

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

**Simultane Tobramycin- und Colistin-Inhalation bei chronisch  
*Pseudomonas aeruginosa* infizierten Mukoviszidose-  
Patienten/innen**

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

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

**vorgelegt von**

**Balzer, Eva Maria, geb. Freitag**

**2022**

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Dr. A. Hector  
2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. E. Bohn

Tag der Disputation: 09.03.2022

*Für*  
*Professor Dr. Joachim Riethmüller*

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1.	Mukoviszidose	1
1.1.1.	Pathogenese und Phänotyp	1
1.1.2.	Diagnostik	3
1.1.3.	Prognose	5
1.1.4.	Aktuelle Therapieübersicht	5
1.2.	Chronische Lungenerkrankung bei Mukoviszidose	7
1.2.1.	Keimspektrum	10
1.2.2.	Besondere Bedeutung der Infektion mit <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	11
1.3.	Therapie der chronischen Lungenerkrankung bei Mukoviszidose	13
1.3.1.	Therapie zur Suppression von <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	14
1.3.1.1.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> wirksame Antibiotika	14
1.3.1.2.	Colistin	17
1.3.1.3.	Tobramycin	18
1.4.	Ziele und Fragestellung	19
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>21</b>
2.1.	Material	21
2.2.	Methoden	22
2.2.1.	Klinische Studie	22
2.2.1.1.	Studiendesign	22
2.2.1.2.	Studienablauf	23
2.2.2.	Studienteilnehmer/innen	25
2.2.2.1.	Einschlusskriterien	25
2.2.2.2.	Ausschlusskriterien	25
2.2.3.	Studienmedikation	26
2.2.3.1.	Anwendung	26
2.2.3.2.	Erlaubte Begleitmedikation	26
2.2.4.	Erhobene Messdaten	27
2.2.4.1.	Blut und Urin	27
2.2.4.2.	Lungenfunktion	27

2.2.4.3. Sputum	28
2.2.5. Mikrobiologische Diagnostik des Sputums	28
2.2.5.1. Endo-Agar als Nährmedium	29
2.2.5.2. Anzucht und Identifizierung der Keime	29
2.3. Datenauswertung und statistische Analyse	30
<b>3 Ergebnisse</b>	<b>32</b>
3.1. Patientenbeschreibung	32
3.2. Primärer Endpunkt	35
3.3. Sekundärer Endpunkt	37
3.3.1. Lungenfunktion	37
3.3.2. Patientensicherheit	40
3.3.3. Therapiewechsel	43
3.3.4. Entzündungsparameter	44
<b>4 Diskussion</b>	<b>45</b>
<b>5 Zusammenfassung</b>	<b>59</b>
<b>6 Literaturverzeichnis</b>	<b>61</b>
<b>7 Anhang</b>	<b>73</b>
7.1. Abbildungsverzeichnis	73
7.2. Tabellenverzeichnis	73
7.3. Erklärung zum Eigenanteil	
7.4. Danksagung	

## Abkürzungsverzeichnis

Beta-HCG	-	Beta-Humanes Choriongonadotropin
BMI	-	Body Mass Index
bzw.		beziehungsweise
cAMP	-	cyclisches Adenosinmonophosphat
CF	-	Cystische Fibrose
CFTR	-	Cystic-fibrosis-transmembrane-conductance-regulator-Gen
CNA	-	Colistin Nalidixinsäure Agar
CrP	-	C-reaktives Protein
d	-	Tag
diast.	-	diastolisch
Dtl.	-	Deutschland
DNA	-	Desoxyribonukleinsäure
DNase	-	Desoxyribonuklease
DTT	-	Dithiothreitol
ENaC	-	Epithelialer Natriumkanal
FEV1	-	forced expiratory volume (englisch): Expiratorische Einsekundenkapazität
FVC	-	forced vital capacity (englisch): Forcierte Vitalkapazität
GGT	-	Gamma-Glutamyltransferase
GM-CSF	-	Granulozyten-Monozyten-Kolonien-stimulierender Faktor
GOT	-	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
GPT	-	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
I.E.	-	Internationale Einheiten
IL	-	Interleukin
ITT	-	Intention-to-treat (englisch): Absicht zu behandeln
i.v.	-	intravenös
kb	-	kilobase
KBE	-	Koloniebildende Einheiten
Kps.	-	Kapsel
LPS	-	Lipopolysaccharide

MEF	-	Mean expiratory flow (englisch): Mittlere Atemstromstärke
Mio.	-	Million
mmol	-	Millimol
MW	-	Mittelwert
N	-	Number (englisch): Anzahl
O <sub>2</sub>	-	Oxygen (englisch): Sauerstoff
PBS	-	phosphat buffered saline (englisch): Phosphat gepufferte Kochsalzlösung
PP	-	Per Protocol (englisch): laut Protokoll
RR	-	Blutdruck
SD	-	Standardabweichung
syst.	-	systolisch
tgl.	-	täglich
TNF- $\alpha$	-	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
UAW	-	unerwünschte Arzneimittelnebenwirkungen
Urea	-	Harnstoff
V	-	Visite

# 1 Einleitung

## 1.1. Mukoviszidose

Mukoviszidose, synonymer Begriff: Zystische Fibrose (CF) tritt mit einer Prävalenz von 1:3300 auf und stellt eine der häufigsten letal verlaufenden, autosomal-rezessiv vererbten Stoffwechselstörung der weißen Bevölkerung dar. Mit einer Heterozygotenfrequenz von 1:20 bis 1:30 tragen phänotypisch gesunde Personen ein erkranktes Gen in sich <sup>1</sup>.

Der Name Mukoviszidose beschreibt die dem Krankheitsbild zugrundeliegende Pathophysiologie: Mucus- lateinisch für Schleim und viscidus- zäh. Durch verschiedene Pathomechanismen hervorgerufen, führt die Ablagerung eines zähen Schleimes zur Inflammation und Zerstörung sowie einem zystisch-fibrotischen Umbau der betroffenen Organe, gleichförmig verwandter Name: Cystische Fibrose <sup>2</sup>.

### 1.1.1. Pathogenese und Phänotyp

1989 konnte das für die Mukoviszidose ursächliche Gen *Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator Gen (CFTR)* identifiziert werden <sup>3</sup>. Das 230 kb große *CFTR*-Gen befindet sich auf dem langen Arm des Chromosom 7 (7q31.2) und kodiert für einen cAMP-regulierten Chlorid-Kanal in der apikalen Membran respiratorischer Epithelzellen sowie in submukösen Drüsen des Intestinaltraktes (Pankreas, Gallenwege und Darm), der Schweißdrüsen und der männlichen Geschlechtsorgane (Vas deferens). 1480 Aminosäuren formen das *CFTR*-Protein <sup>4</sup>.

Die Funktion des *CFTR*-Proteins besteht in einem aktiven, cAMP-regulierten Transport von Anionen: Chlorid und Bikarbonat werden durch die Zellmembran in das Lumen der Drüsenzelle sowie auf die apikalen Epithelzellen des Respirationstraktes geschleust <sup>5,6 7-9</sup>. Eine Ausnahme stellen die Schweißdrüsen dar; hier erfolgt ein Rücktransport von Chlorid von luminal nach intrazellulär.

Zudem hemmt das *CFTR*-Protein den epithelialen Amilorid-sensitiven ENaC-Kanal. Sind diese Funktionen defekt, kommt es zu einer verminderten Sekretion



von Chlorid und Hydrogenbikarbonat sowie zu einer gesteigerten Absorption von Natriumionen<sup>10,11</sup>. Dem Ionenfluss folgend diffundiert Wasser aus dem Lumen in das Interstitium sekretorischer Organe und liegt somit ebenso vermindert auf der Epithelzellschicht vor. So entsteht eine Volumenreduktion der periziliären und epithelialen Flüssigkeitsschicht mit resultierend zähflüssigem Sekret sowie einer Verschiebung des pH-Wertes in den sauren Bereich<sup>12,13</sup>.

Im **Pankreas** kommt es durch die vorzeitige Aktivierung der Verdauungsenzyme im Gangsystem zur Inflammation und zystischen Formation des Pankreasparenchyms mit Verlust der exokrinen und im weiteren Verlauf zumeist auch der endokrinen Funktion des Pankreas<sup>14</sup>.

Auch in der **Leberzelle** bietet das beim Gesunden bikarbonatreiche Sekret auf der apikalen Membran der Cholangiozyten eine Schutzfunktion vor den toxischen Gallensäuren. Bei der CF kommt es durch die Anhäufung toxischer Gallensäuren im zähen, bikarbonatarmen Sekret durch eine vermehrte Inflammationsreaktion zur Zerstörung des Leberparenchyms<sup>15,16</sup>. Die CF-Hepatopathie kann sehr variabel verlaufen mit asymptomatischer, meist transients milder Erhöhung der Transaminasenaktivität bis hin zur Entwicklung einer sekundär biliären Leberzirrhose und allen weiteren Folgekomplikationen.

Der erhöhte **Schweißchloridgehalt** der CF-Patienten/innen wird als Diagnostiktool genutzt (siehe Abschnitt 1.1.2).

Die **pulmonalen** Folgen einer CFTR-Dysfunktion werden im Kapitel 1.2 chronische Lungenerkrankung bei Mukoviszidose beschrieben.

Aktuell sind etwa 2000 Mutationen des *CFTR*-Gens bekannt, welche zu einer Funktionsstörung im CFTR-Protein führen. Die in Deutschland und auch weltweit häufigste Mutation (85.3%) zeigt an Position 508 einen Verlust von Phenylalanin (F508del Mutation), welche während der Translation zu einer Fehlfaltung des Proteins führt<sup>1,17,18</sup>. Weitere häufige Mutationen sind: N1303K (2.4%), G542X (4.5%), G551D (4.4%), R553X (1.8%)<sup>19</sup>. Phänotypisch können 6 Mutationsklassen unterschieden werden. Die Ausprägung der Funktionsstörung des Chlorid-Kanals liegt hierbei vor allem in der zugrundeliegenden genetischen Veränderung begründet. So kommt es bei einer Mutation von G542X

(molekularer Phänotyp I) beispielsweise zu einem vollständigen Fehlen des Chlorid-Kanals in der Apikalmembran, im Gegensatz zu einer nur reduzierten Syntheseleistung des CFTR-Proteins bei einer vorliegenden Typ V Mutation. In unseren Breitengraden stellt der Typ II (gestörte intrazelluläre Reifung und Transport) den häufigsten Phänotyp dar. Eine klare Geno-Phänotyp Korrelation kann nicht vollständig geklärt werden, obwohl einzelne Korrelationen bei der Pankreasfunktion sowie dem Schweißchloridgehalt gezeigt wurden<sup>17,20</sup>. Es wird angenommen, dass zusätzliche modifizierende Gene sowie Umweltfaktoren eine weitere Rolle in der Pathogenese spielen<sup>20-23</sup>. In der Abbildung 1 sind die verschiedenen Klassen gemeinsam mit den häufigsten zugrundeliegenden Mutationen aufgezeigt.

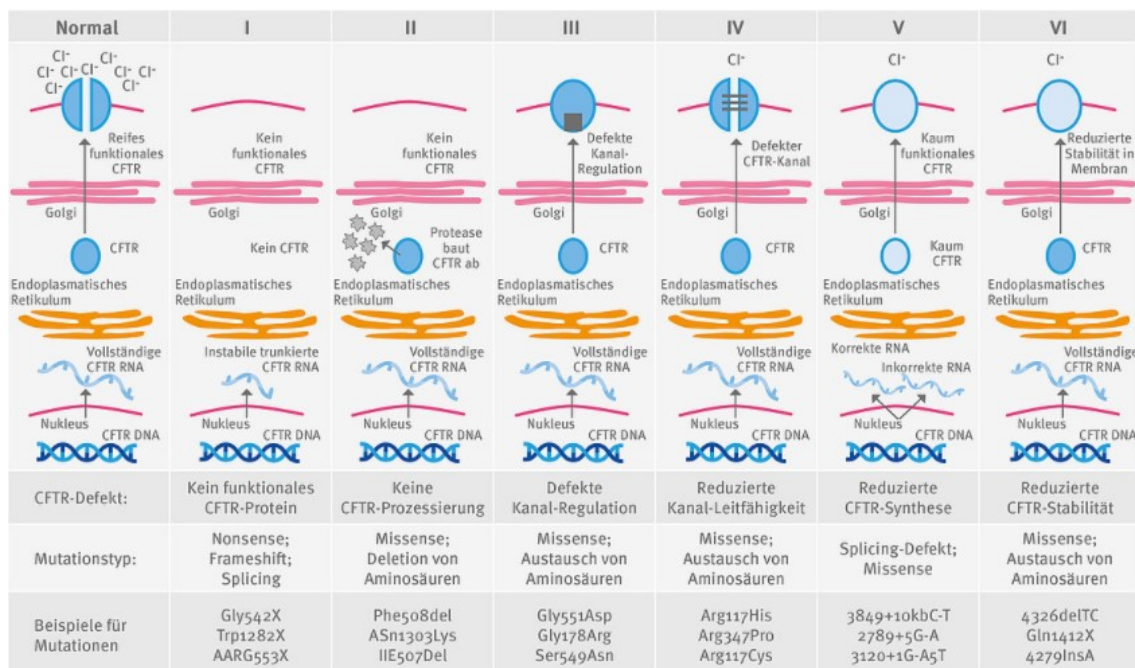


Abbildung 1: CFTR-Mutationsklassen<sup>24</sup>

### 1.1.2. Diagnostik

Laut Beschluss des gemeinsamen Bundesausschusses wird seit September 2016 flächendeckend ein Screening auf Mukoviszidose im Rahmen des Neugeborenen-Screenings angeboten, dies entspricht der klassischen Sekundärprävention. Genutzt wird der Nachweis von Immunreaktivem

Trypsinogen (IRT) und gegebenenfalls Pankreatitis-assoziiertem Polypeptid (PAP) in Kombination mit einer molekulargenetischen Analyse der 31 häufigsten *CFTR*-Mutationen aus dem Blut des Neugeborenen im Rahmen der Untersuchung der Trockenblutkarte des Neugeborenen-Screenings.

Laut dem Berichtsband Qualitätssicherung Mukoviszidose lag der Median des Alters zum Zeitpunkt der Diagnosestellung vor Einführen des Neugeborenen-Screenings bei 4,8 Jahren im Jahre 2012. Bei einer milden Verlaufsform der CF konnte sich der Diagnosezeitpunkt deutlich Richtung Jugend- und Erwachsenenalter verschieben. Nach Einführen des Neugeborenen-Screenings wurden im Jahr 2019 etwa 70% der Neudiagnosen CF im ersten Lebensjahr gestellt <sup>25</sup>.

Ein für die CF typisches und frühes Symptom stellt der Mekoniumileus bei knapp 7% (in 2019) der Betroffenen im Neugeborenenalter dar <sup>19</sup>.

Die **Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF)** hat ein Manuskript erstellt anhand dessen das weitere diagnostische Verfahren bei einer Verdachtsstellung der Mukoviszidose aufgezeigt ist. Hiernach darf die Diagnose Cystische Fibrose gestellt werden, wenn sowohl ein diagnostischer Hinweis (positives Neugeborenen-Screening, ein an CF erkranktes Geschwisterkind, ein CF typisches Symptom wie Mekoniumileus, chronische Bronchitis, Rektumprolaps, Gedeihstörung, Polyposis nasi) als auch eine *CFTR*-Funktionsstörung bei dem Patienten/innen vorliegt. Der Goldstandard zur Diagnostik einer *CFTR*-Funktionsstörung stellt die Schweißchloridmessung mittels Pilokarpin-Iontophorese dar. Liegt der Chloridgehalt aus dem gesammelten Schweiß (mindestens 15 µl, Makroduct®) oberhalb von 60 mmol/l gilt der Wert als pathologisch. Zur Diagnosesicherung müssen zwei pathologische Schweißteste zu unterschiedlichen Zeitpunkten vorliegen oder ein pathologischer Schweißtest mit direkt folgendem genetischem Nachweis. Eine molekulargenetische Diagnostik muss in jedem Fall aufgrund der sich daraus ergebenden therapeutischen Möglichkeiten erfolgen (siehe Kapitel 1.1.4 Aktuelle Therapieübersicht). Bei einem grenzwertigen Ergebnis, einem Schweißchloridgehalt zwischen 30-60 mmol/l kann durch den Nachweis zweier *CFTR*-Mutationen in trans die Diagnose gesichert werden. Nur kurz genannt

werden sollen die elektrophysischen Messungen der Funktion des CFTR-Kanals: die nasale Potenzialdifferenz und die intestinale Kurzschlussstrommessung als weiteres Diagnostiktool <sup>26</sup>.

### **1.1.3. Prognose**

Die CF kann einen schweren Verlauf oder aber auch einen milden Progress über Jahre nehmen. Wie in Kapitel 1.2 beschrieben, ist eine progrediente Verschlechterung der Lungenfunktion der lebenslimitierende Faktor der Erkrankung. Wichtige prognostische Faktoren sind die Schwere der Lungenbeteiligung, der Zeitpunkt einer Besiedlung mit *Pseudomonas aeruginosa*, der BMI sowie der Zeitpunkt der Diagnosestellung. Nach dem Berichtsband von 2018 lag bei 68,7% der 67 verstorbenen Patienten/innen eine kardiopulmonale Problematik als Haupttodesursache vor <sup>27</sup>.

In den letzten Jahrzehnten hat sich aufgrund der verbesserten medizinischen Diagnose- und Therapiemöglichkeiten die Lebenserwartung der Patienten/innen mit Mukoviszidose deutlich erhöht: von wenigen Monaten im Jahre 1950 auf 31,1 Jahre (Median) im Jahr 2012 <sup>28</sup>. Die aktuelle Lebenserwartung eines an CF erkrankten Neugeborenen beträgt 53 Jahre <sup>25</sup>.

### **1.1.4. Aktuelle Therapieübersicht**

Wurde eine Mukoviszidose diagnostiziert, sollte nach Empfehlung der Mukoviszidose Fachgesellschaft die folgende Betreuung an einem Zentrum für Mukoviszidose stattfinden. So kann eine ganzheitliche, patientenorientierte, interdisziplinäre Betreuung organisiert werden <sup>29</sup>. Therapiert wird bei dieser Systemerkrankung mit mukolytischer Atem- und Inhalationstherapie, Sport- und Physiotherapie, Prävention von bakteriellen Infektionen durch Kohortierung der Patienten/innen nach jeweiligem mikrobiologischem Befundbericht sowie entsprechenden Hygienemaßnahmen im Alltag und im Umgang mit medizinischen Produkten, systemischer oder inhalativer Antibiotikatherapie zur Keimeradikation bzw. Reduktion der Keimlast, Ernährungstherapie durch

Substitution von Pankreasenzymen und fettlöslichen Vitaminen sowie hochkalorischer Nahrung <sup>29</sup>.

Seit 2012 stehen mutationsspezifische Therapien zur Verfügung, die am ursächlichen Defekt des CFTR-Proteins ansetzen. Die so genannten CFTR-Modulatoren können eingeteilt werden in Potentiatoren, diese ermöglichen eine erhöhte Funktion des CFTR-Kanals und in CFTR-Korrektoren, diese führen zu einer verbesserten Verfügbarkeit von funktionsfähigem CFTR in der Zellmembran. Der Wirkmechanismus ist spezifisch für jeweils eine oder mehrere CFTR-Mutationsklassen. Somit erfolgt der Einsatz bei Patienten/innen mutationsspezifisch. Mittlerweile stehen verschiedene CFTR-Modulatoren zur Verfügung, die für einen großen Anteil der CF-Patienten/innen zugelassen sind. Jedoch steht diese hochpotente Therapie nicht allen CF-Patienten/innen (z.B. Klasse I Mutation) zu jedem Alter zur Verfügung <sup>24,30</sup>. Eine Übersicht der Modulatoren liefert Tabelle 1.

Zudem wird an Therapieoptionen, die den Basisgendefekt beheben, geforscht <sup>31</sup>.

Tabelle 1: In der EU zugelassene CFTR-Modulatoren nach Alter und CFTR-Genotyp <sup>24</sup>

<b>CFTR-Modulator(en)</b>	<b>Ivacaftor</b>	<b>Lumakaftor + Ivacaftor</b>	<b>Tezakaftor + Ivacaftor</b>	<b>Elexakaftor + Ivacaftor + Tezakaftor</b>
<b>Handelsname</b>	<b>Kalydeco®</b>	<b>Orkambi®</b>	<b>Symkevi®</b>	<b>Kaftrio®</b>
<b>Zugelassenes Alter</b>	Ab 4 Monaten	Ab 2 Jahren	Ab 6 Jahren	Ab 12 Jahren
<b>Genotyp</b>	Gating-Mutationen: • G551D • R117H	• F508del/ F508del	• F508del/ F508del • F508del/ Rest-funktions-mutation	• F508del/ F508del • F508del/ Minimal-funktions-mutation

## 1.2. Chronische Lungenerkrankung bei Mukoviszidose

Im Fokus der Mukoviszidose steht die Lungenerkrankung. Das Ausmaß der Lungenerkrankung ist maßgeblich für die Lebenserwartung der Patienten/innen verantwortlich <sup>22,32</sup>. In über 95% der Fälle stellt die Lungenerkrankung (zumeist kardiopulmonale Problematik) die Todesursache bei CF dar <sup>33,34</sup>.

Das respiratorische Epithel gesunder Menschen besteht aus einem zilien-tragenden Flimmerepithel, welches von einer dünnen, leicht viskösen Schleimschicht bedeckt wird (siehe Abbildung 2). Ein gerichteter Zilienschlag sorgt für den Abtransport des Schleimes sowie der sich in dem Schleim befindlichen Partikel in Richtung Rachen. Dieser Vorgang wird mukoziliäre Clearance genannt.

Aufgrund des Defektes im CFTR-Protein kommt es zu einem ionenarmen, dehydrierten und zähen Schleim, welcher sich als Plaque über das Flimmerepithel legt und den Zilienschlag zum Erliegen bringt <sup>22,32,35,36</sup>. Die Reinigungsfunktion der Atemwege von abgestorbenen Epithelien, DNA-Resten, Entzündungsmediatoren, pathogenen Erregern und Umweltpartikeln ist vermindert und es können sich leicht opportunistische Keime ansiedeln <sup>37,38</sup>. Darüber hinaus besteht eine eingeschränkte Funktion der lokalen Immunabwehr durch den erniedrigten pH-Wert und durch anaerobe Bedingungen in der unteren Mukusschicht <sup>39-42</sup>. Beobachtungen legen nahe, dass eine gestörte Abwehr an Krankheitserregern den Prozess einer anhaltenden Inflammationsreaktion anstößt <sup>43</sup>. So führte eine frühe Besiedelung mit pathogenen Erregern wie z.B. *Staphylokokkus aureus* in Tierversuchen zu einer lokal anhaltenden Infektions- und Inflammationsreaktion <sup>34,44,45</sup>. Neben der bakteriellen Infektion trägt ein komplexer, in seiner Pathologie noch nicht ins Detail verstandener Prozess, durch eine fehlregulierte und verstärkte Aktivierung des angeborenen Immunsystems zur Zerstörung des Lungengewebes bei. Diese Form der nicht-bakteriellen Inflammation wird getriggert durch die Freisetzung von Interleukinen (IL), die Aktivität von Makrophagen, Mastzellen sowie Neutrophilen und einer damit einhergehenden erhöhten Freisetzung von Proteasen und Oxidantien <sup>46 47</sup>.

So führt eine Kombination aus Infektion und Inflammation zur chronischen Lungenerkrankung. Es kann jedoch nicht abschließend geklärt werden, ob die intrinsische (nicht-bakterielle) Inflammation oder die Hyperinflammationsreaktion auf eine frühe Besiedelung mit opportunistischen Keimen als initiale Ursache die Destruktion der Lunge anstößt <sup>38</sup>.

Auf dem Boden der Inflammation und der daraus resultierenden Schleimhautschäden können sich wiederum leichter Keime ansiedeln.

Die anhaltende Schleimproduktion führt zu einer vermehrten Ablagerung eines zähen, sauerstoffundurchlässigen Mukus und im weiteren Verlauf kommt es zum Verschluss kleiner und mittelgroßer Bronchien mit Entstehung von Bronchiektasien <sup>48</sup>.

Worlitzsch et al. beschreibt in seiner Arbeit die Entstehung eines für die Einnistung von *Pseudomonas aeruginosa* günstigen Milieus: durch die Bildung eines zähen Schleimes komme es zum Erliegen des respiratorischen Flimmerepithels. Eine weitere Zunahme der Mukusmasse zusammen mit einem vermehrten Sauerstoffverbrauch durch die hochregulierte Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase bei blockiertem ENaC-Kanal führt zu einem erhöhten Sauerstoffgradienten innerhalb der Mukusmasse <sup>49,50</sup>. Daraus resultiert eine anaerobe Situation nahe der Epithelzellschicht. Mit Hilfe seiner Bakteriengeißeln gelangt *Pseudomonas aeruginosa* bis in die tiefen Mukusschichten. Durch Bildung von Alginat, geschützt vor Umwelteinwirkungen und der Immunabwehr, vermehrt sich der Keim. Da die Migration der neutrophilen Granulozyten, die zur direkten Keimabwehr benötigt werden, in den zähen Schleim erschwert ist, wird ein für das Wachstum von Bakterien günstiges Milieu geschaffen <sup>32,36,51-53</sup>. Siehe zur Veranschaulichung Abbildung 2.

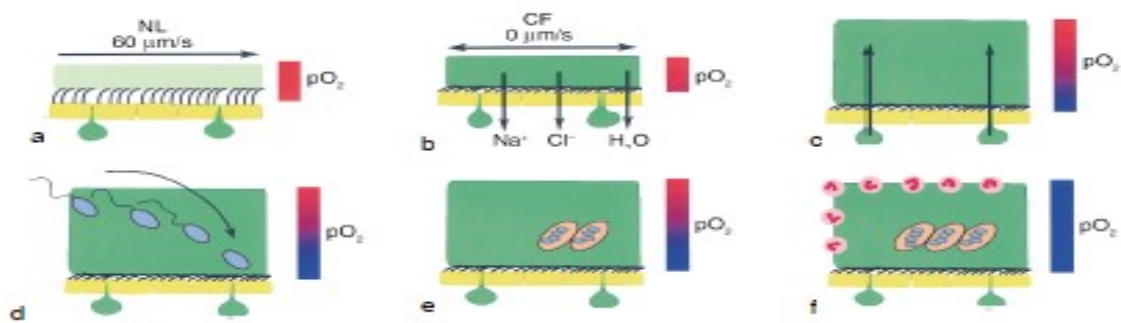


Abbildung 2: Modell der Pathogenese der Lungenerkrankung bei Mukoviszidose, die sich begünstigend auf die Kolonisation mit *Pseudomonas aeruginosa* auswirkt.

- a) Normale Epithelzelle mit einer dünnen Schleimschicht auf der apikalen Membran sekretorischer Epithelzellen. In die Schleimschicht tauchen die Zilien des respiratorischen Epithels ein. Die mukoziliäre Clearance ist effizient. Ein normaler Verbrauch von epithelalem Sauerstoff bewirkt keinen  $O_2$  Gradienten innerhalb der dünnen Schleimschicht.
- b) – f) Epithel bei CF-Patienten/innen:
  - b) ein starker einwärtsgerichteter Flüssigkeitsstrom entlang der Ionenwanderung bewirkt ein Anhaften des Mukus am Flimmerepithel und eine Störung der mukoziliären Clearance.
  - c) Eine fortgesetzte Sekretion führt zu einer massiven Ablagerung von Schleim. Die Dicke der Schleimschicht nimmt auf ein Vielfaches zu. Der erhöhte Sauerstoffverbrauch des Epithels bewirkt eine Zunahme des Sauerstoff Gradienten innerhalb der Mukusmasse.
  - d) *Pseudomonas aeruginosa* ist es aufgrund der Aktivität seiner Geißeln möglich in die tiefen Bereiche des Mukus vorzudringen und siedelt sich bevorzugt in den sauerstoffarmen Bereichen an.
  - e) *Pseudomonas aeruginosa* bildet in Alginat geschützte Mikrokolonien.
  - f) Die gebildeten Mikrokolonien besitzen eine hohe Resistenz gegenüber der körpereigenen Immunabwehr, inklusive der einwandernden neutrophilen Granulozyten. Dies zeigt den Beginn einer chronischen Infektion.

Adaptiert aus <sup>32</sup>

Zeichen der chronischen Inflammation, Infektion und Obstruktion finden sich in Form einer obliterierenden Bronchiolitis, einer massiven pulmonalen Überblähung mit regionalen Obstruktionsemphysemen, einer interstitiellen Pneumonitis, organisierten pneumonischen Infiltraten sowie einer diffusen alveolaren Destruktion (zystische Fibrosierung) <sup>54</sup>. Es zeigt sich ein im Verlauf progredienter Verlust der Lungenfunktion mit starker Einschränkung der körperlichen Belastbarkeit. Weiter entwickelt sich auf dem Boden der Lungenfibrosierung und Gefäßrarefizierung eine pulmonale Hypertonie (Cor pulmonale), welche in eine Herzinsuffizienz mündet <sup>55</sup>.



### 1.2.1. Keimspektrum

Die lokale pulmonale Immunschwäche bei CF begünstigt die Ansiedlung von Keimen. Das Spektrum der Mikrobiologie bei Mukoviszidose unterscheidet sich von dem anderer chronischer Lungenerkrankungen. Es zeigt sich ein alterstypischer Verlauf der bakteriellen Besiedlung: im Kindesalter bevorzugt mit *Staphylococcus aureus* und *Haemophilus influenzae*, im Jugend- und Erwachsenenalter spielt im Besonderen die Infektion mit dem gramnegativen Keim *Pseudomonas aeruginosa* eine bedeutende Rolle<sup>52</sup>. Weitere gramnegative, meist erst in einem höheren Alter im Sputum der Patienten/innen nachzuweisende Bakterien sind *Burkholderia cepacia complex*, *Stenotrophomonas maltophilia* und *Achromobacter denitrificans*. Zwar sind sie mit einer Prävalenz von weniger als 20% eher selten, doch stellen sie aufgrund ihrer Eigenschaften der Multiresistenz eine zunehmende Gefahr dar. In den letzten Jahren haben *atypische Mykobakterien*, insbesondere *M. avium complex* und *M. abscessus*, an Bedeutung zugenommen<sup>19 56</sup>.

Eine hohe Diversität an Keimen zeigen sich bei Patienten/innen in höherem Alter und bei eingeschränkter Lungenfunktion<sup>57</sup>. Siehe zur Darstellung der mikrobiologischen Besiedlung von CF-Patienten/innen Abbildung 3 und 4. Hingegen spielen Keime wie *Streptokokkus pneumoniae*, *Moraxella catharralis* und die Bakterien der endogenen Flora eine untergeordnete Rolle.

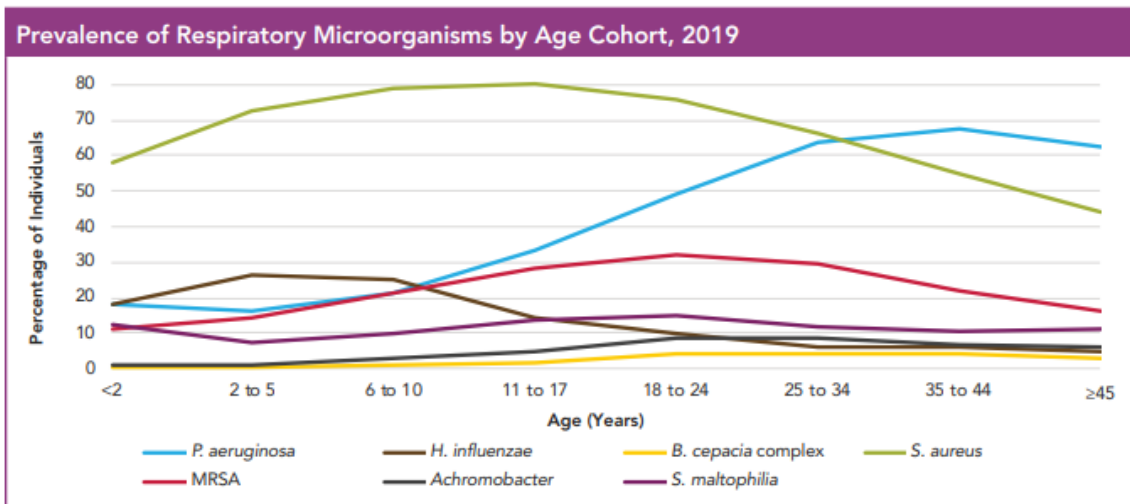


Abbildung 3: Darstellung der mikrobiologischen Besiedlung von CF-Patienten/innen nach Alterskohorte aufgezeigt. Übernommen aus <sup>19</sup>.

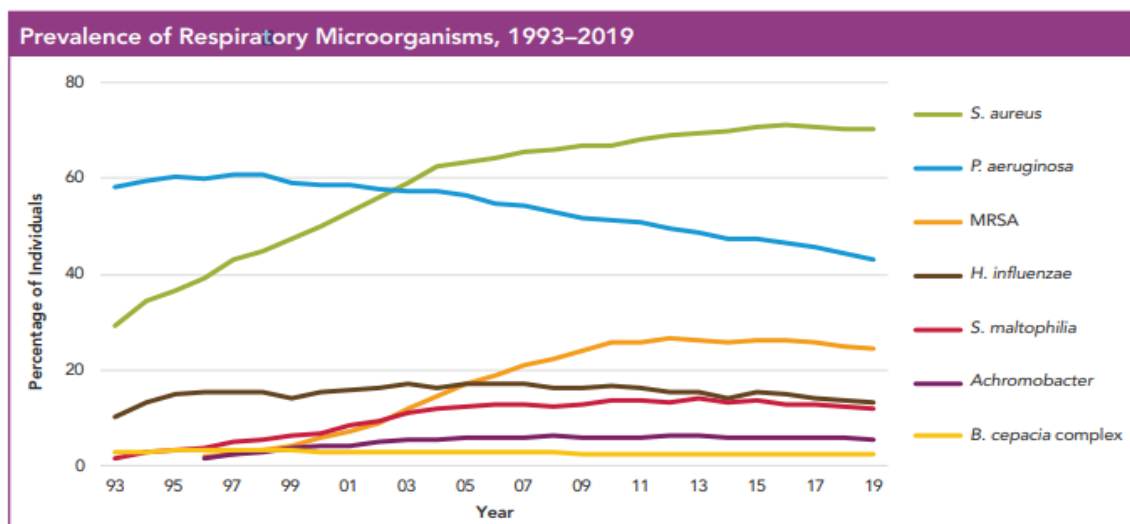


Abbildung 4: Darstellung der Prävalenz der Mikroorganismen bei CF-Patienten/innen im zeitlichen Verlauf. Übernommen aus <sup>19</sup>.

### 1.2.2. Besondere Bedeutung der Infektion mit *Pseudomonas aeruginosa*

Gesunde Epithelzellen des Respirationstraktes mit intaktem CFTR-Protein tragen über Endozytose von *Pseudomonas aeruginosa* zu einer Beseitigung des Keimes bei. Die Epithelzellen von CF-Patienten/innen sind aufgrund ihres defekten CFTR-Proteins dazu nicht mehr befähigt und es kommt, gemeinsam mit weiteren Ursachen, zu einer Vermehrung der Bakterien <sup>36</sup>.

Eine chronische Besiedlung mit *Pseudomonas aeruginosa* trägt entscheidend zu einer Erhöhung der Morbidität und Mortalität von CF-Patienten/innen bei <sup>58</sup>. Eine mögliche Eradikation nach Erstnachweis ist durch eine frühe antibiotische Therapie zumeist erfolgsversprechend <sup>59</sup>.

Die Definition einer chronischen Besiedlung mit *Pseudomonas aeruginosa* liegt laut AWMF Leitlinie (Lungenerkrankung bei Mukoviszidose) vor, „wenn über einen Zeitraum von mindestens einem Jahr in der Hälfte oder mehr der untersuchten Proben *Pseudomonas aeruginosa* in der kulturabhängigen Diagnostik nachgewiesen werden konnte“ <sup>60</sup>.

Strenge Hygienemaßnahmen im klinischen und häuslichen Setting mit Schulungen der Familie sollen eine initiale Besiedlung möglichst lange verhindern.

Warum eine Eradikation im Verlauf trotz intensiver antibiotischer und begleitender Therapie so schwierig ist, zeigt sich in verschiedenen Anpassungs- und Abwehrmechanismen des Bakteriums.

Bei chronischer Besiedlung wird eine phänotypische Veränderung von einer nicht-mukoiden hin zu einer mukoiden Variante beobachtet. Die Ursache ist eine Überproduktion des Exopolysaccharid Alginate aufgrund einer durch Punktmutation entstandenen Inaktivierung des mucA-Gens <sup>51,61,62</sup>. Eingebettet in dieser Exopolysaccharidmatrix umgebenen Schutzhülle, genannt Biofilm, persistiert *Pseudomonas aeruginosa* in einer chronisch infizierten Lunge eines CF-Patienten/in, geschützt vor dem verteidigenden Immunsystem <sup>63</sup>.

Das begrenzte Nährstoffangebot in der CF-Lunge begünstigt vermutlich das Wachstum einer weiteren Subpopulation (small colony variants), welche zu einer verstärkten Abnahme der Lungenfunktion sowie Zunahme der zur Eradikation notwendigen Antibiotikakonzentration (erhöhte minimale Hemmkonzentration-MHK) führen <sup>64,65</sup>.

Genetische Veränderungen, Gentransfer und eine reduzierte Stoffwechselaktivität des Keimes führen, zusätzlich zu einer natürlich bestehenden Antibiotikaresistenz gegenüber manchen  $\beta$ -Lactamen, zu einer im Verlauf zunehmenden Antibiotikaresistenz mit Notwendigkeit des Einsatzes an erhöhten Antibiotikakonzentrationen und Reserveantibiotika <sup>58 66</sup>.

Der Besitz verschiedener Virulenzfaktoren, wie Exotoxin A, alkalische Protease und Elastase führt während des Versuchs der Abwehr des *Pseudomonas aeruginosa* zu einer direkten Gewebszerstörung beim Patienten/in <sup>67,68</sup>.

Eine verstärkte Immunreaktion an der Epithelzellschicht des Respirationstraktes, welche aufgrund der vielseitigen oben bereits aufgeführten Virulenzfaktoren eine Eradikation von *Pseudomonas aeruginosa* zumeist nicht ermöglicht, führt vielmehr durch die entstandene Imbalance zwischen Proteasen und Proteaseinhibitoren sowie pro- und antiinflammatorischen Zytokinen, zu einem das Lungenparenchym zerstörenden Prozess. Patienten/innen ohne Nachweis an *Pseudomonas aeruginosa* zeigen eine stabil höhere Lungenfunktion im Vergleich zu den Patienten/innen mit *Pseudomonas aeruginosa* Besiedlung <sup>69</sup>.

### **1.3. Therapie der chronischen Lungenerkrankung bei Mukoviszidose**

Durch die im Abschnitt 1.2 beschriebenen Vorgänge kommt es ohne Therapie bereits in jungen Jahren zu gravierenden Veränderungen an der Lunge bei CF-Patienten/innen <sup>70</sup>.

Angebunden an ein CF-Zentrum sollten regelmäßige Kontrollen von Lungenfunktion, mikrobiologischer Befundung des Sputums sowie des klinischen Status stattfinden. Eine Kohortierung der Patienten/innen in *Pseudomonas aeruginosa* positiv/negativ und eine Trennung dieser beiden Gruppen stellt eine Präventionsstrategie zur Vermeidung der Übertragung dieses Keimes dar. Die im Abschnitt 1.2 erläuterte Entstehung und Unterhaltung der chronischen Infektion und Inflammation mit all seinen Folgen kann durch eine antibiotische Behandlung häufig zeitweise unterbrochen werden und zu einem klinisch gebesserten Allgemeinzustand, erhöhten Lungenfunktionsparametern, einer gesteigerten Lebensqualität, einem gebesserten Ernährungsstatus und zum verlängerten Überleben der Patienten/innen führen <sup>71-74</sup>.

Im Mittelpunkt der Therapie der chronischen Lungeninfektion steht somit, neben den grundlegenden Maßnahmen zur Lungenhygiene die regelmäßige Anwendung von Antibiotika. Man unterscheidet hier die Eradikationstherapie bei Erstnachweis eines Keimes von einer Suppressionstherapie bei chronischem Besiedlungsstatus zur Reduktion der Keimlast.

Die antibiotische Therapie unterstützend wirken antiinflammatorische Substanzen, eine mukolytische Therapie mittels hyperosmolarer Kochsalzinhalation, Inhalation mit rekombinanter DNase und bei Bedarf mit Bronchodilatoren sowie die Sekretolyse und Stärkung der Atemmuskulatur und somit Förderung der pulmonalen Belüftung durch Physiotherapie und Atemgymnastik <sup>75-78</sup>. Im Besonderen vor Anwendung einer inhalativen antibiotischen Therapie ermöglichen sie durch Reduktion der Mukusmasse eine bessere Wirksamkeit durch Verbesserung der Wirkstoffdeposition.

Ein weiterer eindeutig positiver Zusammenhang besteht zwischen der Lungenfunktion und dem Ernährungsstatus, gemessen mittels BMI, sodass auf eine hochkalorische Ernährung mit adäquater Einnahme der Pankreasenzyme geachtet werden sollte <sup>79-81</sup>. Auch durch eine regelmäßige sportliche Aktivität lässt sich die Lungenfunktion verbessern <sup>82,83</sup>.

Zudem trägt die Therapie mit den CFTR-Modulatoren häufig zu einer deutlichen Verbesserung der Lungenfunktion bei <sup>84</sup>.

### **1.3.1. Therapie zur Suppression von *Pseudomonas aeruginosa***

Bei Erstdiagnose einer Kolonisation mit *Pseudomonas aeruginosa* ist zumeist durch eine sofortige adäquate Antibiotikatherapie die Eradikation des Keimes möglich. Dadurch kann der Übergang in eine chronische Kolonisation und Infektion, einhergehend mit einer Verschlechterung der Lungenfunktion, für mehrere Jahre verschoben werden <sup>71 85 86</sup>.

Eine erfolgreiche Eradikation wird in den S3-Leitlinien wie folgt beschrieben: „*Drei konsekutive Pseudomonas aeruginosa negative respiratorische Proben in einem Gesamtzeitraum von 6 Monaten.*“

Wird eine erfolgreiche Eradikation nicht erreicht, wird zur Reduktion der Keimlast eine Suppressionstherapie angewandt <sup>60</sup>.

#### **1.3.1.1. *Pseudomonas aeruginosa* wirksame Antibiotika**

Zur Therapie des *Pseudomonas aeruginosa* stehen verschiedene Antibiotikaklassen (Cephalosporine, Carbapeneme, Fluorchinolone,

Aminoglykoside, Polymyxin, Acylaminopenicilline, Makrolide) und Applikationsarten (systemisch und inhalativ) mit unterschiedlichen Vor- und Nachteilen zur Verfügung.

Nach einer initialen Kolonisationsphase eines nicht-mukoiden *Pseudomonas aeruginosa* kommt es bei unbehandelten Patienten/innen zu einer manifesten chronischen Infektion mit Wechsel des Phänotyps hin zu einer mukoiden Variante, bei der eine Eradikation kaum möglich ist. Regelmäßige oder dauerhafte antibiotische Therapien zur Suppression der Keimlast führen zu einer Verbesserung des klinischen Zustandes und zu einem verzögerten Verlust der Lungenfunktion <sup>4,48,60,87</sup>.

Nach festgestellter Frühkolonisation kann mittels einer direkt eingeleiteten Inhalationstherapie mit Tobramycin häufig eine Eradikation erreicht werden. Bei chronischer Besiedlung reduziert es die Keimlast und verbessert die Lungenfunktion <sup>88,89</sup>.

Mit ähnlichem Erfolg wird Colistin, ein Polymyxin mit niedrigem Resistenzniveau, inhalativ eingesetzt <sup>90</sup>. Die Kombination aus inhalativem Colistin und der oralen Gabe des Fluorchinolons Ciprofloxacin führen zu einer Reduktion der Keimlast und idealerweise zur Eradikation <sup>90,91</sup>. Im Kopenhagener CF-Zentrum konnte bei bis zu 80% der Patienten/innen mit einer intermittierenden *Pseudomonas aeruginosa* Besiedlung durch eine dauerhafte Therapie mit Colistin per inhalationem und Ciprofloxacin per oral der Übergang in eine chronische Besiedlung um über 15 Jahre verzögert werden <sup>92</sup>.

Zur inhalativen Dauertherapie (Indikation Suppressionstherapie) stehen verschiedene Antibiotika zur Verfügung: Colistin, Tobramycin, Aztreonam oder Levofloxacin. Die Auswahl erfolgt anhand der Verträglichkeit und des Ansprechens auf die Therapie. Colistin und Tobramycin sind die am häufigsten eingesetzten inhalativen Antibiotika in der Therapie gegen *Pseudomonas aeruginosa* <sup>25,60</sup>.

Eine inhalative Suppressionstherapie führt zur Reduktion der Sputummenge und Sputumpurulenz, zu einer Verbesserung der Lungenfunktion bzw. Verlangsamung des Lungenfunktionsverlustes, Abnahme der Exazerbationshäufigkeit, zu einer Gewichtszunahme, Reduktion der Fehltag in

der Schule bzw. am Arbeitsplatz, Verbesserung der Lebensqualität und Reduktion des parenteralen *Pseudomonas* wirksamen Antibiotikaverbrauches<sup>60</sup>. Bei akuter Exazerbation erfolgt in der Regel eine intravenöse Therapie. Die intravenöse Therapie erfolgt üblicherweise als Kombination zweier sich ergänzend wirkender Antibiotika. Eine klare Evidenz zur besseren Wirksamkeit durch Kombination besteht jedoch nicht. In einer Cochrane-Metaanalyse fand sich ein nicht signifikanter Hinweis auf eine vermehrte Resistenzentwicklung in der Monotherapie im Vergleich zur Kombinationstherapie<sup>60,93</sup>. Eine häufig angewandte Kombination ist die Kombination aus  $\beta$ -Lactam-Antibiotika und Aminoglykosiden<sup>60</sup>.

Welche Antibiotika oder Antibiotika-Kombination genutzt werden, hängt von verschiedenen Faktoren ab: Unverträglichkeiten, Ansprechen/Nichtansprechen auf vorhergehende Antibiotika-Therapien, weiterer Organbeteiligung, Ko-Kolonisation<sup>60</sup>.

Die Vorstellung, dass regelmäßige intravenöse Therapien den klinischen Zustand und die Lebenserwartung im Vergleich zur Anwendung bei klinischer Exazerbation verbessern, konnte in verschiedenen Studien nicht bewiesen werden<sup>72,94</sup>. Für den intravenösen Gebrauch, sowohl zur Eradikation als auch zur Suppressionstherapie, wird zumeist Tobramycin sowie das effektivste 3. Generation-Cephalosporin Ceftazidim in Kombination angewandt<sup>95,96</sup>.

Die Fähigkeit *Pseudomonas* wirksamer Penicilline (Piperacillin oder Ticarcillin) und Cephalosporine, das Bronchialsekret zu erreichen, ist gering. Die Sputumkonzentration beträgt nur etwa 3-15% des Serumlevels. Eine erfolgreiche Anwendung wird durch höhere Dosen und regelmäßige intravenöse Gaben erreicht<sup>97</sup>. Das Problem der Penicilline und auch in einem geringeren Ausmaß der  $\beta$ -Laktam-Antibiotika liegt in dem vermehrten Auftreten von Unverträglichkeiten oder Allergien<sup>98</sup>.

Makrolide zeigen durch eine antiinflammatorische Wirkung eine verbesserte Lungenfunktion und ein vermindertes Auftreten von Exazerbationen<sup>99,100</sup>. Die Wirksamkeit einer Dauertherapie mit oralem Azithromycin hat sich bei chronischer Besiedlung mit *Pseudomonas aeruginosa* in verschiedenen Studien bestätigt. Es zeigt sich eine Verbesserung der Lungenfunktion, Reduktion der

Exazerbationsrate und Verbrauch an Antibiotika, vermutlich durch die antiinflammatorischen und immunmodulatorischen Effekte<sup>60,101,102</sup>. Eine regelmäßige Untersuchung auf *Mykobakterien* sollte während der Dauertherapie mit Azithromycin erfolgen, da sich eine erhöhte Prävalenz an *Mykobakterien* zeigt<sup>103</sup>.

Trotz einer großen Vielfalt an wirksamen Therapien gegen *Pseudomonas aeruginosa* ist es bis heute nicht gelungen, den Keim nachhaltig zu eliminieren. Häufig kommt es durch die gewählten Standardtherapien während einer chronischen Infektion zu einer Elimination der freien Bakterien, währenddessen die vom Biofilm geschützten Pseudomonaden weiter existieren<sup>98,104</sup>.

Auf der Suche nach weiteren Strategien zur Suppressionstherapie, ist der Versuch einer inhalativen Kombinationstherapie aus sich ergänzenden Antibiotika, eine mögliche, noch wenig erprobte Variante. Da in der vorliegenden Studie die beiden Antibiotika Colistin und Tobramycin inhalativ als Studienmedikation getestet wurden, werden diese in den folgenden Kapiteln genauer beschrieben.

#### **1.3.1.2. Colistin**

Colistin gehört zu den Polymixinantibiotika und ist auch als Polymixin E, welches von *Bazillus colistinus* produziert wird, bekannt<sup>105,106</sup>. Das Wirkspektrum umfasst gramnegative Keime wie *Pseudomonas aeruginosa* und *Enterobakterien*. Durch seine geringe Resistenzlage, hohe Effektivität und durch eine schnelle bakterizide Wirkung nimmt es eine besondere Bedeutung in der Therapie gegen multiresistente Keime ein<sup>107-109</sup>.

Es werden zwei Formen von Colistin genutzt: Colistinmethat und Colistinsulfat. Colistinmethat (Natrium Colistin Methanesulfonat) zeigt eine geringere toxische Wirkung als Colistinsulfat und wird vor allem als parenterale Infusion im Besonderen bei durch *Pseudomonas aeruginosa* hervorgerufenen Infektionen des Respirations- und Urogenitaltraktes sowie bei septischem Geschehen genutzt<sup>110,111</sup>. Darüber hinaus wird Colistinmethat auch zur inhalativen Therapie bei chronischer *Pseudomonas*-Infektion bei CF-Patienten/innen angewandt<sup>112</sup>.



Colistinsulfat wird aufgrund einer erhöhten toxischen Wirkung bei parenteraler Gabe vor allem zur topischen Anwendung genutzt.

Geprüfte Dosierungen des Colistinmethat liegen zwischen 1 Mio. Einheiten zweimal täglich und kann gesteigert werden bis auf 2 Mio. Einheiten dreimal täglich <sup>85,113</sup>. Die bakterizide Wirkung verhält sich direkt proportional mit der Wirkkonzentration <sup>114</sup>. In diesen Konzentrationen kann die Nebenwirkung der Toxizität auf Nieren und Nerven geringgehalten werden. Im Rahmen der inhalativen Anwendung kam es selten zu Nephro- und Neurotoxizität. Zu beachtende Nebenwirkungen bei inhalativer Anwendung sind: Bronchokonstriktion und Husten <sup>115</sup>.

### **1.3.1.3. Tobramycin**

Tobramycin gehört zur Gruppe der Aminoglykoside. Tobramycin zeigt die höchsten Penetrationsraten der Aminoglykoside. Die Inhalation von Tobramycin bei chronischer Besiedlung mit *Pseudomonas aeruginosa* zeigt eine verbesserte Lungenfunktion, Minimierung der Krankenhausaufenthalte und Reduktion der Keimlast <sup>73</sup>. Angewandt wird ein „on-off“ Schema von je 28 Tagen: zweimal täglich 300 mg Tobramycin per Feuchtinhalation oder via TOBI® Podhaler® 28 mg Hartkapseln 2 x 112 mg täglich für 28 Tage mit anschließender Inhalationspause über 28 Tage <sup>116</sup>. Das „on-off“ Schema soll zur Minimierung der Resistenzentwicklung beitragen <sup>73,117</sup>. Mögliche Nebenwirkungen, wie Gleichgewichts- und Hörstörungen sowie Nephrotoxizität, müssen vor allem bei einer intravenösen Therapie befürchtet werden, wohingegen bei einer inhalativen Verabreichung aufgrund niedriger Serumkonzentrationen ein geringes Risiko für Nephro- und Ototoxizität besteht. Als Nebenwirkung werden Husten und Bronchokonstriktion beschrieben <sup>73,115</sup>.

#### 1.4. Ziele und Fragestellung

In der Studie von Hermann et al. 2010 zeigte sich die Wirkung der Doppelinhalation mit Colistin und Tobramycin (Colistin 1 Mio. I.E./3ml 2xtäglich und Tobramycin 300mg/5ml 2x täglich) der Einfachinhalation mit Colistin überlegen. Getestet wurde die Wirkung gegen den in Biofilm eingebetteten *Pseudomonas aeruginosa in vitro* sowie an Rattenlungen. Nach einer Therapiezeit von 5 Tagen kam es zu einer signifikanten Reduktion der Koloniebildenden Einheiten (KBE) von *Pseudomonas aeruginosa*, einer verminderten Mortalität und geringeren pathologischen Veränderungen am Lungenmodell. Weiter zeigte sich im Rahmen einer kleinen Pilotstudie an fünf CF-Patienten/innen, dass die Doppelinhalation gut vertragen wurde und es auch hier zu einer signifikanten Reduktion der KBE sowie zu einer signifikanten Verbesserung der Lungenfunktion bei 80% der Patienten/innen führte <sup>118</sup>.

Die hier vorgestellte Studie soll die Ergebnisse von Hermann et al. im Rahmen einer größeren Fallzahl bestätigen und die Sicherheit der Doppelinhalation überprüfen.

Ziele der Studie sind die Reduktion der Keimlast von *Pseudomonas aeruginosa* (KBE/ml Sputum) sowie die Steigerung der Lungenfunktion. Als primärer Endpunkt ist die Differenz der Keimlast von Tag 1 (Baseline) zu Tag 28 zwischen den beiden Kohorten beschrieben.

Weitere Endpunkte, verglichen mit der Kontrollgruppe, sind:

- Reduktion der Keimlast zwischen allen 28 Tagen des Therapiewechsels
- Veränderung der Lungenfunktion verglichen mit der Baseline zu Tag 30, 57, 86 und 112, gemessen an forcierter Vitalkapazität (FVC), Expiratorische Einsekundenkapazität (FEV1), Mittlere Atemstromstärke (MEF 25-75), absolut und relativ
- Veränderung der Entzündungsparameter (Leukozyten-Konzentration, proinflammatorische Zytokine, DNA-Gehalt) im Sputum von Baseline bis zu Tag 30, 57, 86 und 112
- Anzahl der pulmonalen Exazerbationen
- Bedarf von oraler und/oder intravenöser *Pseudomonas aeruginosa* wirksamer Antibiotika

Folgende Sicherheitsparameter werden registriert:

- Eine Verschlechterung der Lungenfunktion (FVC, FEV1, MEF 25-75) bis zu 30 Minuten nach Inhalation der Kombination von Colistin/Tobramycin an Tag 1 und Tag 57
- Mögliche Nebenwirkungen und alle akuten Exazerbationen

## 2 Material und Methoden

### 2.1. Material

Tabelle 2: Zur Studie verwendetes Material und Instrumente

<u>Produkt</u>	<u>Hersteller</u>
Ampuwa (steriles, pyrogenfreies Wasser)	Fresenius Kabi, Deutschland (Dtl.)
CNA-Agar	Heipha Dr. Müller GmbH, Heidelberg, Dtl.
DTT (Dithiothreitol 1.4%)	Oxoid, Hampshire, England
Endo Agar	Institut für Mikrobiologie und Hygiene, Tübingen, Dtl.
Eppendorf-Cups, 1.5 ml	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Dtl.
Ethanol 70%	Merck, Darmstadt, Dtl.
Falconröhrchen (15ml, 50ml)	BD Pharmingen, San Diego United States
Glasspatel	Institut für Mikrobiologie und Hygiene Tübingen, Dtl.
Katalase	VWR Chemicals
Oxidase – Teststreifen	Merck, Darmstadt, Dtl.
PBS (phosphat buffered saline)	Sigma Aldrich, Hamburg, Dtl.
Pipettenspitzen (10µl, 100µl, 1000µl)	Sarstedt, Nürnberg, Dtl.
<b>Instrumente</b>	
Leukozyten Messgerät (Advia 120 Labor Bruchelt)	Siemens Healthcare Diagnostics, Deerfield-USA
Spirometer	Jäger, Höchberg, Dtl.
Vortex Genie 2	Bender&Hobein, Zürich, Schweiz

## **Software**

Secutrial V4.9.1.10

Interactive Systems Berlin, Dtl.

Analysis software SAS 9.2

SAS Institute, Cary, North

Carolina, USA

## **2.2. Methoden**

### **2.2.1. Klinische Studie**

#### **2.2.1.1. Studiendesign**

Es wurde eine offene, prospektive, randomisierte, monozentrische klinische Studie der Phase III durchgeführt.

Die Einteilung der Probanden in die beiden Studienarme Colistin und Colistin-Tobramycin erfolgte zufällig anhand einer Block-Randomisierung mit Hilfe des Betriebssystems Randl List, welche von Frau C. Engel (Leitung Ressort IV Biometrie, Center for Pediatric Clinical Studies-CPCS-Tübingen) erstellt wurde. Insgesamt wurden in die Studie 26 Patienten/innen, vom Jugendlichen- bis zum Erwachsenenalter eingeschlossen. Wichtigstes Einschlusskriterium war der Nachweis einer chronischen Besiedlung mit *Pseudomonas aeruginosa*. Die Teilnahmedauer eines jeden Patienten/innen erfolgte über einen Zeitraum von 20 Wochen, wovon sich 16 Wochen auf die Therapie mit der Studienmedikation beliefen.

Die Ethikkommission der Eberhard-Karls-Universität Tübingen prüfte die Studie nach bestehenden Vorschriften (Aktenzeichen Ethikvotum: 457/2013AMG1 - Riethmüller) und das Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM) gab die Zustimmung zur Durchführung der Studie.

### 2.2.1.2. Studienablauf

Es gab vier Therapieblöcke, mit je einer Dauer von 28 Tagen. Wie oben beschrieben erfolgte die Einteilung der Patienten/innen in zwei Studienarme: Im Studienarm der Colistin-Gruppe fand im gesamten Studienverlauf lediglich die Inhalation mit Colistin statt. In der Gruppe der Colistin-Tobramycin-Kombination hingegen erfolgte an den Tagen 1-28 (zwischen der Visite 2 und 3) und an den Tagen 57-84 (zwischen der Visite 4 und 5) eine zusätzliche Inhalation mit Tobramycin statt. Abbildung 5 zeigt zur Veranschaulichung den Studienablauf. Insgesamt fanden während des Studienverlaufs 7 Visiten (V) statt, zu denen die Studienparameter erhoben und die Untersuchungen durchgeführt wurden (siehe Tabelle 3).

**Visite 1** (Screening) Erhoben wurden Ein- und Ausschlusskriterien (siehe Abschnitt 2.2.2. Studienteilnehmer/innen). Zudem erfolgte eine Blutentnahme, eine Lungenfunktionsmessung sowie eine Untersuchung des Sputums durch das Mikrobiologische Institut der Universität Tübingen.

**Visite 2** Erneute Prüfung der Ein- und Ausschlusskriterien mit anschließender Blutentnahme, Asservation einer Sputumprobe zur Quantifizierung der Erreger und Lungenfunktionsmessung (jeweils 30 Minuten vor und 30 Minuten nach Inhalation der Medikation). Der Patient/in wurde bei zutreffenden Einschlusskriterien einem Studienarm zugeordnet und erhielt die zugewiesene Studienmedikation unverblindet: Gruppe 1 inhalierte durchgängig Colistin und zusätzlich im 28-tägigen „on-off“ Schema Tobramycin. Gruppe 2 inhalierte lediglich durchgängig Colistin. Die Inhalation erfolgte morgens (um 8 Uhr +/- 2 Stunden) und abends (um 20 Uhr +/- 2 Stunden).

**Visite 3-6** Es erfolgte eine Blutentnahme, eine Lungenfunktionsmessung, eine Quantifizierung der Erreger sowie eine Messung der Leukozyten im Sputum.

**Visite 7** Im Rahmen der Nachuntersuchung erfolgte eine erneute Lungenfunktionsmessung.

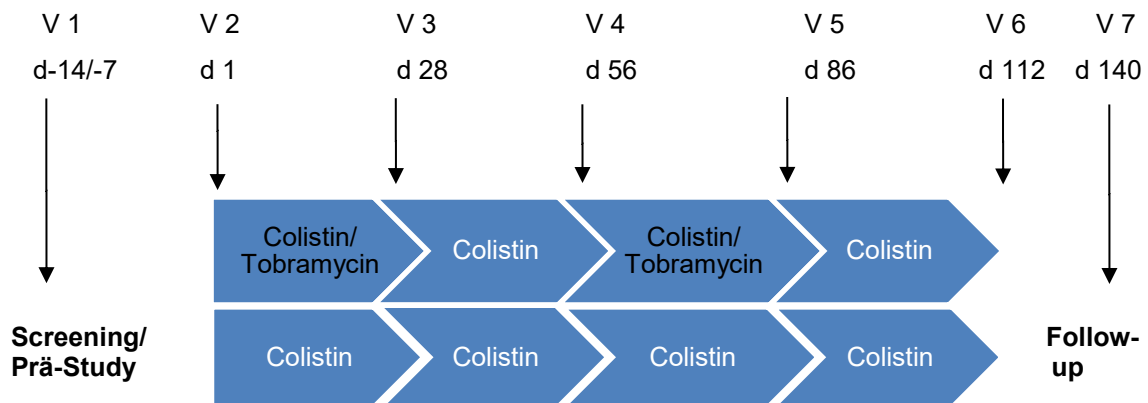


Abbildung 5: Studienablauf

Tabelle 3: Übersicht erhobene Studienparameter

Zeitplan	Vor	Baseline	Studie				Nachunter-
	Studienbeginn		3	4	5	6	suchung
Visite	1	2					7
Woche	-2	1	5	9	13	17	21
Tag	-14 bis -7	1	30	57	86	112	140
<b>Labor<sup>1</sup></b>							
Blutbild	√	√	√	√	√	√	
Klinische Chemie	√	√	√	√	√	√	
Schwangerschaftstest		√	√	√	√		
<b>Diagnostik</b>							
Sputum	√	√	√	√	√	√	
Lungenfunktion	√	√	√	√	√	√	√
<b>Vitalparameter</b>							
Herzfrequenz	√	√	√	√	√	√	
Blutdruck	√	√	√	√	√	√	
Gewicht und Größe	√	√	√	√	√	√	
Einschlusskriterien	√	√					
Ausschlusskriterien	√	√					

<sup>1</sup>Blutbild: Leukozyten, Hämoglobin, Hämatokrit, Thrombozyten

Klinische Chemie: Harnstoff, Kreatinin, C-reaktives Protein (CrP), Gamma-Glutamyltransferase (GGT), Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT), Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT)

### **2.2.2. Studienteilnehmer/innen**

Die Studienteilnehmer/innen wurden durch Herrn Prof. Dr. J. Riethmüller (Leiter der klinischen Prüfung) zur Teilnahme an der Studie angefragt. Nach einem ausführlichen Aufklärungsgespräch über den Ablauf der Studie sowie über mögliche Nebenwirkungen der Studienmedikation, erfolgte eine Untersuchung durch den Prüfarzt. Bei schriftlichem Einverständnis seitens der Probanden, beziehungsweise deren Eltern, sowie Erfüllung der Einschlusskriterien und Verneinung der Ausschlusskriterien, erfolgte die Teilnahme an der Studie.

#### **2.2.2.1. Einschlusskriterien**

Folgende Kriterien mussten erfüllt werden, um in die Studie eingeschlossen zu werden:

- Das Krankheitsbild der Mukoviszidose liegt bestätigt vor
- Der Patient/in ist älter als 12 Jahre
- Die FEV1 [% des Solls] liegt zwischen 25% und 100%
- Es liegt eine chronische Kolonisation (länger als 6 Monate) mit *Pseudomonas aeruginosa* vor
- *Pseudomonas aeruginosa* muss sensitiv auf Tobramycin oder Colistin getestet sein
- Letzte Therapie mit Colistin liegt mehr als 2 Monate zurück
- Eine intravenöse Antibiotikatherapie liegt mehr als 2 Wochen zurück
- Eine informierte Einverständniserklärung des Patienten/in oder seiner gesetzlichen Vertreter liegt vor

#### **2.2.2.2. Ausschlusskriterien**

Bei den folgenden Kriterien konnte die Teilnahme an der Studie nicht stattfinden, beziehungsweise musste die weitere Teilnahme abgebrochen werden:

- Aktuelle klinische Verschlechterung (Exazerbation)
- Eine Inhalation mit Tobramycin in den letzten zwei Wochen vor Studienbeginn



- Niereninsuffizienz (Kreatinin größer 1,5-fach Normalkreatinin, GFR<80%)
- Hör- oder Gleichgewichtsstörungen, Hörverlust
- Unverträglichkeit gegen Tobramycin, Colistin bzw. deren Inhaltsstoffe
- Myasthenia gravis
- Porphyrrie
- Bestehende Schwangerschaft oder Stillzeit

### **2.2.3. Studienmedikation**

In dieser Studie wurde Tobramycin in Form des TOBIPodhaler® Novartis via Podhaler Inhalator sowie Colistimethat-Natrium via Feuchtinhalation genutzt.

#### **2.2.3.1. Anwendung**

Die Anwendung der Antibiotika erfolgte je nach Prüfgruppe inhalativ mit Colistin oder mit Colistin in Kombination mit Tobramycin.

Für die inhalative Therapie mit Tobramycin Trockenpulver ist folgendes Schema zugelassen: on-off-Therapie à 28 Tagen mit 2 x 112 mg Tobramycin Trockenpulver täglich, entspricht 2 x 4 Kapseln à 28 mg mittels Tobi Podhaler® täglich.

Die inhalative Therapie mit Colistin besteht aus 2 x 1 Mega Colistin täglich via Feuchtinhalation.

Einer möglichen Bronchokonstriktion als Nebenwirkung der inhalativen antibiotischen Therapie wurde mittels vorheriger Gabe eines Bronchodilatators (Salbutamol) vorgebeugt.

#### **2.2.3.2. Erlaubte Begleitmedikation**

Die Basistherapie der Mukoviszidose, wie sie der Patient/in vor der Studie geführt hat, war beizubehalten.

Jegliche für den Patienten/in medizinisch notwendige Medikation war während der Studie erlaubt.

#### **2.2.4. Erhobene Messdaten**

Zu jeder der sechs Visiten wurden die Vitalparameter, Laboruntersuchungen, Lungenfunktionsmessungen und Sputumdiagnostik durchgeführt. Zur Nachuntersuchung V7 erfolgte die Lungenfunktionsmessung (siehe Tabelle 3). Weiter wurden alle medizinischen Daten des Patienten/in zusammengeführt und dokumentiert. Als Studiendatenbank wurde die Software Secutrial (V4.9.1.10 Interactive Systems Berlin, Dtl.) verwendet.

Im Folgenden wird die Erhebung der Studienparameter genauer erläutert.

##### **2.2.4.1. Blut und Urin**

Um mögliche Nebenwirkungen oder auch Infektionen rechtzeitig zu erkennen, wurde während allen Visiten, ausgenommen Visite 7, das Blutbild sowie die klinische Chemie kontrolliert.

Bei Frauen im gebärfähigen Alter erfolgte eine Schwangerschaftskontrolle im Urin (Beta-HCG) bei den Visiten 2 bis 5.

##### **2.2.4.2. Lungenfunktion**

Die Lungenfunktion wurde mittels Spirometer (Jäger, Höchberg, Dtl.) zu allen Visiten bestimmt. Bei jeweils der ersten Gabe der zweifachantibiotischen Therapie mit Colistin und Tobramycin erfolgte 30 Minuten vor und nach der Inhalation eine Kontrolle der Lungenfunktion, um mögliche Nebeneffekte wie eine Bronchokonstriktion festzustellen.

Besonders bedeutsame Parameter stellen dar:

- FVC
- FEV1
- MEF 25-75

### **2.2.4.3. Sputum**

Primärer Endpunkt der Studie stellte das Ergebnis der Quantifizierung der Keime zwischen V2 und V3 dar. Daher wurde der Patient/in zu allen Visiten angehalten, ein morgendlich abgenommenes Sputum von etwa 1,5 ml Volumen mitzubringen. Noch am Tag der Probengewinnung wurde das Sputum weiterverarbeitet. Um eine exakte quantitative Bestimmung der Keime zu ermöglichen, wurde das Sputum mit Dithiothreitol (DTT) 1:10 verdünnt und im Anschluss mit einem Vortex Gerät zu einer homogenen Lösung gemischt. Die Ausgangslösung wurde aus 3,75 ml Sputasol (Mischung aus Dithiothreitol, Natriumchlorid, Kaliumchlorid, Di-Natriumhydrogenphosphat, Kaliumhydrogenphosphat) mit 46,25 ml Ampuwa selbstständig hergestellt.

Folgend wurde eine Verdünnungsreihe angesetzt: Aus 1 ml Sputum (entspricht  $10^1$ ) wurden 10  $\mu$ l entnommen und in ein mit 990  $\mu$ l PBS gefülltes Eppendorf Cup pipettiert (entspricht einer Verdünnung von 1:1000). Dieser Verdünnungsschritt wurde bis zu einer endgültigen Verdünnung um den Faktor  $10^9$  fortgeführt. Von dem restlichen Sputum wurden mittels hämatologischer Messeinheit die enthaltenen Leukozyten gemessen sowie 3 x 1 ml bei  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  zur späteren Bestimmung von IL und DNA eingefroren.

### **2.2.5. Mikrobiologische Diagnostik des Sputums**

Ein Teil des aufbereiteten Sputums wurde auf Nährstoffböden ausplattiert, um im Anschluss die darin enthaltenen Keime zu identifizieren und deren Menge zu quantifizieren. Hierfür wurden 92  $\mu$ l jedes Verdünnungsschrittes je auf eine Platte mit Endo-Agar (selektives Wachstum von gramnegativen Keimen) pipettiert und mittels eines Glasspatels gleichmäßig auf dem Nährboden verteilt. Im Anschluss wurden die beimpften Platten für 48 Stunden in einem Brutschrank mit  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Die Platte mit der niedrigsten Verdünnung und noch auszählbaren KBE wurde zur Bestimmung genutzt. Unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors wurden daraus die KBE/ml berechnet.

Hierbei konnte eine mögliche Keimzahlreduktion durch die verabreichten Therapien dargestellt und miteinander verglichen werden.

### **2.2.5.1. Endo-Agar als Nährmedium**

Charakteristisch für diesen ist seine leicht rosarote Färbung. Er stellt ein Selektivmedium für gramnegative Keime dar; im Besonderen für Enterobakterien und weitere coliforme Bakterien, wie Klebsiellen, *E. coli* und *Citrobacter*. Die Selektivität wird durch die Kombination von Natriumsulfit und basischem Fuchsin herbeigeführt. Es führt zu einem gehemmten Wachstum von grampositiven Mikroorganismen. Vor allem *Pseudomonaden* zeigen auf diesem Nährboden ein gutes Wachstum <sup>119-121</sup>.

### **2.2.5.2. Anzucht und Identifizierung der Keime**

Zur Artbestimmung der auf den Platten gewachsenen Bakterienkolonien wurden die in der Mikrobiologie geläufigen Verfahren genutzt: Selektion des Wachstums durch geeignete Agarplatten (siehe 2.2.5.2), Morphologie der Kolonie, Geruch und Oxidase-Test. Von zentraler Bedeutung der Studie war das Wachstum von *Pseudomonas aeruginosa* zu bestimmten Studienzeitpunkten.

*Pseudomonas aeruginosa* ist ein gramnegatives, aerobes Stäbchenbakterium. Angezchtet auf einem Endoagar zeigen die Kolonien einen typisch metallischen Glanz sowie, aufgrund der Fähigkeit zur Pigmentbildung (Pyozyanin, Pyoverdin), ein farbliches Aussehen von rosarot über gelb-grün bis lila. Die Kolonien sind flach, differieren in ihrer Größe und zeigen einen typisch süßlichen Geruch nach Lindenblüten. Man unterscheidet einen mukoiden von einem nicht-mukoiden Typ. Die mukoide Variante zeigt aufgrund einer Mutation im Glykoproteingen die Fähigkeit zur Bildung eines zähen Schleimes und kommt häufig bei Patienten/innen mit Mukoviszidose vor. Bei Unsicherheiten in der Unterscheidung zu morphologisch ähnlichen Keimen kann ein positiv ausfallender Oxidase Test (Nachweis von Cytochrom C Oxidase der Atmungskette bei *Pseudomonaden*) weiterhelfen <sup>120,121</sup>.

### 2.3. Datenauswertung und statistische Analyse

Die Daten wurden nach dem Prinzip Intention-to-treat Analyse (ITT) sowie Per Protocol Analyse (PP) ausgewertet.

In die ITT-Auswertung wurden alle Patienten/innen beider Gruppen aufgenommen, auch die ausgeschiedenen Patienten/innen.

In die PP Analyse wurden nur die Patienten/innen aufgenommen, welche sich prüfkonform verhalten haben. Patienten/innen, welche vier oder mehr Dosen der Medikation nicht eingenommen hatten oder deren „wash-out“ Zeit (notwendige 28-tägige Pause der Tobramycininhalation in der Colistin-Tobramycin-Gruppe) zu kurz, beziehungsweise zu lang war, wurden aus der PP-Analyse ausgeschlossen.

Die statistische Berechnung wurde durchgeführt mittels des nichtparametrischen Wilcoxon-Tests bei nicht normal verteilten Daten und an geeigneter Stelle mittels t-Test (bei Normalverteilung). Die Beschreibung der Exazerbationen und Nutzung von zusätzlicher Anti-*Pseudomonas aeruginosa* wirksamen Medikation wurde mittels Cochran-Mantel-Haenszel-Test ausgewertet.

Die biometrische Planung beinhaltet bei einem adaptiven Design eine Anzahl von 26 Studienteilnehmern mit einer maximalen Abbruchquote von 5%. Unter dieser Annahme wurde ein beschriebenes Testniveau von  $\alpha=0,05$  und  $\beta=0,20$  und eine Teststärke von 80% erreicht. Die maximale Endgröße aufgrund wirtschaftlicher Faktoren lag bei 50 Studienteilnehmer/innen.

Festgelegt wurde  $\alpha_0=0,2$  und  $\alpha_1=0,0348$ . Für die Zwischenanalyse (nachdem 26 Patienten/innen V3 beendet haben) gilt:

- $p < \alpha_1$  – die Überlegenheit der Colistin-Tobramycin-Gruppe ist gegeben. Die Studie wird gestoppt.
- $\alpha_1 < p < \alpha_0$  – Die Stichprobengröße muss erneut berechnet werden, um eine Überlegenheit der Colistin-Tobramycin-Gruppe zu zeigen.
- $\alpha_0 < p$  – eine Überlegenheit der Colistin-Tobramycin-Gruppe erscheint sehr unwahrscheinlich. Die Studie wird gestoppt.

Anhand der vorhergehenden Pilotstudie von Hermann et al. konnte eine maximale Standardabweichung von der mittleren Differenz vor und nach

Inhalation mit Colistin-Tobramycin von  $\pm 2,51$  log KBE *Pseudomonas aeruginosa* beschrieben werden. Der kleinste mögliche Behandlungserfolg wurde ab einer Reduktion der KBE von 2,52 log des *Pseudomonas aeruginosa* in der Colistin-Tobramycin-Gruppe im Vergleich zu keiner Reduktion in der Colistin-Gruppe festgelegt.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1. Patientenbeschreibung

Insgesamt konnten 26 CF-Patienten/innen eingeschlossen werden. Je 13 Studienteilnehmer/innen wurden in die beiden Gruppen randomisiert (zur Veranschaulichung siehe Abbildung 5 unter 2.2.1.2 Studienablauf).

Die Darstellung der Ergebnisse erfolgt als Mittelwert (MW)  $\pm$  Standardabweichung (SD).

Die Studienteilnehmer/innen der Colistin-Gruppe waren im Durchschnitt 6 Jahre älter als in der Colistin-Tobramycin-Gruppe (Colistin-Gruppe:  $32,6 \pm 10,5$  Jahre; Colistin-Tobramycin-Gruppe:  $26,3 \pm 10,9$  Jahre)

Die Geschlechteraufteilung war mit 6 Frauen und 7 Männern in beiden Gruppen ausgeglichen.

Die häufigste extra-pulmonale Manifestation der CF war ein CF-assoziiertes Diabetes mellitus mit einem Gesamtaufkommen von 4 aus 26 Studienteilnehmer/innen. Zwei davon hatten zusätzlich zum Diabetes mellitus eine arterielle Hypertension. Weitere Nebenerkrankungen: Rheumatoide Arthritis (N=1) und intermittierende Hämoptyse (N=1).

Im Rahmen der Visite 1 konnte bei allen Studienteilnehmer/innen, wie durch das Einschlusskriterium bestimmt, ein *Pseudomonas aeruginosa* im Sputum nachgewiesen werden - insgesamt 12 mukoiden Formen, davon 7/13 in der Colistin-Gruppe und 5/13 in der Colistin-Tobramycin-Gruppe.

In der Colistin-Gruppe lag zu Beginn der Studie die niedrigste Lungenfunktion gemessen in FEV1 [% des Solls] bei 27,9 und maximal bei 96 und der MW bei  $61,4 \pm SD 24,9$ . Ähnliche Ergebnisse erbrachten die Ergebnisse der Lungenfunktion in der Colistin-Tobramycin-Gruppe, hier lag die niedrigste FEV1 [% des Solls] bei 25,6 und maximal bei 105 – mit einem MW von  $64,88 \pm SD 22,54$  (siehe Tabelle 4).

In beiden Studiengruppen war keine Veränderung des Körpergewichtes unter Therapie festzustellen. Jeweils Visite 1: Colistin-Gruppe  $58 \pm 8$  kg, Colistin-Tobramycin-Gruppe  $58 \pm 13$  kg (siehe Tabelle 5).

Insgesamt mussten 8 Patienten/innen aus der PP-Analyse ausgeschlossen werden: 3 Patienten/innen aufgrund einer nicht korrekten „wash-out“ Zeit von 28 Tagen und 5 Patienten/innen, weil sie mehr als 4 Dosen der Medikation nicht eingenommen hatten.

Tabelle 4: MW der Lungenfunktion zum Zeitpunkt des Screenings V1

	<b>COLISTIN</b>	<b>COLISTIN- TOBRAMYCIN</b>
<b>FEV1 [%] *</b>	61,4 ± 24,88	64,88 ± 22,54
<b>FEV1 ≥ 25&lt;50% [N] (%)</b>	1 (7,6)	1 (7,6)
<b>FEV1 ≥ 50&lt;80% [N] (%)</b>	5 (38,5)	4 (30,7)
<b>FEV1 ≥ 80&lt;100% [N] (%)</b>	6 (46,1)	6 (46,1)
<b>FEV1 ≥ 100% [N] (%)</b>	1 (7,6)	2 (15,4)
<b>FVC [%] *</b>	78,74 ± 20,98	80,35 ± 18,22
<b>MEF 25-75 [%] *</b>	29,44 ± 21,52	34,03 ± 29,85

---

\*: MW ± SD.



Tabelle 5: Darstellung der Labordaten und der Patientenprofile

Visite	V1 (Baseline)		V2		V3	
	<i>Colistin</i>	<i>Colistin Tobra- mycin</i>	<i>Colistin</i>	<i>Colistin Tobra- mycin</i>	<i>Colistin</i>	<i>Colistin Tobra- mycin</i>
Gewicht [kg] *	58±8	58±13	58±7,5	58±13	58±8	58±13
Größe [cm] *	167±7	165±10	167±7	165±10	167±7	165±10
Herzfrequenz [1/min] *	-	-	83±11	85±9	80±7	83±7
RR syst./ diast.[mmHg] *	-	-	109±10/ 66±7	112±10/ 66±7	110±8/ 66±6	112±10/ 67±8
<i>Pseudomonas</i> mukoid [n]	7	5	4	7	6	5
Leukozyten [ $\cdot 10^3/\mu\text{l}$ ] *	-	-	10,1±2,9	10,0±2,4	10,3±2,8	9,5±2,2
Neutrophile Granulozyten [%] *	-	-	69,2±9,5	67,2±8,2	70,4±7,5	67,9±9,6
Thrombozyten [ $\cdot 10^3/\mu\text{l}$ ] *	-	-	290,4±95	317±114	301,8±89	329,3±121
Creatinin [mg/dl] *	-	-	0,8±0,2	0,7±0,2	0,7±0,2	0,7±0,2
Urea [mg/dl] *	-	-	30,3±10,7	29,4±7,0	29,5±11,1	28,5±5,2
GOT [U/l] *	-	-	26,7±7,1	28,3±12	26,4±9,6	28,4±9,9
GPT [U/l] *	-	-	31,2±12,7	28,0±16	26,4±10,2	27,6±13,0
GGT [U/l] *	-	-	33±38	21,3±19	27,5±30	16,9±14
Bilirubin [mg/dl] *	-	-	0,4±0,2	0,5±0,2	0,4±0,1	0,4±0,3
CrP [mg/dl] *	-	-	0,8±0,9	1,4±1,2	1,2±1,6	1,0±0,9
IgG [ $\cdot 10^3$ mg/dl] *	-	-	1,4±0,3	1,4±0,3	1,2±0,3	1,5±0,4

\*: MW ± SD. Blutdruck (RR), Immunglobulin G (IgG)

### 3.2. Primärer Endpunkt

Die Reduktion der KBE des *Pseudomonas aeruginosa* (nicht mukoid/mukoid) im Sputum der CF-Patienten/innen zum Zeitpunkt der Visite 3 (entsprechend d 28) wurde als Primärer Endpunkt festgelegt.

In der ITT-Gruppe standen die Daten von 13 Patienten/innen aus der Colistin-Gruppe und von 12 Patienten/innen aus der Colistin-Tobramycin-Gruppe zur Verfügung. In keiner der beiden Gruppen zeigte sich eine signifikante Reduktion der KBE/ml des *Pseudomonas aeruginosa* nach 28-tägiger Therapie.

In der Colistin-Gruppe erhöhte sich die log KBE/ml um  $0,2 \pm 1,9$  und in der Colistin-Tobramycin-Gruppe um  $0,04 \pm 1,9$  log KBE/ml ( $p=0,359$  der ITT-Gruppe).

In der PP-Gruppe zeigten sich folgende Ergebnisse: In der Colistin-Gruppe reduzierte sich die log KBE/ml um  $-0,09 \pm 1,65$  und in der Colistin-Tobramycin-Gruppe um  $-0,13 \pm 1,9$  log KBE/ml ( $p=0,373$ ) (siehe Tabelle 6 und Abbildung 6).

Tabelle 6: Differenz *Pseudomonas aeruginosa* KBE/ml im Sputum V2 zu V3, d28 - ITT und PP Analyse im Vergleich

	<b>COLISTIN- TOBRAMYCIN</b>	<b>COLISTIN</b>
<b>ITT (P=0,359) *</b>	+0,04±1,9log KBE (n=12)	+0,20±1,9log KBE (n=13)
<b>PP (P=0,373) *</b>	-0,13±1,9log KBE (n=11)	-0,09±1,65log KBE (n=12)

\*: MW±SD.

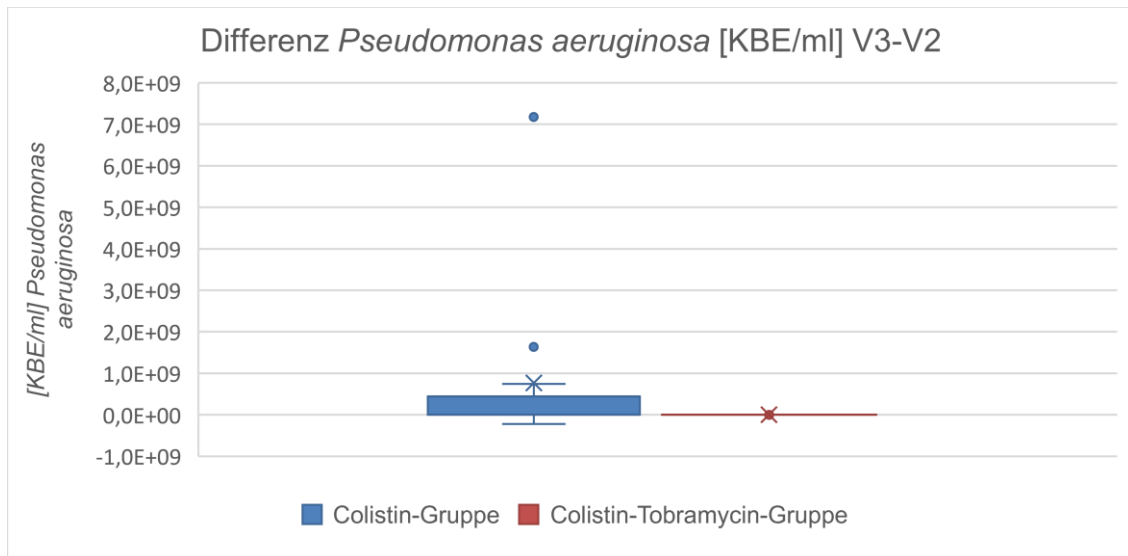


Abbildung 6: ITT-Analyse: Differenz *Pseudomonas aeruginosa* [KBE/ml] V3-V2

Aufgrund der eindeutigen Ergebnisse ist eine Überlegenheit der Therapie mit Colistin-Tobramycin unwahrscheinlich, daher wurde die Studie nach biometrischer Planung offiziell gestoppt und alle weiteren Ergebnisse sind beschreibend.

Bei gutem Befinden und explizitem Wunsch der Studienteilnehmer/innen erfolgte eine Fortführung der bereits in die Studie eingeschlossenen Patienten/innen und Erhebung aller weiterer Daten.

Eine Alternativtherapie mit Wechsel der Inhalationsmedikation auf die Dreifachinhalation Colistin, Tobramycin und Meropenem, aufgrund von Exazerbationen, erfolgte bei insgesamt 9/13 Studienteilnehmer/innen in der Colistin-Gruppe. Genauere Ergebnisinformation siehe Abschnitt 3.3.3 Therapiewechsel.

Die Messung der KBE zu Visite 5 konnte lediglich bei 5/13 Studienteilnehmer/innen in der Colistin-Gruppe und 10/13 Studienteilnehmer/innen in der Colistin-Tobramycin-Gruppe erfolgen, sodass sich aufgrund eines zu hohen Bias bei der statistischen Berechnung keine Aussage zur Quantifizierung des Erregers treffen lässt. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 7 sowie der dazugehörigen Tabelle 7 veranschaulicht.

Beschreibend lässt sich kein Unterschied in den beiden Inhalationsgruppen darstellen.

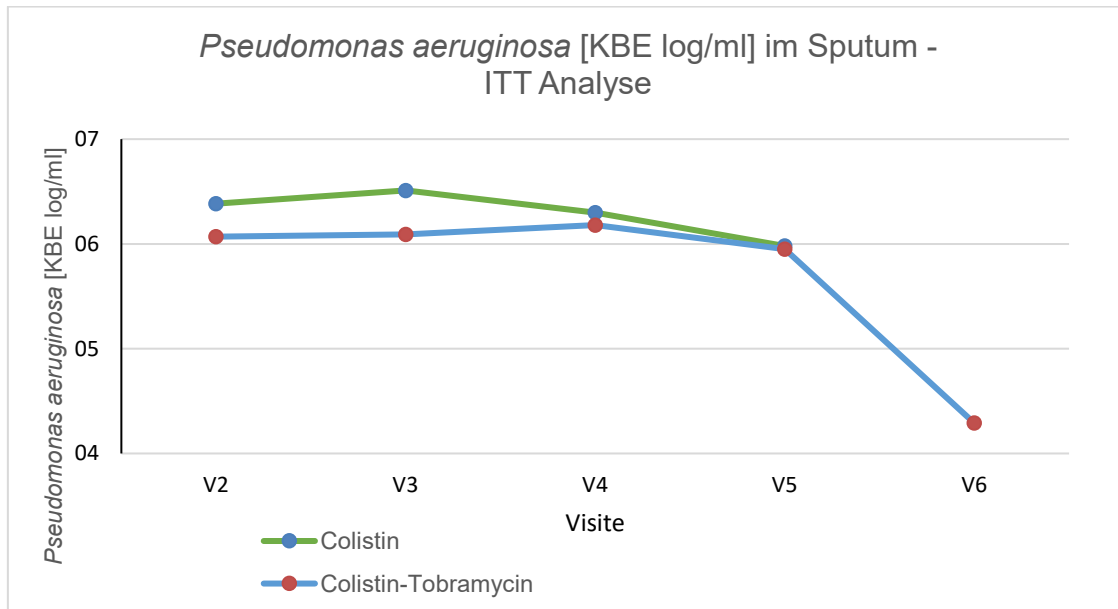


Abbildung 7: ITT-Analyse MW *Pseudomonas aeruginosa* [KBE log/ml]

Tabelle 7: Anzahl der Patienten/innen pro Visite zur *Pseudomonas aeruginosa* Messung

Visite	V2	V3	V4	V5	V6
N (Colistin)	13	13	11	5	0
N (ColistinTobramycin)	11	12	10	10	2

### 3.3. Sekundärer Endpunkt

#### 3.3.1. Lungenfunktion

Anhand der FVC [% des Soll], der FEV1 [% des Soll] sowie der MEF25-75 [% des Soll] wurde die Lungenfunktion dargestellt. Wie die Abbildung 8 beschreibt, zeigte sich in der PP-Gruppe nach einem anfänglichen Absinken der absoluten FEV1 [% des Soll] an d 28 in beiden Gruppen (Colistin-Gruppe:  $-0.8 \pm 2.9$  vs. Colistin-Tobramycin-Gruppe:  $-1,5 \pm 2,2$ ) eine Stabilisation und darauffolgend bis zum d 112, entsprechend Visite 6, ein deutlicher Anstieg der FEV1 [% des Soll].

Eine deutliche Zunahme der absoluten FEV1 [% des Solls] zeigt sich in der Colistin–Tobramycin-Gruppe auf  $+5,3 \pm 7,5$  im Vergleich zur Colistin-Gruppe von  $+2,3 \pm 5,4$  ( $p=0,07$ ). Nur leichte Unterschiede zeigen sich in der Messung der MEF25-75 [% des Solls] (Abbildung 9). Aber auch hier fiel zunächst ein Abfall/ gleichbleibende Lungenfunktion an d 28 auf; in der Colistin-Tobramycin-Gruppe  $-2,1 \pm 4,6$  und in der Colistin-Gruppe  $+ 0,5 \pm 8,3$ . Ein Anstieg der MEF25-75 [% des Solls] ließ sich jedoch ab Visite 4 detektieren (siehe Abbildung 9).

In der Abbildung 10 ist die Veränderung der Lungenfunktion je Studienteilnehmer/in aufgetragen. Es zeigt sich insbesondere in der Colistin-Tobramycin-Gruppe eine Verbesserung der Lungenfunktion bei nahezu allen Teilnehmern/in, unabhängig des Ausgangswertes. Bis zuletzt war die Teilnahme an den Visiten zur Lungenfunktionsmessung gut, siehe Tabelle 8.

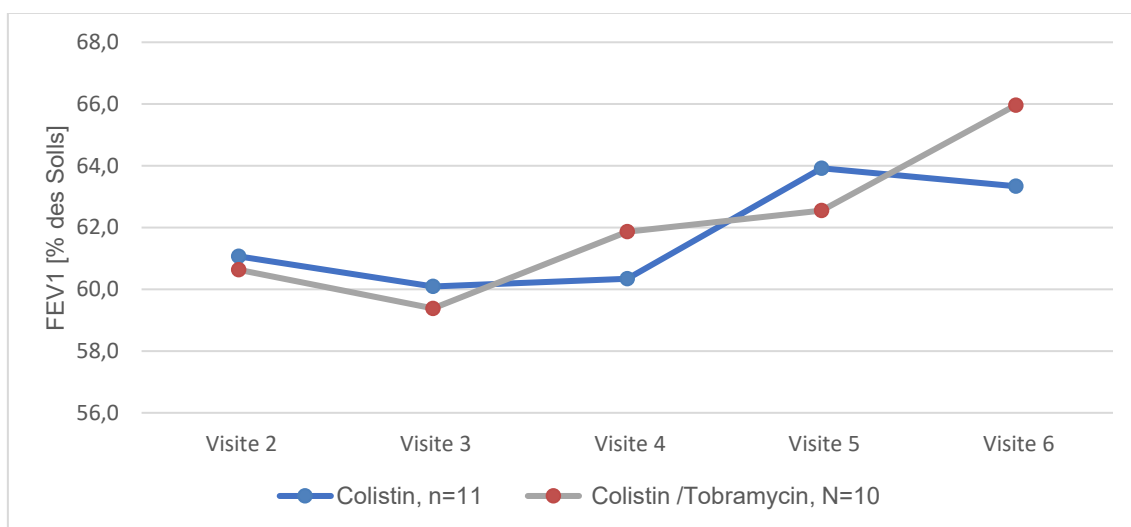


Abbildung 8: MW der FEV1 [% des Solls] während der gesamten Behandlungszeit, PP-Gruppe.

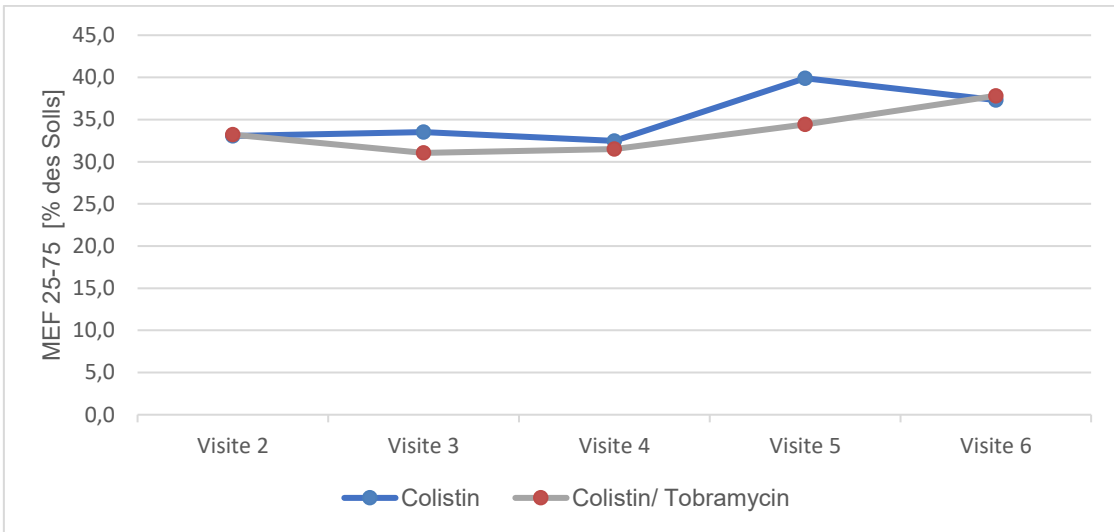


Abbildung 9: Lungenfunktion MEF25-75 [% des Sollis]

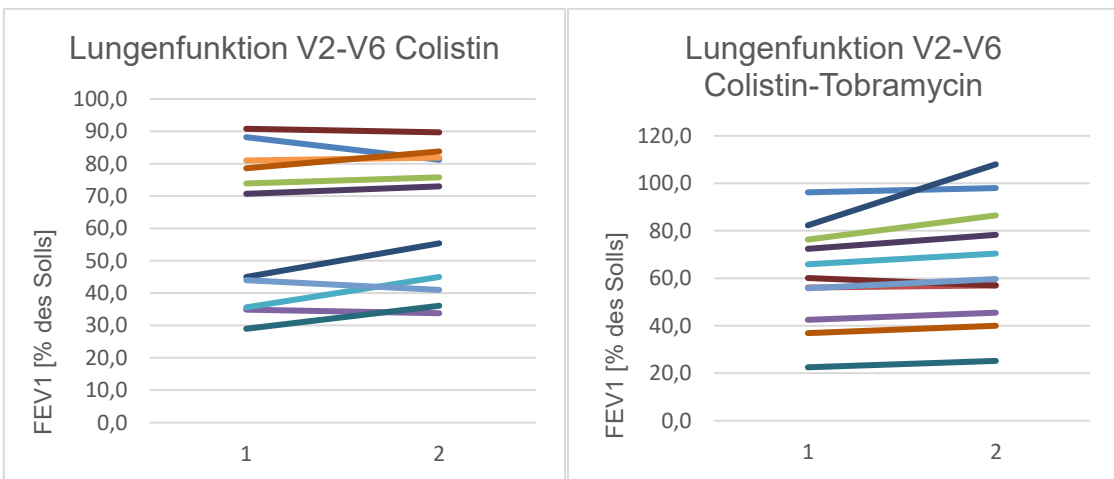


Abbildung 10: Lungenfunktion Zeitpunkt 1.V2 und 2.V6 mit Auflistung der einzelnen Studienteilnehmer/innen in den Gruppen Colistin und Colistin-Tobramycin

Tabelle 8: Anzahl der Teilnehmer/innen in den Visiten zur Lungenfunktionsmessung

Visite	V2	V3	V4	V5	V6
<b>N (Colistin)</b>	13	13	13	12	12
<b>N (Colistin-Tobramycin)</b>	13	13	12	13	13

Wie im Abschnitt 3.3.3 Therapiewechsel aufgezeigt, wurde bei insgesamt 10/13 Studienteilnehmer/innen in der Colistin-Gruppe sowie 3/13 Studienteilnehmer/innen in der Colistin–Tobramycin-Gruppe ein Therapiewechsel bzw. eine Therapieerweiterung aufgrund pulmonaler Exazerbation eingeleitet; deutlich häufiger in der Colistin–Gruppe, beginnend zumeist ab Visite 4. Trotz Erweiterung der antibiotischen Therapie, insbesondere in der Colistin-Gruppe zeigt sich am d 112 der eben beschriebene deutliche Unterschied in der FEV1 [% des Solls] (siehe Tabelle 9).

Tabelle 9: Veränderung der Lungenfunktion nach 28d und 112d Therapie.

	ITT		PP		
<b>28 d</b>	<b>Colistin- Tobramycin</b>	<b>Colistin</b>	<b>Colistin- Tobramycin</b>	<b>Colistin</b>	<b>p=</b>
<b><u>FVC</u> *</b>	-1,9±4,9	+1,3±7,1	-1,0±4,0	-0,2±4,6	0,312
<b><u>FEV1</u> *</b>	-2,4±3,8	+1,5±4,4	-1,5±2,2	-0,8±2,9	0,272
<b><u>MEF25- 75*</u></b>	-2,1±4,6	+0,5±8,3	-1,0±2,3	-1,6±3,7	0,319
<b>112 d</b>	<b>Colistin- Tobramycin</b>	<b>Colistin</b>	<b>Colistin- Tobramycin</b>	<b>Colistin</b>	<b>p=</b>
<b><u>FEV1</u> *</b>			+5,3±7,5	+2,3±5,4	0,07

\*: [% des Solls] MW±SD

### 3.3.2. Patientensicherheit

Es wurden insgesamt keine schwerwiegenden Nebenwirkungen beobachtet.

In direktem Bezug zur Studienmedikation wurde von den Studienteilnehmer/innen als vorbekannte Nebenwirkung eine pulmonale Obstruktion, Husten / Hustenreiz angegeben. In der Colistin-Tobramycin-Gruppe (n=6) traten häufiger die genannten Nebenwirkungen als in der Colistin-Gruppe (n=1) auf, weshalb ein Patient/in nach Visite 4 die Studiengruppe von der Zweifachinhalation in die Monotherapie mit Colistin wechselte.

Bronchodilatoren, insbesondere Salbutamol, wurden von allen Teilnehmer/innen in der Colistin-Tobramycin-Gruppe und von 3/13 in der Colistin-Gruppe angewandt.

Die Lungenfunktionsmessungen (30 Minuten vor und nach Inhalation der Studienmedikation) zeigten keine relevanten akuten Nebenwirkungen, insbesondere keine verstärkt aufgetretene Obstruktion in der Colistin-Tobramycin-Gruppe (exemplarisch Visite 1): FEV1 [% des Soll] (vor Inhalation)  $62,5 \pm 22,4$ , FEV1 [% des Soll] (30 Minuten nach Inhalation)  $59,6 \pm 21,4$ . MEF25-75 [% des Soll] (vor Inhalation)  $33,2 \pm 26,4$  und MEF25-75 [% des Soll] (30 Minuten nach Inhalation)  $32,1 \pm 24,1$ .

Bei den weiter beschriebenen unerwünschten Arzneimittelwirkungen (UAW) ist ein Zusammenhang zur Studienmedikation als unwahrscheinlich eingestuft.

Es sind insgesamt 31 UAW beschrieben (nach Häufigkeit gelistet): Infektionen der oberen und unteren Luftwege mit Husten und pulmonaler Obstruktion, Kopfschmerzen, CrP-Anstieg, Hämoptysen, allergische Rhinokonjunktivitis, Mykobakteriose und allergische bronchopulmonale Aspergillose.

In der Gruppe der Zweifachinhalation zeigten sich insgesamt häufiger UAW (n=22) als in der Monotherapie-Gruppe (n=9). Davon wurden in der Colistin-Gruppe von 1/9 UAW und in der Colistin-Tobramycin-Gruppe 7/21 UAW als mögliche Studiennebenwirkung beschrieben (zur Veranschaulichung siehe Tabelle 10 und 11). Der Schweregrad der UAW wurde in der Colistin-Gruppe in 56% der Fälle als moderat beschrieben versus 41% der Fälle in der Colistin-Tobramycin-Gruppe.

In keiner Studiengruppe wurde ein Verdacht auf eine schwere unerwünschte oder eine unerwartete schwerwiegende Arzneimittelwirkung gestellt.

Laborchemisch ließen sich keine Veränderungen in der Funktion der parenchymatösen abdominalen Organe feststellen. Insbesondere keine Erhöhung der Nierenretentionsparameter.

Im regelmäßigen Screening wurden keine Schwangerschaften detektiert.



Tabelle 10: UAW in den beiden Studiengruppen im Vergleich

	<b>UAW</b>	<b>Schweregrad</b>	<b>Zusammenhang Studienmedikation</b>	
<b>Colistin</b>	<b>Untere Luftwege</b>			
	Exazerbation	Moderat	Nein/ unwahrscheinlich	
	Exazerbation	Moderat	Nein/ unwahrscheinlich	
	Vermehrter Husten	Moderat	Nein/ unwahrscheinlich	
	Allergische Bronchopulmonale Aspergillose	Moderat	Nein/ unwahrscheinlich	
	Mycobacteriose	Mild	Nein/ unwahrscheinlich	
	<b>Oberen Luftwege</b>			
	Infektion	Mild	Nein/ unwahrscheinlich	
	<b>Andere</b>			
	Allergische Rhinokonjunktivitis	Mild	Nein/ unwahrscheinlich	
	CrP Anstieg	Moderat	Möglich	
	CrP Erhöhung	Mild	Nein/ unwahrscheinlich	
<b>Colistin-Tobramycin</b>	<b>Unterer Luftwege</b>			
	Infektion	Moderat	Nein/ unwahrscheinlich	
	Exazerbation	Moderat	Nein/ unwahrscheinlich	
	Exazerbation	Moderat	Nein/ unwahrscheinlich	
	Viel zähes Sekret	Moderat	Nein/ unwahrscheinlich	
	Vermehrter Schleim	Mild	Nein/ unwahrscheinlich	
	Husten	Mild	Ja, möglich	
	Husten	Mild	Ja, möglich	
	Starker Husten	Mild	Ja, möglich	
	Vermehrter Husten	Moderat	Nein/ unwahrscheinlich	
	Vermehrter Husten	Mild	Nein/ unwahrscheinlich	
	Hustenreiz	Mild	Ja, möglich	
	Obstruktion	Moderat	Ja, möglich	
	Obstruktion	Moderat	Ja, möglich	
	Obstruktion	Mild	Ja, möglich	
	Hämoptysen	Mild	Nein/unwahrscheinlich	
		<b>Obere Luftwege</b>		
		Infektion	Moderat	Nein/ unwahrscheinlich
		Infektion	Mild	Nein/ unwahrscheinlich
		Infektion	Mild	Nein/ unwahrscheinlich
	Nasopharyngitis	Moderat	Nein/ unwahrscheinlich	
	<b>Andere</b>			
	Cephalgie	Mild	Nein/ unwahrscheinlich	
	Cephalgie	Mild	Nein/ unwahrscheinlich	
	Cephalgie	Mild	Nein/ unwahrscheinlich	

Tabelle 11: Inzidenz der UAW

	<i>Colistin-Tobramycin</i>	<i>Colistin</i>
<i>Patienten/innen [n]</i>	9	9
<i>UAW insgesamt [n]</i>	22	9
<i>Atemwege betreffend [n]</i>	19	6
<i>Husten/Obstruktion [n]</i>	9 (41%)	1 (11%)
<i>Infektion [n]</i>	5 (23%)	3 (33%)
<i>Mehr Sekret [n]</i>	2 (1,5%)	0
<i>Andere [n]</i>	3	3

### 3.3.3. Therapiewechsel

10/13 Studienteilnehmer/innen aus der Colistin-Gruppe mussten aufgrund pulmonaler Exazerbation oder zur Vermeidung dieser ihre inhalative antibiotische Therapie auf eine i.v.-antibiotische Therapie (n=3) umstellen oder inhalativ erweitern (n=7). Dies geschah deutlich seltener bei 3/13 Studienteilnehmer/innen in der Colistin–Tobramycin-Gruppe (p=0,006). Diese 3 Studienteilnehmer/innen wechselten auf eine i.v. Therapie.

Als Begleitmedikation wurden außer Antibiotika zur Therapie einer Exazerbation oder Vermeidung einer Exazerbation vor allem Salbutamol als Basis- und Bedarfsmedikation genutzt. Weiter kamen bei Kopfschmerzen Ibuprofen und bei allergischem Geschehen Antihistaminika zum Einsatz. Die Routine CF-Therapie wie hypertone Kochsalzlösung, Dornase alfa, Vitamine und Pankreasenzymsubstitution wurde nicht extra aufgelistet.

### 3.3.4. Entzündungsparameter

Gemessen wurden aus dem Sputum verschiedene proinflammatorische Zytokine (IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17, Granulozyten-Monozyten-Kolonien-stimulierender Faktor (GM-CSF) und Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )) sowie die enthaltene DNA als Nachweis von Zelluntergang.

Zur Auswertung stehen lediglich der DNA-Gehalt sowie das IL-8 im Sputum zur Verfügung. In beiden Studiengruppen ließ sich ein leichter Anstieg der gemessenen DNA im Sputum feststellen. Die IL-8 fielen in der Colistin-Gruppe und zeigten einen leichten Anstieg in der Colistin-Tobramycin-Gruppe. Keine der Veränderungen war statistisch signifikant (siehe Tabelle 12).

Laborchemisch ließen sich keine Veränderungen des CrP, der Leukozyten oder des Gesamt-IgG bei den Studienteilnehmer/innen im Verlauf von d1 zu d28 nachweisen (siehe Tabelle 5).

Tabelle 12: Veränderung der Entzündungsparameter nach 28d

ITT			
<b>28 d</b>	<b>Colistin- Tobramycin</b>	<b>Colistin</b>	<b>p=</b>
<b><u>DNA (mg/ml Sputum)</u></b>	+ 6,5 $\pm$ 22*	+ 6,1 $\pm$ 39*	0,293
<b><u>IL-8 (pg/ml Sputum)</u></b>	720 $\pm$ 6311*	-3151 $\pm$ 7767*	0,103

\*: MW $\pm$ SD

## 4 Diskussion

### Einfluss einer chronischen Infektion mit *Pseudomonas aeruginosa* auf die Lungenfunktion

Mit zunehmendem Alter der Patienten/innen mit Cystischer Fibrose steigt die Häufigkeit der chronisch pulmonalen Infektion mit *Pseudomonas aeruginosa* trotz Einhalten verschiedenster präventiver Maßnahmen <sup>19</sup>. Nach Erstnachweis ist eine Eradikationstherapie meist noch erfolgreich, wohingegen eine Eradikation im Verlauf kaum noch möglich ist <sup>122</sup>. Es kommt zu einer chronischen Besiedlung mit wiederkehrenden Exazerbationen und einer zunehmenden Verschlechterung der Lungenfunktion. Mittels einer antibiotischen Suppressionstherapie wird versucht die Dichte an *Pseudomonas aeruginosa* in der Lunge zu reduzieren, um so die angestoßene Verschlechterung der Lungenfunktion aufzuhalten <sup>85,90,91,122,123</sup>.

### Antibiotikaaanwendung: Synergistische Wirkung und Resistenzentwicklung

Insbesondere in den unteren Mukusschichten, geprägt von nahezu anaeroben Bedingungen und reduzierter nutritiver Eigenschaft, gelingt es *Pseudomonas aeruginosa* sich ein Milieu zu schaffen, in dem er gut überleben kann. Durch Bildung von Exopolysaccharid Alginate wandelt er seinen Phänotyp in die mukoide Variante und besitzt so eine physiologische Barriere für die Penetration von Antibiotika <sup>61,62</sup>. Einmal im zähflüssigen Mukus der Patienten/innen festgesetzt, kann *Pseudomonas aeruginosa* unterschiedliche Aktivitätsgrade ausbilden und sich an die vorliegenden Gegebenheiten anpassen <sup>124</sup>. In der unteren Mukusschicht, welche durch anaerobe und schlechte nutritive Bedingungen gekennzeichnet ist, wird der Stoffwechsel des Keims herabgesetzt und zeigt so eine reduzierte Angreifbarkeit für die Aminoglykoside als Proteinbiosynthesehemmer. <sup>125</sup>

Aufgenommen durch metabolisch aktive Bakterien, bindet Tobramycin an die 30s-Untereinheit der bakteriellen Ribosomen und führt so zu einer Störung der bakteriellen Proteinsynthese und zum Zelluntergang. Colistin als ein kationisches zyklisches Peptid hingegen zerstört die äußere Bakterienmembran und tötet

durch diese bakterizide Wirkung die im Mukus und Biofilm „versteckten“ *Pseudomonaden* <sup>126</sup>. Es wurde gezeigt, dass die bei dem Untergang des Bakteriums freigesetzten Lipopolysaccharide (LPS) von Colistin zudem neutralisiert werden können und so eine durch die LPS verursachte Inflammation und Zerstörung vermindert wird <sup>127-129</sup>. Die in der oberflächlichen Mukusschicht befindlichen, stoffwechselaktiven Gruppen an *Pseudomonas aeruginosa* werden durch die Wirkung von Tobramycin in ihrer Translation gehemmt und es kommt zu einer verminderten Aktivität und Ausbreitung <sup>118,130</sup>. So kann eine synergistische Wirkung der beiden Antibiotikaklassen in der Therapie gegen *Pseudomonas aeruginosa* beschrieben werden.

Um einer möglichen Resistenzentwicklung entgegenzuwirken, werden die aktuell zur Verfügung stehenden inhalativen Antibiotika teilweise im „on-off“ Schema inhaliert. Auch eine zyklische Abfolge verschiedener Antibiotika wie Tobramycin und Colistin oder Aztreonam im Wechsel wird vermehrt an den CF-Zentren durchgeführt, da die notwendigen Therapiepausen von einigen in der Erkrankung fortgeschrittener Patienten/innen zum Teil schlecht toleriert werden <sup>131-134</sup>.

Die gleichzeitige Inhalation zweier sich ergänzender Antibiotika, wie es auch in der intravenösen Applikation erfolgt, zeigte *in vitro* gute synergistische Effekte <sup>118</sup>. Bisher gibt es jedoch nur wenige Studien am Patienten/in zu inhalativen Kombinationstherapien <sup>131,133</sup>. Dies hebt die Relevanz der hier durchgeführten Studie hervor.

Hermann et al. konnte die deutlich verbesserte Wirksamkeit in der Kombinationstherapie der beiden Antibiotika Colistin und Tobramycin sowohl *in vitro* (Reduktion der Dichte an *Pseudomonas aeruginosa*), am Mausmodell (verbesserte Morbidität und Mortalität), als auch in einer kleinen Kohorte an CF-Patienten/innen (N=5) mit einer Verbesserung der Lungenfunktion bei 4 der 5 Patienten/innen und Reduktion der KBE/ml Sputum ( $2.52 \pm 2.5 \log_{10}$ ) zeigen <sup>118</sup>.

In der hier durchgeführten Studie wurden initial keine Antibiotikaresistenzen gegenüber den genutzten Antibiotika im Sputum der Patienten/innen nachgewiesen. Eine Aussage über sich neu entwickelnde Resistenzen im Verlauf der Studie ist nicht möglich, da keine weiteren Resistenztestungen erfolgten. Ein

möglicher Einfluss ist jedoch nicht auszuschließen. Daher kann die Resistenzentwicklung als Verlaufspareter für künftige Studien in Erwägung gezogen werden. Bislang wurden bei der inhalativen Anwendung jedoch keine internationalen Grenzwerte beschrieben und der Nutzen der Resistenztestungen konnte in klinischen Versuchen nicht bestätigt werden.

So kommt der Resistenztestung unter inhalativer Therapie eine nur geringfügige Bedeutung zu <sup>60</sup>.

### Ziele der Studie und methodischer Vorteil

Die hier durchgeführte Phase-III-Studie baute auf den eben genannten Ergebnissen von Hermann et al. auf, die einen Vorteil hinsichtlich einer signifikanten Reduktion der KBE von *Pseudomonas aeruginosa* sowie einer signifikanten Verbesserung der Lungenfunktion der Kombinationstherapie der beiden in der CF-Therapie gut bekannten Antibiotika Tobramycin und Colistin *in vitro*, im Mausmodell und im Rahmen einer kleinen Pilotstudie zeigte. Die durch Hermann et al. beschriebenen synergistischen Effekte der beiden Antibiotikagruppen sollten in der hier vorgestellten Studie anhand einer größeren Patientenkohorte bestätigt werden <sup>118</sup>.

Der primäre Endpunkt war die Reduktion der KBE von *Pseudomonas aeruginosa* nach 28-tägiger Therapie mit Colistin verglichen mit Colistin-Tobramycin. Der minimale klinisch relevante Behandlungseffekt konnte aus den Daten der Pilotstudie von Hermann et al. festgelegt werden.

Weiterhin überprüfte diese Studie die Sicherheit der Kombinationstherapie bezüglich UAW. Durch die angewandte Randomisierung zur Einteilung der Patienten/innen konnte die Verzerrung durch Selektion reduziert werden.

Die Aufteilung der Studienteilnehmer/innen in beide Gruppen (betreffend vor allem die Lungenfunktionseinschränkung und der Nachweis des mukoiden *Pseudomonas aeruginosa*) war mit Ausnahme des Alters homogen. Die Homogenität der beiden Gruppen führt zu einer guten Vergleichbarkeit (siehe Tabelle 4 und 5, Abschnitt 3.1. Patientenbeschreibung)

## Pharmakokinetische Aspekte der antibiotischen Therapie bei CF-Lungenerkrankung

Als Monotherapie sind beide Antibiotika sowohl in der intravenösen als auch inhalativen Anwendung bereits geprüft und werden in der Therapie der pulmonalen CF-Erkrankung regelmäßig angewandt <sup>98,122</sup>.

### *Ursachen erhöhter Antibiotikakonzentrationen bei chronischer Pseudomonas aeruginosa Infektion*

Hogardt und Heesemann beschreiben in ihren Arbeiten eine sich durch die reduzierte Stoffwechselaktivität im Biofilm entwickelnde verminderte Wirksamkeit der eingesetzten Antibiotika. Weiter kommt es durch den Verlust von Pili und Flagellum (Motilität) in den unteren Mukusschichten zu einer gestörten Phagozytosefähigkeit der Makrophagen <sup>58,135</sup>. Dies zusammen erfordert den Einsatz deutlich höherer Antibiotikakonzentrationen und hat als langfristige Folge die Bildung multiresistenter Keime <sup>136,137,138</sup>.

Die *small colony variants*, welche mit einem Durchmesser von etwa 1-3 mm<sup>2</sup> zu einer langsam wachsenden Subpopulation der *Pseudomonaden* gehören, führen zu einer verstärkten Abnahme der Lungenfunktion sowie Zunahme der zur Eradikation notwendigen Antibiotikakonzentration (erhöhte minimale Hemmkonzentration) <sup>64</sup>.

Zu den oben genannten *Pseudomonas aeruginosa* bedingten Ursachen für den Bedarf an hochdosierten Antibiotikagaben kommen zugrundeliegende pathophysiologische Bedingungen der Mukoviszidose (zähflüssiger Mukus, minderbelüftete und minderdurchblutete Areale), durch welche die in der tiefen Mukusschicht befindlichen Bakterien nur schwer durch Antibiotika erreicht werden.

Auch bestimmte Eigenschaften der Antibiotika machen eine hohe parenterale Dosis notwendig, um die benötigte Konzentration am Wirkort zu erreichen. So diffundieren Aminoglykoside passiv entlang eines Konzentrationsgefälles über die Blut-Bronchus-Schranke <sup>139</sup>. Ihre Konzentration im Bronchialsekret ist aufgrund verminderter Diffusionsmöglichkeiten gering und ihre Verteilung ist vor allem auf den extrazellulären Flüssigkeitsfilm begrenzt <sup>140,141</sup>. Es muss daher eine

höhere Dosis an Antibiotika eingesetzt werden, als sie bei anderen Lungenerkrankungen benötigt wird und somit können bis zu 25-fach höhere Konzentrationen als die mittlere Hemmkonzentration notwendig werden <sup>71,142</sup>.

### *Anwendung antibiotischer Inhalationstherapie bei CF und deren Nebenwirkungen*

Mittels einer inhalativ-antibiotischen Therapie wird die lokale Konzentration bei gleichzeitig wenig bis keinen systemischen Nebenwirkungen erhöht <sup>143,144</sup>. Vor allem bei Patienten/innen mit einer milden Lungenaffektion und wenig Sputumproduktion erreicht das Aerosol eine gute Verteilung in der Lunge <sup>145</sup>.

Die niedrige Nebenwirkungsrate bei inhalativer Applikation bestätigend, zeigten die Ergebnisse der Studie auch nach längerer Anwendungsdauer keine Veränderungen der Nieren- und Leberfunktionsparameter, gemessen an Kreatinin, Harnstoff und Transaminasenaktivitäten. Da ein Hörtest im Verlauf der Studie nicht stattfand, ist keine Aussage zu einer möglichen Ototoxizität zu treffen. Insgesamt wurden 31 UAW festgestellt, davon wurde keine als schwer kategorisiert und nur in 8 Fällen (26%) als mögliche Nebenwirkung beschrieben. Mit n=22 (71%) kamen UAW häufiger in der Colistin-Tobramycin-Gruppe als in der Colistin-Gruppe n=9 (29%) vor (siehe Tabelle 10, Abschnitt 3.3.2. Patientensicherheit).

Weitere bekannte Nebenwirkungen bei der inhalativen Anwendung der beiden Antibiotika, wie die pulmonale Obstruktion mit vermehrtem Husten wurde häufiger in der Colistin-Tobramycin-Gruppe im Vergleich zur Colistin-Gruppe beschrieben. Eine manifeste Obstruktion, messbar in der Lungenfunktion 30 Minuten vor und nach der Inhalation, war jedoch nicht feststellbar. In Zulassungsstudien der beiden Antibiotikagruppen sind ähnliche Nebenwirkungsprofile beschrieben und zeigen somit kein erhöhtes Risiko in der Doppelinhalationsgruppe an und bestätigen die Sicherheit der Doppelinhalation <sup>146-148</sup>.



### *Unterschiedliche Applikationsarten von Tobramycin*

Tobramycin steht seit einigen Jahren als inhalatives Pulverpräparat zur Verfügung. Seine Wirksamkeit auf die Verbesserung der FEV1 [% des Solls] und Reduktion der Dichte des *Pseudomonas aeruginosa* im Sputum der CF-Patienten/innen sowie die Sicherheitsanalyse konnte in den Zulassungsstudien gezeigt werden <sup>116,146</sup>.

In der Vorläufer-Pilotstudie wurde zur Inhalation Tobramycin-Inhalationslösung 300mg/5ml via Inhalator genutzt. Ein möglicher Einfluss auf die Ergebnisse der Studien durch den Wechsel der Applikationsart von Feucht- zu Trockeninhalation in der hiesigen Studie, ist nicht sicher auszuschließen.

Bei der Feuchtinhalation gilt es eine Partikelgröße von 2-5 µm nicht zu überschreiten, um bis in die kleinen Bronchiolen zu gelangen <sup>149</sup>. Im Allgemeinen kommen nur etwa 15-20% der inhalierten Substanz in den tiefen Lungenabschnitten an, der Rest setzt sich im Oropharynx ab oder wird in die Umgebung vernebelt, da die Wirkstoffdeposition stark von der Inhalationstechnik des Patienten/in abhängt <sup>150</sup>. Mit der Weiterentwicklung der Inhalationsgeräte ließ sich eine Verbesserung der Wirkstoffdeposition in der Lunge zeigen <sup>151</sup>. Ähnliche Ergebnisse der Wirkstoffdeposition zeigt die Applikation via Trockenpulverinhalation, denn auch hier kommt es stark auf die Mitarbeit der Patienten/innen an. Diese Applikationsart erfordert einen ausreichend starken inspiratorischen Fluss, welcher zumeist erst ab dem Schulalter möglich ist <sup>60</sup>.

Ein Vorteil der Trockenpulverinhalation besteht in einer täglichen Zeitersparnis durch eine rasch zu inhalierende Kapseldarreichung und erhöht so vermutlich die Compliance der Patienten/innen. Die aufwändige hygienische Reinigung der Inhalationsgerätschaft entfällt und die Medikamente können bei Raumtemperatur gelagert werden <sup>152-154</sup>. Ein weiterer Vorteil der Trockenpulverinhalation liegt in dem fehlenden Wirkstoffverlust bei der Ausatmung <sup>147</sup>.

Die Patientenzufriedenheit/Compliance war keine explizite Fragestellung der Studie und kann somit nicht exakt beantwortet werden. Jedoch kann bei niedriger Zahl an Therapiewechslern in der Colistin-Tobramycin-Gruppe (3/13) auch von einer guten Compliance der Doppelinhalation ausgegangen werden.

Ramsey et al. schreiben in ihren Studienergebnissen, dass die Inhalationstherapie mit Tobramycin Krankenhausaufenthalte für intravenöse Antibiotikatherapien reduziert. Dies führt zu einer erhöhten Lebensqualität, einer Reduktion an Komplikationen/Nebenwirkungen durch die systemische Therapie und zu reduzierten Kosten für das Gesundheitssystem und stellt somit einen weiteren Vorteil der Inhalationstherapie dar <sup>73</sup>.

### Therapiewechsler

Beobachtungen zeigen eine Reduktion der Wirksamkeit der inhalativen Antibiotika bei längerer Anwendung mit Reversibilität bei Wechsel auf eine andere Wirkstoffklasse oder nach Einhalten einer Therapiepause <sup>98,144</sup>.

Aufgrund pulmonaler Verschlechterung oder zur Abwendung einer pulmonalen Exazerbation unter der dauerhaften Colistintherapie war bei 10/13 Studienteilnehmer/innen ab Visite 3 ein Therapiewechsel notwendig. Es wurde entweder eine i.v. antibiotische Therapie bei pulmonaler Exazerbation eingeleitet oder eine Ergänzung der Inhalationstherapie um Tobramycin und Meropenem durchgeführt. Dies erfolgte deutlich häufiger in der Colistin-Gruppe als in der Colistin-Tobramycin-Gruppe.

Somit zeigte die Monotherapie mit Colistin passend zu der beschriebenen Beobachtung von Döring et al. in der hier vorliegenden Studie bei 77% der Patienten/innen keine stabile pulmonale Situation über einen längeren Zeitraum von mehreren Wochen und machte den genannten Wechsel bzw. eine Ergänzung der Therapie notwendig. <sup>98</sup>

### Primärer Endpunkt und weitere Studienergebnisse

In der hier durchgeführten Studie konnte der festgelegte primäre Endpunkt: Reduktion der KBE/ml Sputum des *Pseudomonas aeruginosa* von Visite 2 zu Visite 3 nicht erreicht werden, denn es ergab sich kein signifikanter Unterschied in der Reduktion der KBE/ml Sputum des *Pseudomonas aeruginosa* in der Colistin-Tobramycin-Gruppe im Vergleich zur Colistin-Gruppe. Lediglich eine Reduktion in der Colistin-Gruppe um  $-0.09 \pm 1.65 \log_{10}$  KBE/ml und in der Colistin-Tobramycin-Gruppe um  $-0.13 \pm 1.9 \log_{10}$  KBE/ml ( $p=0.373$ ) war zu sehen (PP-

Gruppe). So musste die Studie gemäß biometrischer Planung nach erfolgter Zwischenanalyse abgebrochen werden.

Entgegen den Ergebnissen in dieser Studie, zeigte sich in den Arbeiten von Ramsey et al. nach einer 14-tägigen Inhalationstherapie mit Tobramycin (Tobramycin-Inhalationslösung 2x 300mg tgl.) an 258 Teilnehmer/innen (Gesamt N=520) eine Reduktion der KBE/ml Sputum von 2,2 log<sub>10</sub> und nach 28 Tagen eine Durchschnittsreduktion von 1,9 log<sub>10</sub>. Die Wirksamkeit verminderte sich jedoch nach 3 Zyklen im „on-off“ Schema deutlich und es zeigte sich lediglich eine mittlere Reduktion um 0,8 log<sub>10</sub> im Vergleich zum Tag 0 <sup>73</sup>. Zu ähnlichen Ergebnissen kam die EVOLVE Studie. Hier zeigten sich nach 28 Tagen Therapie bei 95 Patienten/innen eine Reduktion der KBE/ml beim mukoiden *Pseudomonas aeruginosa* von 2,61 ± 2,53 log<sub>10</sub> <sup>146</sup>.

Im Gegensatz zu den Studien von Ramsey et al. und Konstan et al. beschreibt die Studie von Hodson et al. bei zwar deutlicher Verbesserung der Lungenfunktion nach 28 Tagen Therapie mit Tobramycin-Inhalationslösung 2x 300 mg tgl. (FEV1[% des Solls] von 6,7% bei p=0,006), lediglich eine mittlere Reduktion der KBE/ml Sputum um 0.86 log<sub>10</sub> und nach Inhalation mit Colistin (2x 1 Mio tgl.) um 0.60 log<sub>10</sub> (p=0,007).

Eine mögliche Erklärung für die divergenten Ergebnisse, insbesondere in der Reduktion an KBE/ml, könnte in der unterschiedlichen Handhabung der inhalationsantibiotischen Standardtherapie vor Durchführung der jeweiligen Studie liegen. Bei der Studie von Ramsey und Kollegen/innen handelte es sich um die Zulassungsstudie von inhalativem Tobramycin zur Behandlung von *Pseudomonas aeruginosa* Infektionen bei CF. Daher kann davon ausgegangen werden, dass die eingeschlossenen Patienten/innen bisher gar nicht oder nur wenig Kontakt zu dieser Therapie hatten. Es finden sich in der Publikation keine Informationen darüber, ob die Studienteilnehmer/innen in der Vergangenheit bereits inhalatives Tobramycin erhalten haben <sup>73</sup>. Bei Konstan und Kollegen/innen war ein Ausschlusskriterium die Applikation von inhalativem Antibiotikum bis vier Monate vor Screening <sup>146</sup>. Hodson und Kollegen/innen beschreiben, dass 85% der Studienteilnehmer/innen ein inhalatives Antibiotikum in den letzten sechs Monaten vor Einschluss erhalten haben <sup>155</sup>. Die beiden

ersteren Studien wurden in den Vereinigten Staaten von Amerika durchgeführt, wo die inhalative antibiotische Therapie bis dahin noch nicht regelmäßig angewandt wurde. Im Gegensatz zur letzteren Studie, welche in Großbritannien stattfand und hier die inhalativantibiotische Therapie bereits länger standardmäßig eingesetzt wird <sup>155</sup>.

#### *Einfluss auf die Lungenfunktion, Entzündungsparameter und das Gewicht*

Ein Vorteil der Kombinationstherapie in der hiesigen Studie zeigte sich in der Lungenfunktion nach einer Therapiedauer von 112 Tagen: Zunächst kam es in beiden Kohorten zu einem leichten Abfall der Lungenfunktion an d 28 (Colistin-Gruppe:  $-0.8 \pm 2.9$  vs. Colistin-Tobramycin-Gruppe:  $-1.5 \pm 2.2$ ). Nach 112 Tagen kam es in der Doppelinhalationsgruppe tendenziell zu einem größeren Anstieg der FEV1[% des Solls]  $+5.3 \pm 7.5$  im Vergleich zu der Monotherapie-Gruppe  $+2,3 \pm 5.4$  ( $p=0.07$ ).

In einer vergleichenden Studie von Tobramycin und Colistin zeigte Hodson et al. an 115 Patienten/innen eine Verbesserung der relativen FEV1 [% des Solls] nach 28 Tagen von 6,7% (Tobramycininhalation) und von 0,37% (Colistininhalation) <sup>155</sup>. In der Kontrolle nach 20 Wochen war in der bereits genannten Studie von Ramsey et al. eine mittlere Verbesserung der FEV1 [% des Solls] in der Tobramycin-Gruppe von etwa 10% zu vermerken <sup>73</sup>. Ähnliche Ergebnisse konnten in der Zulassungsstudie des Tobramycininhalationspulvers (2x112mg/d) erreicht werden (N=95, mittlere Differenz der Lungenfunktion in FEV1 [% des Solls]  $+13,3\%$  nach 28 Tagen Therapie) <sup>146</sup>. Dies zeigt in beiden Studien einen langfristigen Erfolg der Therapie auf. Der Nachbeobachtungszeitraum sollte lang genug gewählt werden.

Alle weiteren erhobenen Messparameter wie Gewicht, Entzündungsparameter (Interleukin-8 und DNA-Reste im Sputum, CrP und Leukozytenzahl im Blut) zeigten keinen nennenswerten Unterschied der beiden Inhalationsgruppen.

### Schwächen im Studiendesign

Ein Mangel der Studie kann in der geringen Anzahl an Teilnehmer/innen beschrieben werden. Außerdem kam es zu einem hohen Anteil an Therapiewechslern in der Colistin-Gruppe von 10/13 Teilnehmer/innen. Daher waren die Daten von Tag 112 nur eingeschränkt der ursprünglichen Studienmedikation zuzuordnen (Therapiewechsler Colistin-Tobramycin-Gruppe: 3/13). Es fällt jedoch auf, dass sich trotz antibiotischer Erweiterung der Therapie in der Colistin-Gruppe eine merkliche Verbesserung der Lungenfunktion nach 112 Tagen in der Colistin-Tobramycin-Gruppe zeigte. Die kurzzeitige Verschlechterung unter der Monotherapie ließ sich durch die Erweiterung der antibiotischen Therapie also nicht mehr aufholen.

Da inhalatives Tobramycin zur Standardtherapie bei chronischer Besiedlung mit *Pseudomonas aeruginosa* gehört, waren 54% der Patienten/innen aus der Colistin-Tobramycin-Gruppe nicht mehr naiv für Tobramycin. Hierdurch ist die Vergleichbarkeit eingeschränkt.

Anders als in anderen Inhalationsstudien beschrieben, konnte in der hiesigen Studie kein signifikanter Unterschied in der individuellen Verbesserung der Lungenfunktion, ausgehend vom Schweregrad der CF-Lungenerkrankung (gemessen an der FEV1 [% des Solls] zum Zeitpunkt V1) festgestellt werden (Siehe Abbildung10, Abschnitt 3.3.1. Lungenfunktion). So beschreibt Steinkamp et al. in seiner Studie eine stärkere Verbesserung der Lungenfunktion durch die Inhalation mit Tobramycin bei Patienten/innen mit höherer Lungenfunktion im Vergleich zu Patienten/innen mit niedriger Lungenfunktion <sup>98,156</sup>.

Eine Kritik der Trockenpulverinhalation wird für Patienten/innen mit geringer Lungenfunktion und einem eingeschränkten Inspirationsflow beschrieben, denn ohne ausreichenden Inspirationsflow ist eine Applikation bis in die tiefen Lungenareale nicht möglich <sup>147</sup>. Bei ähnlichen Verbesserungen der Lungenfunktion einzelner Patienten/innen unabhängig der Ausgangsmessung kann diese mögliche fehlerhafte Applikation in der hiesigen Studie nicht bestätigt werden. Einschränkend ist jedoch erneut auf die geringe Teilnehmerkohorte zu verweisen, die eine differenzierte Betrachtung nur begrenzt ermöglicht.

Ein Nachteil im Studiendesign kann die fehlende Verblindung darstellen, da eine mögliche Verzerrung durch die Erwartung der Patienten/innen- und Behandler/innen nicht ausgeschlossen werden kann.

#### Ausblick in der Therapie gegen *Pseudomonas aeruginosa*

Die neueste Therapiestrategie in der Therapie der CF stellen die CFTR-Modulatoren dar. Die im Jahr 2020 in Deutschland zugelassene Triple-Therapie Kaftrio® bestehend aus zwei Korrektoren (Elexacaftor und Tezacaftor) sowie einem Potentiator (Ivacaftor) erbrachte vielversprechende Erfolge. In der Phase 3 Studie der Triple-Therapie konnte eine deutliche Verbesserung der Lungenfunktion von 10% FEV1 [% des Soll] nach 4 Wochen erzielt werden. Mit einer zudem deutlichen Reduktion der Schweißchloridkonzentration im Mittel von -45 mmol/l kann eine deutliche Funktionszunahme des CFTR-Kanals beschrieben werden <sup>157</sup>.

In der Studie von Middleton 2019 et al. (zweite Phase 3 Studie) konnte ebenso ein FEV1 [% des Soll] Anstieg von 13,8% nach 4 Wochen und von 14,3% nach 24 Wochen gezeigt werden. Die pulmonale Exazerbationsrate erniedrigte sich um 63% und die Patientenzufriedenheit war sehr hoch <sup>158</sup>. In einer weiterführenden Studie konnte in der Zwischenanalyse von Griese et al. nach weiteren 24 Wochen Therapie die Wirksamkeit und Sicherheit der Triple Therapie bestätigt werden <sup>159</sup>.

Es ist anzunehmen, dass es im weiteren Verlauf der Modulatorentherapie zu einer Zunahme der Lungenclearance mit Abnahme der Dichte an *Pseudomonas aeruginosa* kommt.

In der Langzeit Beobachtungsstudie von Volkova et al. wurden 885 Patienten/innen und eine nicht behandelte Vergleichsgruppe aus den Vereinigten Staaten von Amerika und aus Großbritannien seit Beginn der Ivacaftor Einnahme über vier bis fünf Jahre nachverfolgt. Es zeigte sich eine deutliche Reduktion der Infektion mit *Pseudomonas aeruginosa*. In der Ivacaftorgruppe aus Großbritannien waren zum Ausgangszeitpunkt 63% und nach 4 Jahren nur noch 39% der Patienten/innen mit *Pseudomonas aeruginosa* besiedelt. Dies sind signifikant weniger als in der Vergleichsgruppe: hier waren es initial 57% und

nach 4 Jahren 56% der Patienten/innen mit einem chronischen Nachweis an *Pseudomonas aeruginosa*. Ähnliche Ergebnisse wurden in den Vereinigten Staaten von Amerika beschrieben (57%/45% in der Ivacaftorgruppe versus 50/56% in der Vergleichsgruppe) <sup>160</sup>. Jedoch konnte auch in dieser Beobachtungsstudie über die Zeit ein Abfall der Lungenfunktion (gemessen in FEV1 [% des Solls]) festgestellt werden. Dieser war in der Ivacaftorgruppe in den Vereinigten Staaten von Amerika mit -0,7% nach fünf Jahren jedoch deutlich geringer als in der Vergleichsgruppe mit -8,3%. Nach 4 Jahren lag der Zugewinn an FEV1 [% des Solls] in der Ivacaftorgruppe in Großbritannien nach initial deutlichem Anstieg zuletzt bei +4,9% und in der Vergleichsgruppe war die FEV1 [% des Solls] um 4,3% reduziert zum Ausgangswert.

Auch wenn es sich bei den CFTR-Modulatoren nicht um antibiotische Medikamente handelt, zeigen die oben genannten Studien, dass durch eine relevante Korrektur der CFTR-Funktion die eigene Fähigkeit der CF-Lunge zur Abtötung und Elimination von Bakterien wiederhergestellt werden kann.

Trotz der sehr erfolgsversprechenden Ergebnisse der Modulatorentherapie bleiben für viele Patienten/innen inhalative Antibiotika zur Kontrolle des *Pseudomonas aeruginosa* ein notwendiger Baustein in der Therapie der CF-Lungenerkrankung, nicht zuletzt, da weiterhin nicht für alle Mutationskombinationen eine Modulatorentherapie zur Verfügung steht <sup>24</sup>.

Nach Angaben des deutschen CF Register inhalieren 90% aller CF Patienten/innen im „on-off“ Schema Tobramycin bei einer Infektion mit *Pseudomonas aeruginosa* <sup>25</sup>.

In der Studie von Nelson et al. wurden 30 Patienten/innen im Alter zwischen 9 bis 75 Jahre vor/während und nach einer vierwöchigen Tobramycininhalation (Azithromycin wurde als einziges weiteres Antibiotika erlaubt) mittels Lungenfunktion und Sputumkontrollen auf die Wirksamkeit der Therapie und Mikrobiomveränderungen in der Lunge untersucht. Es zeigte sich eine insgesamt sehr geringe Wirksamkeit auf die Reduktion der KBE des *Pseudomonas aeruginosa* bei jedoch interindividuell großen Unterschieden. Klinisch konnten keine Veränderungen anhand der Lungenfunktion festgestellt werden. In der Untersuchung der Mikroorganismen des Sputums zeigte sich eine Änderung des

Mikrobioms hin zu nicht-dominant, fakultativ und obligat anaeroben Bakterien. Eine Selektion des *Pseudomonas aeruginosa* konnte nicht festgestellt werden<sup>161</sup>. Diese Studie ist ein Beispiel dafür, dass bestehende Standardtherapien überprüft und angepasst werden müssen.

Dasenbrook et al. stellte in seiner retrospektiven Studie anhand der Daten aus dem US-Patienten Register fest, dass es zunehmend mehr CF-Patienten/innen gibt, die im Wechsel mit mindestens zwei Antibiotikaklassen inhalieren. Als Ursache wird eine reduzierte Wirksamkeit unter der dauerhaften zyklischen Monotherapie beschrieben (wie auch durch die Studie von Nelson et al gezeigt). Je eingeschränkter die Lungenfunktion der Patienten/innen umso häufiger werden mehr als eine Antibiotikaklasse im Wechsel zur Dauertherapie genutzt<sup>134</sup>. Umso dringlicher sollten weitere Studien nicht nur in der Neuzulassung inhalativer Antibiotika durchgeführt werden, sondern auch in der Synergietestung sich ergänzender Antibiotikaklassen.

Eine der ersten Studie in der nacheinander Colistin mit Tobramycin oder Aztreonam mit Tobramycin oder Aztreonam mit Colistin verglichen wurden, zeigte eine Verbesserung in der Lungenfunktion, Reduktion der Sputummenge und Zufriedenheit gegenüber der Therapie bei den Patienten/innen und Behandlern/innen. Eine Kontrollgruppe zur besseren Vergleichbarkeit der Ergebnisse konnte nicht erstellt werden, da keiner der Patienten/innen mit nur einem Medikament im „on-off“ Zyklus zu inhalieren einverstanden war<sup>131</sup>. So stellt die hier aufgezeigte Studie, neben der vorliegenden Studie eine der wenigen Studien zur Vergleichbarkeit inhalativer Kombinationstherapien dar.



### Schlussfolgerung

In der hier vorgestellten Studie konnte zwar ein eindeutiger Vorteil der Zweifachinhalation mit Colistin und Tobramycin in der Reduktion der Dichte an *Pseudomonas aeruginosa* nach 28 Tagen Therapie nicht belegt werden, die Sicherheit der Doppelinhalationstherapie sowie eine tendenzielle Verbesserung der Lungenfunktion nach 112 Tagen der Doppelinhalationstherapie konnte jedoch gezeigt werden.

Ein wichtiger Bestandteil der Therapie zum Erhalt der Lungenfunktion bleibt bei anhaltend hohen Zahlen an chronisch *Pseudomonas aeruginosa* besiedelten CF-Patienten/innen die antibiotische Therapie zur Suppression des Keimes. In den letzten Jahren wurden einige Antibiotika zur inhalativen Therapie bei chronischer *Pseudomonas aeruginosa* Besiedlung zugelassen. Deren synergistische Wirkung gilt es zu prüfen, um eine klare und wirksame Handlungsempfehlung in der Therapie gegen *Pseudomonas aeruginosa* zu geben und so die durch *Pseudomonas aeruginosa* ausgelöste pulmonale Destruktion aufzuhalten.

## 5 Zusammenfassung

In den letzten Jahrzehnten hat sich durch das Hinzukommen verschiedener zusätzlicher Therapieoptionen (Mukolytische Therapie, (inhalative) Antibiotikatherapien, CFTR-Modulatoren) sowie der Möglichkeit der frühzeitigen Diagnostik auf Mukoviszidose im Rahmen des Neugeborenencreenings die Lebenszeit eines CF-Patienten/in deutlich verbessert.

Eine pulmonale Besiedlung und folgende Infektion mit *Pseudomonas aeruginosa* trägt durch verschiedene Pathogenitätsfaktoren des Bakteriums zum Verlust der Lungenfunktion bei und eine Eradikation im chronischen Stadium zeigt sich erschwert.

Eine wachsende Anzahl an inhalativ applizierbaren Antibiotikatherapien steht zur Auswahl und wird, häufig im Wechsel miteinander, genutzt. Kontrollierte klinische Studien zur Wirksamkeit der wechselnden Therapien fehlen zumeist. Zweifachinhalationen synergistisch wirkender Antibiotikaklassen, wie sie bereits seit vielen Jahren in der systemischen Therapie angewandt werden, kommen nur selten zum Einsatz und Studien zu deren Wirksamkeit gibt es kaum.

In der Vorgängerstudie der vorliegenden Arbeit konnte ein Vorteil der Kombinationstherapie der beiden in der CF-Therapie gut bekannten Antibiotika Tobramycin und Colistin *in vitro*, im Mausmodell und im Rahmen einer kleinen Pilotstudie gezeigt werden. Die hier vorgestellte klinische Studie verfolgte das Ziel die vorbeschriebenen Ergebnisse anhand einer größeren Patientenkohorte zu bestätigen und die Sicherheit der Therapie zu überprüfen.

Die 26 Patienten/innen im Jugend- und Erwachsenenalter wurden in eine der beiden Therapiegruppen randomisiert und erhielten die Studienmedikation unverblindet. In vierwöchigen Abständen wurde ein möglicher Therapieerfolg anhand der gewachsenen Menge an KBE/ml des *Pseudomonas aeruginosa* im Sputum der Patienten/innen und anhand der Lungenfunktion gemessen. Der primäre Endpunkt einer signifikanten Reduktion der KBE/ml des *Pseudomonas aeruginosa* nach 28-tägiger Therapie, wie er in der Vorläuferstudie gezeigt wurde, konnte nicht bestätigt werden, sodass die Studie nach Zwischenanalyse gemäß der biometrischen Planung abgebrochen werden musste. Ein Erfolg zeigte sich jedoch am Ende der Therapie mit einer deutlichen Verbesserung der

Lungenfunktion an Tag 112 in der Colistin-Tobramycin-Gruppe im Vergleich zur Colistin-Gruppe. Ebenso kam es zu weniger Therapiewechslern in der Colistin-Tobramycin-Gruppe und diese kann als sichere Therapie eingestuft werden. Die monozentrisch durchgeführte Studie schloss eine kleine Kohorte an CF-Patienten/innen ein, sodass sich eine differenzierte Betrachtung der Ergebnisse als erschwert zeigte.

Durch die Anwendbarkeit im häuslichen Setting, der Möglichkeit eine hohe lokale Wirkdosis bei geringen systemischen Nebenwirkungen zu erzielen, eine zunehmende Auswahl an verschiedenen inhalativen Antibiotikaklassen und Zunahme der Applikation als Trockenpulver zeigt die inhalative Gabe von Antibiotika viele Vorteile auf, welche zu einer besseren Compliance der Patienten/innen führen.

Langzeitstudien zeigen den Erfolg der Modulatorentherapie in der Reduktion des *Pseudomonas aeruginosa* auch bei chronischer Besiedlung und neueste Kombinationen aus CFTR-Korrektoren und -Potentioren zeigen einen großen Erfolg in der klinischen Verbesserung, gemessen an der Lungenfunktion, Exazerbationsraten und Reduktion des Schweißchloridwertes. Dennoch wird die antibiotische Therapie auch in Zukunft eine bedeutende Rolle im Kampf gegen *Pseudomonas aeruginosa* spielen, nicht zuletzt, da zurzeit noch nicht alle Kombinationen an *CFTR*-Mutationen durch die Modulatoren therapiert werden können.

Um die Wirksamkeit der zur Verfügung stehenden Antibiotikaklassen effektiv zu nutzen und möglichst eine Resistenzentwicklung und unnötigen Selektionsdruck auf das Mikrobiom der Lunge zu reduzieren, sollte die synergistische Wirkung einzelner Antibiotikaklassen weiter geprüft und anhand klinischer Studien am Patienten/in verifiziert werden. So soll die chronische Besiedlung mit *Pseudomonas aeruginosa* reduziert werden, welche weiterhin eine Hauptursache von Morbidität und Mortalität bei Patienten/innen mit Cystischer Fibrose darstellt.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Tummler B, Stuhmann M. [Molecular genetics principles in cystic fibrosis. An example of genetic illness in pneumology]. *Internist (Berl)* 2003;44 Suppl 1:S7-15.
2. Rubin BK. Cystic fibrosis: myths, mistakes, and dogma. *Paediatr Respir Rev* 2014;15:113-6.
3. Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 1989;245:1066-73.
4. Ratjen F, Doring G. Cystic fibrosis. *Lancet* 2003;361:681-9.
5. Boucher RC. Regulation of airway surface liquid volume by human airway epithelia. *Pflugers Arch* 2003;445:495-8.
6. Donaldson SH, Boucher RC. Update on pathogenesis of cystic fibrosis lung disease. *Curr Opin Pulm Med* 2003;9:486-91.
7. Gray MA. Bicarbonate secretion: it takes two to tango. *Nat Cell Biol* 2004;6:292-4.
8. Ko SB, Shcheynikov N, Choi JY, et al. A molecular mechanism for aberrant CFTR-dependent HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> transport in cystic fibrosis. *Embo j* 2002;21:5662-72.
9. Wang Y, Soyombo AA, Shcheynikov N, et al. Slc26a6 regulates CFTR activity in vivo to determine pancreatic duct HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> secretion: relevance to cystic fibrosis. *Embo j* 2006;25:5049-57.
10. Boucher RC. Airway surface dehydration in cystic fibrosis: pathogenesis and therapy. *Annu Rev Med* 2007;58:157-70.
11. Riordan JR. CFTR function and prospects for therapy. *Annu Rev Biochem* 2008;77:701-26.
12. Boucher RC. Human airway ion transport. Part one. *Am J Respir Crit Care Med* 1994;150:271-81.
13. Boucher RC, Stutts MJ, Knowles MR, Cantley L, Gatzky JT. Na<sup>+</sup> transport in cystic fibrosis respiratory epithelia. Abnormal basal rate and response to adenylate cyclase activation. *J Clin Invest* 1986;78:1245-52.
14. Quinton PM. Cystic fibrosis: impaired bicarbonate secretion and mucoviscidosis. *Lancet* 2008;372:415-7.
15. Strazzabosco M, Fabris L, Spirli C. Pathophysiology of cholangiopathies. *J Clin Gastroenterol* 2005;39:S90-s102.
16. Beuers U, Hohenester S, de Buy Wenniger LJ, Kremer AE, Jansen PL, Elferink RP. The biliary HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> umbrella: a unifying hypothesis on pathogenetic and therapeutic aspects of fibrosing cholangiopathies. *Hepatology* 2010;52:1489-96.

17. Augarten A, Paret G, Avneri I, et al. Systemic inflammatory mediators and cystic fibrosis genotype. *Clin Exp Med* 2004;4:99-102.
18. Cheng SH, Gregory RJ, Marshall J, et al. Defective intracellular transport and processing of CFTR is the molecular basis of most cystic fibrosis. *Cell* 1990;63:827-34.
19. Foundation. Annual Data Report - Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry 2019.
20. Tummler B, Kiewitz C. Cystic fibrosis: an inherited susceptibility to bacterial respiratory infections. *Molecular medicine today* 1999;5:351-8.
21. Mahadeva R, Sharples L, Ross-Russell RI, Webb AK, Bilton D, Lomas DA. Association of alpha(1)-antichymotrypsin deficiency with milder lung disease in patients with cystic fibrosis. *Thorax* 2001;56:53-8.
22. Matsui H, Grubb BR, Tarran R, et al. Evidence for periciliary liquid layer depletion, not abnormal ion composition, in the pathogenesis of cystic fibrosis airways disease. *Cell* 1998;95:1005-15.
23. Zielenski J, Corey M, Rozmahel R, et al. Detection of a cystic fibrosis modifier locus for meconium ileus on human chromosome 19q13. *Nat Genet* 1999;22:128-9.
24. 2020. (Accessed 25.11., 2020, at <https://www.muko.info/informieren/ueber-die-erkrankung/therapie-der-mukoviszidose/kaftrio>.)
25. Nährlich L, Burkhart M, Wosniok J. Deutsches Mukoviszidose-Register Berichtsband 2019 10.06.2020.
26. Naehrlich L, Stuhmann-Spangenberg M, Barbeno J, et al. S2k - Leitlinie: Diagnose der Mukoviszidose. 2013.
27. Foundation. Annual data report - Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry. 2018.
28. Sens B, Stern M. Berichtsband Qualitätssicherung Mukoviszidose 2012: Zentrum für Qualität und Management im Gesundheitswesen, Mukoviszidose e.V. und Mukoviszidose Institut gGmbH, editors.; 2012.
29. Ballmann M, Smaczny C. CF-Manual. Bremen: UNI-MED Verlag AG; 2008.
30. Lopes-Pacheco M. CFTR Modulators: The Changing Face of Cystic Fibrosis in the Era of Precision Medicine. *Front Pharmacol* 2019;10:1662.
31. Pranke I, Golec A, Hinzpeter A, Edelman A, Sermet-Gaudelus I. Emerging Therapeutic Approaches for Cystic Fibrosis. From Gene Editing to Personalized Medicine. *Front Pharmacol* 2019;10:121.
32. Worlitzsch D, Tarran R, Ulrich M, et al. Effects of reduced mucus oxygen concentration in airway Pseudomonas infections of cystic fibrosis patients. *J Clin Invest* 2002;109:317-25.

33. Davis PB, Drumm M, Konstan MW. Cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;154:1229-56.
34. Stoltz DA, Meyerholz DK, Welsh MJ. Origins of cystic fibrosis lung disease. *N Engl J Med* 2015;372:351-62.
35. Livraghi-Butrico A, Kelly EJ, Klem ER, et al. Mucus clearance, MyD88-dependent and MyD88-independent immunity modulate lung susceptibility to spontaneous bacterial infection and inflammation. *Mucosal Immunol* 2012;5:397-408.
36. Pier GB. Role of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in innate immunity to *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:8822-8.
37. Chmiel JF, Davis PB. State of the art: why do the lungs of patients with cystic fibrosis become infected and why can't they clear the infection? *Respir Res* 2003;4:8.
38. Malhotra S, Hayes D, Jr., Wozniak DJ. Cystic Fibrosis and *Pseudomonas aeruginosa*: the Host-Microbe Interface. *Clin Microbiol Rev* 2019;32.
39. Gustafsson JK, Ermund A, Ambort D, et al. Bicarbonate and functional CFTR channel are required for proper mucin secretion and link cystic fibrosis with its mucus phenotype. *J Exp Med* 2012;209:1263-72.
40. Shah VS, Meyerholz DK, Tang XX, et al. Airway acidification initiates host defense abnormalities in cystic fibrosis mice. *Science* 2016;351:503-7.
41. Pezzulo AA, Tang XX, Hoegger MJ, et al. Reduced airway surface pH impairs bacterial killing in the porcine cystic fibrosis lung. *Nature* 2012;487:109-13.
42. Abou Alaiwa MH, Reznikov LR, Gansemer ND, et al. pH modulates the activity and synergism of the airway surface liquid antimicrobials  $\beta$ -defensin-3 and LL-37. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014;111:18703-8.
43. Bergeron C, Cantin AM. Cystic Fibrosis: Pathophysiology of Lung Disease. *Semin Respir Crit Care Med* 2019;40:715-26.
44. Stoltz DA, Meyerholz DK, Pezzulo AA, et al. Cystic fibrosis pigs develop lung disease and exhibit defective bacterial eradication at birth. *Sci Transl Med* 2010;2:29ra31.
45. Sun X, Olivier AK, Liang B, et al. Lung phenotype of juvenile and adult cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-knockout ferrets. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2014;50:502-12.
46. Hartl D, Gaggar A, Bruscia E, et al. Innate immunity in cystic fibrosis lung disease. *J Cyst Fibros* 2012;11:363-82.
47. Mantovani A, Cassatella MA, Costantini C, Jaillon S. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 2011;11:519-31.

48. Gibson RL, Burns JL, Ramsey BW. Pathophysiology and management of pulmonary infections in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;168:918-51.
49. Stutts MJ, Knowles MR, Gatzky JT, Boucher RC. Oxygen consumption and ouabain binding sites in cystic fibrosis nasal epithelium. *Pediatr Res* 1986;20:1316-20.
50. Peckham D, Holland E, Range S, Knox AJ. Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase in lower airway epithelium from cystic fibrosis and non-cystic-fibrosis lung. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;232:464-8.
51. Govan JR, Deretic V. Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiol Rev* 1996;60:539-74.
52. Hutchison ML, Govan JR. Pathogenicity of microbes associated with cystic fibrosis. *Microbes Infect* 1999;1:1005-14.
53. Kahl B, Herrmann M, Everding AS, et al. Persistent infection with small colony variant strains of *Staphylococcus aureus* in patients with cystic fibrosis. *J Infect Dis* 1998;177:1023-9.
54. Schibler A, Bolt I, Gallati S, Schoni MH, Kraemer R. High morbidity and mortality in cystic fibrosis patients compound heterozygous for 3905insT and deltaF508. *Eur Respir J* 2001;17:1181-6.
55. Tonelli AR. Pulmonary hypertension survival effects and treatment options in cystic fibrosis. *Curr Opin Pulm Med* 2013;19:652-61.
56. Billinger ME, Olivier KN, Viboud C, et al. Nontuberculous mycobacteria-associated lung disease in hospitalized persons, United States, 1998-2005. *Emerg Infect Dis* 2009;15:1562-9.
57. Jones AM. Which pathogens should we worry about? *Paediatr Respir Rev* 2019;31:15-7.
58. Hogardt M, Heesemann J. Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* during persistence in the cystic fibrosis lung. *Int J Med Microbiol* 2010;300:557-62.
59. Davidson AG, Chilvers MA, Lillquist YP. Effects of a *Pseudomonas aeruginosa* eradication policy in a cystic fibrosis clinic. *Curr Opin Pulm Med* 2012;18:615-21.
60. Schwarz C, Duesbergo U, Bendo J, et al. S3-Leitlinie: Lungenerkrankung bei Mukoviszidose, Modul 2: Diagnostik und Therapie bei der chronischen Infektion mit *Pseudomonas aeruginosa*. AWMF Leitlinie 2017.
61. Boucher JC, Yu H, Mudd MH, Deretic V. Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: characterization of muc mutations in clinical isolates and analysis of clearance in a mouse model of respiratory infection. *Infect Immun* 1997;65:3838-46.

62. Martin DW, Schurr MJ, Mudd MH, Govan JR, Holloway BW, Deretic V. Mechanism of conversion to mucoidy in *Pseudomonas aeruginosa* infecting cystic fibrosis patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:8377-81.
63. Singh PK, Schaefer AL, Parsek MR, Moninger TO, Welsh MJ, Greenberg EP. Quorum-sensing signals indicate that cystic fibrosis lungs are infected with bacterial biofilms. *Nature* 2000;407:762-4.
64. Haussler S, Tummeler B, Weissbrodt H, Rohde M, Steinmetz I. Small-colony variants of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. *Clin Infect Dis* 1999;29:621-5.
65. Haussler S, Ziegler I, Lottel A, et al. Highly adherent small-colony variants of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. *J Med Microbiol* 2003;52:295-301.
66. Lister PD, Wolter DJ, Hanson ND. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clin Microbiol Rev* 2009;22:582-610.
67. Vidal DR, Garrone P, Banchereau J. Immunosuppressive effects of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A on human B-lymphocytes. *Toxicon* 1993;31:27-34.
68. Woods DE, Iglewski BH. Toxins of *Pseudomonas aeruginosa*: new perspectives. *Rev Infect Dis* 1983;5 Suppl 4:S715-22.
69. Parad RB, Gerard CJ, Zurakowski D, Nichols DP, Pier GB. Pulmonary outcome in cystic fibrosis is influenced primarily by mucoid *Pseudomonas aeruginosa* infection and immune status and only modestly by genotype. *Infect Immun* 1999;67:4744-50.
70. Coffey MJ, Whitaker V, Gentin N, et al. Differences in Outcomes between Early and Late Diagnosis of Cystic Fibrosis in the Newborn Screening Era. *J Pediatr* 2017;181:137-45.e1.
71. Döring G, Hoiby N. Early intervention and prevention of lung disease in cystic fibrosis: a European consensus. *J Cyst Fibros* 2004;3:67-91.
72. Frederiksen B, Lannig S, Koch C, Hoiby N. Improved survival in the Danish center-treated cystic fibrosis patients: results of aggressive treatment. *Pediatr Pulmonol* 1996;21:153-8.
73. Ramsey BW, Pepe MS, Quan JM, et al. Intermittent administration of inhaled tobramycin in patients with cystic fibrosis. Cystic Fibrosis Inhaled Tobramycin Study Group. *N Engl J Med* 1999;340:23-30.
74. Regelman WE, Elliott GR, Warwick WJ, Clawson CC. Reduction of sputum *Pseudomonas aeruginosa* density by antibiotics improves lung function in cystic fibrosis more than do bronchodilators and chest physiotherapy alone. *Am Rev Respir Dis* 1990;141:914-21.
75. Heaf DP, Webb GJ, Matthew DJ. In vitro assessment of combined antibiotic and mucolytic treatment for *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis. *Arch Dis Child* 1983;58:824-6.



76. Kuni CC, Regelmann WE, duCret RP, Boudreau RJ, Budd JR. Aerosol scintigraphy in the assessment of therapy for cystic fibrosis. *Clin Nucl Med* 1992;17:90-3.
77. Shak S, Capon DJ, Hellmiss R, Marsters SA, Baker CL. Recombinant human DNase I reduces the viscosity of cystic fibrosis sputum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87:9188-92.
78. Wanner A, Rao A. Clinical indications for and effects of bland, mucolytic, and antimicrobial aerosols. *Am Rev Respir Dis* 1980;122:79-87.
79. Konstan MW, Butler SM, Wohl ME, et al. Growth and nutritional indexes in early life predict pulmonary function in cystic fibrosis. *J Pediatr* 2003;142:624-30.
80. Pedreira CC, Robert RG, Dalton V, et al. Association of body composition and lung function in children with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 2005;39:276-80.
81. Zemel BS, Jawad AF, FitzSimmons S, Stallings VA. Longitudinal relationship among growth, nutritional status, and pulmonary function in children with cystic fibrosis: analysis of the Cystic Fibrosis Foundation National CF Patient Registry. *J Pediatr* 2000;137:374-80.
82. Hebestreit H, Kieser S, Junge S, et al. Long-term effects of a partially supervised conditioning programme in cystic fibrosis. *Eur Respir J* 2010;35:578-83.
83. Kriemler S, Kieser S, Junge S, et al. Effect of supervised training on FEV1 in cystic fibrosis: a randomised controlled trial. *J Cyst Fibros* 2013;12:714-20.
84. Shteinberg M, Taylor-Cousar JL. Impact of CFTR modulator use on outcomes in people with severe cystic fibrosis lung disease. *Eur Respir Rev* 2020;29.
85. Frederiksen B, Koch C, Hoiby N. Antibiotic treatment of initial colonization with *Pseudomonas aeruginosa* postpones chronic infection and prevents deterioration of pulmonary function in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 1997;23:330-5.
86. Frederiksen B, Koch C, Hoiby N. Changing epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* infection in Danish cystic fibrosis patients (1974-1995). *Pediatr Pulmonol* 1999;28:159-66.
87. Lyczak JB, Cannon CL, Pier GB. Lung infections associated with cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev* 2002;15:194-222.
88. Pai VB, Plogsted S. Efficacy and safety of using L-cysteine as a catheter-clearing agent for nonthrombotic occlusions of central venous catheters in children. *Nutr Clin Pract* 2014;29:636-8.
89. Wiesemann HG, Steinkamp G, Ratjen F, et al. Placebo-controlled, double-blind, randomized study of aerosolized tobramycin for early treatment of *Pseudomonas aeruginosa* colonization in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 1998;25:88-92.

90. Littlewood JM, Miller MG, Ghoneim AT, Ramsden CH. Nebulised colomycin for early pseudomonas colonisation in cystic fibrosis. *Lancet* 1985;1:865.
91. Valerius NH, Koch C, Hoiby N. Prevention of chronic Pseudomonas aeruginosa colonisation in cystic fibrosis by early treatment. *Lancet* 1991;338:725-6.
92. Hansen CR, Pressler T, Høiby N. Early aggressive eradication therapy for intermittent Pseudomonas aeruginosa airway colonization in cystic fibrosis patients: 15 years experience. *J Cyst Fibros* 2008;7:523-30.
93. Elphick HE, Jahnke N. Single versus combination intravenous antibiotic therapy for people with cystic fibrosis. *Cochrane Database Syst Rev* 2014:Cd002007.
94. Elborn JS, Prescott RJ, Stack BH, et al. Elective versus symptomatic antibiotic treatment in cystic fibrosis patients with chronic Pseudomonas infection of the lungs. *Thorax* 2000;55:355-8.
95. Blumer JL, Stern RC, Klinger JD, et al. Ceftazidime therapy in patients with cystic fibrosis and multiply-drug-resistant pseudomonas. *Am J Med* 1985;79:37-46.
96. Reed MD, Stern RC, O'Brien CA, Crenshaw DA, Blumer JL. Randomized double-blind evaluation of ceftazidime dose ranging in hospitalized patients with cystic fibrosis. *Antimicrob Agents Chemother* 1987;31:698-702.
97. Lietman PS. Pharmacokinetics of antimicrobial drugs in cystic fibrosis. Beta-lactam antibiotics. *Chest* 1988;94:115s-20s.
98. Döring G, Conway SP, Heijerman HG, et al. Antibiotic therapy against Pseudomonas aeruginosa in cystic fibrosis: a European consensus. *Eur Respir J* 2000;16:749-67.
99. Dinwiddie R. Anti-inflammatory therapy in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* 2005;4 Suppl 2:45-8.
100. Saiman L, Marshall BC, Mayer-Hamblett N, et al. Azithromycin in patients with cystic fibrosis chronically infected with Pseudomonas aeruginosa: a randomized controlled trial. *Jama* 2003;290:1749-56.
101. Southern KW, Barker PM, Solis-Moya A, Patel L. Macrolide antibiotics for cystic fibrosis. *Cochrane Database Syst Rev* 2012;11:Cd002203.
102. Wolter J, Seeney S, Bell S, Bowler S, Masel P, McCormack J. Effect of long term treatment with azithromycin on disease parameters in cystic fibrosis: a randomised trial. *Thorax* 2002;57:212-6.
103. Renna M, Schaffner C, Brown K, et al. Azithromycin blocks autophagy and may predispose cystic fibrosis patients to mycobacterial infection. *J Clin Invest* 2011;121:3554-63.
104. Gibson RL, Emerson J, McNamara S, et al. Significant microbiological effect of inhaled tobramycin in young children with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;167:841-9.

105. Li J, Nation RL, Milne RW, Turnidge JD, Coulthard K. Evaluation of colistin as an agent against multi-resistant Gram-negative bacteria. *Int J Antimicrob Agents* 2005;25:11-25.
106. Suzuki T, Hayashi K, Fujikawa K, Tsukamoto K. The chemical structure of Polymyxin E: The identities of Polymyxin E1 with Colistin A And of Polymyxin E2 with Colistin B. *J Biochem* 1965;57:226-7.
107. Evans ME, Feola DJ, Rapp RP. Polymyxin B sulfate and colistin: old antibiotics for emerging multiresistant gram-negative bacteria. *Ann Pharmacother* 1999;33:960-7.
108. Hancock RE, Chapple DS. Peptide antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:1317-23.
109. Li J, Turnidge J, Milne R, Nation RL, Coulthard K. In vitro pharmacodynamic properties of colistin and colistin methanesulfonate against *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:781-5.
110. Carroll G, Malette WF. The use of colymycin in chronic urinary infections due to *Pseudomonas aeruginosa*. *J Urol* 1961;85:86-8.
111. Levin AS, Barone AA, Penco J, et al. Intravenous colistin as therapy for nosocomial infections caused by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. *Clin Infect Dis* 1999;28:1008-11.
112. Yow EM, Tan E, Shane L, Schonfeld S, Abu-Nassar H. Colistin (colymycin) in resistant bacterial infections. A clinical appraisal. *Arch Intern Med* 1961;108:664-70.
113. Jensen T, Pedersen SS, Garne S, Heilmann C, Hoiby N, Koch C. Colistin inhalation therapy in cystic fibrosis patients with chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection. *J Antimicrob Chemother* 1987;19:831-8.
114. Gunderson BW, Ibrahim KH, Hovde LB, Fromm TL, Reed MD, Rotschafer JC. Synergistic activity of colistin and ceftazidime against multiantibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in an in vitro pharmacodynamic model. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:905-9.
115. Quon BS, Goss CH, Ramsey BW. Inhaled antibiotics for lower airway infections. *Ann Am Thorac Soc* 2014;11:425-34.
116. Geller DE, Konstan MW, Smith J, Noonberg SB, Conrad C. Novel tobramycin inhalation powder in cystic fibrosis subjects: pharmacokinetics and safety. *Pediatr Pulmonol* 2007;42:307-13.
117. Ramsey BW, Dorkin HL, Eisenberg JD, et al. Efficacy of aerosolized tobramycin in patients with cystic fibrosis. *N Engl J Med* 1993;328:1740-6.
118. Herrmann G, Yang L, Wu H, et al. Colistin-tobramycin combinations are superior to monotherapy concerning the killing of biofilm *Pseudomonas aeruginosa*. *J Infect Dis* 2010;202:1585-92.

119. Gebrauchsanweisung-Gebrauchsfertige Plattenmedien BD Endo Agar. Becton Dickinson GmbH 2013. (Accessed 31.03., 2021, at [https://www.bd.com/resource.aspx?IDX=8615.](https://www.bd.com/resource.aspx?IDX=8615))
120. Kayser FH, Böttger EC, Haller O, Roers A, Deplazes P. Medizinische Mikrobiologie. Stuttgart: Thieme Verlag; 2014.
121. KOMPENDIUM Labormedizin und Mikrobiologie Medizinische Laboratorien 2013. (Accessed 31.03., 2020, at [https://www.labor-duesseldorf.de/assets/Kompendum/2354968de7/Gesamtkompendum.pdf.](https://www.labor-duesseldorf.de/assets/Kompendum/2354968de7/Gesamtkompendum.pdf))
122. Döring G, Flume P, Heijerman H, Elborn JS. Treatment of lung infection in patients with cystic fibrosis: current and future strategies. *J Cyst Fibros* 2012;11:461-79.
123. Ratjen F, Doring G, Nikolaizik WH. Effect of inhaled tobramycin on early *Pseudomonas aeruginosa* colonisation in patients with cystic fibrosis. *Lancet* 2001;358:983-4.
124. Werner E, Roe F, Bugnicourt A, et al. Stratified growth in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Appl Environ Microbiol* 2004;70:6188-96.
125. Walters MC, 3rd, Roe F, Bugnicourt A, Franklin MJ, Stewart PS. Contributions of antibiotic penetration, oxygen limitation, and low metabolic activity to tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to ciprofloxacin and tobramycin. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:317-23.
126. Peterson AA, Hancock RE, McGroarty EJ. Binding of polycationic antibiotics and polyamines to lipopolysaccharides of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 1985;164:1256-61.
127. Escartin P, Rodriguez-Montes JA, Cuervas-Mons V, et al. Effect of colistin on reduction of biliary flow induced by endotoxin in *E. coli*. *Dig Dis Sci* 1982;27:875-9.
128. Gardiner KR, Erwin PJ, Anderson NH, McCaigue MD, Halliday MI, Rowlands BJ. Lactulose as an antiendotoxin in experimental colitis. *Br J Surg* 1995;82:469-72.
129. Warren HS, Kania SA, Siber GR. Binding and neutralization of bacterial lipopolysaccharide by colistin nonapeptide. *Antimicrob Agents Chemother* 1985;28:107-12.
130. Pamp SJ, Gjermansen M, Johansen HK, Tolker-Nielsen T. Tolerance to the antimicrobial peptide colistin in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms is linked to metabolically active cells, and depends on the *pmr* and *mexAB-oprM* genes. *Mol Microbiol* 2008;68:223-40.
131. Riethmüller J, Herrmann G, Graepler-Mainka U, et al. Sequential Inhalational Tobramycin-Colistin-Combination in CF-Patients with Chronic *P. Aeruginosa* Colonization - an Observational Study. *Cell Physiol Biochem* 2016;39:1141-51.
132. Elborn JS, Vataire AL, Fukushima A, et al. Comparison of Inhaled Antibiotics for the Treatment of Chronic *Pseudomonas aeruginosa* Lung

Infection in Patients With Cystic Fibrosis: Systematic Literature Review and Network Meta-analysis. *Clin Ther* 2016;38:2204-26.

133. Fiel SB. Aerosolized antibiotics in cystic fibrosis: an update. *Expert Rev Respir Med* 2014;8:305-14.

134. Dasenbrook EC, Konstan MW, VanDevanter DR. Association between the introduction of a new cystic fibrosis inhaled antibiotic class and change in prevalence of patients receiving multiple inhaled antibiotic classes. *J Cyst Fibros* 2015;14:370-5.

135. Hogardt M, Heesemann J. Microevolution of *Pseudomonas aeruginosa* to a chronic pathogen of the cystic fibrosis lung. *Curr Top Microbiol Immunol* 2013;358:91-118.

136. Hoiby N, Ciofu O, Bjarnsholt T. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in cystic fibrosis. *Future Microbiol* 2010;5:1663-74.

137. Oliver A, Baquero F, Blazquez J. The mismatch repair system (*mutS*, *mutL* and *uvrD* genes) in *Pseudomonas aeruginosa*: molecular characterization of naturally occurring mutants. *Mol Microbiol* 2002;43:1641-50.

138. Oliver A, Canton R, Campo P, Baquero F, Blazquez J. High frequency of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. *Science* 2000;288:1251-4.

139. Pennington JE. Penetration of antibiotics into respiratory secretions. *Rev Infect Dis* 1981;3:67-73.

140. Bergogne-Berezin E. Pharmacokinetics of antibiotics in cystic fibrosis patients with particular reference to the bronchopulmonary tree (review). *Infection* 1987;15:288-94.

141. Prandota J. Clinical pharmacology of antibiotics and other drugs in cystic fibrosis. *Drugs* 1988;35:542-78.

142. Mendelman PM, Smith AL, Levy J, Weber A, Ramsey B, Davis RL. Aminoglycoside penetration, inactivation, and efficacy in cystic fibrosis sputum. *Am Rev Respir Dis* 1985;132:761-5.

143. Le Conte P, Potel G, Peltier P, et al. Lung distribution and pharmacokinetics of aerosolized tobramycin. *Am Rev Respir Dis* 1993;147:1279-82.

144. Smith AL, Ramsey BW, Hedges DL, et al. Safety of aerosol tobramycin administration for 3 months to patients with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 1989;7:265-71.

145. Laube BL, Links JM, LaFrance ND, Wagner HN, Jr., Rosenstein BJ. Homogeneity of bronchopulmonary distribution of <sup>99m</sup>Tc aerosol in normal subjects and in cystic fibrosis patients. *Chest* 1989;95:822-30.

146. Konstan MW, Geller DE, Minić P, Brockhaus F, Zhang J, Angyalosi G. Tobramycin inhalation powder for *P. aeruginosa* infection in cystic fibrosis: the EVOLVE trial. *Pediatr Pulmonol* 2011;46:230-8.

147. Máiz L, Girón RM, Oliveira C, et al. Inhaled antibiotics for the treatment of chronic bronchopulmonary *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis: systematic review of randomised controlled trials. *Expert Opin Pharmacother* 2013;14:1135-49.
148. Ryan G, Jahnke N, Remington T. Inhaled antibiotics for pulmonary exacerbations in cystic fibrosis. *Cochrane Database Syst Rev* 2012;12:Cd008319.
149. Newman SP, Clarke SW. Therapeutic aerosols 1--physical and practical considerations. *Thorax* 1983;38:881-6.
150. Touw DJ, Brimicombe RW, Hodson ME, Heijerman HG, Bakker W. Inhalation of antibiotics in cystic fibrosis. *Eur Respir J* 1995;8:1594-604.
151. Heijerman H, Westerman E, Conway S, Touw D, Döring G. Inhaled medication and inhalation devices for lung disease in patients with cystic fibrosis: A European consensus. *J Cyst Fibros* 2009;8:295-315.
152. Conole D, Keating GM. Colistimethate sodium dry powder for inhalation: a review of its use in the treatment of chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection in patients with cystic fibrosis. *Drugs* 2014;74:377-87.
153. Pierart F. [TOBI Podhaler for treating chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis patients]. *Rev Med Liege* 2013;68:486-8.
154. Schuster A, Haliburn C, Doring G, Goldman MH. Safety, efficacy and convenience of colistimethate sodium dry powder for inhalation (Colobreathe DPI) in patients with cystic fibrosis: a randomised study. *Thorax* 2013;68:344-50.
155. Hodson ME, Gallagher CG, Govan JR. A randomised clinical trial of nebulised tobramycin or colistin in cystic fibrosis. *Eur Respir J* 2002;20:658-64.
156. Steinkamp G, Tümmler B, Gappa M, et al. Long-term tobramycin aerosol therapy in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 1989;6:91-8.
157. Heijerman HGM, McKone EF, Downey DG, et al. Efficacy and safety of the elexacaftor plus tezacaftor plus ivacaftor combination regimen in people with cystic fibrosis homozygous for the F508del mutation: a double-blind, randomised, phase 3 trial. *Lancet* 2019;394:1940-8.
158. Middleton PG, Mall MA, Dřevínek P, et al. Elexacaftor-Tezacaftor-Ivacaftor for Cystic Fibrosis with a Single Phe508del Allele. *N Engl J Med* 2019;381:1809-19.
159. Griese M, Costa S, Linnemann RW, et al. Safety and Efficacy of Elexacaftor/Tezacaftor/Ivacaftor for 24 Weeks or Longer in People with Cystic Fibrosis and One or More F508del Alleles: Interim Results of an Open-Label Phase 3 Clinical Trial. *Am J Respir Crit Care Med* 2021;203:381-5.
160. Volkova N, Moy K, Evans J, et al. Disease progression in patients with cystic fibrosis treated with ivacaftor: Data from national US and UK registries. *J Cyst Fibros* 2020;19:68-79.

161. Nelson MT, Wolter DJ, Eng A, et al. Maintenance tobramycin primarily affects untargeted bacteria in the CF sputum microbiome. *Thorax* 2020;75:780-90.

## 7 Anhang

### 7.1. **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: <i>CFTR</i> -Mutationsklassen <sup>24</sup> .....	3
Abbildung 2: Modell der Pathogenese der Lungenerkrankung bei Mukoviszidose, die sich begünstigend auf die Kolonisation mit <i>Pseudomonas aeruginosa</i> auswirkt. ....	9
Abbildung 3: Darstellung der mikrobiologischen Besiedlung von CF-Patienten/innen nach Alterskohorte aufgezeigt. Übernommen aus <sup>19</sup> . ....	11
Abbildung 4: Darstellung der Prävalenz der Mikroorganismen bei CF-Patienten/innen im zeitlichen Verlauf. Übernommen aus <sup>19</sup> . ....	11
Abbildung 5: Studienablauf .....	24
Abbildung 6: ITT-Analyse: Differenz <i>Pseudomonas aeruginosa</i> [KBE/ml] V3-V2 .....	36
Abbildung 7: ITT-Analyse MW <i>Pseudomonas aeruginosa</i> [KBE log/ml].....	37
Abbildung 8: MW der FEV1 [% des Solls] während der gesamten Behandlungszeit, PP-Gruppe. ....	38
Abbildung 9: Lungenfunktion MEF25-75 [% des Solls].....	39
Abbildung 10: Lungenfunktion Zeitpunkt 1.V2 und 2.V6 mit Auflistung der einzelnen Studienteilnehmer/innen in den Gruppen Colistin und Colistin-Tobramycin.....	39

### 7.2. **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: In der EU zugelassene <i>CFTR</i> -Modulatoren nach Alter und <i>CFTR</i> -Genotyp <sup>24</sup> .....	6
Tabelle 2: Zur Studie verwendetes Material und Instrumente .....	21
Tabelle 3: Übersicht erhobene Studienparameter .....	24
Tabelle 4: MW der Lungenfunktion zum Zeitpunkt des Screenings V1 .....	33
Tabelle 5: Darstellung der Labordaten und der Patientenprofile .....	34



Tabelle 6: Differenz <i>Pseudomonas aeruginosa</i> KBE/ml im Sputum V2 zu V3, d28 - ITT und PP Analyse im Vergleich.....	35
Tabelle 7: Anzahl der Patienten/innen pro Visite zur <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Messung.....	37
Tabelle 8: Anzahl der Teilnehmer/innen in den Visiten zur Lungenfunktionsmessung .....	39
Tabelle 9: Veränderung der Lungenfunktion nach 28d und 112d Therapie.....	40
Tabelle 10: UAW in den beiden Studiengruppen im Vergleich .....	42
Tabelle 11: Inzidenz der UAW .....	43
Tabelle 12: Veränderung der Entzündungsparameter nach 28d .....	44

### **7.3. Erklärung zum Eigenanteil**

Die Konzeption der Studie erfolgte durch Prof. Dr. Joachim Riethmüller. Er hat die Arbeit betreut und die Patientendaten zur Verfügung gestellt. Die Korrektur des Manuskripts erfolgte durch Dr. Andreas Hector.

Die mikrobiologische Auswertung wurde nach Einarbeitung durch Dr. Caroline Deppisch von mir eigenständig durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte nach Beratung durch Dr. C. Engel von Prof. Joachim Riethmüller.

Ich versichere, das Manuskript selbstständig nach Anleitung durch Prof. Dr. Joachim Riethmüller und Dr. Andreas Hector verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Würzburg, den 31.03.2022

#### **7.4. Danksagung**

Der Ideengeber der Studie, welcher stets mit ganzem Herzen und ansteckendem Ehrgeiz für seine Forschungsarbeit im Center for Pediatric Clinical Studies arbeitete, war Prof. Dr. Joachim Riethmüller. Ihm verdanke ich den Einstieg in die Forschungstätigkeit und Betreuung während meiner Studientätigkeit.

Nach seinem viel zu frühen Tod hat sich Dr. Andreas Hector, trotz einiger Hürden, bereit erklärt die weitere Betreuung zu übernehmen. Dafür bedanke ich mich herzlichst.

Für eine vorbildliche Einarbeitung in die Labortätigkeiten bedanke ich mich bei Dr. Caroline Deppisch. Vielen Dank an Dr. Constantin Adams für die vielen guten Ratschläge und Ideen während der gemeinsamen Laborarbeit.

Es bedarf viel Unterstützung und Motivation bis zur Fertigstellung einer Dissertation. Bedanken möchte ich mich deshalb von ganzem Herzen bei meiner Familie und meinen Freunden, die mich stets mit einem offenen Ohr, tatkräftigen, motivierenden Worten und helfenden Händen unterstützt haben.

Ohne das Vertrauen und die Teilnahme der Patienten/innen wäre die Studie nicht zustande gekommen. Vielen Dank dem Team der Mukoviszidose Ambulanz und allen teilnehmenden Patienten/innen mit Familie.