypertrophie, Pylorusstenose, sowie Schwangerschaft und Stillzeit zu nennen (vergleiche Karow et Lang-Roth, 2006).

### 1.4.1.3 Nebenwirkungen

Unter der Einnahme von Amitriptylin ist das Auftreten von unten aufgeführten Nebenwirkungen beschrieben worden. Die zumeist vegetativen Begleiterscheinungen sind von Beginn der Therapie an zu beobachten.

Als „unerwünschte Nebenwirkung“ gelten im Allgemeinen schädliche und unbeabsichtigte Reaktionen auf das Arzneimittel (§4 Arzneimittelgesetz 2001; Richtlinie 2001/83/EG). Davon abzusetzen sind „schwerwiegende unerwünschte Nebenwirkungen“, worunter jeglicher Zustand eingeordnet wird, welcher eine körperliche oder geistige Behinderung, eine Tumorerkrankung oder ein vergleichbares Leiden nach sich zieht, im Extremfall lebensbedrohlich oder gar tödlich ist. Bei einer Amitriptylindosis von unter 150 mg/Tag wurden bislang keine Nebenwirkungen verzeichnet, welche per definitionem als schwerwiegend einzuordnen wären.

Als unerwünschte Nebenwirkungen von Amitriptylin sind bei einer Dosierung von 75-150 mg/Tag sehr häufig (>10%) zu beobachten: Mundtrockenheit, Müdigkeit, Schwitzen, Schwindel, orthostatische Dysregulation, Obstipation, Akkomodationsstörungen, Tachykardie und Herzrhythmusstörungen, Gereiztheit, Tremor, Gewichtszunahme und ein meist vorübergehender Anstieg der Leberwerte (GPT, GOT).

Zu den häufigen (1-10%) Nebenwirkungen gehören: Miktionsstörungen, Durstgefühl, unspezifische Exantheme, Hyponatriämien, innere Unruhe, Delirien bei älteren Patienten und Libidoverlust.

Gelegentliche (0,1-1%) Nebenwirkungen sind: Blutbildveränderungen (insbesondere Leukopenie), Gynaekomastie/Galaktorrhoe, Leberfunktionsstörungen (z.B. cholestatische Hepatose), Verschlimmerung einer bestehenden Herzinsuffizienz und allergische Vaskulitis.

Vereinzelt (<0,1 %) können auftreten: Agranulozytose, Glaukomanfälle, Dyskinesien und Akathisie, Polyneuropathie, Alveolitis, Kardiomyopathie und epileptische Anfälle.

### 1.4.1.4 Pharmakodynamik

Beim Wirkmechanismus trizyklischer Antidepressiva sind Akut- von Langzeiteffekten zu unterscheiden. Eine einmalige oder kurzfristige Gabe von Amitriptylin führt zu einer Hemmung des Reuptake-Mechanismus der monoaminergen Neurotransmitter Noradrenalin, Serotonin und Dopamin und resultiert damit in einer Erhöhung ihrer Konzentration im synaptischen Spalt. Ab der ersten Woche der Einnahme ist Amitriptylin eine sedierende Wirkung zuzuschreiben, welche auf die begleitende antihistaminische und anticholinerge Wirkung zurück zu führen ist. Nach ein paar Tagen ist meist ein antriebssteigernder (thymetischer) Effekt zu bemerken. Bis nach 2-3 Wochen die erwünschte stimmungsaufhellende (thymoleptische) Wirkung eintritt, sind in diesem Zeitraum aufgrund der Gefahr vermehrten suizidalen Handelns engmaschige Kontrollen und bei depressiven Störungen mit akut schwerem Verlauf am ehesten eine Überwachung im stationären Rahmen zu empfehlen (Karow et Lang-Roth, 2006). Der nach langfristiger Medikamenteneinnahme eintretende Effekt ist auf Veränderungen der zentralnervösen Rezeptoren zurück zu führen wie Down-Regulation zentraler  $\alpha$ -Rezeptoren, Aktivierung postsynaptischer  $\beta$ -Rezeptoren oder Verstärkung GABAerger Aktivität im Frontalhirn.

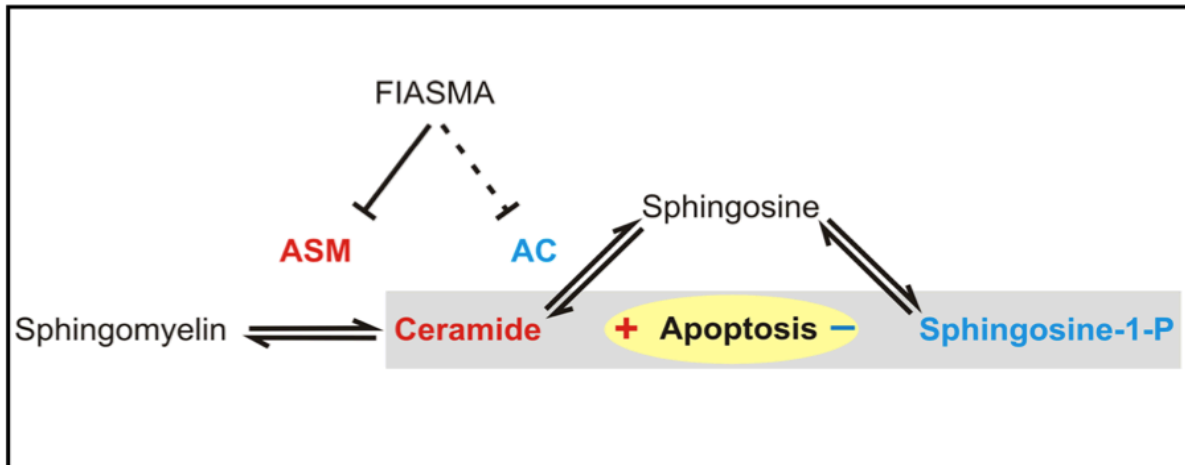
### 1.4.1.5 Pharmakokinetik

Trizyklische Antidepressiva werden nach meist guter enteraler Resorption in der Leber verstoffwechselt, woraus ein beachtlicher First-Pass-Effekt resultiert. Die Halbwertszeit von Amitriptylin beträgt 8 bis 51 Stunden, die seiner Metaboliten circa 30 Stunden.

## 1.4.2 Amitriptylin und CF

Seit den 1970er Jahren ist bekannt, dass schwache organische Basen wie Desipramin und andere trizyklische Antidepressiva wie Amitriptylin neben ihrer Wirkung auf das zentrale Nervensystem als funktionelle Blocker der sauren Sphingomyelinase (ASM) agieren (Hurwitz et al., 1994). Sie sind damit einer neuen großen Medikamentengruppe mit dem Akronym „FIASMA“ (*Functional Inhibitor of Acid SphingoMyelinAse*) zugehörig, welchen ein großes klinisches Anwendungspotential zugeschrieben wird (Kornhuber et al., 2010).

Die sich hauptsächlich in Lysosomen befindliche ASM katalysiert den Abbau von Sphingomyelin zu Ceramid. Dieses wird durch das Enzym AC weiter zu Sphingosin und von Sphingosinkinasen zu Sphingosin-1-Phosphat metabolisiert. Während Ceramid eine entscheidende Rolle bei der Induktion stress- und rezeptorvermittelter Apoptose zugeschrieben werden kann (Thevissen et al., 2006; Gulbins et al., 2006), wird Sphingosin-1-Phosphat eine wesentliche Rolle in Zelldifferenzierungs-, Zellproliferations- und Zellmigrationsprozessen zugeschrieben (Futerman et al., 2004; Hobson et al., 2001; Spiegel et al., 2002). Eine Störung in der Feinregulation dieses physiologischen Gleichgewichts von Zelluntergang einerseits und Zellproliferation andererseits, führt zu schwerwiegenden Krankheitsbildern (Smith et al., 2008). Man spricht auch von dem „Ceramid/Sphingosin-1-Phosphat Rheostat“ (Cuvillier et al., 1996; Spiegel et al., 1998).



**Abb. 1.7:** Der „Ceramid/Spingosin-1-Phosphat Rheostat“

Die Saure Sphingomyelinase (ASM) katalysiert den Abbau von Sphingomyelin zu Ceramid und führt damit zu einem proapoptotischen Effekt. Ceramid wird durch die saure Ceramidase (AC) zu Spingosin verstoffwechselt und durch Sphingosinkinasen weiter zu Spingosin-1-Phosphat phosphoryliert. Die AC vermittelt somit eine anti-apoptotische Wirkung. FIASMAs (*Functional Inhibitors of Acid SphingoMyelinAse*) wirken als funktionale Inhibitoren der ASM. Manche FIASMAs (wie Desipramin) wirken möglicherweise auch funktional inhibitorisch auf die AC (Kornhuber et al., 2010).

Man geht davon aus, dass die ASM im Lysosom an die innere der beiden Doppelmembranen gebunden vorliegt. Eine hohe intralysosomale Konzentration von schwachen organischen Basen führt zu einer Ablösung des Enzyms von der Membran (Kölzer et al., 2004) und löst, vermutlich durch proteolytischen Abbau, seine Inaktivierung aus (Hurwitz et al., 1994). Trizyklische Antidepressiva wie Desipramin und Amitriptylin, welche schwache basische Medikamente sind, fungieren insofern nicht als direkte, sondern indirekt als funktionelle Inhibitoren der ASM.

Amitriptylin ist, wie die meisten bekannten FIASMAs, ein bereits seit Jahrzehnten etabliertes Medikament mit geringer Toxizität und eignet sich daher zur klinischen Erprobung seines ASM-inhibierenden und damit Ceramid-senkenden Potentials in der CF-Therapie.

## **1.5 Klinische Studien zum Thema**

Um zu prüfen, ob sich oben erläuterte Mechanismen und die beschriebene Wirkungsweise von Amitriptylin im Mausmodell auch auf den Respirationstrakt von Patienten mit CF übertragen lassen, wurden bereits eine Pilotstudie an 4 Patienten und eine Phase IIa-Studie (APA IIa) an 18 Patienten zur Sicherheit und Dosisfindung durchgeführt (Riethmüller et al., 2009). In beiden Studien wurde die Anwendung von Amitriptylin mit einem Placebopräparat verglichen.

### **1.5.1 Pilotstudie mit Amitriptylin**

Zunächst wurde die klinische Anwendung von Amitriptylin bei CF im Rahmen einer ersten Studie (Pilotstudie) an 4 erwachsenen CF-Patienten erprobt. In einem Cross-Over Design mit einer jeweils vierwöchigen Auswaschphase wurden die Patienten mit Amitriptylin bzw. einem Placebo (Mehlstärke) behandelt. Als wichtigster Parameter wurde die potentielle Veränderung der Lungenfunktion in Form der FEV<sub>1</sub> (Funktionelle Einsekundenkapazität) gemessen. Bei 3 von 4 Patienten mit Amitriptylin-Therapie (2 x 37,5 mg) war nach 14 Tagen Therapie eine Verbesserung der FEV<sub>1</sub> (+16,7 %; p=0,006) zu beobachten, während bei allen Patienten unter Placebo-Therapie kein Zuwachs an FEV<sub>1</sub> (-1,8 %) zu verzeichnen war. Amitriptylin wurde von allen Patienten insgesamt gut vertragen und nach 14-tägiger Medikamenteneinnahme waren keine schweren unerwünschten Ereignisse zu vermerken.

### **1.5.2 Phase IIa-Studie (Sicherheit und Dosisfindung)**

Nach diesem positiven Studienergebnis wurde eine randomisierte, doppel-blinde, placebo-kontrollierte Phase IIa-Studie angeschlossen. Die Phase IIa diente in erster Linie der Sicherheitsprüfung der Amitriptylintherapie bei CF in Abhängigkeit unterschiedlicher Dosierungen. Die insgesamt 19 Patienten wurden nach einem Randomisierungsverfahren 3 Behandlungsgruppen zugeteilt, in denen sie in einem Cross-Over Design für jeweils 28 Tage täglich 25 mg, 50 mg oder 75 mg Amitriptylin oder ein entsprechendes Placebo erhielten.

Zwar wurden die für Amitriptylin bekannten Nebenwirkungen wie vorübergehende Mundtrockenheit und Müdigkeit berichtet, es traten jedoch während des gesamten Studienzeitraumes keinerlei schwerwiegende unerwünschte Nebenwirkungen auf. Demzufolge ist von einer sicheren Anwendung von Amitriptylin in allen Dosierungen auszugehen.

Für die Therapiegruppe mit der niedrigsten Amitriptylindosis (25mg) zeigte sich an Tag 14 eine signifikante Verbesserung der Lungenfunktion (relatives FEV<sub>1</sub>: 4,0±7 %; p=0,048) und diente damit hinsichtlich der Amitriptylin-Dosis in der hier beschriebenen Studie Phase IIb als Grundlage.

### **1.6 Ziel und Inhalt der vorliegenden Arbeit: Phase IIb-Studie (Verifizierung des Wirkmechanismus)**

Basierend auf den Erkenntnissen aus oben aufgeführten Tierversuchen und den beiden ersten klinischen Studien (Pilot- und Phase IIa-Studie) ist von folgender Hypothesenkaskade auszugehen: CF liegt ein genetischer Defekt des CFTR-Moleküls zugrunde. Dieses ist neben seiner Funktion als Anionenkanal maßgeblich involviert in der Aufrechterhaltung des sauren pH-Milieus intrazellulärer Vesikel. Eine Mangelfunktion von CFTR führt zu einer Alkalisierung dieser Vesikel und damit zu einer Abnahme der Aktivität zweier für den Spingolipidstoffwechsel wesentlicher Enzyme. Während die Aktivität der ASM (Abbau von Sphingomyelin zu Ceramid) um circa 35 % abnimmt, geht die Aktivität der sauren Ceramidase (Abbau von Ceramid zu Sphingosin) um circa 95 % zurück. Die Folge dieser Imbalance ist eine pulmonale Anreicherung von Ceramid, welches mit verantwortlich ist für eine erhöhte Zellapoptose, eine gestörte mukoziliäre Clearance, die Förderung des chronischen proinflammatorischen Status, die hohe Infektanfälligkeit gegenüber *P. aeruginosa* und die Ausbildung von Lungenfibrose.

Amitriptylin agiert als funktioneller Inhibitor der ASM und ist damit in der Lage, die Ceramidkonzentrationen im Respirationsepithel zu senken und die Lungenfunktion folglich zu verbessern.



Basierend auf den erfolgversprechenden Ergebnissen der Pilot- und Phase IIa-Studie (Riethmüller et al., 2009) führten wir zur Prüfung der Effektivität von Amitriptylin an insgesamt 40 Patienten eine weitere, größere placebo-kontrollierte, prospektive, randomisierte, doppel-verblindete Phase IIb-Studie durch.

Wir überprüften folgende Hypothesen:

1. Amitriptylin senkt die Ceramidkonzentration im Respirationsepithel (Ceramid gemessen in nasalen Mukosazellen, gewonnen durch nasale Epithelzellbürstung)
2. Amitriptylin beugt der Apoptose von Epithel- und Immunzellen vor, vermindert DNA-Ablagerungen auf dem Respirationsepithel und fördert die Elimination von *P. aeruginosa* aus der Lunge (gemessen als *P. aeruginosa*-Kolonienzahl im Trachealsekret)
3. Amitriptylin normalisiert die Leukozytenzahl (gemessen in Trachealsekret und Plasma)
4. Amitriptylin reduziert den proinflammatorischen systemischen und pulmonalen Entzündungsstatus (Zytokine gemessen in Trachealsekret und Plasma)
5. Amitriptylin verbessert die Lungenfunktion von Patienten mit CF (gemessen als FEV<sub>1</sub>)

Während die Auswertung des primären Zielparameters (Verbesserung der Lungenfunktion, gemessen an FEV<sub>1</sub>) Inhalt einer anderen Dissertation ist, fokussiert vorliegende Arbeit die Reduktion der zellulären Ceramidkonzentration, die Veränderung der chronischen bakteriellen Lungenbesiedelung und das Verhalten der pro- und anti-inflammatorischen Zytokine in Sputum und Serum.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Studiendesign**

Die vorliegende Untersuchung (APA I Ib) wurde in Form einer prospektiven, randomisierten, placebo-kontrollierten, doppel-verblindeten, multizentrischen Studie der Phase I Ib konzipiert und durchgeführt. Es sollte die Hypothese überprüft werden, ob die Einnahme der Substanz Amitriptylin eine positive Auswirkung auf die Lungenfunktion bei Cystischer Fibrose (CF) hat. Die insgesamt 40 jugendlichen und erwachsenen Patienten wurden per Zufallsverfahren der Verum-Gruppe (Amitriptylin) und der Kontroll-Gruppe (Placebo) zufällig zugeteilt. Mittels der Software StatsDirect 2.7.2 (06.09.2008) wurde eine Randomisierung der Versuchspersonen auf eine der beiden Gruppen gewährleistet. Um dem Einfluss persönlicher Erwartung an das Ergebnis des Experiments vorzubeugen, wurde die Studie doppelt verblindet, das heißt, weder Prüfarzt noch Patient wussten, welche Person ein Verum- und welche ein Placebo-Präparat erhielt.

An der Studie waren drei CF-Zentren beteiligt: CF-Zentrum der Justus-Liebig-Universität Giessen, des Kinderkrankenhauses der Friedrich-Schiller-Universität Jena und der Eberhard-Karls-Universität Tübingen. Die Studie begann im Mai 2009 und endete im Mai 2011.

Die Studie APA I Ib wurde in zwei internationalen Datenbanken für klinische Studien registriert: bei EudraCT (European Union Drug Regulating Authorities Clinical Trials) unter der Identifikationsnummer 2008-002673-13, bei ClinicalTrials.gov unter NCT01309178.

## 2.2 Studienaufbau

Die Gesamtdauer der Behandlung betrug 4 Wochen pro Patient, wobei eine ambulante Durchführung der Studie möglich war. Zur Erfassung des Therapieerfolges sowie zur Kontrolle möglicher Nebenwirkungen wurden die Versuchsteilnehmer während dieses Zeitraumes zu insgesamt fünf Kontrollterminen, den sogenannten „Visiten“, einbestellt. Eine einführende Visite (Visite 1, auch als „*Screening*“ bezeichnet) erfolgte ein bis zwei Wochen vor Beginn der 4-wöchigen Präparateinnahme und diente dem Einschluss der Patienten in die Studie, der Klärung formeller Daten, der Erhebung der Begleitmedikation, der Einschätzung des Gesundheitszustandes des Patienten, sowie der Prüfung der Ein- und Ausschlusskriterien. Es wurden eine ausführliche Anamnese, eine körperliche Untersuchung, eine venöse Blutentnahme, ein Schwangerschaftstest und eine Lungenfunktionsprüfung mittels Spirometer zur Überprüfung der Ein- und Ausschlusskriterien durchgeführt.

Die Termine der Visiten 2-4 wurden wie folgt festgelegt: Visite 2 zu Beginn (Tag 1), Visite 3 zur Hälfte (Tag  $15 \pm 1$ ) und Visite 4 zur Beendigung (Tag  $29 \pm 3$ ) der Medikamenteneinnahme. An Visite 2 erfolgte die Präparatausgabe.

Eine Woche nach der letzten Medikamenteneinnahme (Visite 5, Tag  $36 \pm 3$ ) wurden die Patienten zur klinischen Nachbeobachtung einbestellt. Gegebenenfalls erfolgte eine Sputum- bzw. Blut-Nachkontrolle.

Unter 2.7 und 2.8 sind die angewandten klinischen und labortechnischen Untersuchungen erläutert.

**Tab. 2.1:** Studienablauf schematisch (modifiziert aus Prüfplan Version 5.0, Glubins et al., 2009)

CRP=C-reaktives Protein, GOT=Glutamat-Oxalacetat-Transaminase, GPT=Glutamat-Pyruvat-Transaminase, IL=Interleukin, TNF- $\alpha$ =Tumor-Nekrose-Faktor  $\alpha$ , DNA=Desoxyribonukleinsäure, EKG=Elektrokardiogramm, \*=fakultativ

Visite	Visite 1 <i>Screening</i>	Visite 2 <i>Baseline</i>	Visite 3	Visite 4	Visite 5
Tag	-14 to -7	1	15 $\pm$ 1	29 $\pm$ 3	36 $\pm$ 3
<b>Zu Studienbeginn</b>					
Demographische Angaben	•				
Einverständniserklärung	•				
Einschlusskriterien geprüft	•	•			
Ausschlusskriterien geprüft	•	•			
<b>Aktualisierung Medikamentenanamnese</b>					
Begleitmedikation	•	•	•	•	•
Nebenwirkungen		•	•	•	•
Schwerwiegende Nebenwirkungen		•	•	•	•
<b>Labor</b>					
<b>Blutbild:</b> Leukozyten, Neutrophile, Hämoglobin, Hämatokrit, Thrombozyten	•*	•	•	•	•*
<b>Klinische Chemie:</b> CRP, Kreatinin, Harnstoff, GPT, GOT	•	•	•	•	•*
<b>Serum:</b> IL-6*, IL-8*, IL-10*		•	•	•	
<b>Sputum:</b> Keimzahl Pseudomonaden, Zytokinmessung: IL-8, IL-1 $\beta$ *, IL-6*, IL-10, TNF- $\alpha$ *, DNA-Gehalt		•	•	•	•*
<b>Nasale Epithelzellenbürstung</b>		•	•*	•	
<b>Schwangerschaftstest</b>	•				
<b>Weitere Untersuchungen</b>					
Vitalparameter (Herzfrequenz, Blutdruck, Gewicht)	•	•	•	•	•
Lungenfunktion	•	•	•	•	•
EKG			•		
<b>Studienmedikation</b>					
Gabe der Studienmedikation, 2mal täglich, Visite 2-4		•	•	•	
<b>Ende der Studie</b>					
Überprüfen auf Vollständigkeit und klinische Nachbeobachtung					•

## 2.3 Patienten

### 2.3.1 Patientenkollektiv

In den drei teilnehmenden CF-Zentren Jena, Giessen und Tübingen wurden unter Anwendung der unter 2.3.2 aufgeführten Einschlusskriterien insgesamt 95 Patienten auf ihre Eignung für die Studie geprüft.

Nach Vorlage der jeweiligen Einverständniserklärung konnten 40 Jugendliche und Erwachsene in die Phase IIb-Studie aufgenommen werden. 21 Patienten wurden nach Randomisierung mit Amitriptylin behandelt, 19 bekamen ein Placebo-Präparat.

### 2.3.2 Ein- und Ausschlusskriterien

Die Patienten sollten folgende Einschlusskriterien erfüllen:

1. an Cystischer Fibrose erkrankt
2. älter als 14 Jahre und einwilligungsfähig
3. Körpergewicht > 35kg
4.  $FEV_1 > 30\%$  und  $< 90\%$
5. pulmonale Besiedelung des Patienten mit Bakterien
6. keine akute pulmonale Begleiterkrankung (Virusinfekt)
7. CRP-Wert nicht höher als 2mg/dl
8. eine Lungenfunktionsprüfung ohne Einschränkung möglich
9. eine Begleittherapie in vollem Umfang und ohne Einschränkung möglich

Als Ausschlusskriterien galten:

1.  $FEV_1$ -Differenz zwischen *Screening* und *Baseline* größer als 10%
2. CRP differierte zwischen *Screening* und *Baseline* mehr als 50%
3. Vorliegen eines Glaukoms, eines zerebralen Anfallsleidens, einer Herzinsuffizienz oder einer affektiven Störung
4. Intravenöse antibiotische Therapie in den letzten 4 Wochen vor Visite 1
5. Hochdosierte Steroidtherapie war notwendig
6. On-Off-Therapie mit Tobramycin in den vergangenen 14 Tagen
7. Zeitgleiche Teilnahme an einer zweiten Studie
8. Schwangere und stillende Mütter

### 2.3.3 Individuelle Abbruchkriterien

Die Behandlung wurde individuell abgebrochen, wenn mindestens einer der folgenden Umstände zutraf:

1. Nichteinhaltung des Studienprotokolls (Versäumen der Präparateinnahme vier Mal in Folge oder sechs Mal insgesamt)
2. Unzumutbare Nebenwirkungen, insbesondere Herzrhythmusstörungen, Leberfunktionsstörungen (GPT-, GOT-Erhöhung auf das Doppelte des Normwerts), Agranulozytose, Glaukom, Dyskinesie, Polyneuropathie, Alveolitis, Kardiomyopathie oder epileptische Anfälle
3. jegliche neu aufgetretene pulmonale Komplikation (Pneumothorax, endotracheale oder bronchiale Haemorrhagie)
4. notwendige antibiotische Behandlung im Rahmen einer pulmonalen Zustandsverschlechterung
5. jegliche Umstände, welche die Gesundheit des Patienten hätten gefährden können

### 2.3.4 Begleitende Therapie

Etablierte individuelle Therapiemaßnahmen, jegliche medizinisch indizierte Begleitmedikation, sowie andere supportive Maßnahmen zur Verbesserung der Lungenfunktion wie inhalative Sekretolyse oder Physiotherapie wurden während der Studie weitergeführt.

## 2.4 Studienmedikation

In dieser Studie sollte Amitriptylin, ein seit 1962 zugelassenes und mittlerweile etabliertes trizyklisches Antidepressivum, auf seine potentiell anti-inflammatorische Wirkweise bei CF geprüft werden. Als vergleichendes Kontrollpräparat (Placebo) wurde Maisstärke eingesetzt.

### 2.4.1 Prüfpräparat

Die Ergebnisse der vorhergehenden Studienphase APA IIa zeigten für den Einsatz bei CF ein Wirkmaximum bei einer Dosierung von 2 x 25mg pro Tag, wobei höhere Dosierungen zu einer stärkeren Nebenwirkungsrate (vornehmlich Müdigkeit und Mundtrockenheit) führten. Aus diesem Grund wurde die tägliche Dosis auf initial 2 x 12,5mg festgelegt und nach 2 Tagen Behandlung auf 2 x 25mg erhöht.

Die orale Einnahme der Kapseln erfolgte morgens und abends während insgesamt 28 Behandlungstagen.

### 2.4.2 Placebopräparat

Die Verabreichung des Placebo-Präparates (Maisstärke) erfolgte analog zum Verum-Präparat: 25mg täglich in zwei Dosierungen (2 x 12,5mg) und Anpassung der Dosierung auf 2 x 25mg nach zwei Tagen Therapie.

### 2.4.3 Nebenwirkungen

Zur Detektion eventuell auftretender Nebenwirkungen wurde bei jeder Visite auf eine Kontrolle der Vitalparameter (Herzfrequenz, Blutdruck, Gewicht), der Blut- und Leberwerte (Transaminasen und Kreatinin) Wert gelegt, sowie auf das Durchführen eines EKGs an Tag 14. Jegliches Auftreten von unerwünschten Nebenwirkungen wurde dokumentiert.

Die unter der Einnahme von Amitriptylin bekannten unerwünschten Nebenwirkungen sind in Kapitel 1.4.1.3 aufgelistet.

## 2.5 Zielparameter

Grundlage der Studie ist die Erkenntnis aus vorangegangenen Studien, dass eine Mangelfunktion von CFTR-Molekülen zu einer Akkumulation von Ceramid in pulmonalen Epithelzellen und Makrophagen führt. Der dadurch ausgelöste

proinflammatorische und proapoptotische Zustand der Lunge, sowie die gesteigerte Infektanfälligkeit gegenüber *P. aeruginosa*, konnte durch eine Behandlung mit Amitriptylin reduziert werden.

Um die Hypothese zu prüfen, ob Amitriptylin letztlich positive Auswirkungen auf die Lungenfunktion CF-Erkrankter hat, wurden folgende Zielparameter für die Studie APA IIb festgelegt:

### 2.5.1 Primärer Zielparameter

Primäres Ziel war die Verbesserung der Lungenfunktion relativ zur *Baseline* in 4 Wochen. Als *Baseline* sind die erhobenen Untersuchungsdaten an Visite 2 definiert, also vor erster Gabe der Studienmedikation. Diese überprüften wir bei jeder Sitzung mittels eines Spirometers, wobei die Hauptmessgröße die Forcierte Einsekunden Vitalkapazität (FEV<sub>1</sub>) war.

### 2.5.2 Sekundäre Zielparameter

Sekundäre Zielkriterien im Vergleich zur Placebo-Gruppe waren:

1. Steigerung (absolut und relativ zur *Baseline*) der Lungenfunktion (FVC, MEF<sub>25</sub>) nach 2 und nach 4 Wochen
2. Abnahme der Ceramidkonzentration in Epithelzellen des Atmungstrakts
3. Abnahme der chronischen bakteriellen Besiedlung (*P. aeruginosa*, *S. aureus* u.a.)
4. im Trachealsekret Reduktion des proinflammatorischen Zytokins IL-8 (fakultativ IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ) und Anstieg des anti-inflammatorischen IL-10
5. im Serum fakultativ Reduktion der proinflammatorischen Zytokine IL-8 und IL-6 sowie Anstieg des anti-inflammatorischen IL-10
6. Abnahme des DNA-Gehalts und der Granulozytenkonzentration im Trachealsekret
7. Reduzierung der Infektionen und der akuten Exazerbationen der Lunge, beurteilt anhand folgender Kriterien, von welchen mindestens zwei zutreffen mussten: Veränderung der Sputummenge und/oder Sputumfarbe, verstärktes Husten oder verstärktes Krankheitsgefühl, Müdigkeit oder Erschöpfung, Anorexie bzw.



Gewichtsverlust, Abnahme der Lungenfunktion um  $\geq 10\%$ , radiologische Veränderungen oder verstärkte Dyspnoe.

### 2.6 Statistisches Verfahren

Zur umfassenden Beurteilung, insbesondere der Sicherheit der Therapie, wurden alle Untersuchungsergebnisse aller ursprünglich in die Studie aufgenommenen Patienten nach dem intention to treat-Prinzip (ITT) ausgewertet, auch wenn von den im Prüfplan aufgestellten Studienbedingungen abgewichen wurde.

Die Daten des primären Zielparameters wurde nach dem per protocol-Prinzip (PP) analysiert. Das heißt, es wurden bei der Auswertung nur die Ergebnisse derjenigen Patienten berücksichtigt, welche sich während des Behandlungszyklus prüfplankonform verhielten. Im Konkreten konnten diejenigen Patienten nicht berücksichtigt werden, welche die Präparateinnahme vier Mal in Folge bzw. im Ganzen sechs Mal versäumten. Zudem wurden zur Vermeidung falsch-positiver (CRP-Abnahme) oder falsch-negativer (CRP-Zunahme) Ergebnisse die Patientendaten aus der PP-Analyse ausgeschlossen, sofern der CRP-Wert im Rahmen einer viralen Infektion während der Studienzeit um das 1,5-fache stieg bzw. um weniger als  $1/3$  des *Baseline*-Wertes sank.

Nicht berücksichtigt wurden in der statistischen Auswertung des primären Zielparameters FEV<sub>1</sub> die Daten von Patienten, bei welchen über einen Zeitraum von 4 Wochen keine Lungenfunktionsprüfung durchgeführt werden konnte. Waren die übrigen Untersuchungsergebnisse nach zwei bzw. vier Wochen vollständig, konnten diese jedoch in die Analyse der sekundären Zielparameter mit einbezogen werden.

## **2.7 Studienbedingte klinische und laboratorische Untersuchungen**

Neben bedarfsweise indizierten medizinischen Untersuchungen (wie beispielsweise einem Röntgenthorax) wurden im Rahmen der Studie folgende Tests in Klinik und Labor durchgeführt:

### **2.7.1 Lungenfunktion (Spirometrie)**

Den primären Zielparameter der Studie, die Verbesserung der Lungenfunktion, testeten und dokumentierten wir an allen Behandlungstagen (Tag -14, 1, 15, 29) sowie 7 Tage nach der letzten Behandlung (Tag 36). Hauptparameter zur klinischen Beurteilung des Behandlungserfolges stellte dabei die FEV<sub>1</sub> dar. Die Messgrößen Forcierte Vitalkapazität (FVC) und der Mittlere Expiratorische Fluss (MEF<sub>25</sub>) wurden hinzugezogen, um ein umfassendes Bild zu erhalten. Die Lungenfunktionsmessung wurde an einem Bodyplethysmographen der Firma Jaeger (Höchberg, Deutschland) durchgeführt.

### **2.7.2 Gewicht**

Die Veränderung des Körpergewichts im Zeitraum der Studie erfassten wir aus zweierlei Gründen. Eine Gewichtszunahme ist bei reduzierter Atemarbeit und damit sich erholender Lungenfunktion zu erwarten. Dies wäre ein indirekter Hinweis auf einen Therapieerfolg. Es kann sich bei einer Gewichtszunahme im Verlauf der Therapie jedoch auch um eine gängige Nebenwirkung von Amitriptylin infolge Appetitsteigerung handeln. Im Falle einer Gewichtszunahme ist die Ursache somit nicht eindeutig.

### **2.7.3 Vitalparameter**

Unter Einnahme von Amitriptylin konnten Veränderungen in der Herzfrequenz und orthostatische Regulationsstörungen beobachtet werden. Um diese möglichen Begleiterscheinungen zu erfassen, wurde bei jeder Visite Wert auf eine Blutdruck- und Herzfrequenzkontrolle gelegt.

### 2.7.4 Elektrokardiogramm (EKG)

An Tag 14 wurde ein EKG geschrieben. Dies diente zum Ausschluss unter Amitriptylin beobachteter Herzrhythmusstörungen und kardiomyopathischer Veränderungen.

### 2.7.5 Blut (Serum)

An vier Tagen (Tag -14 (-7), 1, 15, 29) wurde den Patienten 12ml Blut abgenommen und anschließend abzentrifugiert (10 min bei 3.500 U/min). Von dem erhaltenen Serum wurde 1ml zur Bestimmung der Leukozytenzahl separiert, 2ml zur Bestimmung der klinisch chemischen Parameter (CRP, Kreatinin, Harnstoff, GOT, GPT) und 5ml zur fakultativen Bestimmung des Amitriptylin-Gehalts (an Tag 1 und 29). Weitere 2ml des erhaltenen Serums wurden nach eindeutiger Etikettierung unverzüglich bei -20°C für eine spätere kollektive Bestimmung der Zytokine (IL-6, IL-8, IL-10) eingefroren.

### 2.7.6 Trachealsekret (Sputum)

Bei jeder Visite bestimmten wir im Sputum der Patienten den DNA-Gehalt, außerdem die *P. aeruginosa*-Keimzahl, die Zytokine IL-8 und IL-10 (fakultativ IL-1 $\beta$ , IL-6 und TNF- $\alpha$ ) und die Leukozytenanzahl. Um die hierfür notwendige Menge von mindestens 1,5ml zu erhalten, inhalierte der Patient vor Abnahme des Sputums mit 5,85%-iger Kochsalzlösung.

### 2.7.7 Epithelzellen

An Visite 2 und 4, fakultativ auch an Visite 3, wurde mit der Technik der nasalen Schleimhautbürstung Epithelzellen zur Bestimmung der zellulären Ceramidexpression entnommen. Die mit einer Zervixbürste aus der hinteren Nasengrube heraus gelösten Epithelzellen, wurden sofort in 2ml 4%-igem Paraformaldehyd fixiert und nach Essen ins Labor Prof. Gulbins versandt. Dort wurde der relative Ceramidgehalt der Epithelzellen mittels eines Immunfluoreszenz-Verfahrens (siehe 2.8.1) erfasst.

### 2.7.8 Urin

Eine einmalige Urinabgabe aller weiblichen Studienteilnehmer im gebärfähigen Alter war notwendig zum Ausschluss einer Schwangerschaft. Der Test mittels eines standardisierten Schwangerschaftsstreifens erfolgte nach Möglichkeit an Visite 1, spätestens jedoch vor Einnahme der ersten Studienmedikation an Visite 2.

## 2.8 Labortechnische Verfahren

### 2.8.1 Ceramidexpression

Zur Erfassung des Ceramidgehalts der nasalen Epithelzellen kam ein semiquantitatives Verfahren mittels Immunofluoreszenz zur Anwendung.

#### 2.8.1.1 Untersuchungsablauf

Aus der hinteren Nasengrube wurden mithilfe einer Zervixbürste nasale Epithelzellen gewonnen und zunächst in 2% Paraformaldehyd fixiert. Mit dem *Dounce-Homogenizer* wurden die Zellen lysiert, um anschließend die Zellkerne und die noch intakten Zellen abzentrifugieren (2000 rpm, 10 min bei 4°C). Der Überstand wurde verworfen und das Schleimpellet je nach Größe in 50-100µl Pufferlösung (Hepes/Saline) resuspendiert. Im Anschluss wurde die Lösung in ein Eppendorfgefäß überführt.

Jetzt erfolgte die Zugabe des gegen die Ceramidbestandteile gerichteten Primärantikörpers (Cy3-Anti-Ceramid, Maus-IgM von Glycobiotech, # MAB 0011, Verd. 1:100). Die Antikörperlösung wurde zuvor in H/S + 5% FCS im Mengenverhältnis 1:50 verdünnt. Das Volumen der Primär-AK-Lösung entsprach dem Volumen der Zelllösung (1:1), sodass eine Endverdünnung von 1:100 vorlag.

Nach einer Inkubationszeit von 45-60 min bei Raumtemperatur wurde das Gemisch bei 1500 rpm 5 min. abzentrifugiert und der Überstand verworfen.

Es folgte ein dreimaliger Waschvorgang mit H/S und 0,05%igem Tween 20 und sich jeweils anschließendem Abzentrifugieren.

Das entstandene Pellet wurde jetzt mit dem Sekundärantikörper bestückt (50-100µl), einem monoklonalen, fluoreszenzmarkierten Antikörper (Cy3 F(ab')<sub>2</sub> Frag. Esel anti

Maus von Jackson Immuno Research, # 715-166-020) in der Verdünnung 1:500. Dieser richtet sich gegen den Primärantikörper und sorgt für die Farbentstehung.

Nach einer Ruhezeit von 45-60 min bei Raumtemperatur erfolgten wieder drei Waschvorgänge, davon zweimal mit H/S und 0,05%igem Tween 20, das letzte Mal nur mit der Pufferlösung. Nach einem letzten Abzentrifugieren wurde das Pellet in sehr wenig (10-20µl) H/S noch einmal resuspendiert.

Die entstandene Lösung wurde auf einen Objektträger getropft. Im Anschluss wurde um den Tropfen mit einer Mischung aus Mowiol, einem Polyvenylalkohol, und Dabco (Triethylendiamin) ein Ring gezogen. Der Tropfen wurde mit einem Coverslip abgedeckt und das Ganze nach einer kurzen Antrockenzeit mit Nagellack versiegelt.

Mithilfe eines Fluoreszenzmikroskops (Leica DMIRE 2) konnte nun die Intensität der Farbemission ermittelt werden.

### **2.8.1.2 Auswertung**

Anhand einer 5-stufigen Reihe (0,1,2,3,4) wurde die Intensität der Färbung eingeteilt. Die Reihe reicht von "sehr schwach" bis "sehr stark". Die Stärke der Farbemission korreliert dabei positiv mit dem Ceramidgehalt der Epithelzellen. Auf diese Weise konnte die relative Veränderung der zellulären Ceramidexpression im Verlauf der Studie semiquantitativ dokumentiert werden.

### **2.8.2 Zytokin-Assay**

Ein Ungleichgewicht von pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen im Trachealraum wird als Hauptursache für die Entwicklung einer *Pseudomonas*-Infektion diskutiert (vergleiche 1.2.2.6). Aus diesem Grund waren zur Beurteilung der Wirkung von Amitriptylin auf das Immunsystem folgende Interleukine von Interesse: die proinflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-6 und IL-8, sowie das anti-inflammatorische Zytokin IL-10. Die Bestimmung erfolgte quantitativ in Serum und Trachealsekret.

Wir bestimmten quantitativ mit dem Bio-Plex 200 System (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland), einem Gerät, welches mittels sogenannten bead-basierten Multiplex Assays die zeitgleiche Quantifizierung mehrerer Zytokine ermöglicht.

### 2.8.2.1 Prinzip des Assays

Die Technologie des Zytokin-Array-Assays basiert auf dem Prinzip eines „Sandwich-ELISA“ (Bio-Plex Cytokine Assay, Instruction Manual):

Ein spezifisch gegen das gesuchte Zytokin gerichteter Antikörper wird kovalent an magnetische 5,6 µm Polystyren-Beads gebunden. Dies sind Mikropartikel, welche einen für jedes Zytokin individuellen fluoreszierenden Farbcode besitzen.

Es wird eine Probe mit unbekannter Zytokinmenge zugegeben. Diese reagieren mit den antikörpergebundenen Beads. Der Überschuss ungebundener Proteine wird ausgewaschen.

Jetzt wird der Lösung ein weiterer kovalent an Biotin gebundener Antikörper hinzugefügt. Dieser bindet an eine zweite Bindungsstelle des gesuchten Zytokins, sodass sich eine sandwichartige Anordnung der Antikörper um das Zytokin ergibt.

Anschließend wird Streptavidin-Phycoerythrin (SA-PE) beigefügt, welches an die Biotin-gebundenen Antikörper bindet und mittels seiner fluoreszierenden Eigenschaft dem Nachweis des Zytokin-Antikörperkomplexes dient.

Mithilfe der „Bio-Plex Manager Software“ kann nun, basierend auf Farbe und Fluoreszenz der Beads, die Identifikation und Quantifizierung der Zytokine in den individuellen Proben automatisch berechnet werden. Dabei ist die Konzentration des zu bestimmenden Zytokins proportional zum Ausmaß der Fluoreszenzreaktion.

### 2.8.2.2 Material

Neben dem Bio-Plex Suspensions Array System benötigt man den Bio-Plex Zytokinreagens Kit. Dieser besteht aus sterilen Filterplatten mit 96 Wells (Probekammern), dem Detektionsantikörper („detection antibody“), dem Assay-Puffer („Bio-Plex Assay Buffer“), dem Wasch-Puffer („bio-plex wash buffer“), dem Streptavidin-Phycoerythrin (100 x) (SA-PE), den „25 x Stock Beads“, dem „Master Standard Stock“, einer Standardlösung bekannter Zytokinkonzentration, und der Bio-Plex Standardverdünnungslösung „standard diluent“.

Entsprechend den Angaben des Herstellers wurde das Kit bei 4°C gelagert und das Streptavidin-PE stets lichtgeschützt aufbewahrt.

### 2.8.2.3 Untersuchungsablauf

Entsprechend der Anleitung des Herstellers wurden die Untersuchungsplatten folgendermaßen vorbereitet und bestückt: Zunächst wurden die Serum- und Sputumproben sowie alle Puffer- und Verdünnungslösungen auf Raumtemperatur aufgewärmt. Es war darauf zu achten, dass das Gefäß mit den lichtempfindlichen Beads stets in Alufolie eingewickelt ist. Vor Untersuchungsbeginn wurde unter Berücksichtigung der zu untersuchenden Proben, der Kontrollen (C1-C4) sowie der Zytokinstandardverdünnungsreihe, die benötigte Anzahl der Wells bestimmt sowie die Anordnung der Proben auf der 96-Well-Filterplatte festgelegt. Die neunstufige Zytokinstandardverdünnungsreihe (S1-S9) stellten wir aus einer vorgefertigten Bio-Plex Standardlösung „Master Standard Stock“ und der Bio-Plex Standardverdünnungslösung her. Mit letzterer erfolgte auch die Verdünnung der Testproben.

Im nächsten Schritt stellten wir die sogenannte „*Multiplex bead working solution*“ her, bestehend aus „25x Stock Beads“ und „Bio-Plex Assay Buffer“. Nach folgendem Schema wurden die Wells nun bestückt: Zunächst wurden je 100µl „Bio-Plex assay buffer“ in die Wells pipettiert und anschließend mittels Vakuumfiltration wieder extrahiert. Daraufhin folgte die Pipettierung von je 50µl der hergestellten „*Multiplex bead working solution*“. Diese wurde ebenfalls vakuumfiltriert und anschließend mit je 100µl „Bio-Plex wash buffer“ zweimal gewaschen. Zur Inkubation wurde die Platte nun mit versiegelndem Folienkleber und lichtschützender Alufolie bedeckt und auf einen Schüttler gestellt: die ersten 30 Sekunden (sec) bei einer Frequenz von 1.100rpm und weitere 60 Minuten (min) bei 300rpm. Es wurde wieder eine Vakuumextraktion der Wells durchgeführt, gefolgt von einem dreimaligen Waschvorgang mit je „100µl „Bio-Plex wash buffer“.

Als nächster Schritt wurden die Wells mit je 25 µl „Bio-Plex detection antibody working solution“ bestückt, welche vorher aus „50 x stock detection antibody“ und „detection antibody diluent A“ eine „Bio-Plex detection antibody working solution“ hergestellt wurde. Entsprechend dem oben beschriebenen Vorgehen schloss sich eine 60minütige Inkubation und ein dreimaliger Waschvorgang an.

Jetzt wurde die Streptavidin-PE-Lösung gemischt, bestehend aus Streptavidin-PE (100 x) und „Bio-Plex assay buffer“, und davon je 50 µl in jedes Well pipettiert. Es schloss

sich nach oben beschriebenem Vorgang eine 10minütige Inkubation an, sowie ein dreimaliger Waschvorgang.

Mittels je 125 µl „Bio-Plex assay buffer“ wurden die Beads schließlich resuspendiert und die Platte anschließend auf dem Schüttler noch einmal inkubiert (1 min bei 1.100 rpm). Nach einem letzten kurzen Schüttelvorgang (30 sec bei 1.100rpm) konnte die Platte in das Bio-Plex Gerät eingesetzt werden. Unter „Run Protocol“ wurde die Zytokinmessung aktiviert.

### 2.8.2.4 Auswertung

Mittels des „Bio-Plex Suspension Array System“ können in einem Analysevorgang der Inhalt von bis zu 96 Wells ausgewertet werden.

Vor jedem Messzyklus wurde ein Plattenplan erstellt, auf welchem die Anordnung der vorbereiteten Testproben, der Wells der Standardverdünnungsreihe (S1-S9) und der Kontrollen (C1-C4) ersichtlich waren. Zudem ein Messprotokoll, welches der Dokumentation der zu bestimmenden Zytokine (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 und IL-10) diene.

Mit der „Bio-Plex Manager Software“, welche das Ergebnis sowohl als mittlere Fluoreszenzintensität als auch als Konzentration (pg/ml) darstellt, wurden die Daten analysiert. Dabei entspricht die Konzentration des jeweiligen bead-gebundenen Zytokins dem Ausmaß der Fluoreszenzreaktion des Streptavidin-PE-Signalmoleküls.

Die Auswertung erfolgte anhand einer definierten Standardkurve im Rahmen einer nichtlinearen Regressionsanalyse.

### 2.8.3 Mikrobiologie

Durch Anzucht von Sputum bei Visite 2 und 4 erfassten wir die quantitative Veränderung der mikrobiellen pulmonalen Besiedelung im Verlauf der Therapie mit Amitriptylin. Von primärem Interesse war die Quantifizierung von *P. aeruginosa*, dem bei CF-Patienten häufigsten und relevantesten Bakterium. Eine chronische Lungeninfektion wird jedoch auch häufig durch andere Keime wie *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), sowie, wenn auch weniger häufig, durch u.a. *Haemophilus influenzae*, *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Achromobacter xylosoxidans/dentrificans*, *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli*, *Acitenobacter sp. baumannii*, *Staphylococcus epidermidis* und *Vibrio parahaemolyticus*



ausgelöst. Auch Pilzwachstum ist sehr häufig zu finden, sowohl Schimmel- als auch Sprosspilze, von welchen der Hefepilz *Candida albicans* am häufigsten ist.

### 2.8.3.1 Untersuchungsablauf

Das Sputum wurde nach Abnahme in einem Verhältnis von 1:5 bis 1:20 mit DTT verdünnt und am selben Tag auf Nährböden ausplattiert. Um die Keimzahl der Erreger bestimmen zu können, stellten wir eine vierstufige Verdünnungsreihe  $V_0$ - $V_3$  mit dem Faktor  $10^{-2}$  her, wobei  $V_0$  das bereits mit DTT verdünnte Sputum darstellt.  $V_1$ - $V_3$  setzten sich zusammen aus je 990  $\mu$ l PBS, und je 10  $\mu$ l der vorhergehenden Verdünnungsstufe.

Zur Kultivierung der Bakterienstämme wurden zwei verschiedene Agarplatten verwendet: Endo-Platten zur Anzucht von *P. aeruginosa* und bluthaltige CNA-Platten für den Fall einer Besiedelung mit *S. aureus*. Zum Ausplattieren verwendeten wir eine Ausplattiermaschine („Spiral Plater Cu.“, Spiral Systems Inc.). Die Platten wurden mit je 100  $\mu$ l Bakterienlösung beimpft und anschließend bei 37°C inkubiert.

### 2.8.3.2 Auswertung

Nach 48 Stunden Inkubation wurde die Kolonisation der Platten ausgewertet, das heißt, identifiziert und die KBEs ausgezählt. Zugunsten der Genauigkeit zählte die Kolonienzahl der niedrigsten, noch übersichtlichen Verdünnung.

#### *Pseudomonas aeruginosa*

Wir identifizierten *P. aeruginosa* zunächst per Blickdiagnose und überprüften diese anschließend mithilfe des Oxidase-Tests. Zwei unterschiedliche Typen von Pseudomonaden waren dabei zu beachten, einen mukoiden und einen nicht-mukoiden Typ. Der mukoider Typ zeigt sich als glasige, teils ineinander fließende, unterschiedlich große Kolonien, der nicht-mukoider als orange-rosa farbene, runde Kolonien von etwa 1-2mm Durchmesser. Der süßliche, lindenblütenartige Geruch von *P. aeruginosa* war als weiteres Identifikationsmerkmal hinzuzuziehen.

#### *Staphylococcus aureus*

Auch diesen Erreger bestimmten wir zunächst anhand der Morphologie seiner Kolonien und sicherten die Blickdiagnose mit dem Clumping-Faktor-Test. *S. aureus* wächst in typisch goldgelben Kolonien.

### **Andere Bakterien**

Andere Oxidase- und Clumpingfaktor negative Keime wurden mittels eines MALDI TOF Massenspektrometers („Axima Assurance“, Shimadzu) identifiziert.

### **Pilze**

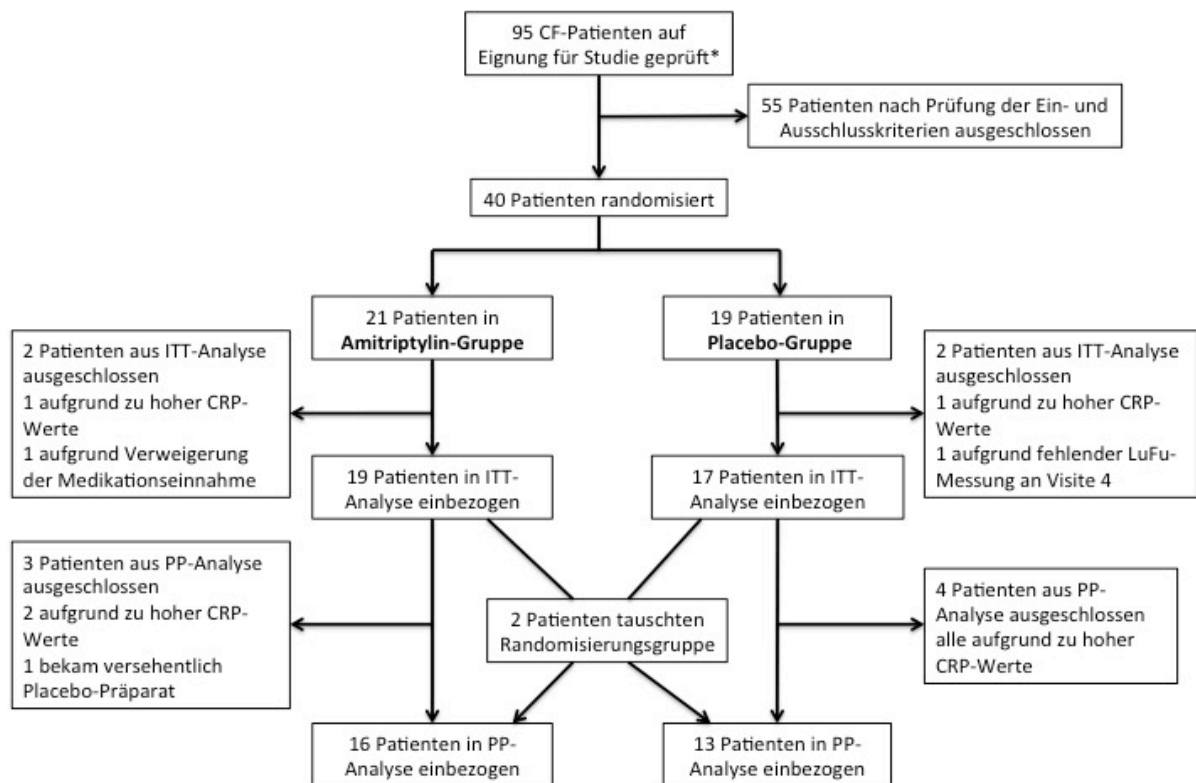
Eine Besiedelung der Lunge mit Schimmel- bzw. Sprosspilzen wurde lediglich dokumentiert, jedoch nicht quantifiziert.

## 3. Ergebnisse

### 3.1 Patienten

95 CF-Patienten im Alter über 14 Jahre wurden anfangs anhand der oben genannten Ein- und Ausschlusskriterien auf ihre Eignung für die Studie geprüft. 40 Patienten wurden nach Aufklärung über Ablauf, mögliche Komplikationen und Nebenwirkungen der Studie und Unterschreiben der Einwilligungserklärung in die Studie aufgenommen. Die Randomisierung der 40 Probanden ergab eine Zuteilung von 21 Patienten in die Amitriptylingruppe und 19 Patienten in die Placebogruppe. 2 Patienten konnten aufgrund zu hoher CRP-Werte die Studie nicht beginnen, ein Patient lehnte die Medikationseinnahme ab. Aufgrund einer versäumten Lungenfunktionsmessung am Tag 28 konnten die Daten eines weiteren Patienten in der Ergebnis-Analyse nicht berücksichtigt werden. Für die ITT (intention to treat)-Analyse standen somit die Daten von insgesamt 36 Probanden zur Verfügung.

Für die PP (per protocol)-Analyse reduzierte sich die Patientenzahl um 7 Patienten, davon 6 aufgrund im Verlauf zu hoher CRP-Werte. Aufgrund eines Fehlers bei der Randomisierung erhielt ein Patient der Verumgruppe das Placebopräparat. Nach Korrektur dieses Randomisierungsfehlers konnten schließlich in die PP-Auswertung 16 Patienten der Amitriptylingruppe und 13 Patienten der Placebogruppe eingeschlossen werden. Abbildung 3.1 liefert einen Überblick über den Ablauf der Studie.



**Abb. 3.1:** Ablaufschema der Studienphase IIb

\*Alle an ein CF-Zentrum angegliederten CF-Patienten über 14 Jahre wurden für Studie in Betracht genommen. ITT=intention to treat. PP=per protocol. CRP=C-reaktives Protein. LuFu=Lungenfunktion

Das Durchschnittsalter der 19 teilnehmenden Frauen und 17 Männer betrug  $25,5 \pm 8,4$  Jahre. Tabelle 3.1 zeigt keinen signifikanten Unterschied der beiden Behandlungsgruppen bezüglich der grundlegenden Ausgangsbedingungen wie Alter, Geschlecht, Gewicht, Lungenfunktion, Pankreasinsuffizienz und chronischer bakterieller Lungenbesiedelung.

**Tab. 3.1:** Demographische Daten und Baseline Charakteristika der an der Studienphase IIb teilnehmenden CF-Patienten

Werte sind Mittelwerte (MW)  $\pm$  Standardabweichung (SD). FEV<sub>1</sub>=Forcierte Einsekundenkapazität. FVC=Forcierte Vitalkapazität. MEF<sub>25-75</sub>=Maximale expiratorische Atemstromstärke bei 25/50/75 % im Thorax befindlicher Vitalkapazität. n.a.=nicht analysiert (n<5). *P. aeruginosa*=Pseudomonas aeruginosa. *S. aureus*=Staphylococcus aureus. MRSA=Multiresistenter Staphylococcus aureus. *S. maltophilia*=Stenotrophomonas maltophilia. *A. fumigatus*=Aspergillus fumigatus. *E. coli*=Escherichia coli. \*Für alle statistischen Auswertungen wurde der Student's t-Test herangezogen,  $p \leq 0,05$ . \*\* Einheit=logarithmischer Durchschnitt der koloniebildenden Einheiten.

Charakteristikum	Amitriptylingruppe (n=19)	Placebogruppe (n=17)	p-Wert
Anteil Frauen (%)	9 (42)	10 (56)	0,44
Alter [Jahren]	25,1 $\pm$ 8,2	25,8 $\pm$ 8,9	0,32
Gewicht [kg]	65,9 $\pm$ 8,9	53,0 $\pm$ 6,5	0,23
FEV <sub>1</sub> [%]	65,0 $\pm$ 15,6	58,4 $\pm$ 17,7	0,24
FVC [%]	81,4 $\pm$ 13,3	75,5 $\pm$ 12,8	0,19
MEF <sub>25-75</sub> [%]	35,4 $\pm$ 17,7	30,6 $\pm$ 23,4	0,51
Pankreasinsuffizienz [%]	2 (10,5)	0	n.a.
<i>P. aeruginosa</i> nicht-mukoid**	8 (7,5)	8 (6,7)	0,44
<i>P. aeruginosa</i> mukoid	7 (6,4)	7 (6,9)	0,5
<i>S. aureus</i>	10 (6,3)	10 (6,6)	0,5
MRSA	1	0	n.a.
<i>S. maltophilia</i>	6 (5,8)	2 (7,7)	0,6
<i>A. fumigatus</i>	3	3	0,5
<i>Candida albicans</i>	7	3	0,09
<i>E. coli</i>	1	1	n.a.
sonstige pulmonale Bakterien	3	3	n.a.

### 3.2 Primärer Zielparameter: FEV<sub>1</sub>-Differenz

Als primärer Zielparameter der Studie galt die Verbesserung der Lungenfunktion unter Amitriptylin-Behandlung, gemessen am Forcierten Expiratorischen Volumen in der ersten Sekunde (FEV<sub>1</sub>) (siehe Tabelle 3.2). In der ITT-Auswertung zeigte sich in der Amitriptylin-Gruppe eine absolut zu den Ausgangswerten an Visite 2 (*Baseline*)

signifikante FEV<sub>1</sub>-Verbesserung von 0,6 % (p=0,03). Relativ zu den Ausgangswerten ergab das eine Verbesserung von 0,2%, diese Steigerung war statistisch jedoch nicht signifikant (p=0,08). In der Placebo-Gruppe verschlechterten sich dagegen die Lungenfunktionswerte um durchschnittlich 3,8% bzw. um 6,1%. 5 von 19 Patienten zeigten über den Studienzeitraum einen FEV<sub>1</sub>-Abfall von mindestens 10%. Ein Funktionsverlust in diesem Ausmaß war bei keinem der Patienten unter Amitriptylin zu verzeichnen.

Die PP-Auswertung ergab eine signifikante Steigerung der Lungenfunktion unter Amitriptylin, sowohl absolut (4,9%, p=0,013), als auch relativ zur *Baseline* (8,5%, p=0,013).

**Tab. 3.2:** Differenz der Lungenfunktion (FEV<sub>1</sub> [%] absolut und relativ zur *Baseline* nach 28 Tagen Therapie mit Amitriptylin bzw. Placebo sowohl in der ITT- als auch in der PP-Analyse)

Die Lungenfunktion wurde beurteilt anhand der Veränderung des Forcierten Expiratorischen Volumens in einer Sekunde (FEV<sub>1</sub>) nach 28-tägiger Behandlung mit Amitriptylin bzw. Placebo. ITT=intention to treat. PP=per protocol. Die Werte repräsentieren arithmetische Mittelwerte (MW) ± Standardabweichung (SD). Statistisch signifikante Unterschiede (p≤ 0,05, Student's t-Test) zwischen der Amitriptylin und der Placebo-Gruppe sind mit einem Stern (\*) gekennzeichnet.

Behandlungsgruppe		Anzahl Patienten	absolut zur <i>Baseline</i> (MW ± SD)	relativ zur <i>Baseline</i> (MW ± SD)
ITT	Amitriptylin	19	0,6 ± 5,7	0,2 ± 11,4
	Placebo	17	-3,8 ± 6,9	-6,1 ± 11,5
	t-Test Ami vs. Placebo (p)			0,034*
PP	Amitriptylin	16	2,2 ± 5,2	3,6 ± 7,9
	Placebo	13	-2,7 ± 5,0	-4,9 ± 10,1
	t-Test Ami vs. Placebo (p)			0,013*

### 3.3 Sekundärer Zielparameter: Ceramidexpression

Die Veränderung der Ceramidexpression der Lungenepithelzellen vor und nach 28-tägiger Behandlung mit Amitriptylin bzw. dem Placebo, wurde in einem semiquantitativen, mikroskopischen Verfahren erfasst. Die Fluoreszenzintensität des angefärbten Ceramids korreliert dabei mit der Ceramidmenge. Sie wurde von einem verblindeten Begutachter anhand eines Scores beurteilt, welcher die Farbintensität in schwach (1), mittel (2), stark (3) und sehr stark (4) einteilte.

Sowohl die ITT- als auch die PP-Auswertung zeigte eine signifikante Abnahme der Ceramidexpression nach Behandlung mit Amitriptylin ( $p_{ITT}=0,01$  und  $p_{PP}=0,008$ ). Im PP-Patientenkollektiv war bei 9 von 14 Patienten (64%; 95%-Konfidenzintervall (CI) 35-87%) eine Abschwächung der Fluoreszenz zu sehen. Allerdings war auch in der Kontrollgruppe nach 28-tägiger Behandlung mit Placebo bei 6 von 13 Patienten (46%, 95%-CI 19-75%) ein Abfall der Ceramidintensität zu beobachten.

**Tab. 3.3:** Auswirkung von Amitriptylin auf die Ceramidexpression der Lungenepithelzellen

Die Stärke der Ceramidexpression wurde eingeteilt in schwach (1), mittel (2), stark (3) und sehr stark (4). V=Visite. ITT=intention to treat. PP=per protocol. vs.=versus. Die Werte repräsentieren Mittelwerte (MW)  $\pm$  Standardabweichung (SD). Statistisch signifikante Unterschiede ( $p \leq 0,05$ , Student's t-Test) zwischen den verschiedenen Gruppen sind mit einem Stern (\*) gekennzeichnet.

Behandlungsgruppe		Anzahl Patienten	V2 (MW $\pm$ SD)	V4 (MW $\pm$ SD)	Differenz (MW $\pm$ SD)	t-Test V2 vs. V4 (p)
ITT	Amitriptylin	17	2,2 $\pm$ 1,2	1,3 $\pm$ 0,8	-0,9 $\pm$ 1,4	0,01*
	Placebo	18	2,1 $\pm$ 1,2	1,7 $\pm$ 0,8	-0,41 $\pm$ 1,1	0,153
	t-Test Ami vs. Placebo (p)			0,384	0,101	0,131
PP	Amitriptylin	14	2,3 $\pm$ 1,3	1,2 $\pm$ 0,9	-1,1 $\pm$ 1,4	0,008*
	Placebo	13	2,1 $\pm$ 1,0	1,6 $\pm$ 0,7	-0,5 $\pm$ 1,2	0,053
	t-Test Ami vs. Placebo (p)			0,323	0,099	0,122

### 3.4 Weitere sekundäre Zielparameter

Neben der Veränderung der epithelialen Ceramidexpression wurden unter Therapie mit Amitriptylin im Vergleich zum Placebo weiter folgende sekundäre Parameter erhoben: die Veränderung der *P. aeruginosa*-Kolonienzahl, der Leukozytenzahl, der Konzentration pro- (IL-1 $\beta$ , IL-8) sowie anti-inflammatorischer Zytokine (IL-10) und des DNA-Gehalts im Trachealsekret (Tabelle 3.4), sowie die Veränderung von Leukozytenzahl und CRP-Wert im But (Tabelle 3.5). Die Messung von IL-6 und TNF $\alpha$  im Sputum war ebenfalls vorgesehen, wobei bei über 90% der Proben jedoch diese Immunparameter unter der Nachweisgrenze waren und aus diesem Grund nicht aufgeführt werden.

In der Auswertung konnten hinsichtlich der erhobenen sekundären Parameter (abgesehen von oben gezeigter Ceramidexpression) weder in der ITT-Analyse noch in der PP-Analyse, weder im Serum noch im Sputum, statistisch signifikante Differenzen festgestellt werden. Aufgrund des enormen Streuungseffekts der Infektionsparameter bei den Patienten mit akuten Virusinfektionen, sind nur die Ergebnisse der PP-Auswertung aufgeführt.



**Tab. 3.4:** Differenzen der Sekundärparameter im Serum nach 28 Tagen Therapie mit Amitriptylin bzw. Placebo in der PP-Analyse

V=Visite. PP=per protocol. CRP=C-reaktives Protein. vs.=versus. Die Werte repräsentieren Mittelwerte (MW) ± Standardabweichung (SD). Statistisch signifikante Unterschiede ( $p \leq 0,05$ , Student's t-Test) zwischen den verschiedenen Gruppen sind mit einem Stern (\*) gekennzeichnet.

Leukozyten-Konzentration [ $\mu\text{l}$ ]					
Behandlungsgruppe	Anzahl Patienten	V2 (MW ± SD)	V4 (MW ± SD)	Differenz (MW ± SD)	t-Test V2 vs. V4 (p)
Amitriptylin	8	9129 ± 1703	9855 ± 3302	726 ± 1924	0,295
Placebo	7	11360 ± 1447	12774 ± 4295	853 ± 4467	0,195
t-Test Ami vs. Placebo (p)		0,007	0,070	0,471	
Konzentration der neutrophilen Granulozyten [%]					
Behandlungsgruppe	Anzahl Patienten	V2 (MW ± SD)	V4 (MW ± SD)	Differenz (MW ± SD)	t-Test V2 vs. V4 (p)
Amitriptylin	6	61,2 ± 7,1	59,3 ± 10	-1,8 ± 6,8	0,361
Placebo	7	72,3 ± 9,6	74,9 ± 10	0,0 ± 9,5	0,294
t-Test Ami vs. Placebo (p)		0,018	0,006*	0,351	
CRP [mg/dl]					
Behandlungsgruppe	Anzahl Patienten	V2 (MW ± SD)	V4 (MW ± SD)	Differenz (MW ± SD)	t-Test V2 vs. V4 (p)
Amitriptylin	16	0,7 ± 0,8	0,7 ± 0,9	-0,1 ± 0,8	0,449
Placebo	11	1,2 ± 1,3	0,9 ± 0,7	-0,3 ± 0,8	0,228
t-Test Ami vs. Placebo (p)		0,103	0,268	0,224	

**Tab. 3.5:** Differenzen der Sekundärparameter im **Trachealsekret** nach 28 Tagen Therapie mit Amitriptylin bzw. Placebo in der PP-Analyse

V=Visite. PP=per protocol. IL=Interleukin. DNA=Desoxyribonukleinsäure *P. aeruginosa*=Pseudomonas aeruginosa. KBE=Kolonien bildende Einheit. vs.=versus. Die Werte repräsentieren Mittelwerte (MW) ± Standardabweichung (SD). Statistisch signifikante Unterschiede ( $p \leq 0,05$ , Student's t-Test) zwischen den verschiedenen Gruppen sind mit einem Stern (\*) gekennzeichnet.

Interleukine [pg/ml]					
Behandlungsgruppe	Anzahl Patienten	V2 (MW ± SD)	V4 (MW ± SD)	Differenz (MW ± SD)	t-Test V2 vs. V4 (p)
IL-1 $\beta$					
Amitriptylin	14	9455,7 ± 13723,4	14003,5 ± 15737,1	4103,2 ± 14054,4	0,147
Placebo	10	11624,7 ± 9010,0	16958,9 ± 27677,4	5316,9 ± 27478,8	0,426
<b>t-Test Ami vs. Placebo (p)</b>		0,319	0,371	0,444	
IL-8					
Amitriptylin	14	25836,5 ± 28092,5	57528,5 ± 100694,2	29903,8 ± 86691,9	0,110
Placebo	10	38145,8 ± 52743,9	19985,7 ± 18872,7	-18296,6 ± 47823,4	0,093
<b>t-Test Ami vs. Placebo (p)</b>		0,216	0,130	0,063	
IL-10					
Amitriptylin	14	19,1 ± 14,1	35,8 ± 44,1	16,8 ± 50,3	0,117
Placebo	10	20,4 ± 16,5	20,3 ± 8,0	-4,0 ± 19,1	0,228
<b>t-Test Ami vs. Placebo (p)</b>		0,416	0,144	0,126	
DNA-Konzentration [mg/dl]					
Behandlungsgruppe	Anzahl Patienten	V2 (MW ± SD)	V4 (MW ± SD)	Differenz (MW ± SD)	t-Test V2 vs. V4 (p)
Amitriptylin	15	1,1 ± 0,7	1,3 ± 1,0	0,1 ± 0,4	0,124
Placebo	11	1,5 ± 1,3	1,6 ± 1,0	-0,1 ± 0,9	0,219
<b>t-Test Ami vs. Placebo (p)</b>		0,172	0,236	0,200	

Leukozyten-Konzentration [ $\mu\text{l}$ ]					
Behandlungsgruppe	Anzahl Patienten	V2 (MW $\pm$ SD)	V4 (MW $\pm$ SD)	Differenz (MW $\pm$ SD)	t-Test V2 vs. V4 (p)
Amitriptylin	15	53,1 $\pm$ 70,6	95,6 $\pm$ 133,2	39,5 $\pm$ 115,5	0,103
Placebo	11	71,9 $\pm$ 92,0	64,0 $\pm$ 73,7	-20,4 $\pm$ 31,2	0,391
t-Test Ami vs. Placebo (p)		0,276	0,242	0,063	
<i>P. aeruginosa</i> -Keimzahl [KBE log]					
Behandlungsgruppe	Anzahl Patienten	V2 (MW $\pm$ SD)	V4 (MW $\pm$ SD)	Differenz (MW $\pm$ SD)	t-Test V2 vs. V4 (p)
Amitriptylin	10	7,0 $\pm$ 1,5	0,8 $\pm$ 0,1	-6,1 $\pm$ 1,4	0,343
Placebo	8	6,5 $\pm$ 2,2	0,8 $\pm$ 0,2	-5,7 $\pm$ 2,0	0,454
t-Test Ami vs. Placebo (p)		0,302	0,250	0,307	

### 3.5 Nebenwirkungen

Die Behandlung mit Amitriptylin wurde insgesamt gut toleriert (Tabelle 3.6). In dem mit Amitriptylin behandelten Patientenkollektiv wurden keine schwerwiegenden unerwünschten Nebenwirkungen verzeichnet. In der Placebo-Gruppe wurde am Ende der 28-tägigen Behandlung von einer Nebenwirkung berichtet, welche als schwerwiegend einzuordnen ist.

Insgesamt wurden bei 30 von 40 Patienten 68 Nebenwirkungen beobachtet, davon sind vermutlich 31 in Zusammenhang mit der Medikation zu stellen. Die unter Amitriptylin gängigsten Nebenwirkungen, Müdigkeit und Mundtrockenheit, waren vornehmlich in der Amitriptylin-Gruppe präsent, wobei sie überwiegend von transienter Natur waren.

Keine der bekannten anderen Amitriptylin-Nebenwirkungen wie beispielsweise Schwindel, arterielle Hypotonie, Überleitungsstörungen, Tremor, Dyskinesie, Obstipation, Dysurie oder Glaukom kam während unserer Studie vor. Dies ist vermutlich auf die geringe Dosierung zurückzuführen.

Im Einklang mit der Studienphase Ia (Dosisfindung und Sicherheit) ist darauf zu schließen, dass eine Behandlung von CF-Patienten mit Amitriptylin keine gravierenden Nebenwirkungen mit sich bringt und damit eine sichere Therapieoption darstellt.

**Tab. 3.6:** Nebenwirkungsprofil der Probanden während der Studienphase Ib

Bei 30 von 40 Patienten wurden insgesamt 68 Nebenwirkungen beobachtet. Die Sicherheit der Studienmedikation wurde nach jedem 28-tägigen Therapiezyklus beurteilt. \* Student's t-Test,  $p \leq 0,05$

Nebenwirkung	Amitriptylingruppe (n=45)	Placebogruppe (n=23)	t-Test (p)*
Mundtrockenheit (%)	14 (82)	3 (18)	0,053
transient	9	3	
Müdigkeit (%)	17 (71)	7 (29)	0,28
transient	12	6	
Exazerbation	0	1	0,08
Erkältung (%)	11 (65)	6 (35)	0,44
Kopfschmerzen (%)	1 (33)	2 (67)	0,11
Gastroenteritis (%)	1 (33)	2 (67)	0,11
Pruritus	0	1	0,08
Schwindel	1	0	0,24
Schlafprobleme	0	1	0,08

Hinsichtlich des Körpergewichts, welches im Rahmen der Nebenwirkungskontrolle regelmäßig gemessen wurde, kann sowohl in der ITT- als auch in der PP-Analyse eine signifikant positive Beeinflussung unter Amitriptylineinnahme festgehalten werden (Tabelle 3.7). Die Patienten der Amitriptylingruppe zeigten während der Behandlung eine durchschnittliche Gewichtszunahme von  $0,8 \pm 1,6$  kg (ITT- Auswertung,  $p=0,024$ ) bzw.  $0,5 \pm 0,9$  kg (PP-Auswertung,  $p=0,019$ ), während in der Placebogruppe das Körpergewicht tendenziell abnahm. Für die Therapie mit Amitriptylin im Vergleich zum Placebo ergab dies sowohl für das ITT-Kollektiv ( $p=0,004$ ) als auch für das PP-Kollektiv ( $p=0,006$ ) eine signifikante Differenz.

**Tab. 3.7:** Differenz des Körpergewichts [kg] nach 28 Tagen Therapie mit Amitriptylin bzw. Placebo in der PP-Analyse

Kg=Kilogramm. V=Visite. PP=per protocol. vs.=versus. Die Werte repräsentieren Mittelwerte (MW)  $\pm$  Standardabweichung (SD). Statistisch signifikante Unterschiede ( $p \leq 0,05$ , Student's t-Test) zwischen den verschiedenen Gruppen sind mit einem Stern (\*) gekennzeichnet.

Behandlungsgruppe		Anzahl Patienten	V2 (MW $\pm$ SD)	V4 (MW $\pm$ SD)	Differenz (MW $\pm$ SD)	t-Test V2 vs. V4 (p)
ITT	Amitriptylin	20	56,7 $\pm$ 8,7	57,4 $\pm$ 8,6	0,8 $\pm$ 1,6	0,024*
	Placebo	20	53,5 $\pm$ 6,7	53,1 $\pm$ 6,7	-0,4 $\pm$ 0,5	0,249
	t-Test Ami vs. Placebo (p)		0,106	0,046	0,004*	
PP	Amitriptylin	16	56,9 $\pm$ 9,7	57,4 $\pm$ 9,4	0,5 $\pm$ 0,9	0,019*
	Placebo	13	53,1 $\pm$ 6,2	52,8 $\pm$ 6,3	-0,2 $\pm$ 0,4	0,196
	t-Test Ami vs. Placebo (p)		0,115	0,072	0,006*	

## 4. Diskussion

In vorliegender klinischer Studie überprüften wir die Hypothese, ob die trizyklische Substanz Amitriptylin neben seiner Wirkung als Antidepressivum das Potential hat, bei Patienten mit CF die Lungenfunktion zu verbessern. Die Hypothese basiert auf experimentellen Voruntersuchungen (Teichgräber et al., 2008) und einer erfolgsversprechenden Pilot- und Phase IIa-Studie (Riethmüller et al., 2009), welche zur Dosisfindung und Sicherheit von Amitriptylin bei CF-Patienten durchgeführt wurde. Aus letzterer geht hervor, dass Amitriptylin in einer täglichen Dosierung von 25-75 mg über einen Zeitraum von 14 Tagen eine sichere, nebenwirkungsarme Therapieoption darstellt. Trotz des geringen Patientenkollektivs von 19 Patienten, zeichnete sich eine signifikante Verbesserung der Lungenfunktionsparameter ab. In der dargestellten Phase IIb-Studie sollte an einem größeren Patientenkollektiv dieser Effekt von Amitriptylin (primärer Zielparameter: FEV<sub>1</sub>-Steigerung) und die ihm zugrunde liegenden pathophysiologischen Mechanismen (sekundäre Zielparameter) geprüft werden.

Laut Literatur und experimentellen Vorstudien ist von folgender Hypothesenkaskade auszugehen: Eine erhöhte Ceramidkonzentration in Lungenepithelzellen, wie es bei Mäusen und Patienten mit CF nachgewiesen wurde, führt zu einem vermehrten Zelluntergang und damit zu einer erhöhten DNA-Freisetzung in die Lunge. Diese DNA-Mengen reduzieren zum einen die mukoziliäre Clearance, zum anderen erleichtern sie das Anhaften von *P. aeruginosa* und fördern so die Entwicklung von Lungeninfektionen. Im Zusammenhang mit Ceramid konnten zudem erhöhte proinflammatorische Zytokine nachgewiesen werden, sodass Ceramid entzündungsfördernde Eigenschaften zugewiesen werden können.

In unserer Studie war nach 28 Tagen Behandlung mit Amitriptylin ein deutlicher Zuwachs von FEV<sub>1</sub> zu beobachten. Dieser Effekt könnte durch eine Normalisierung der Ceramidkonzentration, einer konsekutiv verbesserten mukoziliären Clearance und durch einen Rückgang des Entzündungszustandes in der Lunge erreicht worden sein.

Die täglich verabreichte Amitriptylinmenge von 2x25 mg geht auf die Ergebnisse der Vorstudie zurück, welche für diese Dosis zum einen den größten Erfolg, zum anderen die geringste Nebenwirkungsrate verzeichnete.

Neben der Prüfung des Therapiekonzepts dient die vorliegende Studie der Festlegung der für die Studienphase III benötigten Patientenzahl.

Unserem Kenntnisstand nach ist dies bis zum jetzigen Zeitpunkt die erste klinische Studie, welche Amitriptylin in einem randomisierten, placebo-kontrollierten Verfahren auf seine lungenprotektive Wirkung bei Patienten mit CF untersucht.

### 4.1 Patienten

Anhand der im Methodikteil beschriebenen Ein- und Ausschlusskriterien wurden an drei verschiedenen CF-Zentren (Tübingen, Jena, Gießen) insgesamt 95 Patienten mit CF für die Studie gescreent. 40 Patienten wurden in die Studie aufgenommen, für die ITT-Auswertung eigneten sich die Daten von 36 Patienten, in die PP-Auswertung wurden noch 29 Patienten-Datensätze eingeschlossen. Zurückzuführen ist diese verhältnismäßig hohe Reduktion auf das häufige Auftreten pulmonaler Virusinfektionen, welchen CF-Patienten insbesondere während der Wintermonate ausgesetzt sind.

Das Patientenkollektiv zeigt eine hohe Variabilität in den klinischen Ausgangsbedingungen, auch wenn die Einschlusskriterien im Vergleich zu Vorstudie (APA IIa) bereits enger gefasst wurden. Ausgehend von der Annahme, dass eine Amitriptylin-Therapie vor allem bei Patienten mit milder bis mittelschwerer Lungenbeteiligung anschlägt (Riethmüller et al., 2009), wurde festgelegt, dass der bei der *Baseline*-Untersuchung gemessene FEV<sub>1</sub>-Wert nicht unter 30 und nicht über 90% liegen sollte. Die Inhomogenität des Patientenkollektivs ist auch dadurch gegeben, dass sich jeder Patient in einem anderen Krankheitsstadium befindet, die Krankheit eine unterschiedliche klinische Verlaufsform hat und die Patienten differente chronische bakterielle Lungenbesiedelungen aufweisen. Nicht alle Patienten waren dabei positiv für *P. aeruginosa*. Der durch die interindividuelle Variabilität bedingte Nachteil für die Aussagekraft der gewonnenen Daten soll durch eine erheblich höhere Stichprobenzahl in einer Phase III-Studie (siehe unten) relativiert werden.

## 4.2 Primärer Zielparameter: FEV<sub>1</sub>-Differenz

Die detaillierte Betrachtung der Studienergebnisse bezüglich des primären Zielparameters, der Auswirkung von Amitriptylin auf die Lungenfunktion von CF-Patienten, ist Gegenstand einer anderen Dissertation. Dennoch soll hier festgehalten werden, dass die vierwöchige Behandlung mit dem Prüfpräparat im Vergleich zum Placebopräparat zu einer signifikant positiven Veränderung der forcierten Einsekundenkapazität (FEV<sub>1</sub>) geführt hat. Während sich die Differenz in der ITT-Auswertung nur absolut zur *Baseline* ( $p=0,03$ ), nicht aber relativ zur *Baseline* ( $p=0,08$ ), als signifikant herausstellte, sind in der PP-Analyse, also unter Ausschluss der Patienten mit akuten viralen Infekten, sowohl die absolute (Steigerung um 4,9%,  $p=0,013$ ) als auch die relative Differenz (Steigerung um 8,5%,  $p=0,013$ ) als signifikant zu bewerten. Damit bestätigt sich das zugrunde liegende Hypothesenkonzept.

## 4.3 Sekundärer Zielparameter: Ceramidexpression

Der Erfolg des Studienkonzepts wird unterstützt durch die fluoreszenzmikroskopischen Beobachtungen bezüglich der Veränderung der Ceramidexpression in pulmonalen Epithelzellen. Die in unserer Studie durchgeführten Messungen der epithelialen Ceramidkonzentration vor und nach Behandlung mit Amitriptylin bestätigen die Hypothese, dass Amitriptylin als Blocker der sauren Sphingomyelinase fungiert und damit das Potential hat, die bei CF beobachtete pulmonale Ceramidakkumulation zu normalisieren.

Betrachtet man die durchschnittliche Veränderung der Ceramidkonzentration am Ende im Vergleich zum Anfang der Medikamenteneinnahme, zeigt sich innerhalb der Amitriptylingruppe sowohl für die ITT- (10 von 17 Patienten,  $p=0,01$ ) als auch für die PP-Population (9 von 14 Patienten,  $p=0,008$ ) eine signifikante Abnahme der relativen Fluoreszenzintensität. Interessanterweise konnte auch in der Kontrollgruppe bei 6 von 13 Patienten eine Abnahme der Ceramidintensität beobachtet werden. Daher ist für diesen Testparameter eine signifikante Differenz nur innerhalb der Amitriptylingruppe, nicht jedoch zwischen den beiden Prüfgruppen zu verzeichnen.



Es ist zu beachten, dass zur Analyse der pulmonalen Ceramidkonzentration ein semiquantitatives Verfahren zur Anwendung kam, das heißt, nach Anfärben der Proben erfolgte die Auswertung durch einen Begutachter, welcher die Fluoreszenzintensität der Zellen mikroskopisch anhand einer von 1 bis 4 reichenden Skala beurteilte. Um eine objektivere Messung des Ceramids zu gewährleisten, sollte das bisherige Verfahren durch eine quantitative Ceramidanalyse abgelöst werden, beispielsweise mittels Massenspektrometrie oder eines Ceramide Kinase Assays.

### 4.4 Weitere sekundäre Zielparameter

Neben der Veränderung der epithelialen Ceramidkonzentration waren in vorliegender Studie folgende sekundäre Fragen von Interesse: Senkt Amitriptylin die DNA-Freisetzung in die Lunge? Senkt Amitriptylin die pulmonale Pseudomonaslast? Hat Amitriptylin eine entzündungshemmende Wirkung?

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die hierzu erhobenen Testparameter keine signifikanten Ergebnisse lieferten. Für die Auswertung wurden zudem die Daten derjenigen Patienten ausgeklammert, welche im Verlauf einen Virusinfekt erlitten (PP-Analyse), da die breite Streuung insbesondere der Entzündungsparameter keine Tendenzen mehr erkennen ließen.

Die Bewertung der DNA-Bestimmungen im Sputum ist Inhalt einer anderen Dissertation, darum soll hier nicht weiter darauf eingegangen werden.

Zur Bestimmung der quantitativen Veränderung der mikrobiellen pulmonalen Besiedelung mit *P. aeruginosa* züchteten wir vor und nach der Therapie Aliquots aus Trachealsekret an und verglichen die Anzahl der gewachsenen Kolonien. Da sich die Zahl der Kolonienbildenden Einheiten (KBE) oft im sechsstelligen Bereich bewegten, logarithmisierten wir die Werte zugunsten einer besseren Auswertbarkeit (Normalverteilung). Interessanterweise konnte bei allen Patienten, das heißt, sowohl der Amitriptylin- als auch der Placebogruppe, eine tendenzielle Abnahme der Kolonisation beobachtet werden. Demzufolge konnte unsere Fragestellung diesbezüglich nicht

vollständig geklärt werden. Ferner ist zu bedenken, dass die Anzucht der Bakterien als auch die Verdünnung des Sputums einem manuellen Verfahren unterliegen und somit fehlerbehaftet sein können. Während bei einer niedrigen Verdünnungsstufe die Koloniendichte unübersichtlich werden konnte, war die Kolonienzahl bei der nächst höheren Verdünnungsstufe mitunter nicht mehr repräsentativ. Diese Fehlerquelle könnte durch ein objektiveres Verfahren behoben werden.

Vorstudien an CF-Mäusen zeigten eine hohe peribronchiale Anreicherung von Leukozyten und proinflammatorischen Zytokinen. Durch Hemmung der Ceramidbildung konnte die Menge der Entzündungszellen und die Ausschüttung der proinflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$  und IL-8 normalisiert, sowie der Spiegel des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 angehoben werden (Becker et al., 2010 et 2012). Um Erkenntnisse über die Wirkung von Amitriptylin auf das lokale Immunsystem beim Menschen zu gewinnen, bestimmten wir im Sputum die Leukozytenkonzentration sowie die Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-8 und IL-10. Zur Erfassung eventueller systemischer Auswirkungen interessierten uns zusätzlich die Entwicklung der Leukozyten (insbesondere der neutrophilen Granulozyten) im Serum als auch des C-reaktiven Proteins.

Die Auswertung ergab bei keinem der Immunparameter eine ersichtliche Tendenz. Lediglich die Granulozytenzahl im Sputum erwies eine deutliche Differenz zwischen der Verum- und der Kontrollgruppe. Das Ergebnis ist jedoch fraglich, da die beiden Gruppen hinsichtlich dieses Parameters, sowie hinsichtlich der Gesamtleukozytenzahl, bereits vor der ersten Medikationseinnahme signifikant differierten.

Die Nicht-Verwertbarkeit dieses Ergebnisteils ist am ehesten darauf zurückzuführen, dass die Analyse zum einen auf recht wenigen vollständigen Datensätzen basiert, zum anderen die Standardabweichungen weit über den Mittelwerten liegen, das heißt, die Streuung der Messwerte im Verhältnis zur Anzahl der Messwerte zu hoch ist, um eine fundierte Aussage machen zu können. In der geplanten Studienphase III wird die Fallzahl deutlich höher liegen, dennoch bleibt fraglich, ob bezüglich der Immunreaktion eindeutige Tendenzen ausgemacht werden können, da das Immunsystem ein sehr sensibel und rasch reagierendes System ist, welches vielen intrinsischen (z.B. Stress, Schlafmenge, Ernährung, Bewegung) und extrinsischen (z.B. Krankheitserreger und

CF-assoziiertes Asthma) Einflussfaktoren unterliegt. Darüber hinaus gilt es zu beachten, dass das Immunsystem von Patienten mit CF permanent sowohl mit chronischen als auch akuten Infekten konfrontiert ist und die Entzündungsparameter auch aus diesem Grund starke Schwankungen zeigen.

#### 4.5 Nebenwirkungen

Im Einklang mit vorausgegangener Studienphase IIa spricht vorliegende Studie für einen sicheren Einsatz von Amitriptylin bei der Behandlung von Mukoviszidose. Bei einer täglichen Dosis von 2x25 mg pro Tag über einen Zeitraum von vier Wochen traten keine schwerwiegenden unerwünschten Nebenwirkungen auf. Die für das seit langem etablierte trizyklische Antidepressivum (Kornhuber et al., 2008) typischen leichten Nebenwirkungen wie Müdigkeit und Mundtrockenheit wurden berichtet, sie waren jedoch überwiegend von transienter Natur und traten nur in den ersten Tagen der Medikamenteneinnahme auf. Alle anderen für Amitriptylin bekannten Nebenwirkungen traten nicht auf (siehe Ergebnisteil, Tabelle 3.6), was höchstwahrscheinlich mit der niedrigen Dosierung zu erklären ist. Hierbei ist zu erwähnen, dass sich die auftretenden Nebenwirkungen in der Art und Häufigkeit denjenigen von Nicht-CF-Patienten entsprachen, obwohl bei Patienten mit CF von einem generell gesteigerten Stoffwechsel auszugehen ist (Parker et al., 1997).

Auch wenn die Entwicklung des Körpergewichts unter Amitriptylin bzw. Placebo nur im Rahmen der Nebenwirkungsbeobachtung von Interesse war, soll hier kurz darauf eingegangen werden, da sich diesbezüglich ein deutlicher Unterschied zwischen den beiden Prüfgruppen zeigte. Die ITT- und die PP-Analyse ergaben, dass zum einen das Körpergewicht innerhalb der Amitriptylingruppe signifikant zunahm, und sich zum anderen auch signifikant von der Entwicklung des Körpergewichts in der Placebogruppe unterschied. Eine Darstellung ist im Ergebnisteil Tabelle 3.7 zu sehen.

Eine Gewichtszunahme ist eine unter Amitriptylintherapie häufig geschilderte Nebenwirkung, welche mit Appetitsteigerung und der sedierenden Wirkung von trizyklischen Depressiva erklärt wird. Allerdings liegt die von uns verabreichte Dosis (2x25 mg/Tag) unterhalb der für eine Behandlung einer akuten endogenen Depression

üblichen Dosis (bis zu 150 bis 300 mg/Tag). Die Zunahme des Gewichts bei den CF-Patienten, die in unserer Studie das Prüfpräparat einnahmen, könnte insofern auch ein indirekter Therapieerfolg bedeuten. Bei Erholung des Entzündungszustands der Lunge steigt die Lungenfunktion, das heißt, die Lungenarbeit wird weniger, weil effektiver, und der Kalorienverbrauch nimmt ab.

Betrachtet man die Daten der Patienten mit Amitriptylinbehandlung, fällt jedoch auf, dass bei nur 5 von 16 Patienten die Zunahme des Gewichts mit einer Steigerung der FEV<sub>1</sub> korrelierte, 5 Patienten hielten ihr Ausgangsgewicht, davon 4 mit Lungenfunktionsverbesserung, einer mit Lungenfunktionsverlust. Bei den restlichen 6 Patienten entwickelten sich Lungenfunktion und Gewicht gegenläufig. Um eine klarere Aussage über den Zusammenhang von Amitriptylineinnahme, Lungenfunktion und Gewicht treffen zu können, wäre eine Langzeitbeobachtung sinnvoll, da das Körpergewicht verschiedenen kurzfristigen Schwankungen unterliegt.

### **4.6 Schlussfolgerung und Ausblick**

Zusammenfassend sind unsere Ergebnisse der Studienphase IIb aufgrund des kleinen Stichprobenumfangs, unterschiedlicher konstitutioneller, pulmologischer und mikrobiologischer Ausgangsbedingungen der Patienten, häufiger Beeinflussung durch pulmonale Virusinfektionen und der sich daraus ergebenden breiten Variabilität der Messergebnisse nicht auf die Gesamtheit der Patienten mit CF übertragbar. Jedoch ließen sich unter Therapie mit 2x25 mg Amitriptylin statistisch signifikante und klinisch relevante Anstiege der FEV<sub>1</sub>-Werte erzielen, damit bestätigt sich die Aussage der vorangegangenen Studienphasen I (Pilotstudie) und IIa (Dosisfindung und Sicherheit). Der Erfolg des Therapiekonzepts wird gestützt durch die zeitgleiche signifikant messbare Reduktion der Ceramidkonzentration in den respiratorischen Epithelzellen. Bezüglich der weiteren sekundären Zielparameter konnten positive Tendenzen bezüglich der anti-inflammatorischen Wirksamkeit von Amitriptylin beobachtet werden, diese lagen jedoch aufgrund der zu geringen Datenmenge außerhalb des statistischen Signifikanzbereiches.

Seit Anfang August läuft die Studienphase III mit dem Ziel der Verifizierung des Wirkmechanismus und baldigen Marktzulassung von Amitriptylin im Einsatz bei CF. Analog der vorliegenden Studie APA IIb ist APA III als prospektive, randomisierte, placebokontrollierte, doppelblinde Kohortenstudie konzipiert. 102 CF-Patienten nehmen teil, die geplante Gesamtstudiendauer liegt bei maximal 24 Monaten. Um einer Aussage über die längerfristige Therapieauswirkung näher zu kommen, ist die individuelle Medikationseinnahme von 4 auf 16 Wochen erweitert worden. Die Ein- und Ausschlusskriterien wurden im Wesentlichen beibehalten, lediglich das Mindestalter der Patienten wurde auf 12 Jahre herabgesetzt und die Spanne der FEV<sub>1</sub>-Ausgangswerte auf 25 bis 100 % ausgedehnt.

Angepasst an die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, liegt das primäre Ziel in der Ermittlung der absoluten FEV<sub>1</sub>-Abweichung unter Einsatz von Amitriptylin versus Placebo. Die sekundären Zielparameter (pulmonale Pseudomonaslast, pro- und anti-inflammatorische Zytokine, DNA- und Granulozytenkonzentration im Sputum und Ceramidexpression im Respirationsepithel) wurden analog vorliegender Studie gewählt und werden erneut auf signifikante Veränderungen unter Amitriptylin geprüft. Die Epithelzellen werden nicht aus dem Nasenabstrich, sondern mittels Trachealsekret gewonnen, um mittels quantitativem Essay genauer bestimmt werden zu können.

Sollten in der Phase III die Ergebnisse der Vorstudien bestätigt werden, könnte ein völlig neues, nebenwirkungsarmes Therapiekonzept zur Behandlung der CF-Lungenerkrankung etabliert werden. Während die gegenwärtig etablierten Therapieformen auf einer rein symptomatischen Behandlung beruhen, würde die Einnahme von Amitriptylin schon früher in den fortschreitenden Prozess der Lungeninsuffizienz eingreifen, indem es das pulmonale Entzündungsgeschehen und die Infektanfälligkeit gegenüber *P. aeruginosa* herabsetzt. Es wäre mit einer Steigerung der Lebensqualität und letztlich einer Zunahme der Lebenserwartung zu rechnen, für welche der Funktionszustand der Lunge ausschlaggebend ist.

## 5. Zusammenfassung

Zystische Fibrose (CF), auch bekannt als Mukoviszidose, ist die in den westlichen Ländern am häufigsten vorkommende autosomal rezessiv vererbte Erkrankung, ausgelöst durch Mutationen im CFTR-Gen (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*). Neben weiteren Symptomen ist CF vor allem charakterisiert durch eine im Verlauf der Erkrankung immer wiederkehrende und schließlich chronisch verlaufende Infektion der Lunge. Die daraus resultierende progressive Einschränkung der Lungenfunktion stellt nach wie vor die Hauptursache für den letalen Verlauf der Krankheit dar.

Während die bislang etablierte Mukoviszidose-therapie auf rein symptomatischen Behandlungsmethoden beruht, zeichnet sich durch CF-Tiermodelle und die vorliegende klinische Studie eine neue, kausal ansetzende Therapieoption mittels des trizyklischen Antidepressivums Amitriptylin ab. Erstmals wurde das entzündungshemmende Wirkungspotential von Amitriptylin und damit seine hemmende Wirkung auf den fortschreitenden Prozess der Lungeninsuffizienz bei Menschen mit CF getestet.

Die molekularen Mechanismen, welche bei Mutationen innerhalb des CFTR-Gens zu einer gesteigerten Infektanfälligkeit des Respirationstraktes führen, sind bislang noch nicht ausreichend geklärt. Es konnte gezeigt werden, dass das CFTR-Molekül neben seiner Funktion als Anionenkanal maßgeblich an der Aufrechterhaltung des sauren pH-Milieus intrazellulärer Vesikel im Respirationsepithel beteiligt ist. Eine eingeschränkte Funktion von CFTR hat schließlich über ein resultierendes Konzentrations-Ungleichgewicht zweier für den Sphingolipidstoffwechsel wesentlicher pH-abhängiger Enzyme, der sauren Sphingomyelinase (ASM) und der sauren Ceramidase, eine Alkalisierung dieser Vesikel mit konsekutiver Ceramid-Anreicherung zur Folge.

In vorangegangenen Untersuchungen wurde die Hypothese generiert, dass die Akkumulationen von Ceramid innerhalb des Respirationsepithels eine erhöhte Zellapoptose, eine gestörte mukoziliäre Clearance, die Förderung des chronischen proinflammatorischen Status, die hohe Infektanfälligkeit gegenüber des Hauptinfektionserregers *Pseudomonas aeruginosa* und die Ausbildung von Lungenfibrose bewirkt.

Das in unserer Studie verwendete Prüfpräparat Amitriptylin agiert neben seiner Wirkung auf das zentrale Nervensystem als funktioneller Inhibitor der ASM und ist damit nach unserer Hypothese in der Lage die Ceramidkonzentration im Respirationsepithel zu senken.

Nach der erfolgreichen Durchführung einer Pilot- und Phase IIa-Studie überprüften wir im Rahmen einer placebo-kontrollierten, prospektiven, randomisierten, doppelverblindeten Studie an 40 erwachsenen CF-Patienten anhand diverser Surrogatparameter die Wirkung von Amitriptylin. Gegenstand der Untersuchung waren dabei die Veränderung der Lungenfunktion (gemessen als FEV<sub>1</sub> mittels Spirometrie), der Einfluss auf die epitheliale Ceramidexpression (fluoreszenzmikroskopisch gemessen in nasalen Mukosazellen), auf abgestorbenes Zellgewebe (gemessen als DNA-Konzentration im Trachealsekret), auf die proinflammatorische Immunlage (Leukozyten-Konzentration und Konzentration pro- sowie anti-inflammatorischer Zytokine gemessen in Trachealsekret und Serum) und auf die pulmonale Bakterienlast (gemessen als *P. aeruginosa*-Kolonienzahl).

Unter der Therapie von täglich 2x25 mg Amitriptylin lässt sich eine statistisch und klinisch relevante Veränderung der Lungenfunktionswerte bestätigen. Eine zeitgleich signifikante Abnahme der epithelialen Ceramidkonzentrationen unterstützt das zugrunde liegende Therapiekonzept. Die weiteren sekundären Zielparameter ergaben zwar positive Tendenzen, jedoch keine statistisch signifikanten Veränderungen.

Durch das ursächliche Eingreifen in den Progress der Lungeninsuffizienz könnte durch die Medikation mit Amitriptylin eine neue Mukoviszidose-Therapie etabliert werden, welche sowohl zu einer deutlichen Steigerung der Lebensqualität als auch der Lebenserwartung führen könnte. Eine klinische Phase III-Studie an insgesamt 102 CF-Patienten mit dem Ziel der Verifizierung des Wirkmechanismus von Amitriptylin im Einsatz bei CF ist zwischenzeitlich im Gange.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Abdel Shakor AB, Kwiatkowska K, Sobota A. Cell surface ceramide generation precedes and controls FcγRII clustering and phosphorylation in rafts. *The Journal of biological chemistry* 2004; **279**(35): 36778-87.
2. Arzneimittelgesetz. §4 Richtlinie 2001/83/EG. 2001.
3. Aurora P, Spencer H, Moreno-Galdo A. Lung transplantation in children with cystic fibrosis: a view from Europe. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2008; **177**(9): 935-6.
4. Barasch J, Kiss B, Prince A, Saiman L, Gruenert D, al-Awqati Q. Defective acidification of intracellular organelles in cystic fibrosis. *Nature* 1991; **352**(6330): 70-3.
5. Barenholz Y, Thompson TE. Sphingomyelins in bilayers and biological membranes. *Biochimica et biophysica acta* 1980; **604**(2): 129-58.
6. Becker K RJ, Döring G, Gulbins E. Zystische Fibrose - pathophysiologische Konzepte. *Biospektrum* 2009.
7. Becker KA, Henry B, Ziobro R, Tummler B, Gulbins E, Grassme H. Role of CD95 in pulmonary inflammation and infection in cystic fibrosis. *Journal of molecular medicine* 2012; **90**(9): 1011-23.
8. Becker PM. Pharmacologic and nonpharmacologic treatments of insomnia. *Neurologic clinics* 2005; **23**(4): 1149-63.
9. Bigal ME, Rapoport AM, Hargreaves R. Advances in the pharmacologic treatment of tension-type headache. *Current pain and headache reports* 2008; **12**(6): 442-6.
10. Birbes H, El Bawab S, Obeid LM, Hannun YA. Mitochondria and ceramide: intertwined roles in regulation of apoptosis. *Advances in enzyme regulation* 2002; **42**: 113-29.
11. Bodas M, Min T, Mazur S, Vij N. Critical modifier role of membrane-cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-dependent ceramide signaling in lung injury and emphysema. *Journal of immunology* 2011; **186**(1): 602-13.
12. Borowitz D, Baker RD, Stallings V. Consensus report on nutrition for pediatric patients with cystic fibrosis. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* 2002; **35**(3): 246-59.
13. Borst P, Elferink RO. Mammalian ABC transporters in health and disease. *Annual review of biochemistry* 2002; **71**: 537-92.
14. Boujaoude LC, Bradshaw-Wilder C, Mao C, et al. Cystic fibrosis transmembrane regulator regulates uptake of sphingoid base phosphates and lysophosphatidic acid: modulation of cellular activity of sphingosine 1-phosphate. *The Journal of biological chemistry* 2001; **276**(38): 35258-64.
15. Brodlie M, McKean MC, Johnson GE, et al. Ceramide is increased in the lower airway epithelium of people with advanced cystic fibrosis lung disease. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2010; **182**(3): 369-75.
16. Burns JL, Gibson RL, McNamara S, et al. Longitudinal assessment of *Pseudomonas aeruginosa* in young children with cystic fibrosis. *The Journal of infectious diseases* 2001; **183**(3): 444-52.



17. Collie JT, Massie RJ, Jones OA, LeGrys VA, Greaves RF. Sixty-five years since the New York heat wave: advances in sweat testing for cystic fibrosis. *Pediatric pulmonology* 2014; **49**(2): 106-17.
18. Corey M, McLaughlin FJ, Williams M, Levison H. A comparison of survival, growth, and pulmonary function in patients with cystic fibrosis in Boston and Toronto. *Journal of clinical epidemiology* 1988; **41**(6): 583-91.
19. Cuvillier O, Pirianov G, Kleuser B, et al. Suppression of ceramide-mediated programmed cell death by sphingosine-1-phosphate. *Nature* 1996; **381**(6585): 800-3.
20. Dbaibo GS, Hannun YA. Signal transduction and the regulation of apoptosis: roles of ceramide. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* 1998; **3**(5): 317-34.
21. Di A, Brown ME, Deriy LV, et al. CFTR regulates phagosome acidification in macrophages and alters bactericidal activity. *Nature cell biology* 2006; **8**(9): 933-44.
22. Doring G, Conway SP, Heijerman HG, et al. Antibiotic therapy against *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: a European consensus. *The European respiratory journal* 2000; **16**(4): 749-67.
23. Doring G, Gulbins E. Cystic fibrosis and innate immunity: how chloride channel mutations provoke lung disease. *Cellular microbiology* 2009; **11**(2): 208-16.
24. Doring G, Hoiby N, Consensus Study G. Early intervention and prevention of lung disease in cystic fibrosis: a European consensus. *Journal of cystic fibrosis : official journal of the European Cystic Fibrosis Society* 2004; **3**(2): 67-91.
25. Dumitru CA, Gulbins E. TRAIL activates acid sphingomyelinase via a redox mechanism and releases ceramide to trigger apoptosis. *Oncogene* 2006; **25**(41): 5612-25.
26. Egan TM. Solid benefit of lung transplantation for some children with cystic fibrosis. *Pediatric transplantation* 2008; **12**(2): 125-8.
27. Esen M, Schreiner B, Jendrossek V, et al. Mechanisms of *Staphylococcus aureus* induced apoptosis of human endothelial cells. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* 2001; **6**(6): 431-9.
28. Fanen P, Wohlhuter-Haddad A, Hinzpeter A. Genetics of cystic fibrosis: CFTR mutation classifications toward genotype-based CF therapies. *The international journal of biochemistry & cell biology* 2014.
29. Farrell PM, Rosenstein BJ, White TB, et al. Guidelines for diagnosis of cystic fibrosis in newborns through older adults: Cystic Fibrosis Foundation consensus report. *The Journal of pediatrics* 2008; **153**(2): S4-S14.
30. Ford AC, Talley NJ, Schoenfeld PS, Quigley EM, Moayyedi P. Efficacy of antidepressants and psychological therapies in irritable bowel syndrome: systematic review and meta-analysis. *Gut* 2009; **58**(3): 367-78.
31. Fuchs HJ, Borowitz DS, Christiansen DH, et al. Effect of aerosolized recombinant human DNase on exacerbations of respiratory symptoms and on pulmonary function in patients with cystic fibrosis. The Pulmozyme Study Group. *The New England journal of medicine* 1994; **331**(10): 637-42.
32. Futerman AH, Hannun YA. The complex life of simple sphingolipids. *EMBO reports* 2004; **5**(8): 777-82.
33. Gaskell. Post-Traumatic Stress Disorder: The Management of PTSD in Adults and Children in Primary and Secondary Care. *Psych Bulletin* 2005; **30**: 357
34. Gassert E, Avota E, Harms H, Krohne G, Gulbins E, Schneider-Schaulies S. Induction of membrane ceramides: a novel strategy to interfere with T lymphocyte

- cytoskeletal reorganisation in viral immunosuppression. *PLoS pathogens* 2009; **5**(10): e1000623.
35. Gibson LE, Cooke RE. A test for concentration of electrolytes in sweat in cystic fibrosis of the pancreas utilizing pilocarpine by iontophoresis. *Pediatrics* 1959; **23**(3): 545-9.
36. Goggel R, Winoto-Morbach S, Vielhaber G, et al. PAF-mediated pulmonary edema: a new role for acid sphingomyelinase and ceramide. *Nature medicine* 2004; **10**(2): 155-60.
37. Goldberg HJ, Deykin A. Advances in lung transplantation for patients who have cystic fibrosis. *Clinics in chest medicine* 2007; **28**(2): 445-57.
38. Goldman MJ, Anderson GM, Stolzenberg ED, Kari UP, Zasloff M, Wilson JM. Human beta-defensin-1 is a salt-sensitive antibiotic in lung that is inactivated in cystic fibrosis. *Cell* 1997; **88**(4): 553-60.
39. Goss CH, Ratjen F. Update in cystic fibrosis 2012. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2013; **187**(9): 915-9.
40. Grammatikos G, Teichgraber V, Carpinteiro A, et al. Overexpression of acid sphingomyelinase sensitizes glioma cells to chemotherapy. *Antioxidants & redox signaling* 2007; **9**(9): 1449-56.
41. Grassme H, Gulbins E, Brenner B, et al. Acidic sphingomyelinase mediates entry of *N. gonorrhoeae* into nonphagocytic cells. *Cell* 1997; **91**(5): 605-15.
42. Grassme H, Jekle A, Riehle A, et al. CD95 signaling via ceramide-rich membrane rafts. *The Journal of biological chemistry* 2001; **276**(23): 20589-96.
43. Grassme H, Jendrossek V, Bock J, Riehle A, Gulbins E. Ceramide-rich membrane rafts mediate CD40 clustering. *Journal of immunology* 2002; **168**(1): 298-307.
44. Grassme H, Kirschnek S, Riethmueller J, et al. CD95/CD95 ligand interactions on epithelial cells in host defense to *Pseudomonas aeruginosa*. *Science* 2000; **290**(5491): 527-30.
45. Grassme H, Riehle A, Wilker B, Gulbins E. Rhinoviruses infect human epithelial cells via ceramide-enriched membrane platforms. *The Journal of biological chemistry* 2005; **280**(28): 26256-62.
46. Grassme H, Schwarz H, Gulbins E. Molecular mechanisms of ceramide-mediated CD95 clustering. *Biochemical and biophysical research communications* 2001; **284**(4): 1016-30.
47. Gulbins E, Kolesnick R. Raft ceramide in molecular medicine. *Oncogene* 2003; **22**(45): 7070-7.
48. Gulbins E, Li PL. Physiological and pathophysiological aspects of ceramide. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology* 2006; **290**(1): R11-26.
49. Gulbins E RJ, Döring G. Protocol after Amendment for a Phase IIb - Study. Anti-inflammatory pulmonal therapy of CF-patients with Amitriptyline and Placebo - a randomised, double-blind, placebo-controlled, multicenter, cohort - study. 2009.
50. Haggie PM, Verkman AS. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-independent phagosomal acidification in macrophages. *The Journal of biological chemistry* 2007; **282**(43): 31422-8.
51. Hauck CR, Grassme H, Bock J, et al. Acid sphingomyelinase is involved in CEACAM receptor-mediated phagocytosis of *Neisseria gonorrhoeae*. *FEBS letters* 2000; **478**(3): 260-6.

52. He X, Okino N, Dhimi R, et al. Purification and characterization of recombinant, human acid ceramidase. Catalytic reactions and interactions with acid sphingomyelinase. *The Journal of biological chemistry* 2003; **278**(35): 32978-86.
53. Heeckeren A, Walenga R, Konstan MW, Bonfield T, Davis PB, Ferkol T. Excessive inflammatory response of cystic fibrosis mice to bronchopulmonary infection with *Pseudomonas aeruginosa*. *The Journal of clinical investigation* 1997; **100**(11): 2810-5.
54. Hobson JP, Rosenfeldt HM, Barak LS, et al. Role of the sphingosine-1-phosphate receptor EDG-1 in PDGF-induced cell motility. *Science* 2001; **291**(5509): 1800-3.
55. <http://www.cff.org>. Patient Registry Annual Data Report 2012. Zugriff 28.08.2014.
56. <http://www.de.wikibooks.org>. Stoffwechsel der Sphingolipide. Zugriff 29.08.2014.
57. <http://www.muko.info.de>. Über Mukoviszidose. Zugriff 28.08.2014.
58. <http://www.wikipedia.de>. Amitriptylin. Zugriff 29.08.2014.
59. Hurwitz R, Ferlinz K, Sandhoff K. The tricyclic antidepressant desipramine causes proteolytic degradation of lysosomal sphingomyelinase in human fibroblasts. *Biological chemistry Hoppe-Seyler* 1994; **375**(7): 447-50.
60. Inoue H, Massion PP, Ueki IF, et al. *Pseudomonas* stimulates interleukin-8 mRNA expression selectively in airway epithelium, in gland ducts, and in recruited neutrophils. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 1994; **11**(6): 651-63.
61. Ishibashi Y, Nakasone T, Kiyohara M, et al. A novel endoglycoceramidase hydrolyzes oligogalactosylceramides to produce galactooligosaccharides and ceramides. *The Journal of biological chemistry* 2007; **282**(15): 11386-96.
62. Johnson C, Butler SM, Konstan MW, Morgan W, Wohl ME. Factors influencing outcomes in cystic fibrosis: a center-based analysis. *Chest* 2003; **123**(1): 20-7.
63. Karow T L-RR. Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie; 2006.
64. Kerem B, Rommens JM, Buchanan JA, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science* 1989; **245**(4922): 1073-80.
65. Khan TZ, Wagener JS, Bost T, Martinez J, Accurso FJ, Riches DW. Early pulmonary inflammation in infants with cystic fibrosis. *American journal of respiratory and critical care medicine* 1995; **151**(4): 1075-82.
66. Kolesnick RN, Goni FM, Alonso A. Compartmentalization of ceramide signaling: physical foundations and biological effects. *Journal of cellular physiology* 2000; **184**(3): 285-300.
67. Kolzer M, Werth N, Sandhoff K. Interactions of acid sphingomyelinase and lipid bilayers in the presence of the tricyclic antidepressant desipramine. *FEBS letters* 2004; **559**(1-3): 96-8.
68. Kornhuber J, Tripal P, Reichel M, et al. Functional Inhibitors of Acid Sphingomyelinase (FIASMA): a novel pharmacological group of drugs with broad clinical applications. *Cell Physiol Biochem* 2010; **26**(1): 9-20.
69. Kornhuber J, Tripal P, Reichel M, et al. Identification of new functional inhibitors of acid sphingomyelinase using a structure-property-activity relation model. *Journal of medicinal chemistry* 2008; **51**(2): 219-37.

70. Kraynack NC SC, Sheers T, Bryson E, Mc Bride J. Standardization of a pulmonary exacerbation designed to uniformly identify pulmonary exacerbations in cystic fibrosis is associated with continued improvement in pulmonary function. *Pediatric pulmonology* 2007; **42**: 372.
71. Kumar V, Becker T, Jansen S, et al. Expression levels of FAS are regulated through an evolutionary conserved element in intron 2, which modulates cystic fibrosis disease severity. *Genes and immunity* 2008; **9**(8): 689-96.
72. Lacour S, Hammann A, Grazide S, et al. Cisplatin-induced CD95 redistribution into membrane lipid rafts of HT29 human colon cancer cells. *Cancer research* 2004; **64**(10): 3593-8.
73. Lang PA, Schenck M, Nicolay JP, et al. Liver cell death and anemia in Wilson disease involve acid sphingomyelinase and ceramide. *Nature medicine* 2007; **13**(2): 164-70.
74. Lao O, Andres AM, Mateu E, Bertranpetit J, Calafell F. Spatial patterns of cystic fibrosis mutation spectra in European populations. *European journal of human genetics : EJHG* 2003; **11**(5): 385-94.
75. LeGrys VA, Yankaskas JR, Quittell LM, Marshall BC, Mogayzel PJ, Jr., Cystic Fibrosis F. Diagnostic sweat testing: the Cystic Fibrosis Foundation guidelines. *The Journal of pediatrics* 2007; **151**(1): 85-9.
76. Lethem MI, James SL, Marriott C, Burke JF. The origin of DNA associated with mucus glycoproteins in cystic fibrosis sputum. *The European respiratory journal* 1990; **3**(1): 19-23.
77. Liou TG, Adler FR, Cox DR, Cahill BC. Lung transplantation and survival in children with cystic fibrosis. *The New England journal of medicine* 2007; **357**(21): 2143-52.
78. Megha, Bakht O, London E. Cholesterol precursors stabilize ordinary and ceramide-rich ordered lipid domains (lipid rafts) to different degrees. Implications for the Bloch hypothesis and sterol biosynthesis disorders. *The Journal of biological chemistry* 2006; **281**(31): 21903-13.
79. Megha, London E. Ceramide selectively displaces cholesterol from ordered lipid domains (rafts): implications for lipid raft structure and function. *The Journal of biological chemistry* 2004; **279**(11): 9997-10004.
80. Moran A, Dunitz J, Nathan B, Saeed A, Holme B, Thomas W. Cystic fibrosis-related diabetes: current trends in prevalence, incidence, and mortality. *Diabetes care* 2009; **32**(9): 1626-31.
81. Nährlich L MJG, 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, Döring G, Glubins E and Riethmüller J Therapy of CF-Patients with Amitriptyline and Placebo - a Randomised, Double-Blind, Placebo-Controlled Phase IIb Multicenter, Cohort-Study. *Cell Physiol Biochem* 2013; **31**.
82. O'Sullivan BP, Freedman SD. Cystic fibrosis. *Lancet* 2009; **373**(9678): 1891-904.
83. Okino N, He X, Gatt S, Sandhoff K, Ito M, Schuchman EH. The reverse activity of human acid ceramidase. *The Journal of biological chemistry* 2003; **278**(32): 29948-53.
84. Parker AC, Pritchard P, Preston T, Smyth RL, Choonara I. Enhanced drug metabolism in young children with cystic fibrosis. *Archives of disease in childhood* 1997; **77**(3): 239-41.

85. Peterson ML, Jacobs DR, Jr., Milla CE. Longitudinal changes in growth parameters are correlated with changes in pulmonary function in children with cystic fibrosis. *Pediatrics* 2003; **112**(3 Pt 1): 588-92.
86. Pfeiffer A, Bottcher A, Orso E, et al. Lipopolysaccharide and ceramide docking to CD14 provokes ligand-specific receptor clustering in rafts. *European journal of immunology* 2001; **31**(11): 3153-64.
87. Pier GB. CFTR mutations and host susceptibility to *Pseudomonas aeruginosa* lung infection. *Current opinion in microbiology* 2002; **5**(1): 81-6.
88. Pier GB, Grout M, Zaidi TS, et al. Role of mutant CFTR in hypersusceptibility of cystic fibrosis patients to lung infections. *Science* 1996; **271**(5245): 64-7.
89. Ratjen F, Doring G. Cystic fibrosis. *Lancet* 2003; **361**(9358): 681-9.
90. Riethmuller J, Anthonysamy J, Serra E, Schwab M, Doring G, Gulbins E. Therapeutic efficacy and safety of amitriptyline in patients with cystic fibrosis. *Cell Physiol Biochem* 2009; **24**(1-2): 65-72.
91. Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 1989; **245**(4922): 1066-73.
92. Rosenstein BJ, Langbaum TS. Incidence of meconium abnormalities in newborn infants with cystic fibrosis. *American journal of diseases of children* 1980; **134**(1): 72-3.
93. Rotolo JA, Zhang J, Donepudi M, Lee H, Fuks Z, Kolesnick R. Caspase-dependent and -independent activation of acid sphingomyelinase signaling. *The Journal of biological chemistry* 2005; **280**(28): 26425-34.
94. S H. Chemistry of glycosphingolipids. *Sphingolipid biochemistry* 1983: 1-165.
95. Santana P, Pena LA, Haimovitz-Friedman A, et al. Acid sphingomyelinase-deficient human lymphoblasts and mice are defective in radiation-induced apoptosis. *Cell* 1996; **86**(2): 189-99.
96. Schroeder TH, Reiniger N, Meluleni G, Grout M, Coleman FT, Pier GB. Transgenic cystic fibrosis mice exhibit reduced early clearance of *Pseudomonas aeruginosa* from the respiratory tract. *Journal of immunology* 2001; **166**(12): 7410-8.
97. Schultz MJ, Rijneveld AW, Florquin S, Edwards CK, Dinarello CA, van der Poll T. Role of interleukin-1 in the pulmonary immune response during *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 2002; **282**(2): L285-90.
98. Schwiebert EM, Egan ME, Hwang TH, et al. CFTR regulates outwardly rectifying chloride channels through an autocrine mechanism involving ATP. *Cell* 1995; **81**(7): 1063-73.
99. Sens B SM. Berichtsband Qualitätssicherung Mukoviszidose, 2011.
100. Sens B. SM. Berichtsband Qualitätssicherung Mukoviszidose, 2012.
101. Sermet-Gaudelus I. Ivacaftor treatment in patients with cystic fibrosis and the G551D-CFTR mutation. *European respiratory review : an official journal of the European Respiratory Society* 2013; **22**(127): 66-71.
102. Simons K, Ikonen E. Functional rafts in cell membranes. *Nature* 1997; **387**(6633): 569-72.
103. Sims EJ, Clark A, McCormick J, et al. Cystic fibrosis diagnosed after 2 months of age leads to worse outcomes and requires more therapy. *Pediatrics* 2007; **119**(1): 19-28.

104. Smith EL, Schuchman EH. The unexpected role of acid sphingomyelinase in cell death and the pathophysiology of common diseases. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2008; **22**(10): 3419-31.
105. Smyth A, Elborn JS. Exacerbations in cystic fibrosis: 3--Management. *Thorax* 2008; **63**(2): 180-4.
106. Spiegel S, Cuvillier O, Edsall LC, et al. Sphingosine-1-phosphate in cell growth and cell death. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1998; **845**: 11-8.
107. Spiegel S, Milstien S. Sphingosine 1-phosphate, a key cell signaling molecule. *The Journal of biological chemistry* 2002; **277**(29): 25851-4.
108. Stutts MJ, Canessa CM, Olsen JC, et al. CFTR as a cAMP-dependent regulator of sodium channels. *Science* 1995; **269**(5225): 847-50.
109. Tabary O, Escotte S, Couetil JP, et al. Relationship between IkappaBalpha deficiency, NFkappaB activity and interleukin-8 production in CF human airway epithelial cells. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 2001; **443 Suppl 1**: S40-4.
110. Teichgraber V, Ulrich M, Endlich N, et al. Ceramide accumulation mediates inflammation, cell death and infection susceptibility in cystic fibrosis. *Nature medicine* 2008; **14**(4): 382-91.
111. Thevissen K, Francois IE, Winderickx J, Pannecouque C, Cammue BP. Ceramide involvement in apoptosis and apoptotic diseases. *Mini reviews in medicinal chemistry* 2006; **6**(6): 699-709.
112. Tirouvanziam R, de Bentzmann S, Hubeau C, et al. Inflammation and infection in naive human cystic fibrosis airway grafts. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 2000; **23**(2): 121-7.
113. Trulock EP CJ, Edwards LB, et al. Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: twenty-fourth official adult lung and heart-lung transplantation report - 2007. *Heart Lung Transplant* 2007: 782-95.
114. Uceyler N, Hauser W, Sommer C. A systematic review on the effectiveness of treatment with antidepressants in fibromyalgia syndrome. *Arthritis and rheumatism* 2008; **59**(9): 1279-98.
115. Vankeerberghen A, Cuppens H, Cassiman JJ. The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator: an intriguing protein with pleiotropic functions. *Journal of cystic fibrosis : official journal of the European Cystic Fibrosis Society* 2002; **1**(1): 13-29.
116. Venkatakrisnan A, Stecenko AA, King G, et al. Exaggerated activation of nuclear factor-kappaB and altered IkappaB-beta processing in cystic fibrosis bronchial epithelial cells. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 2000; **23**(3): 396-403.
117. Walshaw M. Highlights of the North American CF Conference 2013. *Paediatric respiratory reviews* 2014; **15 Suppl 1**: 8-9.
118. Whiting P, Al M, Burgers L, et al. Ivacaftor for the treatment of patients with cystic fibrosis and the G551D mutation: a systematic review and cost-effectiveness analysis. *Health technology assessment* 2014; **18**(18): 1-106.
119. Wiegmann K, Schutze S, Machleidt T, Witte D, Kronke M. Functional dichotomy of neutral and acidic sphingomyelinases in tumor necrosis factor signaling. *Cell* 1994; **78**(6): 1005-15.
120. Wilschanski M, Durie PR. Patterns of GI disease in adulthood associated with mutations in the CFTR gene. *Gut* 2007; **56**(8): 1153-63.

121. Worlitzsch D, Tarran R, Ulrich M, et al. Effects of reduced mucus oxygen concentration in airway Pseudomonas infections of cystic fibrosis patients. *The Journal of clinical investigation* 2002; **109**(3): 317-25.
122. Xu X, Bittman R, Duportail G, Heissler D, Vilcheze C, London E. Effect of the structure of natural sterols and sphingolipids on the formation of ordered sphingolipid/sterol domains (rafts). Comparison of cholesterol to plant, fungal, and disease-associated sterols and comparison of sphingomyelin, cerebroside, and ceramide. *The Journal of biological chemistry* 2001; **276**(36): 33540-6.
123. Yamashiro Y, Shimizu T, Oguchi S, Shioya T, Nagata S, Ohtsuka Y. The estimated incidence of cystic fibrosis in Japan. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* 1997; **24**(5): 544-7.
124. Zhang Y, Li X, Grassme H, Doring G, Gulbins E. Alterations in ceramide concentration and pH determine the release of reactive oxygen species by Cfr-deficient macrophages on infection. *Journal of immunology* 2010; **184**(9): 5104-11.
125. Ziobro R, Henry B, Edwards MJ, Lentsch AB, Gulbins E. Ceramide mediates lung fibrosis in cystic fibrosis. *Biochemical and biophysical research communications* 2013; **434**(4): 705-9.

## 7. Danksagung

Großer Dank gebührt zuallererst Herrn PD Dr. med. Joachim Riethmüller für die Überlassung des Themas sowie seine ausgezeichnete Betreuung. Ich habe mich bei allen auftretenden Fragen und Problemen durchweg sehr unterstützt gefühlt. Herzlichsten Dank!

Weiterhin gilt mein Dank Frau Sook Thies für die hervorragende Einarbeitung in die laboratorischen Untersuchungsabläufe sowie dem Team des CPCS für die außerordentlich freundliche und gute Zusammenarbeit.

Ganz herzlichen Dank zudem an alle Probanden. Ohne ihre Teilnahme und ihr Durchhaltevermögen wäre diese Studie nicht möglich gewesen.

Auch möchte ich mich bei den Menschen bedanken, die mich während des Schreibens dieser Arbeit unterstützt und motiviert haben. Herzlichster Dank gilt in dieser Hinsicht insbesondere Friederike Richter, welche mir den idealen Arbeitsplatz zur Verfügung stellte.

Größter Dank gilt an dieser Stelle außerdem meinen Schwiegereltern, deren verlässliche Hilfe vor allem durch die regelmäßige Betreuung unserer Kinder für die Fertigstellung der Arbeit entscheidend war.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Ehemann Richard Wüst, welcher mit zahlreichen Anregungen technischer und inhaltlicher Art, mehrfachem Korrekturlesen und insbesondere ideeller Unterstützung einen wesentlichen Beitrag zum Gelingen dieser Dissertation geleistet hat.

Abschließend bedanke ich mich von Herzen bei meinen Eltern, welche mir dieses Studium ermöglicht haben. Danke für Euren Rückhalt und Eure vielseitige und liebevolle Unterstützung während der gesamten Studienzeit!