

Aus der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Wirksamkeit und Verträglichkeit des *Raft*-Interventionstherapeutikums  
Miltefosin bei der Behandlung der  
kutanen Mastozytose

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von  
Nicole Schoepke  
aus Berlin

Gutachter/in: 1. Prof. Dr. med. M. Maurer  
2. Priv.-Doz. Dr. med. K. Brockow  
3. Priv.-Doz. Dr. med. K. Hartmann

Datum der Promotion: 03.09.2010

**meinen Eltern gewidmet**

# Inhaltsverzeichnis

<b>I Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>VII</b>
<b>II Abbildungs- und Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>IX</b>
Abbildungsverzeichnis .....	IX
Tabellenverzeichnis .....	XII
<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Mastozytose .....</b>	<b>1</b>
1.1.1 Geschichte .....	1
1.1.2 Epidemiologie .....	1
1.1.3 Klassifikation und klinisches Bild .....	2
1.1.3.1 Kutane Mastozytose .....	4
1.1.3.1.1 Makulopapulöse kutane Mastozytose .....	4
1.1.3.1.2 Diffuse kutane Mastozytose .....	5
1.1.3.1.3 Kutanes Mastozytom .....	6
1.1.3.2 Systemische Mastozytose .....	7
1.1.4 Ätiologie .....	8
1.1.5 Die Mastzelle – ihre Aktivierung, Signaltransduktion und Degranulation .....	9
1.1.6 Diagnostik .....	17
1.1.7 Therapie und Prognose der Mastozytose .....	19
<b>1.2 Studienmedikamente .....</b>	<b>22</b>
1.2.1 Dermoxinale® und dessen Wirkstoff Clobetasol-17-propionat .....	22
1.2.2 Miltex® und dessen Wirkstoff Miltefosin .....	24
1.2.3 Hametum® Extrakt und dessen Wirkstoff Hamamelis .....	28
<b>1.3 Herleitung der Fragestellung .....</b>	<b>28</b>
<b>1.4 Fragestellung .....</b>	<b>30</b>
<b>2. Material und Methoden .....</b>	<b>32</b>
<b>2.1 Studiendesign .....</b>	<b>32</b>
<b>2.2 Studienpatienten .....</b>	<b>32</b>
2.2.1 Einschlusskriterien .....	33
2.2.2 Ausschlusskriterien .....	33
2.2.3 Abbruchkriterien .....	34
<b>2.3 Studienmedikation .....</b>	<b>34</b>
2.3.1 Applikation .....	34

2.3.2	Medikamente .....	35
2.3.3	Verblindung .....	35
<b>2.4</b>	<b>Geräte und Messverfahren .....</b>	<b>36</b>
2.4.1	Darier Testgerät 1.0 .....	36
2.4.2	Ultraschall.....	37
2.4.3	Volumetrie .....	40
2.4.3.1	Berechnungen der Volumina .....	43
2.4.3.1.1	Berechnung der Volumina mittels Matchingverfahren .....	43
2.4.3.1.2	Berechnung mittels individueller Bereichsmarkierung.....	46
2.4.4	Thermografie .....	47
2.4.5	Ophthalmologische Untersuchung .....	48
<b>2.5</b>	<b>Studienablauf .....</b>	<b>49</b>
2.5.1	<i>Screening visit</i> .....	49
2.5.2	<i>Entry visit</i> .....	50
2.5.3	Telefonische Kontaktierung.....	51
2.5.4	<i>End of study visit</i> .....	51
<b>2.6</b>	<b>Statistik.....</b>	<b>52</b>
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>54</b>
<b>3.1</b>	<b>Randomisierte Studienpatienten.....</b>	<b>54</b>
<b>3.2</b>	<b>Abweichungen vom Studienprotokoll .....</b>	<b>54</b>
<b>3.3</b>	<b>Das klinische Bild der Mastozytose .....</b>	<b>55</b>
<b>3.4</b>	<b>Begleitmedikation und -erkrankungen .....</b>	<b>57</b>
<b>3.5</b>	<b>Überprüfung der Wirksamkeit .....</b>	<b>57</b>
3.5.1	Subjektive Analogskalen .....	57
3.5.1.1	<i>Composite Score</i> .....	57
3.5.1.1.1	Urtikarielle Veränderung ( <i>Wheal Subscore</i> ) .....	58
3.5.1.1.2	Erythematöse Veränderung ( <i>Erythema Subscore</i> ) .....	59
3.5.1.1.3	Veränderung des Juckreizes ( <i>Itching Subscore</i> ) .....	59
3.5.1.2	<i>Global efficacy assessment – Investigator and Patient</i> .....	60
3.5.2	Objektive Beurteilung.....	61
3.5.2.1	Biopsien .....	61
3.5.2.2	Volumetrie .....	63
3.5.2.3	Thermografie.....	67

---

<b>3.6 Überprüfung der Sicherheit .....</b>	<b>67</b>
3.6.1 Sonographie – Detektion möglicher Veränderungen der Hautdicke.....	67
3.6.2 Nebenwirkungen.....	69
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>73</b>
<b>5. Zusammenfassung .....</b>	<b>87</b>
<b>6. Summary.....</b>	<b>90</b>
<b>7. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>93</b>
<b>8. Anhang.....</b>	<b>103</b>
Danksagung.....	103
Lebenslauf .....	104
Publikationsliste .....	105
Eidesstattliche Erklärung .....	106

## I Abkürzungsverzeichnis

ALP	= Alkyllysophospholipid
ALT	= Alaninaminotransferase
APC	= Alkylphosphocholin
ASM	= aggressive systemische Mastozytose
AST	= Aspartataminotransferase
AUC	= <i>Area under the curve</i>
Btk	= <i>Bruton's tyrosin kinase</i>
CM	= Kutane Mastozytose
CTP	= <i>phosphocholine cytidyltransferase</i>
cPLA <sub>2</sub>	= zytosolische Phospholipase A <sub>2</sub>
DAG	= Diacylglycerin
DOG	= Deutsche Ophthalmologische Gesellschaft e.V.
DCM	= diffuse kutane Mastozytose
eCRF	= <i>electronic Case Report Form</i>
ERK	= <i>extracellular signal-related kinase</i>
GM-CSF	= Granulozyten-Makrophagen koloniestimulierender Faktor
GPI	= Glycosylphosphatidylinositol
GR	= Glukokortikoidrezeptor
GRE	= <i>glucocorticoid response elements</i>
HePC	= Hexadecylphosphocholin
ITAM	= <i>immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i>
ITT	= <i>Intention-to-treat-Population</i>
IP3	= Inositol-1,4,5-trisphosphat
ISM	= indolente systemische Mastozytose
JNK	= c-Jun-N-terminale Kinase
KG	= Körpergewicht
MAPK	= <i>mitogen-activated protein kinase</i>
MC	= Mastzelle
MGF	= <i>mastcell growth factor</i>
MICUMA	= <i>Miltefosine in Cutaneous Mastocytosis</i>
MIMACT	= <i>Miltefosine effects on human skin mast cell activation</i>

---

MPCM	= makulopapulöse kutane Mastozytose
NFκB	= <i>'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
nGRE	= <i>negative glucocorticoid response elements</i>
PC	= Phosphatidylcholin
PGD <sub>2</sub>	= Prostaglandin D <sub>2</sub>
PI3K	= Phosphatidylinositol 3-Kinase
PI-PLC	= Phosphoinositide-spezifische Phospholipase C
PIP <sub>2</sub>	= Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphat
PIP <sub>3</sub>	= Phosphatidylinositol-(3,4,5)-triphosphat
PKB	= Proteinkinase B
PKC	= Proteinkinase C
PLC	= Phospholipase C
PLC γ	= Phospholipase Cγ
POPC	= Palmitylethylphosphatidylcholin
PRIMOS	= <i>Phaseshift Rapid in vivo Measurement of Skin</i>
PTK	= Proteintyrosinkinase
PUVA	= Psoralen-UVA-Phototherapie
SCF	= Stammzellfaktor
SCORAD	= <i>scoring index of atopic dermatitis</i>
SCORMA	= <i>scoring index of mastocytosis</i>
SM	= systemische Mastozytose
SM-AHNMD	= <i>systemic mastocytosis with an associated clonal hematologic non- mast cell lineage disease</i>
SPT	= Skin Prick Tests
TEAEs	= <i>treatment-emergent adverse events</i>
TEMP	= <i>Teleangiectasia macularis eruptiva perstans</i>
TRPV	= <i>transient receptor potential vanilloid</i>
UP	= Urticaria pigmentosa

## II Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

### Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Klinisches Bild der MPCM beim Erwachsenen (links) und beim Kind (rechts) <sup>25</sup>	<b>5</b>
<b>Abbildung 2:</b> Klinisches Bild der DCM <sup>4</sup>	<b>6</b>
<b>Abbildung 3:</b> Klinisches Bild des solitären Mastozytoms <sup>25</sup>	<b>6</b>
<b>Abbildung 4:</b> Graphische Darstellung der Differenzierung von myeloiden Zellen aus CD34 <sup>+</sup> Vorläuferzellen <sup>31</sup>	<b>9</b>
<b>Abbildung 5:</b> (A) Innerhalb ruhender Zellen sind die IgE-Rezeptoren von den Lyn-haltigen <i>Rafts</i> ausgeschlossen. (B) Interaktion von multivalenten Antigenen mit an FcεRI gebundenem IgE bedingt die Translokation des IgE-Rezeptors in die Src-Kinase-haltigen <i>Rafts</i> . [nach <sup>50</sup> ],.....	<b>11</b>
<b>Abbildung 6:</b> Signaltransduktionswege im Inneren der Zelle nach der Stimulierung. Dargestellt sind die Signaltransduktionswege infolge der Interaktion von multivalenten Antigenen mit an FcεRI gebundenem IgE. [nach <sup>37, 52, 55, 56</sup> ]	<b>13</b>
<b>Abbildung 7:</b> Biologische Effekte von MC-Mediatoren [nach <sup>64</sup> ]	<b>16</b>
<b>Abbildung 8:</b> Behandlungsareale eines Beispielpatienten vor (links) und nach (rechts) Provokation des Darier-Zeichens mit Entwicklung urtikarieller und erythematöser Veränderungen infolge mechanischer Reizung.....	<b>17</b>
<b>Abbildung 9:</b> Strukturformel von Clobetasol	<b>22</b>
<b>Abbildung 10:</b> Strukturformel von HePC, Miltefosin	<b>24</b>
<b>Abbildung 11:</b> Darier Testgerät 1.0 mit Detailansicht der Edelstahlstifte	<b>36</b>
<b>Abbildung 12:</b> Ultraschallgerät Dermascan C mit Transducer und Bildgebung. Detailausschnitt (rechts) vom Messfenster des Transducers mit Plastikfolienmembran.....	<b>38</b>
<b>Abbildung 13:</b> Sonogramm der Epidermis bis zur Subkutis eines gesunden Probanden.....	<b>39</b>
<b>Abbildung 14:</b> Sonogramm mit Darstellung atrophischer Hautveränderungen. ....	<b>40</b>
<b>Abbildung 15:</b> PRIMOS contact Messgerät mit Abstandshalter zur dreidimensionalen Darstellung der Hautoberfläche.....	<b>41</b>
<b>Abbildung 16:</b> Projektionsstreifen ohne Auslenkung (links). Verschneidefiguren (rechts) durch Auslenkung der Projektionsstreifen, veranschaulicht mit Hilfe einer Holzhalbkugel.....	<b>42</b>
<b>Abbildung 17:</b> Prinzip der Streifenprojektionstechnik mit dem Triangulationswinkel $\alpha$ zur Berechnung der Position des zu vermessenen Objektes. ....	<b>42</b>
<b>Abbildung 18:</b> 40 x 30 mm <sup>2</sup> großes Messfenster, innerhalb dessen die dreidimensionale Oberflächenmessung erfolgt.....	<b>43</b>

<b>Abbildung 19:</b> Schritt 1: Die Höhenbilder des <i>Entry visit</i> und <i>End of study visit</i> für jeden einzelnen Patienten wurden in die Datenbank eingefügt. ....	<b>44</b>
<b>Abbildung 20:</b> Schritt 2: Nach der Markierung aller Höhenbilder wurden diese ausgerichtet und gespeichert.....	<b>44</b>
<b>Abbildung 21:</b> Schritt 3: Die Funktion „3D-Matching für elastische Oberflächen“ (1’) wurde aufgerufen. Eines der zuvor ausgerichteten, gespeicherten Höhenbilder des Patienten wurde als Referenzdatei bestimmt und diese eingefügt (2’). Ein ausgerichtetes Höhenbild des <i>Entry visit</i> oder <i>End of study visit</i> wurde der Referenzdatei gegenüber gestellt (3’). Die Matchingfunktion wurde gestartet (4’), wodurch das Höhenbild entsprechend der Bildpunkte der Referenzdatei ausgerichtet und ein direkter Vergleich der Dateien ermöglicht wurde.....	<b>44</b>
<b>Abbildung 22:</b> Schritt 4: Nach dem Doppelklicken auf ein Höhenbild innerhalb der Datenbank der gematchten Bilder, wurde über den Menüpunkt „Filter“ die „Polynom Filter“ - Funktion aktiviert. Durch die Betätigung der Schaltflächen „Berechnen“ und „Abweichung“ wurde eine Trennung der Mikro- und Makrostruktur bewirkt.....	<b>45</b>
<b>Abbildung 23:</b> Schritt 5: Um eine genauere Abgrenzung der Quaddeln zu gewährleisten, wurde die Skalierung geändert.....	<b>45</b>
<b>Abbildung 24:</b> Schritt 6: Um die Quaddeln von Hand zu umzeichnen, wurde die Schaltfläche „Bereichsmarkierung“ betätigt und die „Freihandzeichnung“ gewählt.....	<b>45</b>
<b>Abbildung 25:</b> Schritt 7: Die zuvor geöffnete Datenbank der gematchten Bilder wurde aufgerufen. Der Menüpunkt „Komponente“ „alle Einträge markieren“ wurde gewählt. Über den Menüpunkt „Komponente“ „Parameter öffnen“ wurde die zuvor gespeicherte Markierung in alle Höhenbilder eingefügt und durch Aktivierung der Schaltfläche „Polygon zeichnen“ sichtbar gemacht. ....	<b>46</b>
<b>Abbildung 26:</b> Schritt 8: Eine Filterung aller Strukturen des Höhenbildes mit Ausnahme der markierten Bereiche wurde ermöglicht, indem die Funktion „Filter von invertierter Markierung“ und anschließend der „Polynom-Filter“ (Polynomgrad 5) aktiviert wurden. ....	<b>46</b>
<b>Abbildung 27:</b> Schritt 9: Die Berechnung erfolgte mit Hilfe der Schaltfläche „Volumen der Erhöhungen“.....	<b>46</b>
<b>Abbildung 28:</b> FLIR ThermaCAM S60 für die Temperaturmessung auf der Hautoberfläche... <b>48</b>	<b>48</b>
<b>Abbildung 29:</b> Drei 50cm <sup>2</sup> große Behandlungsareale bei einer Probandin. ....	<b>50</b>
<b>Abbildung 30:</b> Prozentuale Darstellung der Manifestationsorte der Läsionen.....	<b>56</b>
<b>Abbildung 31:</b> Veränderung des <i>Composite Scores</i> vom <i>Entry visit</i> zum <i>End of study visit</i> für Miltefosin, Clobetasol und Plazebo .....	<b>58</b>

---

<b>Abbildung 32:</b> Veränderung des <i>Wheal Subscores</i> vom <i>Entry visit</i> zum <i>End of study visit</i> für Miltefosin, Clobetasol, Plazebo .....	<b>58</b>
<b>Abbildung 33:</b> Veränderung des <i>Erythema Subscores</i> vom <i>Entry visit</i> zum <i>End of study visit</i> für Miltefosin, Clobetasol und Plazebo .....	<b>59</b>
<b>Abbildung 34:</b> Veränderung des <i>Itching Subscores</i> vom <i>Entry visit</i> zum <i>End of study visit</i> für Miltefosin, Clobetasol und Plazebo .....	<b>60</b>
<b>Abbildung 35:</b> Beurteilung möglicher Veränderungen nach der Therapie mit Miltefosin, Clobetasol und Plazebo mit Hilfe des <i>Global efficacy assessment</i> , jeweils unabhängig durch den Patienten und Prüfarzt eingeschätzt .....	<b>61</b>
<b>Abbildung 36:</b> Anzahl der MC pro mm <sup>2</sup> nach 14-tägiger Behandlung mit Miltefosin, Clobetasol und Plazebo .....	<b>62</b>
<b>Abbildung 37:</b> Prozentuale Veränderung der AUC vom <i>Entry visit</i> zum <i>End of study visit</i> .....	<b>63</b>
<b>Abbildung 38:</b> Volumetrische Aufnahmen eines Beispielpatienten nach der mechanischen Provokation, aufgenommen mit Hilfe der PRIMOS Messtechnik.....	<b>64</b>
<b>Abbildung 39:</b> Histogramm zur graphischen Häufigkeitsverteilung der prozentualen Veränderung der AUC und daher der Quaddelvolumina für Miltefosin, Clobetasol und Plazebo .....	<b>65</b>
<b>Abbildung 40:</b> Prozentuale Veränderung der Volumina der Läsionen vom <i>Entry visit</i> zum <i>End of study visit</i> .....	<b>65</b>
<b>Abbildung 41:</b> Volumetrische Aufnahmen der Läsionen eines Beispielpatienten vor der mechanischen Provokation, aufgenommen mit Hilfe der PRIMOS Messtechnik.....	<b>66</b>
<b>Abbildung 42:</b> Histogramm zur graphischen Häufigkeitsverteilung der prozentualen Veränderung der Volumina der Läsionen für Plazebo, Clobetasol und Miltefosin.....	<b>67</b>
<b>Abbildung 43:</b> Sonogramme eines Beispielpatienten vor und nach der medikamentösen Therapie mit Miltefosin, Clobetasol und Plazebo .....	<b>68</b>
<b>Abbildung 44:</b> Veränderung der Hautdicke vom <i>Entry visit</i> zum <i>End of study visit</i> für Miltefosin, Clobetasol, Plazebo .....	<b>68</b>
<b>Abbildung 45:</b> Fotografische Dokumentation der Behandlungsareale eines Beispielpatienten vor (links) und nach (rechts) medikamentöser Therapie mit Miltefosin.....	<b>70</b>

**Tabellenverzeichnis**

<b>Tabelle 1:</b> WHO-Klassifikation der Mastozytose <sup>22</sup> .....	<b>3</b>
<b>Tabelle 2:</b> Initiierende Faktoren der MC-Degranulation [nach <sup>1, 6, 19</sup> ].....	<b>14</b>
<b>Tabelle 3:</b> Diagnosekriterien für die kutane und systemische Mastozytose [nach <sup>22</sup> ].....	<b>19</b>
<b>Tabelle 4:</b> Tabellarische Übersicht des Studienablaufes .....	<b>53</b>
<b>Tabelle 5:</b> Detaillierte Beschreibung der kleineren Abweichungen vom Studienprotokoll.....	<b>55</b>
<b>Tabelle 6:</b> Detaillierte Beschreibung der großen Abweichungen vom Studienprotokoll.....	<b>55</b>
<b>Tabelle 7:</b> Auflistung der durch die Medikamente und nicht durch die Medikamente (non-TEAEs) bedingten TEAEs .....	<b>69</b>
<b>Tabelle 8:</b> Veränderung der Laborparameter vom <i>Entry visit</i> zum <i>End of study visit</i> mit Abweichungen von den Normalwerten.....	<b>71</b>
<b>Tabelle 9:</b> Auflistung der Abnormitäten im Rahmen der allgemeinen körperlichen Untersuchung für den <i>Screening Visit</i> und <i>End of study visit</i> .....	<b>72</b>

# 1. Einleitung

## 1.1 Mastozytose

Mastozytosen sind eine heterogene Gruppe von Erkrankungen, die durch eine erhöhte Proliferation und Akkumulation von Mastzellen (MC) in einem oder mehreren Organsystemen gekennzeichnet sind<sup>1-8</sup>.

Die Erkrankung manifestiert sich bei 80-90% der Patienten, die unter einer Form der Mastozytose leiden, an der Haut und wird daher oft durch den Dermatologen diagnostiziert. Neben einer als kutane Mastozytose (CM) bezeichneten Form, können im Rahmen der entweder benigne oder maligne verlaufenden systemischen Mastozytose (SM) zusätzlich oder ausschließlich extrakutane Organe betroffen sein<sup>3,5,7,9</sup>.

### 1.1.1 Geschichte

Im Jahre 1869 berichteten Nettleship und Tay erstmals über kutane, braune, makulopapulöse Primäreffloreszenzen, die sich bei einem zweijährigen Kind manifestierten und nach mechanischer Provokation eine urtikarielle Veränderung zeigten. Auf diese Weise wurde das klinische Bild der Urticaria pigmentosa (UP), eine Form der CM, beschrieben, deren Bezeichnung 1878 durch Sangster geprägt wurde<sup>10-12</sup>. Der Begriff „Mastozytose“ wurde dagegen 58 Jahre später, im Jahre 1936, von Sézary *et al.* eingeführt<sup>13</sup>. Paul Ehrlich entdeckte 1877 Bindegewebszellen, innerhalb derer er mit Hilfe von histologischen Färbungen metachromatische Granula darstellen konnte. Zwei Jahre später benannte er diese Zellen als „Mastzellen“<sup>14</sup>. Die erstmalige Verbindung zwischen der Entdeckung von Paul Ehrlich und der Beschreibung durch Nettleship und Tay stellte Unna 1887 her, als er von einer dermalen MC-Akkumulation innerhalb der Hautläsionen bei der CM berichtete<sup>15</sup>. 1949 konnte Ellis im Rahmen einer Biopsie bei einem einjährigen Kind die Akkumulation von MC nicht nur in der Haut, sondern auch in Organen wie Milz, Leber, Thymus, Knochenmark, Pankreas und in Lymphknoten aufzeigen. Entgegen der Annahme, dass die pathologische Anhäufung der MC auf die Haut beschränkt sei, konnte Ellis auf diese Weise eine systemische Form der Mastozytose mit Organbeteiligung beschreiben<sup>16</sup>.

### 1.1.2 Epidemiologie

Die Beurteilung der Inzidenz und Prävalenz innerhalb der gegenwärtigen Population ist problematisch. Dies ist auf einen hohen prozentualen Anteil an Patienten zurückzuführen, der von einer reinen kutanen Form der Mastozytose betroffen ist, die mittels klinischer Diagnostik oder Laborwertuntersuchungen nicht bestätigt und daher nicht präzise diagnostiziert werden

kann. Es ist daher von einer hohen Dunkelziffer auszugehen. In der Literatur sind unterschiedliche Angaben zu finden, so dass die tatsächliche Inzidenz unbekannt ist. Demnach variiert diese in der gegenwärtigen Population von 1/10.000 bis 4/10.000<sup>17</sup>. Unter den Patienten, welche eine dermatologische Abteilung aufsuchen, liegt sie schätzungsweise zwischen 1/1.000 und 1/8.000<sup>2, 17-19</sup>. Jüngste britische Studien berichten über eine geschätzte Inzidenz von 0,0000667%, demnach erkranken jährlich zwei Personen innerhalb einer Population von 300.000 Menschen an einer Mastozytose<sup>18, 20</sup>. Eine Prävalenz von nicht mehr als 0,3 pro 10.000 wird angegeben<sup>21</sup>. Insgesamt zeigen diese Daten, dass die Mastozytose eine eher selten auftretende Erkrankung darstellt<sup>1</sup>. Über 15% aller Patienten, die unter einer Form der Mastozytose leiden, zeigen eine kongenitale Manifestation. Weitere 30% der Patienten entwickeln die Mastozytose vor dem sechsten Lebensmonat, 10% vor dem zweiten Lebensjahr und über 10% zwischen dem zweiten und 15. Lebensjahr. Demzufolge sind 65% der Patienten Kinder. Bei den restlichen 35% manifestiert sich die Erkrankung vorrangig zwischen der zweiten und vierten Lebensdekade<sup>4, 9, 18</sup>. Während eine familiäre Häufung möglich, aber sehr selten ist, bestehen keine Hinweise auf eine Geschlechtsprädisposition<sup>2, 5, 17-19</sup>.

### **1.1.3 Klassifikation und klinisches Bild**

Aufgrund der ausgeprägten Heterogenität des klinischen Bildes der Mastozytose erscheint eine Klassifikation nützlich. Das Klassifikationsschema von Metcalfe stellt nur einen von vielen Ansätzen dar, die in der Vergangenheit erarbeitet wurden<sup>8</sup>. Die meisten Vorschläge berücksichtigten dabei vor allem die Unterscheidung der kutanen und systemischen Beteiligung, der indolenten und aggressiven Form und richteten außerdem ein Augenmerk auf die Assoziation der SM mit anderen hämatologischen Erkrankungen oder Abnormitäten<sup>7</sup>. Im Jahre 2000 trafen sich Expertengruppen in Wien, um über den aktuellen Wissensstand und über eine mögliche Klassifikation der Mastozytosen zu diskutieren. Das in diesem Zusammenhang erarbeitete Klassifikationsschema wurde im Jahre 2001 von der WHO übernommen und stellt das aktuellste Schema dar (Tabelle 1)<sup>22</sup>.

**Tabelle 1:** WHO-Klassifikation der Mastozytose <sup>22</sup>

	<i>Kategorie</i>	<i>Subvarianten</i>
<b>kutan</b>	<b>kutane Mastozytose</b>	- MPCM (historisch auch UP) - Typische MPCM - Plaquetform - Noduläre Form/Mastozytom (solitär oder multiple) - <i>Teleangiectasia macularis eruptiva perstans</i> (TEMP)
		- diffuse kutane Mastozytose (DCM)
		- Mastozytom der Haut
<b>systemisch</b>	<b>indolente systemische Mastozytose (ISM)</b>	- <i>smouldering</i> systemische Mastozytose - isolierte Knochenmarksmastozytose
	<b>SM mit assoziierter hämatologischer Erkrankung (SM-AHNMD)</b>	- meist myeloproliferative Erkrankung oder myeloische Leukämien
	<b>aggressive systemische Mastozytose (ASM)</b>	- lymphadenopathische, systemische Mastozytose mit Eosinophilie
	<b>Mastzellenleukämie</b>	- aleukämische Mastzellenleukämie
	<b>Mastzellsarkom</b>	
	<b>extrakutan Mastozytom</b>	

Laut der WHO-Klassifikation werden zu der CM die UP, die diffuse kutane Mastozytose (DCM), sowie das kutane Mastozytom gezählt. Die Plaquetform und der noduläre Typ mit Mastozytom-ähnlichen Läsionen, sowie die *Teleangiectasia macularis eruptiva perstans* (TEMP) bilden demnach eine Subvariante der UP <sup>22</sup>. Diese in der WHO-Klassifikation integrierte Untergliederung wurde von Hartmann *et al.* kontrovers betrachtet. Die Autoren schlagen wegen der unterschiedlichen klinischen Präsentation und Prognose, sowie des abweichenden klinischen Verlaufes dieser Mastozytoseform eine Modifizierung der Klassifikation vor. Mastozytom- und Plaquetyp treten nur bei Kindern auf und verschwinden für gewöhnlich bis zur Pubertät. Im Gegensatz dazu manifestiert sich die UP im Kindes- und im Erwachsenenalter und bildet sich seltener spontan zurück. Bei der UP konnte außerdem eine Mutation im Rezeptor für den Stammzellularfaktor (SCF), der auch als CD117 bzw. als Kit bezeichnet wird, nachgewiesen werden, welche beim Mastozytom- und Plaquetyp nicht aufgezeigt werden konnte. Aufgrund dieser Ausführungen scheint eine kritische Betrachtung der Subgliederung der CM angebracht <sup>9</sup>. Darüber hinaus ist die Bezeichnung makulopapulöse kutane Mastozytose (MPCM) anstelle des historischen Begriffes UP geeigneter. Bei den Hautveränderungen handelt es sich um stabile Läsionen, die vor allem nach mechanischer Provokation urtikarielle Veränderung zeigen. Es handelt sich nicht um eine transient auftretende Quaddelbildung, wie der Begriff „Urtikaria“ impliziert <sup>9</sup>. Im Folgenden wird daher an Stelle des historischen Begriffes UP die Bezeichnung MPCM verwendet.

### 1.1.3.1 Kutane Mastozytose

Die CM als eine Kategorie des WHO-Schemas zeigt ein mannigfaltiges Spektrum an Hautveränderungen<sup>4</sup>. Obwohl alle Läsionen der CM auf die gleiche Ursache, nämlich auf eine abnorm gesteigerte Anzahl an MC in der Dermis zurückzuführen sind, variiert die Anzahl und Morphologie der Effloreszenzen beträchtlich<sup>19</sup>. So können zartbraune Makulae im Hautniveau, rötlich-bräunliche Plaques oder Papeln, Tumore oder diffuse Hautinfiltrationen auftreten<sup>4</sup>. Die mögliche Hyperpigmentierung der Läsionen ist auf ein erhöhtes epidermales Melanin zurückzuführen<sup>19</sup>. Ein Manifestationszeitpunkt der CM im Kindesalter ist häufig, sie kann jedoch auch erst im Erwachsenenalter auftreten<sup>5, 23</sup>. Im Folgenden werden das klinische Bild und die Charakteristika der einzelnen Formen der CM beschrieben:

#### 1.1.3.1.1 Makulopapulöse kutane Mastozytose

Von allen Patienten, die unter einer Form der Mastozytose leiden, zeigen 65% eine MPCM<sup>24</sup>. Sie stellt damit die häufigste Manifestationsform der Mastozytose beim Erwachsenen dar und kann entweder als rein kutane Form oder in Kombination mit einer SM auftreten<sup>3, 18</sup>. Die MPCM kann eine ausgeprägte Heterogenität im Bezug auf das klinische Bild aufweisen<sup>25</sup>. Neben den typisch pigmentierten Läsionen, die sich als rötliche bis tief-braune Makulae oder als geringfügig erhabene Papeln präsentieren, ist außerdem das Auftreten weiterer Primäreffloreszenzen – wie Plaques oder Nodi – möglich<sup>2, 7, 18, 19, 24-27</sup>. Die disseminiert am gesamten Integument auftretenden Läsionen zeigen eine ovale oder runde Konfiguration<sup>19, 27</sup>. Aufgrund der variablen Anzahl an Läsionen kann das klinische Hautbild entweder nur durch einzelne Hautläsionen charakterisiert sein oder bis zu mehrere tausend Effloreszenzen aufweisen<sup>19</sup>. Die Läsionen der MPCM manifestieren sich am häufigsten am Rumpf und an den Oberschenkeln, obwohl alle Hautregionen, auch die Schleimhäute, betroffen sein können. Handflächen, Fußsohlen, Gesicht und Kopfhaut sind häufig ausgespart<sup>2, 5, 7, 18, 19, 25, 26</sup>. 33-46% der Patienten leiden unter Pruritus. Dieser kann neben weiteren Symptomen wie z.B. der Quaddelbildung und Erythementwicklung nach einer mechanischen Provokation auftreten – ein Phänomen, das als Darier-Zeichen bezeichnet wird<sup>18</sup>. Vor allem bei Kindern können sich innerhalb der ersten zwei Lebensjahre Bullae oder Vesikulae manifestieren, die zumeist ohne Narbenbildung abheilen<sup>6, 18, 25</sup>. Die pädiatrischen Läsionen sind im Vergleich zu den adulten Läsionen meist besser abgegrenzt, zeigen eine stärkere Hyperpigmentierung und einen größeren Durchmesser. Studien zufolge konnte für den Durchmesser der adulten Läsionen ein Mittelwert von 3 mm und ein maximaler Durchmesser von 4 mm ermittelt werden. Für den Durchmesser

der pädiatrischen Läsionen werden Mittelwerte von 5 mm und Maximalwerte von 15 mm genannt<sup>25</sup>.



**Abbildung 1:** Klinisches Bild der MPCM beim Erwachsenen (links) und beim Kind (rechts)<sup>25</sup>

Die noduläre Form als Unterform der MPCM ist eine seltene Manifestation der CM<sup>23</sup>. Es treten mehrere Läsionen auf, die die gleichen Charakteristika wie das Mastozytom zeigen und daher als multiple Mastozytome der Haut betrachtet werden können<sup>22</sup>. Die Nodi sind scharf begrenzt, mit einem Durchmesser von einigen mm bis annähernd 2 cm. Die Läsionen können sich bereits bei der Geburt präsentieren, häufiger entwickeln sie sich jedoch innerhalb des ersten Lebensjahres<sup>25</sup>.

Der Plaquetyp als weitere Unterform der MPCM ist durch flache bis leicht erhabene, diskret und homogen pigmentierte Läsionen gekennzeichnet, die bräunlich gefärbt sind<sup>25</sup>.

Die letzte Unterform der MPCM stellt die TEMP dar, die sich hauptsächlich im Erwachsenenalter manifestiert<sup>5, 6, 18, 26</sup>. Sie tritt bei weniger als 1% aller Patienten mit Mastozytose auf und stellt daher eine eher seltene Form der CM dar<sup>20, 23, 25, 26</sup>. Das Hautbild zeigt solitäre oder multiple, unscharf begrenzte, rötlich bis bräunlich kolorierte, zwei bis sechs mm durchmessende Makulae mit Teleangiektasien<sup>5, 18, 20, 23, 25, 26</sup>. Das Darier-Zeichen ist normalerweise negativ<sup>6, 18, 25</sup>.

#### 1.1.3.1.2 Diffuse kutane Mastozytose

Die DCM ist eine klassische, aber mit < 1% der Fälle eine selten auftretende Subvariante der CM, die sich vor dem dritten Lebensjahr manifestiert<sup>2, 5, 18, 20, 23</sup>. Die kutanen Infiltrationen können das gesamte Integument betreffen<sup>5, 6</sup>. Es zeigen sich eine generalisierte ödematöse

Verdickung, eine teigige Verhärtung und eine *peau d'orange* - artige Textur (Abbildung 2)<sup>5, 18, 19</sup>. Das Hautkolorit kann ein normales bis rot-gelb-braunes Spektrum annehmen<sup>5</sup>. Insbesondere bei der DCM ist innerhalb der ersten beiden Lebensjahre eine spontane Blasenbildung auf den Läsionen möglich, die für gewöhnlich denen des Pemphigoids ähnelt<sup>19</sup>. Normalerweise kommt es bei der DCM zwischen dem 15. Lebensmonat und dem fünften Lebensjahr zu einer Regression<sup>5</sup>. Patienten mit DCM haben ein erhöhtes Risiko für eine systemische Beteiligung<sup>18, 19</sup>. Wegen der hohen MC-Anzahl und der damit verbundenen massiven Freisetzung von Histamin, können schwere Komplikationen wie Hypotonie, Schock, Diarrhö und andere Beschwerden des Gastrointestinaltraktes auftreten<sup>6, 19, 23</sup>.



**Abbildung 2:** Klinisches Bild der DCM<sup>4</sup>

#### 1.1.3.1.3 Kutanes Mastozytom

Solitäre Mastozytome präsentieren sich entweder bei der Geburt oder entwickeln sich innerhalb der ersten drei Lebensmonate<sup>5, 25</sup>. Nur selten wurden sie bei Erwachsenen beschrieben<sup>5, 19, 25</sup>. Sie stellen sich als braune, flache oder leicht erhabene, gut begrenzte Plaques, Makulae oder Nodi dar, die mehrere cm durchmessen können<sup>2, 5, 18, 19, 25</sup> (Abbildung 3).



**Abbildung 3:** Klinisches Bild des solitären Mastozytoms<sup>25</sup>

Auch das zusätzliche Auftreten von Bullae ist möglich<sup>2, 5, 19, 25</sup>. Mastozytome können sich am gesamten Integument manifestieren, sind jedoch mit Aussparungen der palmaren und plantaren Hautareale vor allem an den Extremitäten lokalisiert<sup>5, 6</sup>. In den meisten Fällen bilden sich die Läsionen spontan zurück<sup>2</sup>.

### 1.1.3.2 Systemische Mastozytose

Im Gegensatz zu den beschriebenen Formen der CM können die MC auch extrakutane Organe infiltrieren und eine SM bedingen<sup>7, 28</sup>. 15-20% der Patienten, die von einer Form der Mastozytose betroffen sind, leiden unter der systemischen Manifestation. Neben einer möglichen, jedoch nicht zwingenden Hautbeteiligung bei der SM, die etwa bei der Hälfte der Patienten auftritt, sind Knochenmark, lymphatische Organe, Gastrointestinaltrakt oder die Leber häufige im Rahmen der SM involvierte Organe<sup>1, 3, 4, 7, 28</sup>. Die SM wird meist erst nach der dritten Lebensdekade diagnostiziert und stellt damit eine vor allem die Adoleszenz betreffende Erkrankung dar<sup>28</sup>. Bei über 90% der Patienten verläuft die SM benigne / indolent, mit einer guten Prognose<sup>19, 25</sup>. Der Verlauf der SM kann über Jahre stabil sein. Patienten mit indolenter systemischer Mastozytose (ISM) weisen jedoch ein erhöhtes Risiko für andere hämatologische Erkrankungen auf und in seltenen Fällen kann eine indolente in eine aggressive Form übergehen. Neben dem indolenten Verlauf kann sich die SM als aggressive systemische Mastozytose (ASM) manifestieren, bei der eine progressive Infiltration von unreifen MC vorliegt, die eine Organdestruktion mit Verlust der Organfunktion bedingen kann<sup>7</sup>. Sie ist sehr selten und tritt in weniger als 10% der Fälle auf<sup>21</sup>. Mögliche Symptome sind Hepatosplenomegalie, Lymphadenopathie, Leberfunktionsstörungen, Leberfibrose, Aszites, Knochenmarkfibrose oder beeinträchtigte Funktionen des Knochenmarkes mit Anämie, Leukopenie, Thrombozytopenie, Leukozytose oder Eosinophilie. Zusätzliche durch die MC-Infiltration bedingte Organstörungen sind Knochenschmerzen, pathologische Frakturen, Osteosklerose und Osteolyse. Auch Magenbeschwerden, Ulzera des Gastrointestinaltraktes, Blutungen, Diarrhö und Malabsorption, die zu Gewichtsverlust oder Kachexie führen, können auftreten<sup>7</sup>. Bei ungefähr 10% der Patienten mit SM ist diese mit einer klonalen, nicht der MC-Reihe zuzuordnender hämatologischen Erkrankung (*systemic mastocytosis with an associated clonal hematologic non-mast cell lineage disease*; SM-AHNMD) assoziiert<sup>25</sup>. Beispielsweise treten myeloische Leukämien, in Einzelfällen auch myelodysplastische Syndrome, chronische myeloproliferative Syndrome und Non-Hodgkin-Lymphome auf<sup>28</sup>. Die aggressivste Form der Mastozytose ist die selten auftretende Mastzelleukämie mit schlechter Prognose<sup>7, 25</sup>. Eine diffuse MC-Infiltration im Knochenmark von >20% und die Ausschwemmung von MC in das periphere Blut von >10%

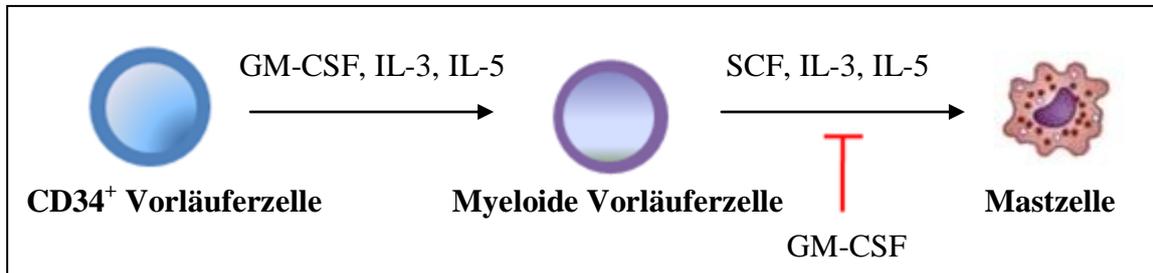
kennzeichnen diese Form, die zu den myeloproliferativen Syndromen gezählt wird<sup>28</sup>. In der Literatur wurden seltene Fälle solitärer MC-Tumore beschrieben, die ebenso wie die drei bekannten Fälle von MC-Sarkomen einen hohen Malignitätsgrad und eine schlechte Prognose besitzen<sup>25, 28</sup>.

#### 1.1.4 Ätiologie

Als genetische Basis der Mastozytose bei Erwachsenen wird eine Mutation des c-Kit-Gens vermutet, das auf dem Chromosom 4q12 lokalisiert ist<sup>4</sup>. Sowohl bei der SM als auch bei der CM hat diese Mutation Auswirkungen auf die MC-Proliferation<sup>29</sup>. Das c-Kit-Protoonkogen ist für die Kodierung eines transmembranären Tyrosinrezeptors für den SCF zuständig, der auf CD34<sup>+</sup> hämatopoetischen Stammzellen, MC-Progenitorzellen und reifen MC exprimiert wird<sup>7, 18, 25</sup>. Der auch als *mastcell growth factor* bezeichnete SCF induziert Wachstum, Reifung und Differenzierung der MC und kann zusätzlich durch die Aktivierung der Melanozytenproliferation die Bildung von Melaninpigment stimulieren<sup>7, 8, 19, 30</sup>. Der Kit-Rezeptor ist ein Transmembranrezeptor, der neben einer extrazellulären Region mit Bindungsdomänen für SCF auch einen intrazellulären Anteil mit enzymatischen Domänen, bestehend aus Tyrosinkinasen und juxtamembranären Domänen, besitzt. Verschiedene Punktmutationen wurden für das c-Kit-Protoonkogen beschrieben, die eine ligandenunabhängige Aktivierung des Rezeptors bedingen und damit zu einer erhöhten Proliferationsrate der MC und ihrer Vorläuferzellen, sowie zu einer verlängerten Überlebenszeit der MC führen<sup>3, 4, 8, 19</sup>. Bislang konnten 10 verschiedene Mutationen des c-Kit-Gens nachgewiesen werden<sup>4</sup>. Der Ersatz der Aminosäure Aspartat durch Valin im Codon 816 (D816V) stellt jedoch die am häufigsten auftretende genetische Veränderung dar<sup>3, 4</sup>. Diese Punktmutation tritt bei adulten Patienten auf und konnte auch innerhalb der Haut nachgewiesen werden. Sie ist unabhängig von der Klassifikation und korreliert nicht mit der Prognose<sup>3, 18</sup>. Während die Mutationen in Codon 816 bei Kindern nur selten gefunden wird, konnten kürzlich bei pädiatrischen Patienten mit Mastozytose c-Kit-Mutationen im Codon 839 aufgezeigt werden, die eine klonale Ursache der pädiatrischen Form vermuten lassen<sup>8, 18</sup>. Jedoch konnten auch bei anderen hämatologischen Erkrankungen, ohne das Vorliegen einer Mastozytose, c-Kit-Mutationen nachgewiesen werden. Als pathogenetische Ursache kommt eine c-Kit-Mutation in Betracht, die jedoch mit großer Wahrscheinlichkeit nicht alleine hinreichend für die Entstehung der Mastozytose ist<sup>4</sup>.

### 1.1.5 Die Mastzelle – ihre Aktivierung, Signaltransduktion und Degranulation

MC sind von  $CD34^+$  multipotenten Knochenmark-Progenitorzellen abstammende hämatopoetische Zellen<sup>31</sup>. Die MC-Differenzierung und -Reifung erfolgt in extramedullären Organen<sup>3, 7, 8, 19</sup>.



**Abbildung 4:** Graphische Darstellung der Differenzierung von myeloiden Zellen aus  $CD34^+$  Vorläuferzellen durch Granulozyten-Makrophagen koloniestimulierenden Faktor (GM-CSF), IL-3 und IL-5. Durch Stimulation von SCF, IL-3 und IL-5 differenzieren sich MC aus myeloiden Vorläuferzellen. GM-CSF zeigt auf diese Differenzierung einen inhibitorischen Effekt<sup>31</sup>.

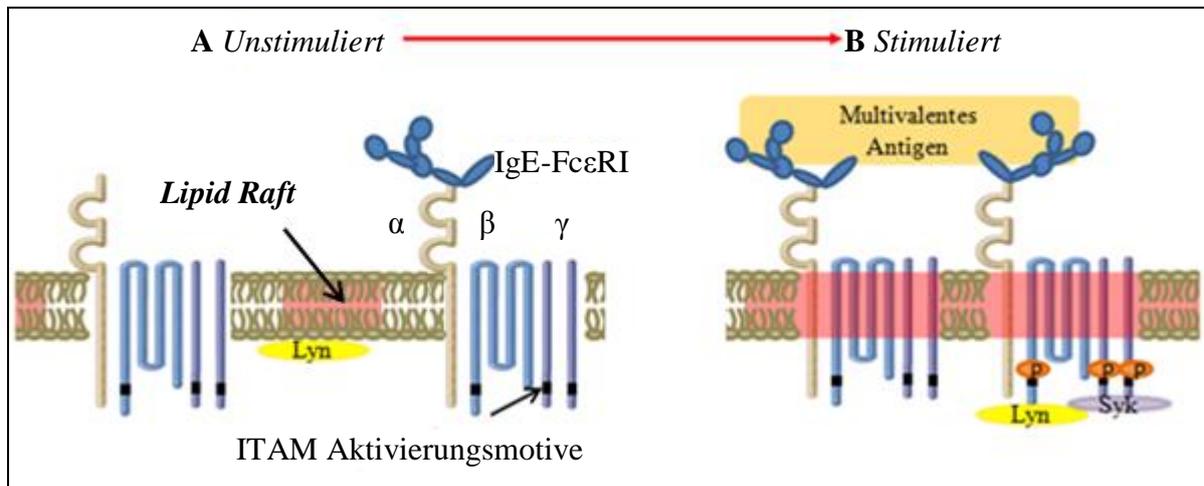
Vorzugsweise sind die MC in der Haut und in Schleimhäuten des Respirations- und Gastrointestinaltraktes mit direktem Kontakt zur Umwelt lokalisiert, können sich aber in annähernd allen Organen befinden<sup>2, 6, 32</sup>. MC sind vor allem um periphere Nerven, Hautanhangsgebilde und benachbart zu Blut- und Lymphgefäßen anzutreffen<sup>2, 6, 19</sup>. Diese anatomische Verteilung, der als multipotente Effektorzellen des Immunsystems fungierenden MC erlaubt die Interaktion mit verschiedenen Zelltypen wie Fibroblasten, glatten Muskelzellen, Epithelien, Endothelien und anderen Zellen des Immunsystems und verdeutlicht deren protektive und inflammatorische Aufgabe<sup>1-3, 7, 8, 19, 25, 33</sup>.

MC und auch Basophile exprimieren einen hoch affinen, tetrameren Rezeptor für IgE, den  $Fc\epsilon RI$ , der neben den B- und T- Zellrezeptoren ein Mitglied der *multichain immune recognition receptor family* (MIRR) ist. Der  $Fc\epsilon RI$  besteht aus je einer  $\alpha$ - und  $\beta$ - Kette, sowie aus zwei durch Disulfidbrücken verbundenen  $\gamma$ - Ketten. Die  $\alpha$ - Ketten haben die Fähigkeit IgE an den  $Fc\epsilon RI$  zu binden. Die  $\beta$ - Ketten bewirken eine Verstärkung der durch IgE induzierten Signalereignisse. Sowohl die  $\beta$ - als auch die  $\gamma$ - Ketten enthalten tyrosinabhängige Aktivierungsmotive, die als *immunoreceptor tyrosine-based activation motif* (ITAM) bezeichnet werden und eine zentrale Rolle bei der Signaltransduktion spielen<sup>34-37</sup>. Der beschriebene  $Fc\epsilon RI$  ist in der Plasmamembran der MC lokalisiert, die keine uniforme Lipiddoppelmembran darstellt, sondern ca. 10-200 nm große, heterogene, dynamische cholesterol- und sphingolipidreiche Mikrodomänen besitzt. Diese als *Lipid Rafts* bezeichneten Domänen, die hauptsächlich von Phospholipiden umgeben werden,

sind in der Plasmamembran aller eukaryotischen Zellen zu finden und in viele biologische Prozesse involviert<sup>35, 38, 39</sup>. Sie sind reich an verschiedenen Klassen von Proteinen, einschließlich Glycosylphosphatidylinositol-verankerten Proteinen; myristoylierten Proteinen, wie die Tyrosinkinase der Src-Familie (PTK), zu denen Kinasen wie Lyn, Fyn und Syk gehören; Adapterproteinen wie LAT; verschiedenen G-Proteinen und einigen Transmembranproteinen<sup>40, 41</sup>. Darüber hinaus sind sie reich an *mitogen-activated protein kinase* (MAPK), Proteinkinase C (PKC), der p85-Untereinheit der Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K), Grb2 und shc<sup>42</sup>. Gleichzeitig ist in ruhenden Zellen der Ausschluss von Membranproteinen, wie beispielsweise den MIRRs, von den *Lipid Rafts* möglich<sup>34</sup>. Dieser Zustand verändert sich durch die Quervernetzung der Oberflächenrezeptoren, die durch eine Interaktion von multivalenten Antigenen mit an FcεRI gebundenem IgE stattfindet. Dadurch wird die binnen Sekunden erfolgende Verlagerung der ausgeschlossenen MIRRs in die Src-Kinase-haltigen *Rafts* induziert und deren Interaktion und folgende Signaltransduktion ermöglicht<sup>34, 35, 43-47</sup>. Entsprechendes gilt für den Kit-Rezeptor, der sich infolge Ligandenbindung in die *Lipid Rafts* verlagert. Es konnte gezeigt werden, dass erst diese Verlagerungen eine Interaktion mit der Src-Kinase-Familie und die sich anschließenden Kaskaden ermöglicht<sup>48</sup>. Neuere Publikationen zeigen außerdem an *rat basophilic leukemia* (RBL) MC-Linien, dass die an der Exozytose beteiligten integralen Membranproteine - die t-SNARE Proteine - mit den *Lipid Rafts* während der Exozytose assoziiert sind. Dies lässt vermuten, dass *Lipid Rafts* zusätzlich eine wichtige Rolle bei der Fusion der Granula mit der Plasmamembran von MC und damit direkt bei der Degranulation spielen. Insgesamt kann festgehalten werden, dass *Lipid Rafts* eine zentrale Rolle bei Zellprozessen wie der Signaltransduktion und der anschließenden Degranulation spielen<sup>49</sup>.

Neben der beschriebenen Translokation, bewirkt die Quervernetzung außerdem eine Transphosphorylierung der Tyrosinreste der ITAMs innerhalb der β- und γ-Ketten, was den Initiierungsschritt der Signaltransduktion darstellt (Abbildung 5)<sup>50</sup>.

Die Phosphorylierung erfolgt durch eine mit der β-Untereinheit verbundenen und als Lyn bezeichneten PTK<sup>34, 44, 51-53</sup>. Dieser Schritt resultiert in einer vermehrten Rekrutierung von Lyn mit Bindung an die β-Untereinheiten, sowie einer Akkumulation der PTK Syk. Diese ist, mittels ihrer tandemartigen, als src-Homolog (SH2) bezeichneten Domänen, in der Lage, an die durch Phosphorylierung neu entstandenen Bindungsstellen an der γ-Untereinheit der ITAMs zu binden<sup>40, 47, 51-53</sup>. Das Resultat ist eine Konformationsänderung und Aktivierung von Syk, das die Fähigkeit hat, eine Vielzahl von Proteinen - wie beispielsweise LAT - zu phosphorylieren und zu aktivieren<sup>53, 54</sup>.



**Abbildung 5:** (A) Innerhalb ruhender Zellen sind die IgE-Rezeptoren von den Lyn-haltigen *Rafts* ausgeschlossen. (B) Interaktion von multivalenten Antigenen mit an FcεRI gebundenem IgE bedingt die Translokation des IgE-Rezeptors in die Src-Kinase-haltigen *Rafts*. Kaskadenartig kommt es durch die Tyrosinkinase Lyn der Src-Familie zu einer Phosphorylierung (P), anschließend zu einer vermehrten Rekrutierung von Lyn und Syk und Bildung neuer Bindungsstellen [nach <sup>50</sup>]

Der anschließende Signaltransduktionsweg und die Degranulation erfolgen über verschiedene Kaskaden, die im Folgenden beschrieben werden (Abbildung 6) <sup>37, 52, 55, 56</sup>:

LAT ist ein innerhalb der *Lipid Rafts* lokalisiertes Protein, das multiple Tyrosinreste enthält und eine zentrale Rolle im Phospholipase C (PLC)-Signalweg und im MAPK-Weg spielt <sup>57</sup>. Nach der Phosphorylierung durch Syk bildet LAT ein Molekülkomplex mit Adapterproteinen wie beispielsweise SLP-76, Grb2, Vav1 und PLCγ. Durch Syk phosphoryliertes LAT ermöglicht eine Aktivierung und Rekrutierung der PLCγ an die Plasmamembran. PLCγ hydrolysiert membrangebundenes Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) zu Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP<sub>3</sub>) und Diacylglycerin (DAG) <sup>58</sup>. IP<sub>3</sub> bindet in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums an seinen Rezeptor und induziert die Freisetzung von Ca<sup>2+</sup>. Freigesetztes Ca<sup>2+</sup> führt zu einem Einstrom von extrazellulärem Ca<sup>2+</sup> über die Plasmamembran durch *store operated Ca<sup>2+</sup> channels* (SOGs). Außerdem aktivieren Ca<sup>2+</sup> und DAG verschiedene Isoformen der PKC. Ca<sup>2+</sup> und PKC sind notwendig für eine optimale MC-Degranulation, bei der die intrazellulären Vesikel mit der Plasmamembran fusionieren und die Mediatoren per Exozytose freigesetzt werden <sup>59</sup>. Integrale Membranproteine der Vesikelmembran, die als vesikuläre SNAP-Rezeptoren (v-SNARE) bezeichnet werden, sowie SNAP-Rezeptoren der

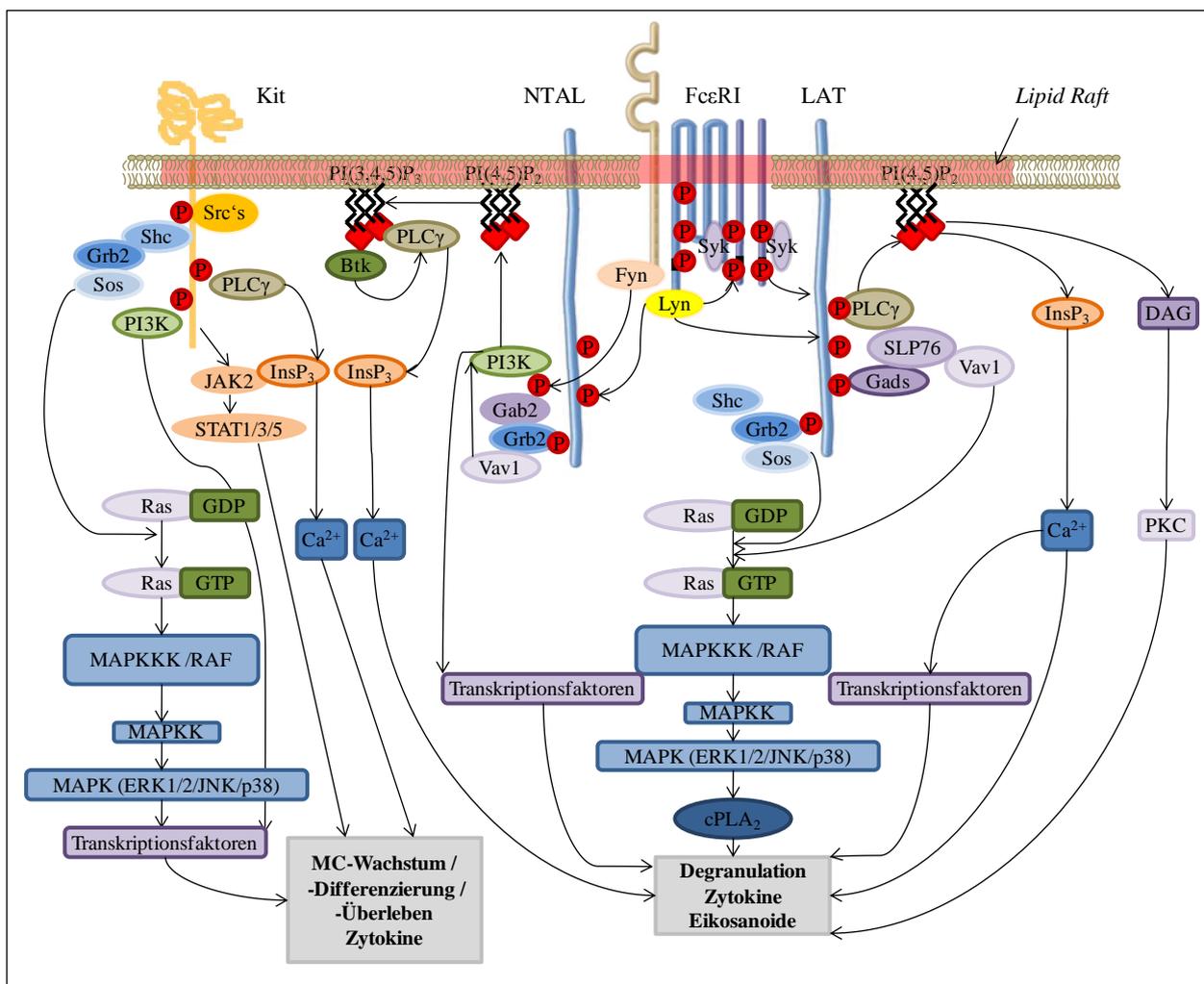
Akzeptor (Target) - Membran (t-SNARE) sind wichtige, an der Degranulation beteiligte Komponenten<sup>49</sup>.

Die beschriebenen Adapterproteine am LAT spielen außerdem eine wichtige Rolle bei der Initiierung des MAPK-Signalweges, der in einer Aktivierung und Regulierung der zytosolischen Phospholipase A<sub>2</sub> (cPLA<sub>2</sub>) gipfelt<sup>58</sup>. Die Phosphorylierung von LAT bedingt eine Rekrutierung des Grb2/Sos-Komplexes und des Proteins Gad. Letzteres bindet an LAT und initiiert dadurch die Rekrutierung von SLP-76 zum Komplex. An dem durch Syk phosphorylierten SLP-76 werden Bindungsstellen für das Protein Vav ausgebildet. Vav und Grb2 (über Sos) bewirken den Übergang von Ras in die aktivierte, GTP-bindende Form. Die nun mögliche Interaktion von Ras-GTP mit Raf, einer Serin/Threoninkinase, die wegen ihrer sukzessiven Kinaseaktivität auch als MAPKKK (Mitogen Aktivierte Protein Kinase Kinase Kinase) bezeichnet wird, führt zu dessen Aktivierung und fungiert selbst als Aktivator einer MAPK-Kinase (MEK). Diese phosphoryliert und aktiviert eine weitere Kinase, die MAP-Kinase. Dies sind Proteinkinasen, die in die drei Gruppen *extracellular signal-related kinase* (ERK) mit den Isoformen ERK1 und ERK2, p38-mitogenaktivierte Proteinkinase und c-Jun-N-terminalen Kinasen (JNK) eingeteilt werden<sup>58</sup>. Im aktivierten Zustand begibt sich die MAPK in den Zellkern und phosphoryliert und aktiviert dort Transkriptionsfaktoren, die für die Zytokinproduktion nötig sind. Zusätzlich kontrolliert die MAPK ERK1/2 die Aktivierung der cPLA<sub>2</sub>, die in die Zellmembran transloziert und an der Synthese von Lipidmediatoren beteiligt ist<sup>56</sup>. Die beschriebene Kaskade mündet schließlich in der Aktivierung der cPLA<sub>2</sub>, die Lipidmediatoren synthetisiert<sup>36, 52, 53, 55</sup>. Phosphatidylcholin wird mittels der cPLA<sub>2</sub> zu Arachidonsäure und Lysophosphatidylcholin metabolisiert. Aus Arachidonsäure entstehen über die Cyclooxygenase Prostaglandine und über die Lipoxygenase Leukotriene<sup>60</sup>.

In einer weiteren Kaskade ist die Fyn-Kinase mit der  $\beta$ -Untereinheit verbunden und wird wie Lyn - durch die Interaktion von Allergenen mit dem am Fc $\epsilon$ RI gebundenen IgE - aktiviert. Fyn phosphoryliert das Adapterprotein Gab2. Dieses besitzt multiple Bindungsstellen für die p85-Untereinheit der Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) und fungiert als wichtiger Regulator der PI3K-Aktivierung<sup>58</sup>. PI3K beeinflusst einerseits die Transkription, andererseits bindet phosphoryliertes Gab2 an PI3K und rekrutiert es an die Plasmamembran. Hier katalysiert es die Umwandlung von PIP<sub>2</sub> in Phosphatidylinositol-(3,4,5)-triphosphat (PIP<sub>3</sub>) und ermöglicht letztendlich die Rekrutierung verschiedener Proteine, wie *Bruton's tyrosin kinase* (Btk). Diese Kinase phosphoryliert PLC $\gamma$ , ermöglicht so die Hydrolyse von PIP<sub>2</sub> zu IP<sub>3</sub> und gipfelt in der Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung und Degranulation<sup>36, 37, 52, 53, 55</sup>.

Durch Bindung des SCF an den Kit-Rezeptor wird die intrinsische Tyrosinkinase aktiviert und eine Autophosphorylierung von Tyrosinresten bedingt. Diese stellen Bindungsstellen für die Src-kinase, Shc, PI3K und PLC $\gamma$  zur Verfügung. Über die Aktivierung der MAPK, PI3K, PLC $\gamma$  und der JAK2 kommt es zu einer Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration, zu einer Transkriptionssteigerung und zur Aktivierung von Überlebenssignalwegen, die für das MC-Wachstum, -Überleben und -Differenzierung verantwortlich sind.

Zusätzlich besteht eine Verbindung zwischen den Signalkaskaden, die durch die Aktivierung von Kit und Fc $\epsilon$ RI ausgelöst werden. Die Bindung von SCF an den Kit-Rezeptor potenziert durch die Phosphorylierung von NTAL die Antigen-vermittelte Antwort<sup>56</sup>.



**Abbildung 6:** Signaltransduktionswege im Inneren der Zelle nach der Stimulierung. Dargestellt sind die Signaltransduktionswege infolge der Interaktion von multivalenten Antigenen mit an Fc $\epsilon$ RI gebundenem IgE. Der über LAT vermittelte PLC $\gamma$ -Signalweg, sowie der MAPK/ERK-Signalweg münden neben dem durch Fyn induzierten PI3K-Signalweg in der Degranulation und Freisetzung von Zytokinen und Eikosanoiden. Dargestellt ist außerdem der

Signaltransduktionsweg über den Kit-Rezeptor, der in der Zytokinfreisetzung mündet und MC-Wachstum, -Differenzierung und -Überleben kontrolliert. P = Phosphorylierung [nach <sup>37, 52, 55, 56</sup>]

Neben der beschriebenen IgE-abhängigen Mediatorfreisetzung kann die MC-Degranulation auch über IgE-unabhängige Signalwege – z.B. pharmakologisch oder physikalisch – erfolgen, deren Einzelheiten jedoch noch nicht vollständig beschrieben sind (Tabelle 2) <sup>2, 4, 6, 19</sup>.

**Tabelle 2:** Initiierende Faktoren der MC-Degranulation [nach <sup>1, 6, 19</sup>]

<b>Initiierende Faktoren</b>
Immunologische Stimuli (IgE)
Ionophore (z.B. Calcium Ionophore A 23187)
Polymere (Compound 48/80; Dextran)
Anaphylatoxine (C3A und C5A)
ATP
Emotionale Faktoren: Stress, Angst
Insekten- oder Schlangengift
Biologische Polypeptide von Quallen, Hummer, Flusskrebse
Bakterientoxine
Arzneimittel: ASS, Alkohol, Codein, Morphin, Amphotericin B, Reserpin, Scopolamine, Polymyxin B, Thiamine, D-tubocurarine, Quinine, Gallamine, Decamethonium, jodhaltige Kontrastmittel
Physikalische Stimuli: Hitze, Kälte, UV-Strahlung, mechanische Reizung

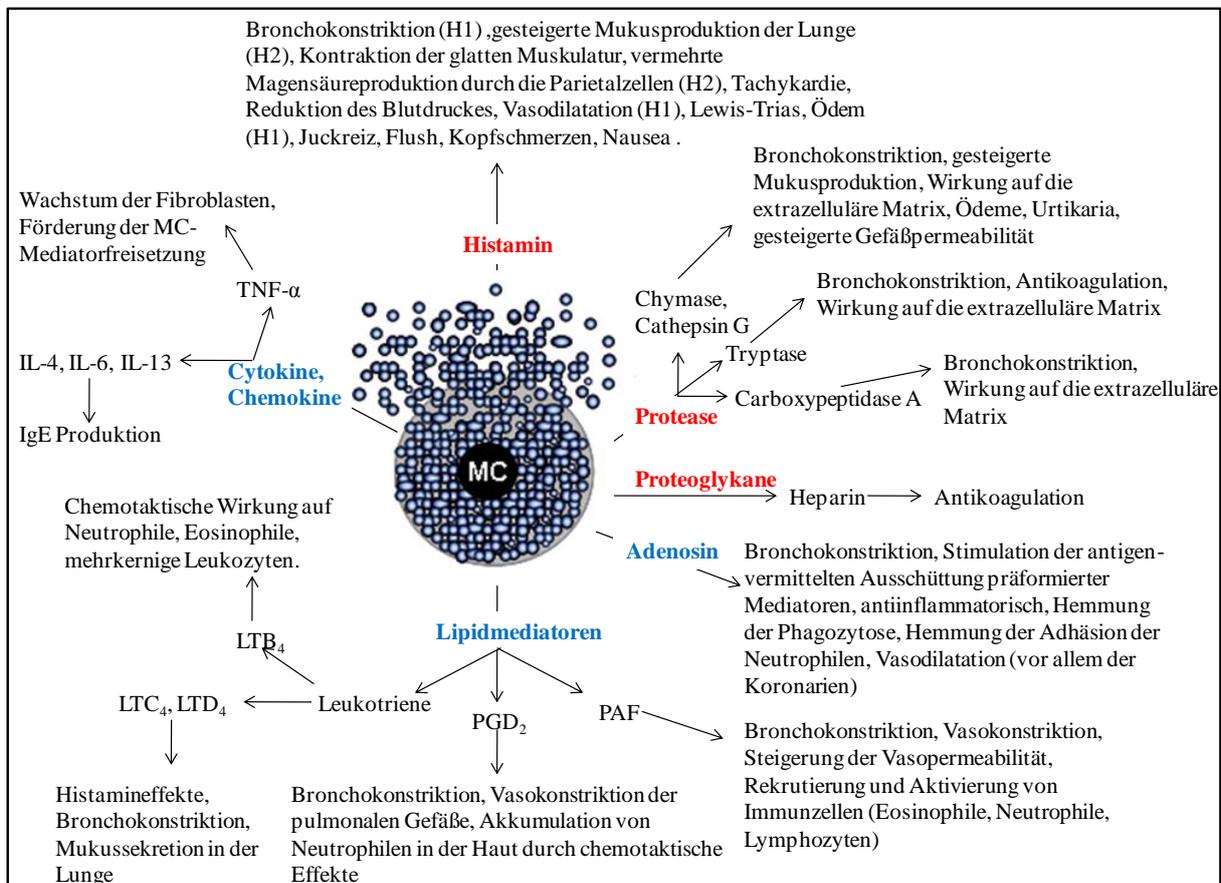
Beispielsweise können basische Verbindungen, wie Substanz P oder Compound 48/80 eine IgE-unabhängige MC-Degranulation bedingen. Sie aktivieren in MC pertussis toxin-sensitive G-Proteine, Gi2 und Gi3. Einerseits führt dies zu einer Stimulierung der PLC $\beta$  und mündet unter Beteiligung von PKC und Ca<sup>2+</sup> in der Exozytose mit Histaminfreisetzung. Andererseits kommt es über die Aktivierung der PI3K zur Synthese und Freisetzung von Arachidonsäure <sup>61</sup>. Die IgE-unabhängige Mediatorfreisetzung kann darüber hinaus durch Calcium Ionophore A 23187 induziert werden. Dabei handelt es sich um einen transmembranen Ca<sup>2+</sup>-Transporter, der über einen Einstrom von extrazellulärem Ca<sup>2+</sup> zu einer Stimulation der Mediatorfreisetzung führt <sup>60</sup>. Der Mechanismus der IgE-unabhängigen Mediatorfreisetzung, vermittelt durch physikalische Stimuli, speziell der mechanischen Irritation, ist weiterhin unklar. Es wurden jedoch verschiedene Hypothesen postuliert. Demnach ist eine Mikrotraumatisierung des Gewebes, wahrscheinlich vermittelt durch lokales Komplement oder Aktivierung von Plasminogen, ein möglicher, zur Degranulation führender Mechanismus. Eine weitere Hypothese ist die Irritation neuronaler Strukturen infolge mechanischer Reizung, die in der Degranulation anliegender MC

mündet. Diese mechanische Nervenstimulation kann entweder spezifisch durch die Aktivierung von Mechanorezeptoren erfolgen oder unspezifisch durch die lokale Aktivierung von nozizeptiven Nervenendigungen. Nozizeptorenreizung kann in dem innervierten Gewebe zu einer lokalen Änderung der Durchblutung und Gefäßpermeabilität führen. Dies wird durch verschiedene Verbindungen bewirkt, die aus den peripheren Endigungen freigesetzt werden. Unter anderen gehört Substanz P dazu, die wiederum auf MC wirken kann. Eine dritte Hypothese postuliert die Wirkung über Mechanorezeptoren direkt auf den MC. Demnach konnten auch auf MC mechanosensitive Ionenkanäle nachgewiesen werden<sup>62</sup>. In Studien wurde gezeigt, dass Kationenkanäle der *transient receptor potential vanilloid family* (TRPV) vermutlich an der MC-Aktivierung durch physikalische Stimuli beteiligt sind. Speziell TRPV4 wurde mit der mechanischen Stimulation in Zusammenhang gebracht<sup>63</sup>.

In ihrem Zytoplasma enthalten die MC elektronendichte Granula, die 40% des gesamten Zellvolumens ausmachen. Dies verdeutlicht, dass MC eine wichtige Quelle für biologisch aktive Mediatoren sind, die entweder innerhalb der sekretorischen Granula präformiert gespeichert sein können oder neu synthetisiert werden<sup>3, 6</sup>. Wichtigste Vertreter der ersten Gruppe sind Histamin, Heparin, neutrale Proteasen, wie Tryptase und Chymase, Serotonin, Heparin, Peroxidasen und Phospholipasen<sup>3, 56</sup>. Membranabgeleitete Lipidmetabolite wie LTB<sub>4</sub>, LTC<sub>4</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub> oder PAF und inflammatorische Zytokine wie TNF- $\alpha$ , IL-5, IL-6, IL-13 können nach der MC-Aktivierung synthetisiert werden<sup>1-3, 19, 25</sup>. Im Gegensatz zu den neu synthetisierten Metaboliten werden die präformierten unmittelbar freigesetzt und wirken schnell<sup>64</sup>. Die Freisetzung von Histamin tritt beispielsweise 30-45 Sekunden nach der Stimulation auf, seine Effekte können innerhalb der ersten bis fünften Minute beobachtet werden<sup>19</sup>.

Die freigesetzten Mediatoren bewirken ein heterogenes Spektrum an Symptomen (Abbildung 7)<sup>3, 25, 64</sup>. Die spontane oder induzierte Freisetzung von Mediatoren aus den akkumulierten MC in der Haut führt zum Auftreten von Flush, erythematösen, diffusen Hautveränderung mit Wärmegefühl, sowie Pruritus, Quaddelbildung und einem positiven Darier-Zeichen<sup>3, 6, 25, 65</sup>. Blasenbildung, vor allem bei Patienten <2 Jahre, wurde neben selten auftretender *peau d'orange*, die sich bei Läsionen mit tiefer dermaler Ausdehnung präsentieren kann, als weiteres kutanes Symptom beschrieben<sup>20</sup>. Die angeführten kutanen Manifestationen können sowohl im Rahmen der systemischen, als auch der kutanen Mastozytose auftreten<sup>17, 65</sup>. Der Juckreiz beschränkt sich oft auf die Stellen der MC-Infiltration und tritt paroxysmal auf<sup>6</sup>. Er entsteht durch die Erregung von polymodalen, marklosen C-Nervenfasern durch die freigesetzten Mediatoren, wie Histamin oder auch Tryptase. Dabei dienen die freien Endigungen in der Epidermis und oberen Dermis als Nozizeptoren. Die Entstehung der Erytheme und urtikariellen Hautveränderungen basiert auf

dem Mechanismus der sog. Lewis Trias, oder auch *Triple response of Lewis*: durch eine Aktivierung der Histamin H1-Rezeptoren kommt es zu einer Vasodilatation, die in der Ausbildung eines unmittelbar auftretenden Erythems mündet. Neben dieser Senkung des Gefäßtonus, wird zusätzlich die Gefäßpermeabilität gesteigert, wodurch sich dermale Ödeme ausbilden, die in einer urtikariellen Veränderung gipfeln. Schließlich bildet sich ebenfalls in Folge der Vasodilatation ein durch den Axonreflex vermittelter Erythemhof aus<sup>19, 64</sup>.



**Abbildung 7:** Biologische Effekte von MC-Mediatoren; rot= präformierte Mediatoren, blau: neusynthetisierte Mediatoren [nach<sup>64</sup>]

Ferner können bei der CM systemische Symptome beobachtet werden<sup>20</sup>. Symptome des Gastrointestinaltraktes sind nach Pruritus und Flush die am häufigsten auftretenden Manifestationen, die oft schwere Ausprägungen und einen chronischen Verlauf zeigen. Über Histamin H2-Rezeptoren wird eine erhöhte Magensäureproduktion durch die Parietalzellen vermittelt<sup>64</sup>. Patienten mit SM klagen dabei häufig über Schmerzen und Diarrhö, seltener auch über Nausea und Vomitus. Bei Patienten mit ISM, ASM oder MC-Leukämie werden Müdigkeit, Gewichtsverlust, Schwitzen und Fieber als auftretende Symptomatik berichtet<sup>65</sup>. Darüber hinaus

kann bei allen Formen der Mastozytose die Freisetzung von biologisch aktiven Mediatoren aus den MC neuropsychiatrische Symptome wie Kopfschmerzen und Krämpfe oder kardiovaskuläre Beschwerden wie Hypotonie bedingen und bis hin zum Schock reichen<sup>3, 6, 7, 17, 26</sup>. Pulmonale Symptome treten eher selten auf, auch Gerinnungsstörungen werden beschrieben<sup>1, 20, 64</sup>. Das Auftreten von Osteoporose und Knochenschmerzen, vor allem in den langen Röhrenknochen lokalisiert, wird berichtet<sup>65</sup>.

### 1.1.6 Diagnostik

Die Diagnosestellung der CM basiert auf den typischen klinischen und histologischen Befunden der Haut in Abwesenheit von Kriterien, welche die Diagnosestellung einer SM erlauben<sup>22</sup>. Bei dem Vorliegen typischer Hautveränderungen kann der Verdacht auf eine CM erhoben werden, welcher durch typische Symptome, wie beispielsweise einem positiven Darier-Zeichen, untermauert werden kann<sup>2</sup>. Das nach dem französischen Dermatologen Ferdinand-Jean Darier benannte Zeichen kann bei allen kutanen Formen der Mastozytose, mit Ausnahme der TEMP, ausgelöst werden<sup>20, 66</sup>.



**Abbildung 8:** Behandlungsareale eines Beispielpatienten vor (links) und nach (rechts) Provokation des Darier-Zeichens mit Entwicklung urtikarieller und erythematöser Veränderungen infolge mechanischer Reizung.

Beim klassischen Darier-Zeichen wird die provozierte Quaddel von einem umgebenden Erythem, sowie von lokalem Pruritus begleitet<sup>66</sup>. Reibung bewirkt dabei eine Degranulation der sich innerhalb der Haut vermehrt befindenden MC. Die auf diese Weise ausgelöste Mediatorfreisetzung bedingt den Symptomkomplex. Klassischerweise zeigt sich die

Quaddelbildung im Bereich der Läsionen, kann aber auch die klinisch unauffällige Haut bei Patienten mit Mastozytose betreffen. Die genannten Symptome können bereits nach zwei bis fünf Minuten einsetzen und 30 Minuten bis mehrere Stunden persistieren<sup>66</sup>. Eine ausbleibende oder geringfügige Quaddelbildung nach der Provokation ist möglich, da nicht bei allen Patienten mit CM ein positives Darier-Zeichen vorliegen muss. Ausbleibende Symptome nach der Provokation schließen daher die Diagnose einer Mastozytose nicht aus. In Studien konnte bei über 90% der Patienten mit MPCM das Darier-Zeichen ausgelöst werden<sup>66, 67</sup>. Das Darier-Zeichen ist für die Mastozytose jedoch nicht 100% spezifisch, sondern kann in seltenen Fällen auch bei anderen dermatologischen Erkrankungen, wie der Leukemia cutis, Xanthogranuloma juvenile, Histiocytosis X und Lymphomen nachgewiesen werden<sup>66</sup>. Die Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen einer Mastozytose ist bei einem typischen Hautbefund und positiven Darier-Zeichens sehr hoch und kann mittels Hautbiopsie und anschließender histologischer Untersuchung bestätigt werden<sup>27</sup>. Diese zeigen MC als runde oder ovale bis spindelförmige Zellen mit einem Durchmesser von 15 bis 30 µm und zahlreichen zytoplasmatischen Granula<sup>33</sup>. Neben der Giemsa-, Tryptase- oder Toluidinblaufärbung können enzymatische Färbemethoden wie Chloracetatesterase oder konjugiertes Avidin zur Darstellung der MC genutzt werden<sup>2, 7, 25</sup>. In jüngeren Studien wurde eine Anzahl von 75 MC/mm<sup>2</sup> als normal und 250 MC/mm<sup>2</sup> als pathologisch definiert<sup>33</sup>. Die höchste Dichte der MC-Akkumulation zeigt sich in der Nähe der dermo-epidermalen-Junktionszone<sup>6</sup>. Hohe MC-Konzentrationen finden sich auch um die Blutgefäße<sup>33</sup>. Die Anzahl der MC nimmt mit zunehmender Tiefe progredient ab<sup>6</sup>. Das subkutane Fettgewebe enthält im Vergleich sehr wenig, die Epidermis normalerweise keine MC. Bei stärker infiltrierten Läsionen, wie z.B. dem Mastozytom oder dem nodulären Typ der CM, können sich die Infiltrate bis in die gesamte Dermis und sogar bis in das subkutane Fettgewebe erstrecken<sup>5, 25</sup>. Die DCM zeigt bandartige Infiltrate<sup>5</sup>.

Die Diagnosestellung einer SM erfordert das Vorliegen eines Haupt- und Nebenkriteriums oder den Nachweis von drei Nebenkriterien (Tabelle 3).

**Tabelle 3:** Diagnosekriterien für die kutane und systemische Mastozytose. Für die Bezeichnung müssen ein Haupt- und ein Nebenkriterium oder drei Nebenkriterien erfüllt sein [nach <sup>22</sup>]

<b>Kutane Mastozytose</b>
Typische Hautläsionen = typische klinische Zeichen der CM <u>und</u> ein positiver histologischer Befund mit typischen MC-Infiltraten: multiple / fokal oder diffus
<b>Systemische Mastozytose</b>
<u>Hauptkriterien:</u>
- Multifokale dichte MC-Infiltrate (>15 zusammenliegende MC) im Knochenmark oder anderen extrakutanen Organen
<u>Nebenkriterien:</u>
- Atypische Morphologie der Mastzellen (25% spindelförmige Zellen) innerhalb der MC-Infiltrate
- Detektion von c-Kit-Mutationen in extrakutanen Organen
- MC im Knochenmark exprimieren CD2 oder CD25
- Serumtryptase > 20 µg/l, gilt nicht bei assoziierter klonaler hämatopoetischer Erkrankung

### 1.1.7 Therapie und Prognose der Mastozytose

Gegenwärtig stehen, trotz wachsender wissenschaftlicher Erkenntnisse, keine kurativen Therapieoptionen zur Behandlung der Mastozytose zur Verfügung <sup>1, 3, 25, 26</sup>. Die momentan zum Einsatz kommende medikamentöse Therapie basiert auf einer Reduktion der Mediatorfreisetzung, deren Antagonisierung oder auf einer Reduktion der MC-Anzahl <sup>2, 19, 30</sup>. Klinische Studien zur medikamentösen Behandlung an einem großen Patientenkollektiv fehlen, weil einerseits nicht jede CM einer Therapie bedarf, andererseits die Mastozytose eine geringe Prävalenz zeigt. Aufgrund dessen beruhen die Therapieempfehlungen oftmals auf Einzelfallberichten. Im Kontrast dazu offenbart eine kürzlich publizierte Studie, dass Patienten mit Mastozytose unter stärkeren Symptomen und unter größerer Einschränkung leiden, als bisher vermutet <sup>21</sup>. Dies unterstreicht die Dringlichkeit und Notwendigkeit für die Suche nach neuen Medikamenten zur Behandlung der Mastozytose. Im Folgenden wird die gegenwärtige Therapie der CM aufgezeigt:

Eine wichtige Maßnahme ist die ausführliche Aufklärung des Patienten über die Diagnose, Prognose, mögliche Auslösefaktoren und deren Vermeidung <sup>2, 3, 25, 26</sup>. Die medikamentöse Intervention erfolgt zumeist symptomatisch und richtet sich nach den jeweiligen subjektiven Beschwerden des Patienten <sup>3</sup>. Im Mittelpunkt stehen Kortikosteroide, Antihistaminika und Psoralen-UVA-Phototherapie (PUVA), die im Folgenden näher beleuchtet werden <sup>1, 68</sup>:

Topisch applizierte oder intraläsional injizierte Kortikosteroide können eine Verbesserung der kutanen Symptomatik und eine partielle Regression der Läsionen mit verminderter

Hyperpigmentierung bewirken<sup>2, 6, 19, 30</sup>. Die Effekte sind jedoch temporär limitiert<sup>6, 19</sup>. Aufgrund zahlreicher Nebenwirkungen werden Steroide nur zeitlich begrenzt angewandt. Vor Beginn einer Therapie muss daher eine Nutzen-Risiko-Abwägung erfolgen<sup>6</sup>. Parallel zur Wirkstärke der Steroide steigt die Anzahl und Intensität unerwünschter Nebenwirkungen. Steroide zeigen insbesondere auf die kollagenproduzierenden Fibroblasten des Coriums und auf die Keratinozyten der Epidermis einen antiproliferativen Effekt, der Wachstum und Migration der Zellen inhibiert. Eine direkte Folge ist eine eingeschränkte Barrierefunktion der Hornschicht durch Degeneration der Lipidlamellen des Stratum corneum, wodurch sie eine signifikante Erhöhung des transepidermalen Flüssigkeitsverlustes bedingen<sup>69</sup>. Gelegentlich, bei mehr als 1/100 aber weniger als 1/1.000 Patienten, können beispielsweise nach der Therapie mit dem Steroid Dermoxinale® (Clobetasol-17-propionat) lokale atrophische Veränderungen auftreten<sup>70</sup>. Die atrophischen Hautveränderungen manifestieren sich klinisch mit Ausdünnung und Glanz der Haut, Verlust der Hautlinien, sowie erhöhter Transparenz<sup>71</sup>. Auch Teleangiektasien treten nach mehr als zweiwöchiger Behandlung oder bei großflächiger Applikation auf mehr als 10% der Körperoberfläche und vor allem bei Verwendung von Okklusivverbänden auf<sup>70</sup>. Morphologisch sind die atrophischen Hautveränderungen durch eine ausgedünnte Epidermis gekennzeichnet, die oft auf weniger als die Hälfte der ursprünglichen Dicke reduziert sein kann. Eine begleitende abgeflachte dermo-epidermale-Junktionszone ist ein zusätzliches morphologisches Merkmal<sup>71</sup>. Die epidermale Atrophie ist meist reversibel und kann sich mit pergamentartiger Fragilität der Haut, verzögerter Wundheilung und Hypopigmentierung manifestieren. Die dermale Atrophie ist nur partiell reversibel und durch das Auftreten von Striae rubrae, weißlicher Follikelprominenz, sternförmigen, weißen Pseudonarben und Hypertrichose gekennzeichnet<sup>72</sup>. Klinische Studien berichten über atrophische Hautveränderungen, induziert durch dermale, potente Steroide, die nach 6 Wochen Behandlung auftraten, jedoch reversibel waren und sich zwei bis sechs Wochen nach der Beendigung der Therapie zurückbildeten<sup>73, 74</sup>. Bei langfristiger Anwendung werden außerdem entzündliche Hautphänomene beschrieben. Das Auftreten von Steroidakne, Follikulitis, Ekchymosen, Milienbildung und perioraler Rosazea-ähnlicher Dermatitis ist möglich<sup>69</sup>. Sehr selten (<1/10.000) können Überempfindlichkeitsreaktionen auftreten, die sich als örtlich begrenzte Erytheme, Pruritus, Urtikaria, Brennen oder allergische Kontaktdermatitis manifestieren. Ein weiterer Nachteil der lokalen Applikation von potenten Steroiden ist der Reboundeffekt, der vor allem bei chronischen Dermatosen nach dem abrupten Absetzen der Steroide auftreten kann. Klinisch fassbare systemische Nebenwirkungen treten infolge der dermalen Applikation nur sehr selten, bei weniger als 1/10.000, auf<sup>69, 70, 72</sup>. Vor allem eine langfristige Anwendung von mehr als zwei Wochen, eine großflächige Auftragung von mehr als

10% der Körperoberfläche oder Therapie unter okklusiven Bedingungen kann über die Kapillaren der Haut zu einer systemischen Aufnahme des Wirkstoffes führen. Anzeichen des Hypercortisolismus oder der Nebenniereninsuffizienz können auftreten<sup>70</sup>. Bei maximaler Ausprägung können sie vergleichbar mit denen sein, die bei systemischer Applikation auftreten. Unerwünschte systemische Nebenwirkungen der topischen Steroide können daher Cushing-Syndrom, arterielle Hypertonie, Osteoporose, Dekompensation eines Diabetes mellitus, Glaukom oder Steroidakne sein<sup>72</sup>. Die Lokaltherapie zeigt jedoch gegenüber der oralen Gabe eine deutlich bessere Verträglichkeit<sup>75</sup>. Eine Risikominimierung wird durch die einmal tägliche Applikation des jeweils schwächsten noch wirksamen Steroids über den kürzestmöglichen Zeitraum ohne Okklusion erreicht<sup>69</sup>.

Neben kutanen Symptomen wie Pruritus, Flush oder Quaddelbildung können außerdem Tachykardie, Hypotension oder Dyspnoe durch den Einsatz von H1-Histaminrezeptorantagonisten behandelt werden<sup>1, 3, 6, 24, 76</sup>. Hohe Dosen von H1-Antagonisten können jedoch kardiotoxisch wirken und Herzrhythmusstörungen in Form von *Torsade de pointes* bedingen<sup>3</sup>. H2-Histaminrezeptorantagonisten wie Ranitidin, Famotidin und Cimetidin können durch bessere Kontrolle der gastralen Sekretion insgesamt eine Verbesserung der gastrointestinalen Symptomatik bewirken<sup>1, 2, 18, 24, 30</sup>. Bei einigen Patienten kann die Kombination aus H1- und H2- Antagonisten zu einer Linderung der Symptomatik führen<sup>19</sup>.

Der Wirkmechanismus der Phototherapie ist weiterhin ungeklärt, die Literatur ist in Bezug auf die Auswirkungen auf die MC-Anzahl und den Histamingehalt der Haut widersprüchlich<sup>19</sup>. Eine reduzierte MC-Anzahl und verminderte Histaminfreisetzung aus den MC wird vermutet<sup>1, 19</sup>. Tierexperimentelle Studien zeigten eine temporäre Suppression der MC-Degranulation<sup>3</sup>. Verbesserungen insbesondere der kutanen Symptomatik wurden in Studien infolge PUVA-Phototherapie und nach UVA1-Therapie beschrieben<sup>3, 18, 19, 28</sup>. Die orale PUVA-Phototherapie kann neben einer Linderung des Juckreizes und einer Verminderung der Quaddelbildung außerdem eine Remission der kutanen Läsionen bewirken. Auch hier herrschen die Ergebnisse von Studien mit kleineren Fallzahlen vor und die Ergebnisse sind lediglich temporärer Natur<sup>6, 18, 23</sup>. Verbesserungen von wenigen Wochen bis zu 10 Jahren wurden beschrieben<sup>1, 3, 28</sup>. Neben der rezidivierenden Symptomatik stellt das Langzeitrisiko für maligne Hautveränderungen eine weitere Limitation der Phototherapie dar. Eine Nutzen-Risiko-Abwägung muss daher einer Phototherapie stets vorausgehen<sup>1, 2, 6, 18, 19, 25</sup>.

Neben diesen drei beschriebenen medikamentösen Interventionen existiert eine Vielzahl an klinischen Einzelfallstudien zur Überprüfung weiterer Therapiemöglichkeiten. Beispiele dafür sind Disodium Cromoglycat, Calciumkanal-Blocker wie Nifedipin, Laserbehandlung, ASS und

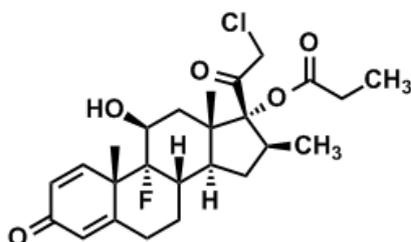
andere nichtsteroidale, antiinflammatorische Medikamente oder die Therapie mit Interferon- $\alpha$  <sup>2, 5-7, 18, 19, 24-26, 76</sup>.

Für die prognostische Beurteilung der Mastozytose spielen das Alter des Patienten bei Manifestationsbeginn und die Art der Mastozytose eine Rolle <sup>3</sup>. Eine CM oder ISM, sowie eine Mastozytose mit frühem Krankheitsbeginn in der Kindheit können als prognostisch günstig eingestuft werden <sup>3, 4</sup>. CM bei Kindern bilden sich fast ausnahmslos zurück, die pädiatrische UP zeigt in ca. 50% der Fälle bis zur Pubertät eine Remission <sup>3</sup>. Im Gegensatz dazu kann bei Patienten mit einer sich im Erwachsenenalter manifestierenden kutanen Form nur selten eine Remission der Läsionen festgestellt werden <sup>7, 20</sup>. 90% der Patienten, bei denen die Mastozytose nach dem 10. Lebensjahr aufgetreten ist, zeigen persistierende MC-Infiltrate <sup>6</sup>. SM verlaufen in der Regel langsam progredient oder bleiben stabil, ohne Einfluss auf die Lebenserwartung <sup>2, 4, 26</sup>. Nur in seltenen Fällen kann eine ISM in eine aggressive Form übergehen. Bei Mastozytosen mit einer zusätzlichen hämatologischen Erkrankung bestimmt diese die Prognose der Erkrankung. Mastzelleukämien und MC-Sarkome weisen wie die ASM eine schlechte Prognose mit verminderter Lebenserwartung auf <sup>3, 26</sup>.

## 1.2 Studienmedikamente

### 1.2.1 Dermoxinale® und dessen Wirkstoff Clobetasol-17-propionat

Die topischen Glukokortikoide fanden nach ihrer erstmaligen Einführung von Hydrokortison durch Silzberger und Witten im Jahre 1952 zunehmende Verbreitung und stellen heute eine der am häufigsten verordneten Untergruppen der topischen Dermatika dar <sup>72, 77</sup>. Kortikosteroide besitzen ein Grundgerüst aus 17 Kohlenstoffatomen, die in Form von vier Ringen, drei Sechser- und einem Fünfering, angeordnet sind. Durch Abwandlungen des Steroidgrundgerüsts entstehen verschiedene Wirkstoffstärkeklassen <sup>72</sup>. Clobetasol-17-propionat (im Folgenden als Clobetasol bezeichnet), ein fluoriertes, sehr potentes Glukokortikosteroid der Klasse IV, besitzt an der Position 17 des Grundgerüsts eine veresterte Hydroxylgruppe. Die Veresterung erhöht die Lipophilie und bedingt gleichzeitig eine verbesserte antiphlogistische Wirkung <sup>69, 77</sup>.



**Abbildung 9:** Strukturformel von Clobetasol

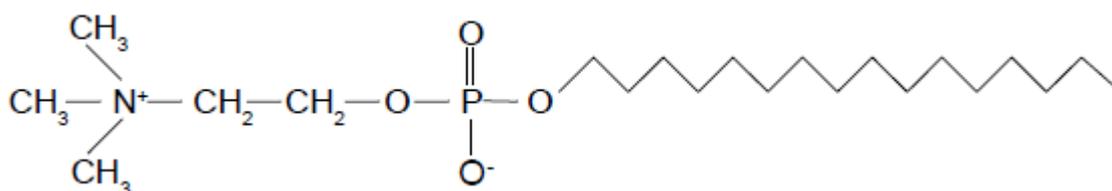
Die atopische Dermatitis, Lichen sclerosus und die moderate bis schwere Psoriasis sind Hauterkrankungen, bei denen Clobetasol bereits mit guter Wirksamkeit topisch appliziert wird. Auch andere ekzematöse Hautveränderungen wie die allergische Kontaktdermatitis, der diskoidale Lupus erythematosus, Alopecia areata totalis und universalis wurden erfolgreich mit Clobetasol behandelt. Die Therapie mit Steroiden ist hauptsächlich symptomatisch ausgerichtet. Es wirkt über immunsuppressive, antiinflammatorische und antimittotische Effekte, die das Wachstum, die Differenzierung und die Funktion der verschiedenen Zellen beeinflussen und die Produktion von Zytokinen inhibieren können <sup>77</sup>.

Die meisten Effekte der Glukokortikoide werden über den zytosolischen Glukokortikoidrezeptor (GR) vermittelt, über den die Genexpression entweder positiv oder negativ reguliert werden kann <sup>78</sup>. Im Zytoplasma liegt der GR in einer inaktiven, nicht-steroidhormongebundenen Form vor und bildet mit anderen Proteinen, wie dem Hitzeschockprotein 70, einen Komplex. Glukokortikoide diffundieren durch die Zellmembran, binden an den GR und bedingen eine Konformationsänderung. Dadurch löst sich der GR aus dem Komplex und wandert in den Nukleus, bindet an Elemente der DNA und beeinflusst über verschiedene Wege die Expression von Genen <sup>69</sup>. Es werden drei verschiedenen Mechanismen für die Regulation der Genexpression beschrieben. Einerseits kann die Transkription durch Bindung an Bereiche innerhalb der Promotorstruktur bestimmter Gene, den *glucocorticoid response elements* (GRE) und negativen GRE (nGRE), aktiviert oder reprimiert werden. Auf diese Weise können Glukokortikoide die Expression von verschiedenen antiinflammatorischen Proteinen induzieren, wie z.B. IL-1-Rezeptorantagonist, Prostaglandinsynthese inhibierendes Lipocortin-1 oder IκBα, der zu einer Inhibition des Transkriptionsfaktors *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells* (NFκB) führt <sup>78</sup>. Demgegenüber können Glukokortikoide eine Repression der Genexpression beispielsweise von Zytokinen wie IL-1 bis IL-6, IL-9, IL-11 bis IL-13, IL-16 bis IL-18, TNF, GM-CSF, SCF und auch von Chemokinen, bedingen <sup>79</sup>. Das zweite Wirkprinzip ist der DNA-bindungsunabhängige Mechanismus, bei dem der ligandengebundene GR über Protein-Protein-Wechselwirkungen mit anderen Transkriptionsfaktoren interagiert. In diesem Zusammenhang kommt es zu einer GR-vermittelten Inhibition von beispielsweise *Activating Protein-1* oder NFκB, die beide normalerweise die Aktivität verschiedener Zytokine stimulieren. Der dritte Mechanismus erfolgt durch die Interferenz mit Signaltransduktionswegen. Einen zentralen Stellenwert nimmt dabei der MAP-Kinase-Signalweg ein. Glukokortikoide induzieren die Expression eines Inhibitors des MAP-Kinase-Signalweges, die MAP-Kinase Phosphatase-1. Diese bewirkt eine Hemmung von JNK, ERK und p38 MAP-Signaltransduktionswege, die auch an der Degranulation der MC beteiligt sind <sup>79</sup>. Als weiterer Mechanismus der Wirkung von

Glukokortikoiden wird eine reduzierte Expression der MC-Oberflächenrezeptoren FcεRI vermutet, die wahrscheinlich auf einer posttranskriptionalen Modifikation beruht und mit einer verminderten Degranulation einhergeht<sup>74</sup>. Zusätzlich wird in der Literatur eine Verminderung der MC-Anzahl im Gewebe nach Therapie mit Glukokortikoiden berichtet. Diese MC-Reduktion beruht auf einer erhöhten Apoptoserate, die vermutlich durch eine Herunterregulierung der lokalen SCF-Produktion aus Stromazellen, wie Fibroblasten, induziert wird<sup>73, 80</sup>.

### 1.2.2 Miltex® und dessen Wirkstoff Miltefosin

Die Substanzgruppe der Etherlipide gliedert sich in die Klasse der Alkylphosphocholine (APC), zu denen das synthetische Derivat Hexadecylphosphocholin (HePC) Miltefosin (Miltex®) zählt und in die Alkyllysophospholipide (ALP)<sup>81-84</sup>.



**Abbildung 10:** Strukturformel von HePC, Miltefosin. Es besitzt eine Phosphocholingruppe, die direkt über eine Etherverbindung mit einer C16 Kette verknüpft ist.

Miltefosin ist das erste, auf einer Phospholipid-ähnlichen Struktur basierende Medikament, das antineoplastische Aktivität besitzt<sup>85</sup>. ALP und APC sind zytostatisch und zytotoxisch wirksam und können eine Differenzierung von Tumorzellen, die Inhibition von Tumorzellinvasion und Tumorneoangiogenese bedingen. Nebenwirkungen wie die Myelotoxizität, die sonst bei DNA-schädigenden Chemotherapeutika auftreten, werden durch ALP und APC nicht hervorgerufen. Sie stimulieren das Wachstum hämatopoetischer Vorläuferzellen und führen bei systemischer Gabe zu Leukozytose und Thrombozytose<sup>86</sup>. Miltefosin übt neben der zytotoxischen Aktivität ebenfalls eine geringe Toxizität auf normale Zellen aus<sup>87</sup>. Neben dem Einsatz von Miltefosin bei der Behandlung von Tumorerkrankungen zeigt oral appliziertes Miltefosin außerdem eine hohe Wirksamkeit bei parasitären Erkrankungen wie der viszeralen und kutanen Leishmaniose<sup>81-84, 88, 89</sup>. Um Nebenwirkungen wie die gastrointestinale Toxizität und die hämolytische Aktivität von Miltefosin zu minimieren, wurde HePC für die topische Applikation entwickelt<sup>90</sup>. Im Jahre 1980 erfolgte die Einführung von Miltefosin in klinische Studien, in denen seine topische Applikation

bei Patienten mit Hautmetastasen des Mammakarzinoms gute Wirksamkeit zeigte<sup>85</sup>. Gegenwärtig wird es bei der Behandlung von kutanen Metastasen des Mammakarzinoms und anderer maligner Läsionen dermal eingesetzt<sup>90</sup>.

Der genaue Wirkmechanismus von Miltefosin ist derzeit noch nicht vollständig verstanden. Die Etherlipide wirken im Gegensatz zu anderen konventionellen Chemotherapeutika nicht an der DNA, sondern an der Zellmembran. Multiple Angriffspunkte, wie eine Störung des Phospholipidmetabolismus, des Membranaufbaues und der Signaltransduktionswege, die unter anderem die Zellproliferation, das Zellüberleben und Apoptose beeinflussen, wurden postuliert und werden im Folgenden beschrieben<sup>86</sup>:

Phosphatidylcholin (PC) ist ein wichtiger, struktureller Bestandteil biologischer Membranen und an der Bildung von Membranphospholipiden, wie Phosphatidylethanolamin und Sphingomyelin, beteiligt. Studien zeigen, dass APC und ALP die PC-Biosynthese durch Hemmung der *phosphocholine cytidyltransferase (CTP)* inhibieren. Eine Folge ist die Hemmung der Sphingomyelinsynthese. Diese spielt jedoch eine wichtige Rolle für die beschriebenen cholesterol- und sphingolipidreichen Mikrodomänen, den *Lipid Rafts*. Außerdem akkumulieren Ceramide als Vorstufen des Sphingomyelins und können dadurch Zytostase und Apoptose bedingen<sup>83, 91-94</sup>.

Die Wirksamkeit bei Tumorerkrankungen ergibt sich unter anderem aus der Aktivierung des *Jun-N-terminal-Kinase (JNK/SAPK)*-Signalweges, welcher Zelltodmechanismen fördert, sowie durch eine Inhibition von proliferationsfördernden Signalwegen, wie dem MAPK/ERK-Weg.

Ferner konnte gezeigt werden, dass ALP und APC den PI3K/PKB-Weg inhibieren. Dieser Signalweg wies in zahlreichen Tumorzellen eine erhöhte Expressivität auf. Eine Inhibition stellt daher einen vielversprechenden Ansatz zur Hemmung des Tumorwachstums dar. PI3K phosphoryliert normalerweise Phosphoinositide und katalysiert die Umwandlung von PIP<sub>2</sub> in PIP<sub>3</sub>. Dabei gebildete *second messenger*, wie die Phosphatidylinositoltriphosphate, binden an die nachgeschalteten Phosphatidylinositol-abhängigen Kinasen PKB<sub>1</sub> und PKB<sub>2</sub>. Diese Bindung induziert die Verlagerung der Kinasen an die Plasmamembran und bewirkt eine Aktivierung der Proteinkinase B (PKB/Akt) als Effektor kinase. PKB/Akt hat die Fähigkeit zahlreiche Zellantworten, die das Wachstum und Überleben der Zelle betreffen, zu regulieren und modulieren. Daher ist der PKB/Akt-Signalweg essentiell für das Überleben der Zellen, beispielsweise indem *mammalian target Rapamycin* aktiviert wird, was die Translation von Proteinen, die für die Zellzyklusprogression von Bedeutung sind, beeinflusst. Im Gegensatz dazu werden Apoptosesignale gehemmt, indem proapoptische Proteine, wie die Caspase 9, inhibiert werden. Ferner kommt es über den PKB/Akt-Signalweg zu einer gesteigerten Expression von

angiogenetischen Signalproteinen, wie beispielsweise dem *vascular endothelial growth factor* (VEGF), welcher die Tumorangiogenese stimuliert<sup>86, 95, 96</sup>.

Experimentell konnte gezeigt werden, dass Miltefosin außerdem eine inhibitorische Wirkung auf die PKC ausübt. PKC ist eine Serin/Threonin-Kinase, deren Aktivierung unter Beteiligung der PLC $\gamma$  durch plasmamembranassoziierte Signalkaskaden erfolgt. Wie oben beschrieben, setzt die PLC $\gamma$  aus PIP<sub>2</sub> DAG und IP<sub>3</sub> frei. IP<sub>3</sub> bewirkt die Freisetzung von Ca<sup>2+</sup>, welches zusammen mit DAG zu einer Aktivierung der PKC führt. Auch der oben beschriebene Weg der PI3K kann eine Aktivierung der PKC auslösen. Aktivierte PKC kann in die Regulation der Transkription, der Zellproliferation, des Zellzyklus und der Invasion eingreifen und bewirkt darüber hinaus eine Aktivierung der MAPK/ERK-Signalkaskade. Diese Kaskade mündet durch Translokation der aktivierten MAPK in den Zellkern, in einer Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren und folglich in einer Erhöhung der Transkription bestimmter Gene, die für das Zellwachstum, die Differenzierung und die Proliferation von Bedeutung sind. In zahlreichen Tumoren, wie z.B. Brust-, Lungen- und Magenkarzinomen, sowie malignen Hirntumoren, konnte eine gesteigerte Expression und Aktivität der PKC nachgewiesen werden. Durch Inhibition der PKC konnte in Studien eine Reduktion der Zellproliferation und eine verminderte Invasion von Tumorzellen aufgezeigt werden<sup>86, 92, 95, 97</sup>.

Außerdem konnte eine ALP-bedingte Inhibition der phosphoinositide-spezifischen PLC (PI-PLC), zu denen auch die PLC $\gamma$  gehört, gezeigt werden. Sie sind für die Mobilisierung von Ca<sup>2+</sup> und Aktivierung der PKC verantwortlich<sup>95</sup>.

Neben den bereits beschriebenen ALP-vermittelten Effekten, wurde auch eine Wirkung auf Fas und auf Oberflächenrezeptoren wie dem *epidermal growth factor receptor* (EGF-Rezeptor) und dem GM-CSF-Rezeptor beschrieben und darüber hinaus eine erhöhte Etherlipid-bedingte Aktivierung von Makrophagen postuliert<sup>85, 90, 91, 93, 95</sup>.

Diese Ausführungen zeigen, dass Miltefosin und seine Analoga nicht nur eine wichtige Rolle bei der Induktion der Apoptose und infolgedessen bei der Tumorthherapie spielen, sondern auch Effekte auf zelluläre Prozesse ausüben, die für die IgE-abhängige und -unabhängige MC-Aktivierung essentiell sind. Dazu gehört z.B. die beschriebene Inhibition der PI-PLC, PLC $\gamma$ , PKC und PI3K. Zusätzlich werden proliferationsfördernde Signalwege, wie der MAPK/ERK-Weg inhibiert.

Neuere Publikationen beschreiben neben den erwähnten Wirkmechanismen außerdem eine Wechselwirkung von Miltefosin und seinen Analoga mit den *Lipid Rafts*. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass die amphiphilen APC in die *Lipid Rafts* gelangen und anschließend durch *Raft*-abhängige Endozytose internalisiert werden<sup>81, 86, 93, 98</sup>. Die

Akkumulation in der Zellmembran wird durch die Etherverbindungen ermöglicht, welche sie vor dem schnellen Umsatz durch Phospholipasen schützen<sup>81, 93</sup>. Darüber hinaus konnten Wechselwirkungen von Miltefosin mit Lipiddomänen in Modellmembranen beschrieben werden. Rakotomanga *et al.* untersuchten experimentell die Wirkung von HePC auf ein aus Palmitoyloleylphosphatidylcholin (POPC) oder Sterol bestehendes Membranmodell. Es konnte gezeigt werden, dass sich HePC-Moleküle als Monomere in die Molekularschicht des Modells einfügen und sich als Gruppen von Monomeren in der POPC- oder Sterolschicht verteilen. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass sich HePC in Membranen integrieren und mit Sterol, zu dem es eine große Affinität hat, interagieren kann<sup>88</sup>. Zusätzlich konnten Heczkova *et al.* experimentell zeigen, dass HePC palmitoyl-sphingomyelin- / cholesterolreiche Domänen gegen temperaturinduzierte Schmelzung stabilisieren und wahrscheinlich die Bestandteile der *Lipid Rafts* beeinflussen oder verändern kann<sup>93</sup>. An humanen leukämischen Zellen wurde gezeigt, dass Etherlipide die Fähigkeit haben, die Struktur von *Rafts* zu modifizieren<sup>99</sup>. Ausili *et al.* zeigten, dass Edelfosin, der Prototyp der APC, in hohen Konzentrationen in *Rafts* von leukämischen Zellen akkumuliert. Bei solch hohen Konzentrationen ist Edelfosin fähig eine Vielzahl von Bestandteilen der Lipidmembranen zu beeinflussen und eine Reorganisation der *Rafts* zu bewirken<sup>100</sup>. Nach der Zugabe von Edelfosin kam es neben der Translokation von Sterol aus der Plasmamembran in das Innere der Zelle zusätzlich zu einem Verlust der Pma1P, einer essentiellen H<sup>+</sup>-ATPase der *Rafts*. Es bewirkt dadurch eine Veränderung der Bestandteile der Mikrodomänen<sup>94</sup>.

Schlussfolgernd lässt sich festhalten, dass *Lipid Rafts* durch die oben beschriebene Interaktion mit FcεRI, dem Kit-Rezeptor, sowie den t-SNARE Proteinen, essentieller Bestandteil der Signaltransduktion und Degranulation sind<sup>49, 101</sup>. Der Einsatz von Miltefosin kann Wechselwirkung mit den *Lipid Rafts* bedingen und diese modifizieren. Viele Komponenten, die eine wichtige Rolle bei der IgE-abhängigen und auch IgE-unabhängigen MC-Degranulation spielen - wie PKC, PI3K, Grb2, LAT oder G-Proteine - sind innerhalb der *Lipid Rafts* lokalisiert. Es ist zu vermuten, dass durch eine Miltefosin-bedingte Modifizierung der *Lipid Rafts* nicht nur die beschriebenen Signalwege, sondern auch die in den *Lipid Rafts* enthaltenen Komponenten beeinflusst werden und auf diese Weise die MC-Signaltransduktion und -Degranulation beeinträchtigt wird. Zusätzlich inhibiert Miltefosin direkt Enzyme wie die PKC oder PI-PLC und folglich Signaltransduktionswege, die an der MC-Degranulation beteiligt sind. Auch Signalwege, die das Überleben und die Differenzierung der MC fördern, werden gehemmt. Es ist daher zu vermuten, dass Miltefosin mindestens über einen dieser multiplen Ansatzpunkte in MC

*Raft*-kontrollierte Signaltransduktionswege beeinflussen und auf diese Weise die MC-Degranulation inhibieren kann.

### 1.2.3 Hametum® Extrakt und dessen Wirkstoff Hamamelis

Hametum® Extrakt enthält die rein pflanzlichen Wirkstoffe der *Hamamelis virginiana* und kommt bei der Behandlung kleinflächiger Hautverletzungen und Entzündungen zur Anwendung. Es soll antiphlogistisch, adstringierend und lokal hämostyptisch wirken. Eine Wirksamkeit von Hametum® Extrakt auf die Symptomatik der CM ist nicht bekannt.

### 1.3 Herleitung der Fragestellung

Die Beobachtungen, dass Miltefosin und andere Etherlipide Signaltransduktionsprozesse inhibieren können und mit *Rafts*, die eine wichtige Rolle bei der Signaltransduktion spielen, interagieren, dienten für das biopharmazeutische Unternehmen JADO als Arbeitsgrundlage zur Entwicklung des *Raft*-Interventionstherapeutikums Miltefosin und dessen Anwendung bei MC-vermittelten Erkrankungen, wie der Mastozytose. Es ist zu vermuten, dass die Hemmung der *Raft*-kontrollierten Signaltransduktionsprozesse einen möglichen Wirkmechanismus von Miltefosin an MC darstellt. Diese multiplen Angriffspunkte machen Miltefosin als Therapeutikum bei der Behandlung von MC-vermittelten Erkrankungen, wie der Mastozytose, attraktiv.

Die Wirkung von Miltefosin auf die MC-Aktivierung und -Degranulation konnte bereits in experimentellen Studien aufgezeigt werden. Grosman konnte nachweisen, dass Miltefosin die Freisetzung von Histamin aus isolierten Ratten-MC, getriggert durch Calcium Ionophore A23187 und Compound 48/80, inhibieren kann<sup>102, 103</sup>.

Die Effekte von Miltefosin auf humane MC wurden außerdem im Rahmen der vorausgegangenen Studie *Miltefosine effects on human skin mast cell activation* (MIMACT) untersucht. Die Hypothese, dass Miltefosin eine Inhibition der MC Aktivierung und eine Hemmung der Mediatorfreisetzung bedingen kann, wurde zunächst *in vitro* überprüft. Dazu erfolgte bei vorausgegangener Inkubation mit Miltefosin und nach Stimulation mit anti-IgE, Substanz P, C5a und Calcium Ionophore die Messung der bewirkten Mediatorfreisetzung aus C57-Zellen, einem Modell aus murinen Zellen mit humanem IgE-Rezeptor, sowie aus humanen Hautmastzellen und basophilen Granulozyten. Die freigesetzten Metabolite wie Histamin, Prostaglandin D<sub>2</sub> (PGD<sub>2</sub>) als Arachidonsäurederivat, sowie TNF und andere Zytokine wurden gemessen.

Mit Hilfe dieser experimentellen Untersuchungen konnte eine inhibitorische Wirkung auf die IgE-abhängige oder -unabhängige Histaminfreisetzung in allen untersuchten Zelltypen aufgezeigt werden. Im Einzelnen konnte gezeigt werden, dass Miltefosin die IgE-induzierte Histaminfreisetzung aus humanen MC dosisabhängig, mit einem maximalen Effekt bei 25  $\mu$ M und zeitunabhängig inhibiert. Selbst kurze Präinkubationszeiten führten zu einem maximalen inhibitorischen Effekt, vergleichbare Ergebnisse waren auch nach 30 und 60 Minuten zu verzeichnen. Zusätzlich konnte die Substanz P-vermittelte Histaminfreisetzung durch Miltefosin dosisabhängig und zeitunabhängig inhibiert werden. Bei humanen MC, nicht aber bei Basophilen konnte ein inhibitorischer Effekt auf die anti-IgE induzierte Zytokinfreisetzung beschrieben werden. Auch die anti-IgE induzierte Histaminfreisetzung aus Basophilen konnte statistisch signifikant dosis-, aber nicht zeitabhängig gehemmt werden. Nur in basophilen Zellen, nicht aber in humanen MC konnte eine Inhibition der IgE-vermittelten Freisetzung von Arachidonsäurederivaten nachgewiesen werden. Die durch C5a induzierte Histaminfreisetzung aus Basophilen wurde statistisch signifikant zeit- und dosisabhängig inhibiert. Bei der Zelllinie C57 wurde ein dosis- und zeitabhängiger, statistisch signifikanter, inhibitorischer Effekt von Miltefosin auf die Histaminfreisetzung, ausgelöst durch IgE und Calcium Ionophore A23187, dargestellt.

Neben den experimentellen Untersuchungen erfolgte zusätzlich eine klinische Pilotstudie. In diesem Rahmen wurden mögliche inhibitorische Effekte auf IgE- und MC-abhängige Hautreaktionen nach der Vorbehandlung mit topisch appliziertem Miltefosin überprüft. Auf den Unterarmen von fünf Probanden wurden *Skin Prick Tests* (SPT) mit Positivkontrollen (Histamin), Negativkontrollen (NaCl-Lösung) und Allergenen durchgeführt. Zwei Stunden vor dem SPT erfolgte eine doppelblinde Auftragung von 6%iger Miltefosinlösung auf einem Unterarm (2 Tropfen auf 16 cm<sup>2</sup>), sowie die doppelblinde Applikation eines Placebos in Form von NaCl auf dem anderen Unterarm. Zur Beurteilung der Wirksamkeit von Miltefosin wurden die Durchmesser der beim SPT entstandenen Quaddeln und der Erytheme gemessen und volumetrische, sowie thermographische Messungen durchgeführt. Die Durchmesser der Quaddeln und Erytheme, die durch Allergene induziert wurden, waren innerhalb der mit Miltefosin vorbehandelten Areale im Vergleich zum Placebo signifikant kleiner ( $p=0,023$ ). Im Gegensatz dazu konnte der Durchmesser der durch Histamin induzierten Quaddel innerhalb des mit Miltefosin vorbehandelten Areals im Vergleich zum Placebo nicht statistisch signifikant reduziert werden. Gleiches gilt für den Durchmesser des durch Histamin induzierten Erythems. Die volumetrischen Messungen bestätigten die makroskopische Evaluation der Quaddeln. Mit Hilfe der objektiven thermographischen Messungen konnte tendenziell, jedoch ohne statistische

Signifikanz, eine abgesunkene Maximaltemperatur in den durch Allergene induzierten Quaddeln nach der Vorbehandlung mit Miltefosin aufgezeigt werden. Mit Hilfe von MIMACT konnte gezeigt werden, dass *Raft*-Interventionstherapeutika wie Miltefosin das Potential besitzen, die Aktivierung und Degranulation der MC *in vitro* zu hemmen. Zusätzlich kann die dermale Vorbehandlung mit 6%iger Miltefosinlösung die IgE-abhängige MC-Stimulierung *in vivo* inhibieren<sup>104</sup>.

#### 1.4 Fragestellung

Aufgrund jüngster wissenschaftlicher Erkenntnisse, dass *Rafts* essentielle Bestandteile bei der Signaltransduktion der MC-Degranulation sind, wurde die Wirkung des *Raft*-Interventionstherapeutikums Miltefosin auf die MC experimentell im Rahmen einer Phase I Studie und innerhalb einer *in vivo* Pilotstudie untersucht. Neben einer hohen Wirksamkeit von Miltefosin bei der Behandlung parasitärer Erkrankungen, Hautmetastasen des Mammakarzinoms oder kutanen Veränderungen des T-Zell-Lymphoms, bestärkten uns vor allem die im Rahmen der Phase I Studie und Pilotuntersuchung gewonnenen, vielversprechenden Ergebnisse in der Hypothese, dass Miltefosin eine Wirkung auf MC im Rahmen MC-vermittelter Erkrankungen wie der Mastozytose ausübt. Zwar zeigen die innerhalb der MIMACT-Studie gewonnenen Ergebnisse keine vollständige Inhibition, doch bedingt Miltefosin eine Reduktion der anti-IgE-abhängigen und -unabhängigen Histaminfreisetzung bei humanen MC *in vitro*. Auch die Beobachtung, dass Miltefosin keinen Einfluss auf die PGD<sub>2</sub>-Freisetzung ausübt, lässt vermuten, dass Miltefosin keine vollständige Regression von MC-Mediator-bedingten Symptomen, jedoch eine Reduktion bewirken kann. Über die beschriebenen Wirkmechanismen vermuten wir daher eine Miltefosin-vermittelte Reduktion der Mediatorfreisetzung, die am Beispiel von MC-Mediator-bedingten Symptomen, wie sie bei der CM auftreten, beleuchtet werden soll. Zur Überprüfung der Hypothese wird Miltefosin im Rahmen der *Miltefosine in Cutaneous Mastocytosis* (MICUMA) - Studie bei Patienten mit CM oder ISM mit Hautmanifestation in einer Dosierung, wie sie bereits bei der Therapie von Hautmetastasen des Mammakarzinoms zum Einsatz kommt, 14-tägig dermal appliziert. Ziel dieser Phase II Studie ist es, einen Effekt von Miltefosin in Form einer Reduktion der subjektiv beurteilten Parameter Quaddelbildung, Erythementwicklung und Juckreiz nach mechanischer Reizung aufzuzeigen. Ferner werden an einer Subpopulation objektive Verfahren in Form der dreidimensionalen Oberflächenmessung, der Volumetrie, sowie der Thermografie durchgeführt. Hautprobeentnahmen am Ende der Studie werden durchgeführt, um die Wirkung von Miltefosin auf die MC-Anzahl aufzeigen. Ophthalmologische und körperliche Untersuchungen, sowie sonographische Messungen dienen

neben Blutentnahmen als Sicherheitsparameter möglicher Nebenwirkungen. Die Wirksamkeit von Miltex®, das den Wirkstoff Miltefosin enthält, wird mit der Positivkontrolle Dermoxinale®, ein bereits bei der Therapie der Mastozytose eingesetztes Steroid und dem Hautpflegeprodukt Hametum® Extrakt als Negativkontrolle verglichen.

Ziele der Studie sind:

1. Erfassung der Wirksamkeit von Miltex® im Vergleich zum Hametum® Extrakt
2. Erfassung der Wirksamkeit von Miltex® im Vergleich zu Dermoxinale®
3. Erfassung der Verträglichkeit und Sicherheit von Miltex® im Vergleich zu Dermoxinale®

---

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Studiendesign

Zur Evaluation der Wirksamkeit und Sicherheit von lokal appliziertem, liquidem Miltefosin bei der Behandlung der CM bzw. der indolenten systemischen Form mit Hautmanifestation wurde eine multizentrische Phase II Studie durchgeführt. Insgesamt waren fünf nationale Zentren in die Studie involviert. Investigatoren waren der Studienkoordinator Herr Prof. Dr. med. Maurer der Charité – Universitätsmedizin Berlin, sowie Prüfarzte an den Zentren der Universitäts-Hautklinik Mainz, Köln, der Ludwig-Maximilians Universität München und der Technischen Universität München. An allen benannten Zentren wurde eine randomisierte, doppelblinde, plazebo- und aktivkontrollierte Studie mit intraindividuellem Vergleich durchgeführt. Sponsor der MICUMA-Studie war das auf die Entwicklung und Implementierung von Raft-Interventionstherapeutika spezialisierte Unternehmen JADO Technologies GmbH mit Firmensitz in Dresden. Die vom Sponsor ursprünglich vorgegebene Studienzeit begann am 20. April 2007 und sollte bis Juli 2007 reichen. Da es sich um eine explorative Studie handelt, wurde keine formelle Stichprobenplanung vorgenommen. Mit der geplanten Stichprobengröße von 28 Patienten kann ein mittelgroßer Effekt von 0,5 Standardabweichungen auf einem einseitigen Signifikanzniveau von 5% mit einer Power von 80% (gepaarter T-Test) nachgewiesen werden. Unter Berücksichtigung einer Ausfallrate von 5% wurde mit einem Einschluss von 30 Patienten geplant, entsprechend sechs Patienten pro Zentrum. Ausfälle wurden nicht ersetzt. Die gesamte Studie wurde gemäß dem ethischen Prinzip „*Good Clinical Practice*“ mit Ursprung in der Deklaration von Helsinki durchgeführt. Die Genehmigung der Studie erfolgte durch die Ethik-Kommissionen der jeweiligen Zentren. Zuständige Institution der Berliner Charité war das Landesamt für Gesundheit und Soziales, Geschäftsstelle der Ethik-Kommission des Landes Berlin (EudraCT Studiennummer:2006-006704-10). Die ordnungsgemäße Durchführung der Studie und die fehlerfreie Dokumentation der Daten wurden vor, während und nach der Studie durch Monitoring-Besuche überprüft.

### 2.2 Studienpatienten

Patienten, die in den Datenbanken der jeweiligen Zentren mit einer positiven Diagnose hinsichtlich der Mastozytose registriert waren und keine offensichtlichen Ausschlusskriterien aufwiesen, wurden über die Durchführung der Studie mittels Informationsschreiben benachrichtigt. Diese Patienteninformation beinhaltete eine umfassende Erklärung des

Studienablaufes, sowie der Studienziele und klärte über mögliche Risiken der Behandlung auf. Ferner erfolgte eine Woche später der telefonische Kontakt. Zeitgleich wurden Informationen zur Studie im Internet veröffentlicht.

### **2.2.1 Einschlusskriterien**

Voraussetzung für die Teilnahme an der MICUMA-Studie war das Vorliegen einer chronischen, stabilen, symptomatischen, makulopapulösen CM oder einer indolenten systemischen Form mit Hautbeteiligung. Bedingung war zudem das Vorliegen eines positiven Darier-Zeichens. Das genannte klinische Bild musste auf mindestens drei Feldern mit einer Größe von jeweils 50 cm<sup>2</sup> existieren, wobei intertriginöse Areale und das Gesicht als mögliche Behandlungsfelder ausgeschlossen wurden. Die drei Hautareale sollten darüber hinaus einen annähernd gleich stark ausgeprägten Hautbefund aufweisen. Ein ansonsten unauffälliger körperlicher Untersuchungsbefund, sowie ein Alter über 18 Jahre stellten weitere zu erfüllende Einschlusskriterien dar. Zudem musste bei gebärfähigen Frauen eine zuverlässige kontrazeptive Maßnahme während und mindestens 6 Monate nach Beendigung der Studie nachgewiesen werden. Eine Einverständniserklärung zur freiwilligen Teilnahme an der Studie musste von allen Probanden unterschrieben werden.

### **2.2.2 Ausschlusskriterien**

Allgemeine Ausschlusskriterien waren das Vorliegen einer Schwangerschaft, das Stillen während der Studienzeit, die Teilnahme an anderen Studien innerhalb der zurückliegenden 30 Tage, die Unterbringung in psychiatrischen Einrichtungen, sowie die Inhaftierung im Gefängnis während der Studienzeit. Patienten mit Bilirubinwerten  $\geq 1,5$  mg/dl, Serumkreatininwerten  $\geq 1,5$  mg/dl, Alanin- (ALT) und Aspartataminotransferasewerten (AST), die das 1,5-fache der Referenzwerte überstiegen oder Patienten mit klinisch signifikanten Abnormitäten hinsichtlich des Blutbildes, waren ebenfalls zu keiner Teilnahme an der Studie berechtigt. Weitere Kriterien, die eine Teilnahme ausschlossen, waren die Erkrankung an einer ASM, das Vorliegen anderer dermatologischer Erkrankungen im Bereich der während der Studienzeit behandelten Areale, implantierte Fremdkörper (z.B. Brustprothesen) im Bereich der Behandlungsfelder, sowie maligne Hauterkrankungen. Bekannte Allergien gegen Inhaltsstoffe der angewandten Medikamente, pathologische Befunde der Retina in der vergangenen oder gegenwärtigen Krankengeschichte, psychiatrische Erkrankungen, Alkohol- oder Drogenabusus, sowie Strahlentherapie in den vorangegangenen vier Wochen stellten weitere Ausschlusskriterien dar. Patienten mit Erkrankungen, die das Immunsystem betreffen - wie z.B. HIV- und Patienten, die

in den letzten vier Wochen vor Studienbeginn an einer chronischen oder akuten Erkrankung litten, welche eine systemische, die Studienergebnisse beeinflussende Medikamenteneinnahme erforderte, waren ebenfalls zu keiner Teilnahme berechtigt. Außerdem war eine Anwendung bestimmter Medikamente vor bzw. während der Studie untersagt:

- *Drei Tage* vor Beginn der Applikation der Studienmedikation und während der Studie: Lokale Medikamente zur Behandlung der Testareale, Leukotrienantagonisten, wie z.B. Montelukast, H1- und H2-Antihistaminika. Pflegeprodukte waren gestattet.
- *Zwei Wochen* vor Beginn der Studienmedikationsapplikation und während der Studie: Ketotifen, Doxepin
- *Vier Wochen* vor Beginn der Applikation der Studienmedikation und während der Studie: Topische Kortikosteroide im Bereich der Testareale, UV-Therapie einschließlich PUVA, systemische Immunsuppressiva
- *Zwölf Wochen* vor Beginn der Applikation der Studienmedikation und während der Studie: Medikamente, die das ZNS aktivieren, Astemizol, Tranquilizer, Antidepressiva, Sedativa, Hypnotika, Antiepileptika, nichtsteroidale antiinflammatorische Medikamente, Medikamente, die beispielsweise durch Wirkung auf MC die Studienergebnisse beeinflussen können.

### 2.2.3 Abbruchkriterien

Das Auftreten von allergischen Reaktionen gegen Inhaltstoffe der applizierten Medikamente, eine klinisch relevante Verschlechterung in den behandelten Arealen, Hinweise auf Drogen- oder Alkoholabusus, eine Schwangerschaft oder *Non-Compliance* wurden als Kriterien bestimmt, die zum sofortigen Absetzen der Studienmedikation, sowie zum Ausschluss des Patienten von der Studie führen. Entsprechendes galt für Patienten, die während der Behandlung klinisch signifikante Veränderungen des Blutbildes zeigten (Erythrozyten  $< 2 \times 10^{12}/l$ , Thrombozyten  $< 50 \times 10^9/l$ , Leukozyten  $< 2 \times 10^9/l$ ).

## 2.3 Studienmedikation

### 2.3.1 Applikation

Die Studienmedikamente Miltex®, Dermoxinale® und Hametum® Extrakt wurden über einen Zeitraum von zwei Wochen, jeweils morgens und abends, auf je eines der drei 50 cm<sup>2</sup> großen Testareale aufgetragen. Die Applikation erfolgte epikutan, nicht-okklusiv. Nach dem Auftragen der farblosen, leicht viskösen Flüssigkeiten wurden diese mit Hilfe von Einweghandschuhen,

von denen für jede Flasche und Anwendung neue verwendet werden sollten, unter leichtem Druck in die Haut einmassiert. Die Patienten wurden dazu angehalten die behandelten Areale mehrere Stunden nach dem Auftragen nicht zu waschen. Pro 10 cm<sup>2</sup> wurden 2 Tropfen der jeweiligen Studienmedikation appliziert, entsprechend 10 Tropfen pro Testareal und Applikation. Diese verabreichte Tropfenmenge für Miltex® orientiert sich an den Empfehlungen der „*summary of product characteristics*“ bei der Behandlung von Hautmetastasen im Rahmen des Mammakarzinoms, jedoch in einem deutlich kürzeren Zeitraum. Entsprechend wurden die Applikationsmengen von Dermoxinale® und Hametum® Extrakt angepasst.

### 2.3.2 Medikamente

Alle verwendeten Medikamente wurden bei der Firma *OUTPUT Pharma Services GmbH* (Aachen, Germany) erworben.

Miltex® (Genehmigungsnummer: 24202.00.00, 24204.00.00) ist ein Produkt der Firma *Baxter Oncology GmbH*. Neben dem Wirkstoff Miltefosin enthält Miltex® außerdem 3-Propoxypropan-1,2-diol, 3-Hexyloxypropan-1,2-diol, 3-Nonyloxypropan-1,2-diol, Zitronensäure, Natriumhydroxid, sowie gereinigtes Wasser. Miltex® enthält pro 1 ml, entsprechend 40 Tropfen, 60 mg Miltefosin. Die während der Studie täglich applizierten 20 Tropfen entsprechen somit 0,5 ml Miltex® oder 30 mg Miltefosin <sup>105</sup>.

Dermoxinale® Lösung (Genehmigungsnummer: 6080252.00.00) ist ein Produkt der Firma *GlaxoSmithKline GmbH & Co KG* und *Effipharm GmbH*. Als aktiven Wirkstoff enthält Dermoxinale® Clobetasol (0,05 w-% Clobetasol). 1g Dermoxinale entspricht ungefähr 40 Tropfen und enthält 0,5 mg Clobetasol. Carbomer 980, Propan-2-ol, Natriumhydroxid und gereinigtes Wasser sind weitere Bestandteile <sup>70</sup>.

Hametum® Extrakt (Genehmigungsnummer: 6402945.00.01) ist ein Produkt der Firma *Dr. Willmar Schwabe Arzneimittel GmbH&Co KG*. 100g Flüssigkeit entsprechen 102 ml und enthalten: 25 g Destillat aus frischen Hamamelisblättern, -zweigen und Destillationsmittel in Form von 6%igem Ethanol.

Meaverin ist ein Produkt der Firma *DeltaSelect GmbH*. Als Wirkstoff enthält Meaverin Mepivacainhydrochlorid und findet im Rahmen der Hautprobenentnahme als Anästhetikum Anwendung.

### 2.3.3 Verblindung

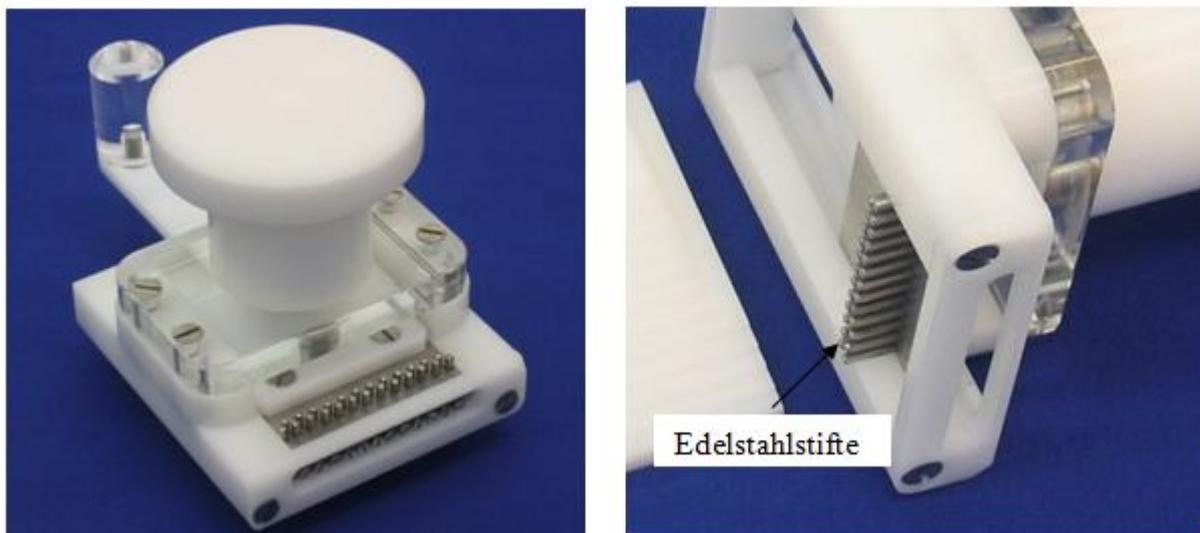
Die Verblindung der Studienmedikamente erfolgte durch die Firma *OUTPUT Pharma Services GmbH* (Aachen, Germany), sodass weder der Patient, noch der Prüfarzt davon in Kenntnis

gesetzt waren, welche Therapie auf welchem der drei Areale angewandt wurde. Die drei Studienpräparate wurden jeweils zufällig den Buchstaben A bis C zugeordnet und der Inhalt der Medikationsfläschchen mittels versiegelter Verpackung unkenntlich gemacht. Lediglich die Aufschriften A, B und C ließen eine Unterscheidung der ansonsten in ihrer Erscheinung identischen Präparate zu. Die Behandlungsareale wurden zuvor mit den Buchstaben A bis C bezeichnet, sodass die einzelnen Studienmedikamente diesen entsprechend zugeordnet werden konnten. Die Fläschchen A, B und C besaßen eine Kitnummer, mit Hilfe derer die Zuordnung zu den Probanden für die spätere Entblindung ermöglicht werden konnte.

## 2.4 Geräte und Messverfahren

### 2.4.1 Darier Testgerät 1.0

Im Rahmen der Einschlusskriterien sollte durch mechanische Provokation das Vorliegen eines positiven Darier-Zeichens überprüft werden. Die Provokation erfolgte mit Hilfe eines eigens für die Studie vom Allergie-Centrum-Charité entwickelten und in Kooperation mit den medizinisch-technischen Laboratorien der Charité hergestellten Gerätes (Abbildung 11).



**Abbildung 11:** Darier Testgerät 1.0 mit Detailansicht der Edelstahlstifte

Das Darier Testgerät 1.0 kam erstmals im Rahmen dieser Arbeit in einer Studie zum Einsatz, wurde aber bereits zuvor in Sprechstunden an Patienten mit Mastozytose angewandt. Es besteht aus einem Kunststoffgestell, in welches ein beweglicher Kunststoffschlitten integriert ist. Dieser Schlitten besitzt 25 Edelstahlstifte, die zweireihig angeordnet sind. Zur Provokation wird das Gerät auf die Haut aufgesetzt und durch Druck auf den Haltegriff fixiert. Die Bewegung des Schlittens bei fixiertem Kunststoffgestell erfolgt durch Betätigung des transparenten

Führungshebels. Die auf diese Weise aus ihrer Ausgangsposition geführten Edelstahlstifte bewirken auf einem 50 x 50 mm großen Areal eine mechanische Reizung. Um im Rahmen der Studie eine urtikarielle Schwellung zu erzeugen, wurde der Schlitten dreimal aus seiner Ausgangsposition gebracht und zurückgeführt. Im Vergleich zu der üblichen Provokation des Darier-Zeichens mittels eines Holzspatels oder ähnlichen Gegenständen, ermöglicht dieses standardisierte Gerät an allen Zentren und zu den unterschiedlichen Studienterminen eine mechanische Provokation, die hinsichtlich der Intensität vom Untersucher unabhängig ist.

#### 2.4.2 Ultraschall

Topisch applizierte Glukokortikoide können atrophische Hautveränderungen bedingen. Sonographische, nichtinvasive Messungen wurden durchgeführt, um als Sicherheitsparameter eine mögliche Atrophie verursacht durch Dermoxinale®, vergleichsweise aber auch durch Miltefosin, zu überprüfen. Die Grundlage des Sonographieverfahrens beruht auf dem Impuls-Echo-Prinzip<sup>106-108</sup>. Piezoelektrische Kristalle, die als Sender und zugleich als Empfänger fungieren, erzeugen Schallwellen, die sich longitudinal ausbreiten<sup>109, 110</sup>. Auf dem Weg durch das Gewebe unterliegen sie Phänomenen wie Reflektion, Streuung, Absorption oder Brechung. Neben diesen Erscheinungen trägt außerdem die Impedanz zur Entstehung des Ultraschallbildes bei. Größere Impedanzunterschiede führen dazu, dass ein größerer Teil der Schallwellen abgelenkt wird. Eine Transmission tritt bei geringerem Impedanzunterschied auf<sup>106, 107</sup>. Die reflektierten Schallsignale werden detektiert und können in verschiedenen Modi angezeigt werden. Im A-Mode (Amplitudenmodulationsmodus) wird ein einzelnes reflektiertes Echosignal direkt graphisch auf einem Oszilloskop dargestellt. Dem A-Mode als alleiniges Verfahren wird heutzutage nur noch eine geringfügige Bedeutung beigemessen. Beim B-Mode (*Brightness mode*) werden die Amplituden des A-Mode Signals helligkeitsmoduliert und multiple A-Scans zu einem zweidimensionalen Bild zusammengesetzt<sup>107, 108, 111</sup>. In der Dermatologie ist die hochfrequente 20 MHz Sonographie ein fest integriertes, diagnostisches Mittel. Dieses Verfahren ermöglicht eine zuverlässige Darstellung kutaner und subkutaner Strukturen. Es findet daher vor allem in der Tumordiagnostik, bei der Verlaufskontrolle von Dermatosen, der Elastizitäts-, Dicke- und Dichtebestimmung Anwendung. Ferner können im Rahmen von verschiedenen Dermatosen Entzündungsprozesse nachgewiesen werden, die sich durch echoarme Banden darstellen<sup>107-109, 111</sup>. Auch die Ausbreitungsdiagnostik von bösartigen Erkrankungen im Hinblick auf eine Lymphknotenmetastasierung hat mittlerweile seinen festen Bestandteil in der Routineversorgung von z.B. Melanompatienten. Ein Vorteil der Methode des Ultraschalls ist dabei stets die völlig ungefährliche und günstige Applikation von Schallwellen

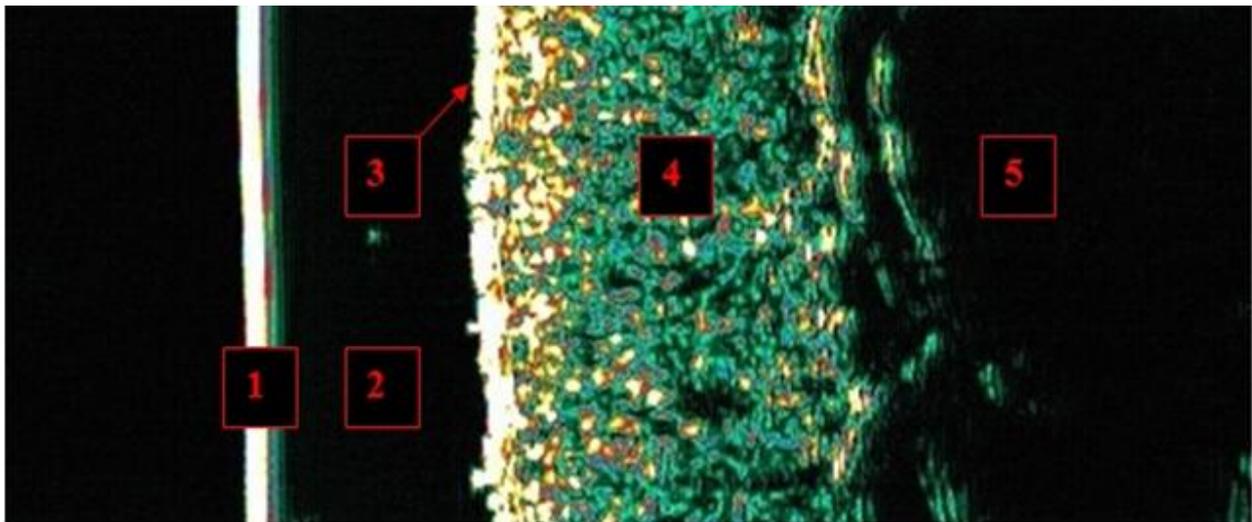
im Rahmen einer Bildgebung, die dadurch auch häufig wiederholbar ist. Der Vorteil wird v. a. gegenüber anderen teils sehr teuren und invasiven bzw. schädlichen bildgebenden Verfahren wie z.B. PET-CT oder MRT deutlich. Ein Nachteil der Sonographie besteht in der Untersucherabhängigkeit des Verfahrens<sup>112</sup>. Innerhalb der Studie wurde das zur real-time Aufzeichnung von 2D Bildern fähige Ultraschallgerät Dermascan C der Firma Cortex Technology (Hadsund, Dänemark) verwendet (Abbildung 12)<sup>106,107</sup>.



**Abbildung 12:** Ultraschallgerät Dermascan C mit Transducer und Bildgebung. Detailausschnitt (rechts) vom Messfenster des Transducers mit Plastikfolienmembran, die als Kopplungsmedium fungiert.

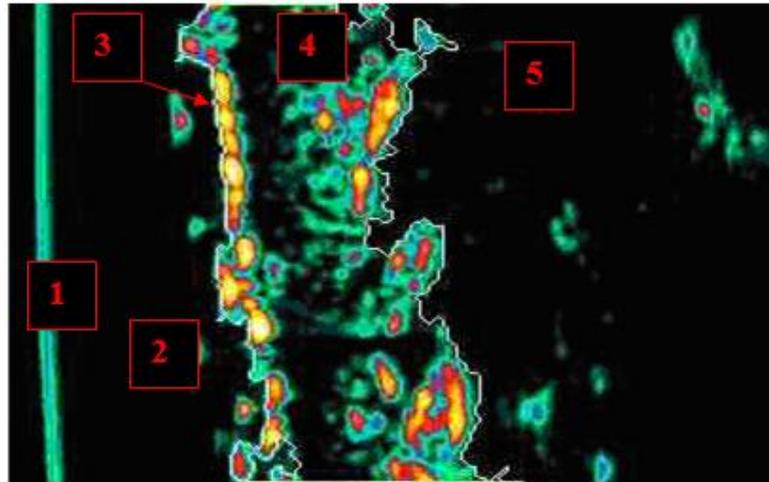
Das Gerät besitzt einen 20 MHz Keramik-Transducer, welcher durch Steppermotoren im Applikator durch eine Wasservorlaufstrecke bewegt werden kann<sup>110</sup>. Das in den Schallkopf zuvor eingefüllte destillierte Wasser, sowie eine sich am Messfenster befindende Plastikfolienmembran dienen als Kopplungsmedium. Zur Durchführung der Messungen wurde der Schallkopf mit dem Messfenster und der abnehmbaren Abschlussmembran direkt auf die Haut aufgesetzt (Abbildung 12). Am Übergang von Luft zu Weichteilgewebe kommt es aufgrund des sehr großen Impedanzunterschiedes praktisch zu einer Totalreflexion. Dies kann vermieden werden, indem zusätzlich Ultraschallgel als Kopplungsmedium auf die Haut aufgebracht wird<sup>108</sup>. Jedes empfangene Echosignal wird seiner Stärke entsprechend in einer Falschfarbkodierung mit 256 Farben wiedergegeben. Schwarz repräsentiert Echoleere, Weiß

hingegen Echoreichtum. Dazwischen liegen nach zunehmender Echodichte geordnet die Farben Grün, Blau, Rot und Gelb<sup>106-108</sup>. Bei einem axialen Auflösungsvermögen von ca. 80 µm in Richtung der Schallausbreitung und einer lateralen Auflösung von 200 µm senkrecht zur Schallausbreitung können auf diese Weise Strukturen mit einer Tiefe von max. 12 mm dargestellt werden<sup>107, 110, 111</sup>. Bei der Beurteilung der Sonogramme (Abbildung 13) zeigt sich zunächst ein Eintrittssignal, welches durch die gespannte Plastikmembran hervorgerufen wird (Abbildung 13; Nr.1). Darunter stellt sich das Ultraschallkontaktgel als echoarme oder echoleere Zone dar (Abbildung 13; Nr.2). Das echoreiche Eintrittsecho entsteht durch die hohe Impedanzdifferenz zwischen der Gel-Vorlaufstrecke ,2' und dem dichten Stratum corneum (Abbildung 13; Nr.3) bzw. der gesamten Epidermis. Hierbei ist zu beachten, dass das Eindringecho nicht direkt der Dicke der Epidermis entspricht, sondern dicker ausfällt. Die darauffolgende Dermis ist im Ultraschallbild durch einen mäßig echoreichen Abschnitt ,4' gekennzeichnet. Die Hauptquelle dieser Echogenität ist die Art der Anordnung, die Struktur und die Dichte des Kollagens innerhalb der Dermis (Abbildung 13; Nr.4). Das subkutane Fettgewebe stellt sich aufgrund der geringeren Kollagendichte und des weiteren Abstandes vom Echo-Transducer echoärmer dar (Abbildung 13; Nr.5)<sup>107, 108, 110, 111</sup>.



**Abbildung 13:** Sonogramm der Epidermis bis zur Subkutis eines gesunden Probanden. Dargestellt ist 1' Plastikmembran, 2' echoarmer/echoleerer Bereich des Ultraschallkontaktgels, 3' Stratum corneum, 4' Dermis, 5' subkutanes Fettgewebe.

Mit Hilfe des Sonogrammes können neben den benannten Anwendungsmöglichkeiten ferner atrophische Hautveränderungen detektiert werden (Abbildung 14).



**Abbildung 14:** Sonogramm mit Darstellung atrophischer Hautveränderungen. 1' Eintrittssignal der gespannten Folie, 2' Gelvorlaufstrecke, 3' Eintrittsecho, 4' Echoreiche Dermis, 5' echoarme Subkutis.

Zur Überprüfung atrophischer Hautveränderungen im Rahmen der MICUMA-Studie wurde die Hautdicke in Millimeter vor und nach medikamentöser Therapie mit Hilfe der Sonogramme ausgemessen. Als oberer Messpunkt wurde die untere Grenze des echoreichen Eintrittsechos definiert. Als unterer Messpunkt diente die Grenze zwischen der echoarmen, das subkutane Fettgewebe darstellenden Zone und der echoreichen Dermis. Innerhalb der zuvor eingezeichneten kreisrunden Areale für die Ultraschallmessungen wurde je eine Messung längs und quer durchgeführt. Der Mittelwert dieser beiden Messungen ergab die Hautdicke in mm des jeweiligen Behandlungsareals. Ziel war es, eine mögliche Veränderung infolge der Therapie sonographisch darzustellen.

### 2.4.3 Volumetrie

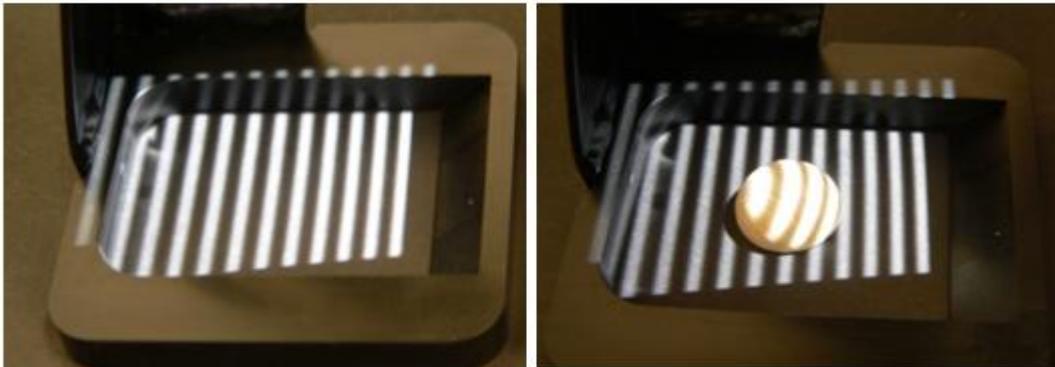
An dem Zentrum der Berliner Charité erfolgte im Rahmen der MICUMA-Studie ergänzend zur subjektiven Bewertung der urtikariellen Veränderungen eine objektive Beurteilung in Form der Volumetriemessung. Diese dreidimensionale Aufnahme der Hautoberfläche wurde mit Hilfe des PRIMOS *contact* (*Phaseshift Rapid In Vivo Measurement Of Skin*) Gerätes der GF Messtechnik GmbH (Teltow, Germany) durchgeführt. Für einen fehlerfreien Produktionsprozess in der industriellen Fertigung spielt die Profilometrie, die dreidimensionale Erfassung von Oberflächen, eine zentrale Rolle. Nicht minder ist deren Bedeutung in der Medizin. Mit Hilfe dieser nichtinvasiven Darstellung eines 3D-Profiles der Hautoberfläche können in der Dermatologie Parameter wie Rauheit, Wundheilungsprozesse oder die Effektivität von Laserbehandlungen bei z.B. Aknenarben beurteilt werden. Hautveränderungen wie Melanome, Nävi und Falten können

dargestellt und die Wirksamkeit von medikamentösen Behandlungen überprüft werden<sup>113-116</sup>. Um Oberflächen dreidimensional zu erfassen, können Hautabdrücke (Replika) hergestellt werden. Verschiedene Instrumente und Systeme wurden entwickelt, um die Oberfläche dieser Replika zu vermessen. Seit 1973 wurden für diesen Zweck mechanisch tastende Oberflächenmesssysteme eingesetzt. Die Berechnung mittels digitaler Messverfahren erfolgt seit 1980, Ende der 80er Jahre kam außerdem die Laserprofilometrie zum Einsatz. Bei der Erstellung von Replika zur Messung von Oberflächen kommt es jedoch zu einem direkten Kontakt mit den zu analysierenden Hautarealen. Aufgrund dessen ist einerseits die Beurteilung von geschädigten Hautbereichen und folglich von Wundheilungsprozessen problematisch. Andererseits kann der direkte Hautkontakt zu Abweichungen in der Oberflächenform der Haut führen und die Messergebnisse beeinflussen<sup>113, 116, 117</sup>. Verfälschungen der Ergebnisse können auch entstehen, wenn bei der Anfertigung der Replika Luftblasen eingeschlossen werden<sup>113</sup>. Diese Nachteile können durch den Einsatz von optischen 3D *in vivo* Hautmesstechniken mit digitaler Streifenprojektion vermieden werden<sup>117</sup>. PRIMOS bietet die Möglichkeit eines solchen Hautmesssystems, welches eine schnelle ( $<70\text{ms}$ ), kontaktfreie 3D-Darstellung der Hautoberfläche erlaubt (Abbildung 15). Messergebnisse mit einer Höhenauflösung von  $\geq 4\mu\text{m}$ , einer lateralen Auflösung von  $63\mu\text{m}$  und einer Messgenauigkeit von  $\geq 5\mu\text{m}$  werden durch PRIMOS contact ermöglicht<sup>114, 116, 117</sup>.

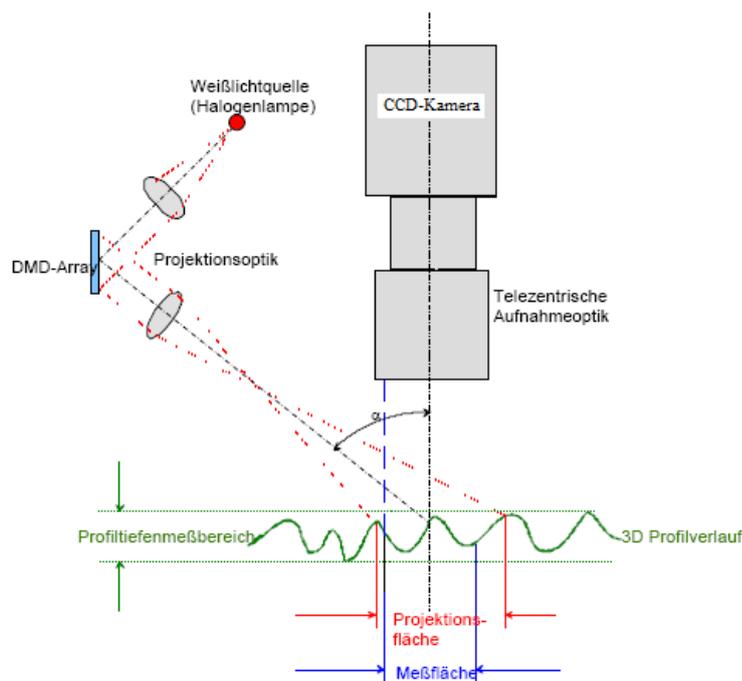


**Abbildung 15:** PRIMOS contact Messgerät mit Abstandshalter zur dreidimensionalen Darstellung der Hautoberfläche

Bei dem Prinzip der digitalen Streifenprojektion werden parallele Streifenmuster auf die Hautoberfläche projiziert (Abbildung 16). Das Licht stammt aus einer Weißlichtquelle und wird nach dem Prinzip der digital ansteuerbaren Mikrospiegel-Projektionseinheiten (DMD) der Firma Texas Instruments USA (Dallas, Texas) auf die Haut gelenkt. Feinste Höhenunterschiede auf der Hautoberfläche lenken die parallelen Projektionsstreifen aus. Derart entstehende Verschneidefiguren werden von einer CCD-Kamera aufgenommen, digitalisiert und mit Hilfe mathematischer Algorithmen ausgewertet<sup>113-115, 117</sup>.



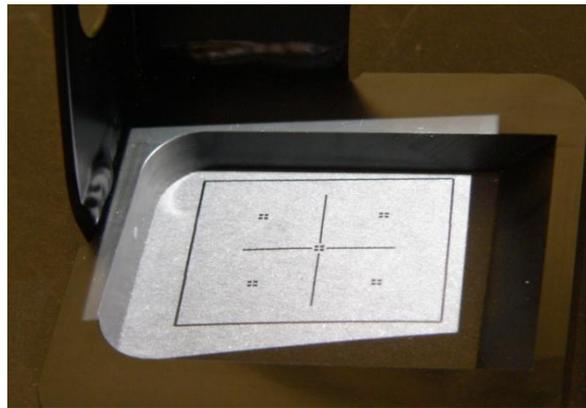
**Abbildung 16:** Projektionsstreifen ohne Auslenkung (links). Verschneidefiguren (rechts) durch Auslenkung der Projektionsstreifen, veranschaulicht mit Hilfe einer Holzhalbkugel.



**Abbildung 17:** Prinzip der Streifenprojektionstechnik mit dem Triangulationswinkel  $\alpha$  zur Berechnung der Position des zu vermessenen Objektes.

Die Projektion der Streifenmuster auf die Oberfläche und die Aufnahme über die CCD Kamera erfolgt unter einem bestimmten Winkel. Mit Hilfe dieses Triangulationwinkels kann die Position des zu vermessenen Objektes bestimmt werden (Abbildung 17) <sup>114</sup>.

Die volumetrischen Messungen im Rahmen der MICUMA-Studie zur Beschreibung der Volumina der Läsionen erfolgten für alle drei Areale vor mechanischer Reizung. Zur Beurteilung der Quaddelvolumina wurden nach Auslösung des Darier-Zeichens Messungen im Abstand von je fünf Minuten über einen Zeitraum von einer halben Stunde durchgeführt. Das Gerät wurde über einen Abstandshalter direkt auf die Haut aufgesetzt und auf diese Weise die Oberfläche eines 40 x 30 mm<sup>2</sup> großen Hautareals dreidimensional dargestellt (Abbildung 18). Alle durchgeführten Messungen wurden gespeichert und die Volumina berechnet.



**Abbildung 18:** 40 x 30 mm<sup>2</sup> großes Messfenster, innerhalb dessen die dreidimensionale Oberflächenmessung erfolgt.

#### **2.4.3.1 Berechnungen der Volumina**

Mit Hilfe der PRIMOS Software (PRIMOS 5\_4 Rev 2 200707 Release SIT) wurden die Volumina aller Läsionen und Quaddeln auf den Behandlungsarealen über zwei verschiedene Verfahren berechnet. Im Folgenden wird das strukturierte Vorgehen zur Nutzung der PRIMOS Software graphisch dargestellt.

##### **2.4.3.1.1 Berechnung der Volumina mittels Matchingverfahren**

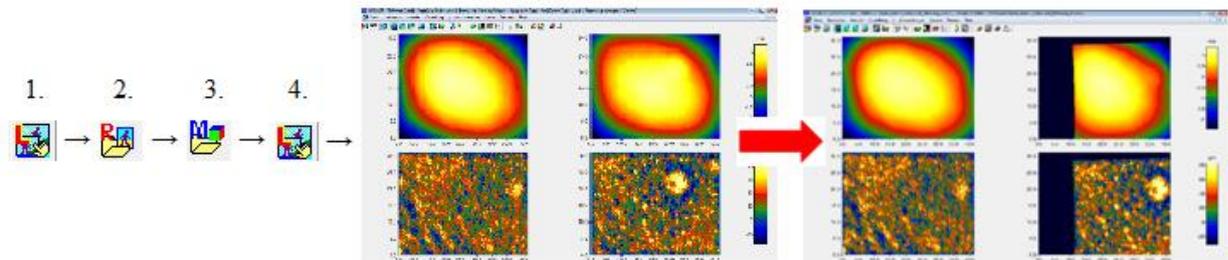
Das folgende Berechnungsverfahren ermöglicht, dass in allen Bildern vor und nach medikamentöser Therapie an derselben Stelle und auf derselben Fläche das Läsions- und Quaddelvolumen berechnet werden konnte. Eine Beurteilung der Veränderung der Volumina vom *Entry visit* zum *End of study visit* wurde auf diese Weise ermöglicht.



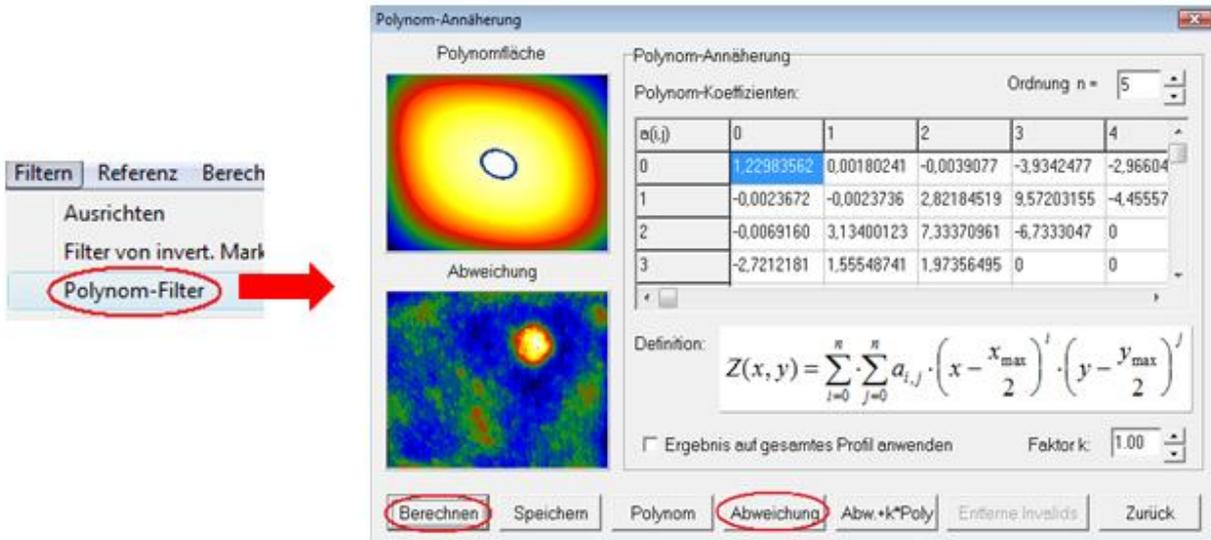
**Abbildung 19:** Schritt 1: Die Höhenbilder des *Entry visit* und *End of study visit* für jeden einzelnen Patienten wurden in die Datenbank eingefügt.



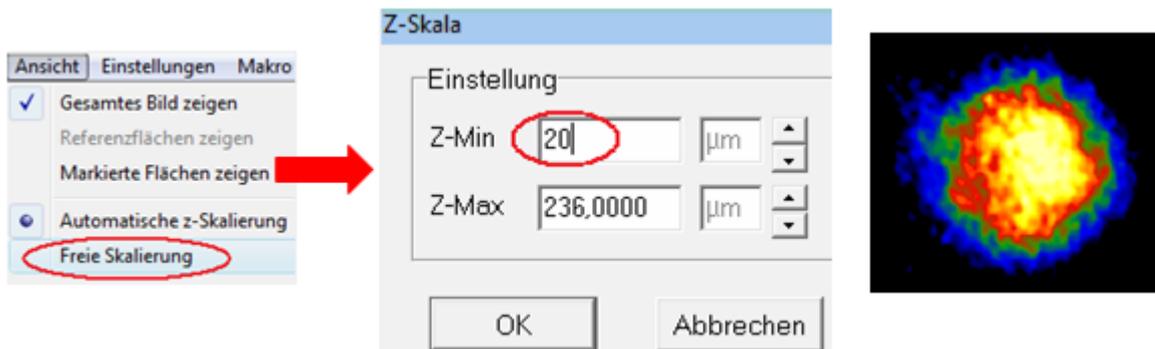
**Abbildung 20:** Schritt 2: Nach der Markierung aller Höhenbilder wurden diese ausgerichtet und gespeichert.



**Abbildung 21:** Schritt 3: Die Funktion „3D-Matching für elastische Oberflächen“ (1') wurde aufgerufen. Eines der zuvor ausgerichteten, gespeicherten Höhenbilder des Patienten wurde als Referenzdatei bestimmt und diese eingefügt (2'). Ein ausgerichtetes Höhenbild des *Entry visit* oder *End of study visit* wurde der Referenzdatei gegenüber gestellt (3'). Die Matchingfunktion wurde gestartet (4'), wodurch das Höhenbild entsprechend der Bildpunkte der Referenzdatei ausgerichtet und ein direkter Vergleich der Dateien ermöglicht wurde. Alle Höhenbilder des *Entry visit* und *End of study visit* wurden auf diese Weise gematcht, gespeichert und anschließend in eine neue Datenbank (siehe Schritt 1) aufgenommen.



**Abbildung 22:** Schritt 4: Nach dem Doppelklicken auf ein Höhenbild innerhalb der Datenbank der gemachten Bilder, wurde über den Menüpunkt „Filter“ die „Polynom Filter“ - Funktion aktiviert. Durch die Betätigung der Schaltflächen „Berechnen“ und „Abweichung“ wurde eine Trennung der Mikro- und Makrostruktur bewirkt.



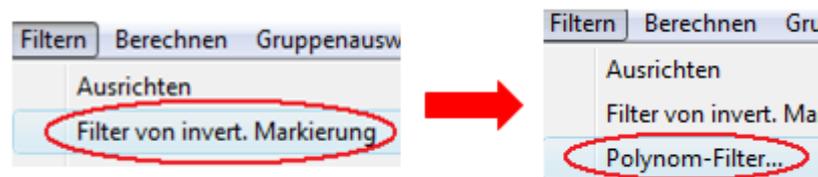
**Abbildung 23:** Schritt 5: Um eine genauere Abgrenzung der Quaddeln zu gewährleisten, wurde die Skalierung geändert. Bei allen Patientenaufnahmen wurde einheitlich die Einstellung „Z-Min“ auf 20 µm gesetzt.



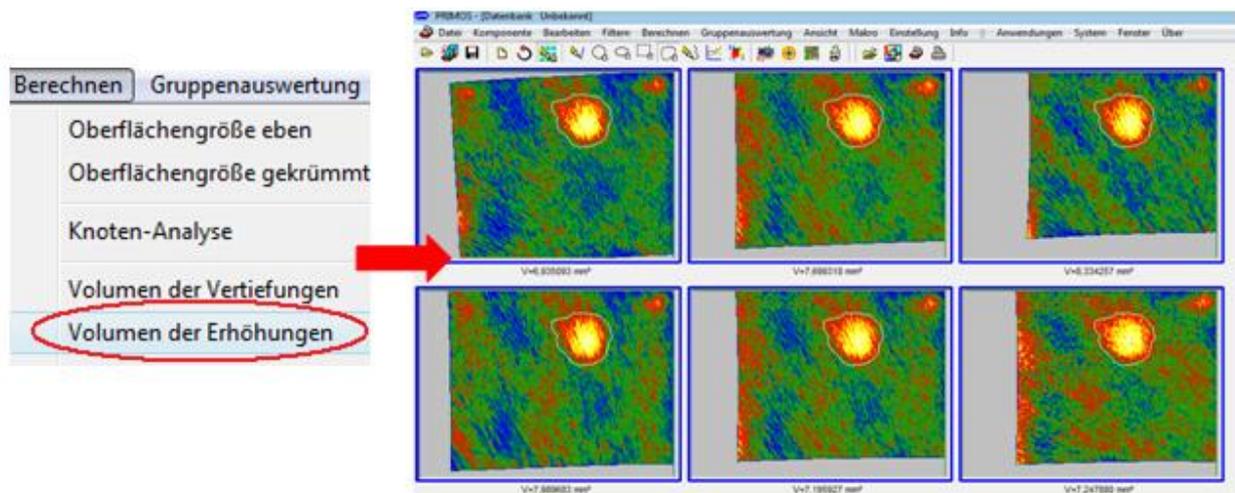
**Abbildung 24:** Schritt 6: Um die Quaddeln von Hand zu umzeichnen, wurde die Schaltfläche „Bereichsmarkierung“ betätigt und die „Freihandzeichnung“ gewählt. Nach der Einzeichnung der Bereichsmarkierung um die Quaddel wurde dieser Parameter gespeichert.



**Abbildung 25:** Schritt 7: Die zuvor geöffnete Datenbank der gematchten Bilder wurde aufgerufen. Der Menüpunkt „Komponente“ „alle Einträge markieren“ wurde gewählt. Über den Menüpunkt „Komponente“ „Parameter öffnen“ wurde die zuvor gespeicherte Markierung in alle Höhenbilder eingefügt und durch Aktivierung der Schaltfläche „Polygon zeichnen“ sichtbar gemacht.



**Abbildung 26:** Schritt 8: Eine Filterung aller Strukturen des Höhenbildes mit Ausnahme der markierten Bereiche wurde ermöglicht, indem die Funktion „Filter von invertierter Markierung“ und anschließend der „Polynom-Filter“ (Polynomgrad 5) aktiviert wurden.



**Abbildung 27:** Schritt 9: Die Berechnung erfolgte mit Hilfe der Schaltfläche „Volumen der Erhöhungen“.

#### 2.4.3.1.2 Berechnung mittels individueller Bereichsmarkierung

Nicht bei allen Patienten war das Matchen aller Bilder des *Entry visit* und *End of study visit* möglich. Unter anderem konnte aufgrund veränderter Hautstrukturen eine Zuordnung der

Bildpunkte der einzelnen Aufnahmen zur Referenzdatei nicht erfolgen. Um jedoch auch diese Messungen auswerten zu können, wurden zunächst die unter 1, 2, 4, 5 und 6 beschriebenen Schritte durchgeführt. Anschließend wurde innerhalb der Datenbank nur das Höhenbild markiert, für welches zuvor der Parameter gespeichert wurde. Gemäß Arbeitsschritt 7 wurde nun die Markierung in dieses einzelne Höhenbild eingefügt. Anschließend wurde wie in Schritt 8 und 9 das Volumen der Quaddel für dieses einzelne Höhenbild berechnet. Dieses Vorgehen wurde nun mit allen Höhenbildern und allen Läsionen und Quaddeln eines Patienten einzeln durchgeführt. Diese Methodik ermöglicht zwar die Berechnung der Volumina, jedoch bietet die beschriebene Matchingfunktion eine genauere Möglichkeit zum Vergleich der Volumina während und zwischen dem *Entry visit* und *End of study visit*. Die gespeicherten Daten wurden hinsichtlich einer Veränderung der Läsions- und Quaddelvolumina vor und nach medikamentöser Therapie ausgewertet. Für die Betrachtung der Quaddelvolumina im zeitlichen Verlauf wurde die *Area under the curve* (AUC) für den Zeitraum vor bis dreißig Minuten nach Provokation mit Hilfe des Programms *GraphPad Prism 4*, Version 4.00 berechnet. Die prozentuale Veränderung der AUC vom *Entry visit* zum *End of study visit* wurde ermittelt.

#### 2.4.4 Thermografie

Das Verfahren der Thermografie ermöglicht die Messung und Aufzeichnung von Temperaturen im Körper und die Beurteilung der Temperaturverteilung auf der Körperoberfläche<sup>118</sup>. Über den Einsatz der Thermografie innerhalb der klinischen Dermatologie wurde erstmals 1964 durch Brasfield berichtet, welcher hyperthermische Veränderungen bei kutanen Melanomen betrachtete<sup>119</sup>. Angewandt wird die Thermografie unter anderem in der Dermatochirurgie zur Diagnostik, Operationsplanung, Therapie- und Rezidivkontrolle. Mit Hilfe des Verfahrens können Aussagen über die Abstoßung oder Einheilung eines Vollhaut- oder Spalthauttransplantates getroffen werden. Neben der Beurteilung von Pigmenttumoren, Hautkarzinomen, Präkanzerosen, Hautmetastasen oder anderen Dermatosen, kann die Thermografie zur Überprüfung von Blutverteilungsänderungen, Lokalreaktionen der Hautgefäße, antiphlogistischen und weiteren pharmakologischen Wirkungen eingesetzt werden. Nicht minder ist deren Bedeutung in der Phlebologie und Andrologie, wo es u.a. bei der Varikozelendiagnostik als ein wertvolles Zusatzverfahren genutzt wird<sup>118-120</sup>. Die Messung kann zum einen als Kontaktmessung, bei welcher kalte Detektoren auf die warme Hautoberfläche direkt aufgelegt werden, oder kontaktlos als Fernmessmethode erfolgen. Bei Letzterer wird die im langwelligen, infraroten Bereich liegende Wärmestrahlung der Hautoberfläche gemessen. Die emittierte Temperaturstrahlung liegt im nicht sichtbaren Wellenlängenbereich von 2-20  $\mu\text{m}$ <sup>118, 120, 121</sup>. Die Menge der durch

Strahlung abgegebenen Wärme ist gemäß dem Stefan-Boltzmann-Gesetz ein direktes Maß für die Temperatur der Hautoberfläche. Die Wärmestrahlung entsteht durch Wärmetransport vom Körperinneren zur Körperoberfläche durch Konduktion und Konvektion. Über ein Linsen- oder Spiegeldetektorsystem wird die Wärmestrahlung erfasst und entsprechend dem Temperaturniveau in einem farbkodierten Thermogramm dargestellt<sup>118, 122</sup>. Die im Rahmen der Urtikaria auftretende Dilatation der Gefäße und die Extravasation bedingen Veränderungen der Hauttemperatur. An der Berliner Charité wurde die Temperatur der behandelten Hautareale als ein weiterer Parameter mit Hilfe der FLIR ThermoCAM S60, FLIR Systems GmbH (Frankfurt/Main, Germany) gemessen (Abbildung 28). Die Messungen erfolgten vor und über einen Zeitraum von einer halben Stunde alle fünf Minuten nach Provokation. Die Temperaturentwicklung der Quaddeln vor und nach medikamentöser Therapie wurde verglichen.



**Abbildung 28:** FLIR ThermoCAM S60 für die Temperaturmessung auf der Hautoberfläche.

#### 2.4.5 Ophthalmologische Untersuchung

Da Miltex® eine Beeinträchtigung der Hell-Dunkeladaptation bewirken kann, wurden vor und nach medikamentöser Therapie als Sicherheitsparameter ophthalmologische Untersuchungen durchgeführt<sup>123</sup>. Adaptometer, die für diese Messung genutzt werden können, sind selten verfügbar. Aufgrund dessen wurde mittels eines Nyktometers die Blendempfindlichkeit bestimmt, welche indirekt Rückschlüsse auf die Hell-Dunkeladaptation zulässt. Eine erhöhte Blendempfindlichkeit im Vergleich zu den Messwerten vor medikamentöser Behandlung ist

somit ein Hinweis für eine Verschlechterung der Hell-Dunkeladaptation. Zudem wurde neben der Blendempfindlichkeit die Dämmerungssehschärfe beurteilt. Für diese Untersuchungen von der DOG (Deutsche Ophthalmologische Gesellschaft e.V. zur Qualitätssicherung bei sinnesphysiologischen Untersuchungen und Geräten) als verwendbar beurteilte Geräte sind zum einen das Kontrastometer der Firma BKG Medizin Technik GmbH (Bayreuth, Germany), Mesotest II der Firma Oculus (Wetzlar, Germany) und das Nyktometer 500 der Firma Rodenstock (München, Germany).

## **2.5 Studienablauf**

Im Rahmen der MICUMA-Studie mussten alle an der Studie teilnehmenden Probanden zu folgenden fünf Terminen erscheinen: *Screening visit*, *Entry visit*, *End of study visit*, sowie zwei ophthalmologische Untersuchungstermine.

### **2.5.1 Screening visit**

An der Studie interessierte Patienten mit der Diagnose einer Mastozytose ohne offensichtliche Ausschlusskriterien erschienen zu einem *Screening visit*. In diesem Rahmen wurden die Patienten ergänzend zu den bereits erhaltenen Informationsschreiben ausführlich über die Erfordernisse, Rechte und Pflichten aufgeklärt. Den Patienten wurde die Nutzen/Risiko-Bewertung aufgezeigt und die erwarteten Nebenwirkungen im Rahmen des ärztlichen Aufklärungsgesprächs beschrieben. Nach einer Bedenkzeit und der Möglichkeit Fragen an den Prüfarzt zu richten, musste eine Einverständniserklärung zur freiwilligen Teilnahme an der Studie von allen Probanden unterschrieben werden. Im *Screening visit* erfolgte die Erfassung der zurückliegenden und gegenwärtigen Krankengeschichte. Zentraler Punkt hierbei war die Beurteilung des Hautbefundes hinsichtlich Anzahl, Größe und Verteilung der Läsionen. Das Jahr in dem die Patienten die Diagnose Mastozytose erhielten, der zuletzt gemessene Tryptasewert im Serum, die bisherigen Therapieversuche, sowie die Klassifikationszuordnung wurden zusätzlich eruiert. Im Rahmen einer allgemeinen klinischen körperlichen Untersuchung wurden neben dem Hautbild nicht nur Organsysteme wie Lunge, Herz und Abdomen beurteilt, sondern auch auf mögliche pathologische Befunde hinsichtlich Kopf, Hals und Extremitäten geachtet. Eine Messung der Vitalparameter Blutdruck, Puls, Temperatur, sowie Gewicht und Größe erfolgte. Die benannten Ein- und Ausschlusskriterien wurden überprüft und nach Begleiterkrankungen und -medikamenten gefragt. Alle Daten wurden pseudonymisiert, schriftlich protokolliert und elektronisch mittels *electronic Case Report Form* (eCRF) dokumentiert. Erfüllte der Patient alle Kriterien, wurden 10 ml venöses Blut entnommen und folgende Parameter durch das Labor *Dr.*

*Spranger & Partner* (Ingoldstadt) bestimmt: Blutbild, Differentialblutbild, AST, ALT, Bilirubin, alkalische Phosphatase, Kreatinin, Calcium, Natrium, Kalium. Bei gebärfähigen Frauen musste zusätzlich mittels Urinschnelltest eine Schwangerschaft ausgeschlossen werden. Anschließend an den *Screening Visit* erfolgte die nyktometrische Untersuchung.

### 2.5.2 *Entry visit*

Wurden alle Voraussetzungen für die Teilnahme an der Studie erfüllt, erschienen die Patienten spätestens 28 Tage nach dem *Screening visit* zum *Entry visit*. Erneut wurden Ein- und Ausschlusskriterien überprüft und mögliche Veränderungen hinsichtlich der Begleitmedikation erfragt. Mittels einer Schablone und einem sterilen, wasserfesten Hautmarker wurden nun die drei 50 cm<sup>2</sup> großen Areale, mit einem Mindestabstand von 5 cm, auf die Haut gezeichnet (Abbildung 29).



**Abbildung 29:** Drei 50cm<sup>2</sup> große Behandlungsareale bei einer Probandin.

Diese Markierungen mussten während der gesamten zweiwöchigen Therapie durch den Patienten nachgezeichnet werden, um eine Behandlung ausschließlich in den dafür vorgesehenen Arealen zu gewährleisten. Außerdem wurden kreisrunde Markierungen in alle Areale eingezeichnet, sodass die im *End of study visit* erfolgende sonographische Untersuchung an derselben Stelle wie im *Entry visit* durchgeführt werden konnte. Nach der sonographischen Hautdickebestimmung wurden die drei Testareale vor und fünf Minuten nach Provokation fotografisch dokumentiert. Fünf Minuten nach mechanischer Irritation wurde jedes Testareal zusätzlich durch den Prüfarzt hinsichtlich des Parameters Erythementwicklung beurteilt (*Erythema Subscore*). Palpatorisch wurde außerdem die urtikarielle Veränderung bewertet (*Wheal Subscore*). Diese subjektiven Beschreibungen erfolgten mit Hilfe einer Analogskala, welche die Beurteilungswerte 0 bis 3 aufwies (0= keine Symptome, 1= milde Symptome, 2=

mittelstark ausgeprägte Symptome, 3= starke Symptome). Eine entsprechende Bewertung wurde außerdem durch den Probanden für den Parameter Juckreiz abgegeben (*Itching Subscore*). Die Addition der Werte für alle drei Parameter mündete in den *Composite Score*, der maximal neun Scorepunkte annehmen kann. Nachdem die volumetrischen und thermographischen Messungen vor und alle fünf Minuten nach mechanischer Provokation über eine halbe Stunde aufgezeichnet wurden, erfolgte die Ausgabe der Studienmedikation. An die Aufklärung über die ordnungsgemäße Anwendung der Medikamente schloss sich das erstmalige Auftragen unter Anleitung des Prüfarztes an. Die Patienten erhielten ein Tagebuch, mit welchem die täglich durchgeführte Applikation der Medikamente durch den Patienten dokumentiert werden musste. Auf diese Weise wurde die Compliance des Patienten überprüft.

### **2.5.3 Telefonische Kontaktierung**

Nachdem die Applikation zweimal täglich über einen Zeitraum von  $7 \pm 1$  Tagen erfolgte, wurden die Patienten telefonisch kontaktiert. Mögliche Veränderungen der Hautareale oder Nebenwirkungen, bedingt durch die Studienmedikation, wurden erfragt. Dabei wurden Beginn, Dauer und Stärke der Nebenwirkungen erfasst. Eine mögliche Einnahme von Medikamenten aufgrund der unerwünschten Wirkung wurde dokumentiert, ebenso die Einschätzung, ob die Nebenwirkungen durch die Studienmedikation aufgetreten sind. Erneut wurden Veränderungen hinsichtlich der Begleitmedikation eruiert. Alle Informationen wurden entsprechend zum *Screening visit* und zum *Entry visit* mittels eCRF dokumentiert.

### **2.5.4 End of study visit**

Nach  $14 \pm 1$  Tagen Anwendung der Präparate erschienen die Patienten zum *End of study visit*. Neben einer allgemeinen körperlichen Untersuchung wurden erneut die Vitalparameter erfasst. Außer der Entnahme von 10 ml venösen Blutes und anschließender Labordiagnostik wurde eine mögliche Schwangerschaft erneut mittels Urinschnelltest ausgeschlossen. Die Einnahme neuer Begleitmedikamente, sowie neu aufgetretene Nebenwirkungen, bedingt durch die Studienmedikamente, wurden erfragt. Die Durchführung sonographischer Messungen erfolgte an denselben Hautstellen wie im *Entry visit*. Analog wurden die Behandlungsareale photographisch dokumentiert, das Darier Zeichen provoziert und anschließend die einzelnen Parameter des *Composite Scores* beurteilt. Ergänzend wurde mit Hilfe eines weiteren Scores - jeweils unabhängig von einander - durch den Prüfarzt und durch den Patienten eine mögliche Veränderung eingeschätzt. Bei dieser als *Investigator / Patient global assessment* bezeichneten subjektiven Analogskala konnten den einzelnen Behandlungsarealen Werte von 0 bis 6

zugeordnet werden (0= vollkommenes Fehlen von Mastozytose-spezifischen Hautveränderungen, 1= deutliche Verbesserung, 2= mittel stark ausgeprägte Verbesserung, 3= leichte Verbesserung, 4= keine Veränderung, 5= leichte Verschlechterung, 6= starke Verschlechterung). Entsprechend der Vorgehensweise im *Entry visit* wurden volumetrische und thermographische Messungen aufgezeichnet und das eCRF durch die gesammelten Daten ergänzt. Abschließend erfolgte die Entnahme von Hautprobebiopsien. 1%iges Meaverin, das als Lokalanästhetikum nicht direkt in, sondern neben die in der quantitativen Histomorphometrie zu analysierenden Hautbereiche injiziert wurde, ermöglichte eine schmerzlose Entnahme der Gewebeproben. Aus jedem der drei Behandlungsareale wurde unter Verwendung einer 4 mm Biopsiestanze ein Gewebestück der zu befundenden Hautveränderungen exzidiert. Das direkte Einlegen des Exzidates in 5% gepuffertes Formalin ermöglichte eine chemische Fixierung. Die Gewebeproben wurden an das Zentrum Mainz gesendet, wo durch die unabhängige Ärztin Frau Dr. med. Staubach die verblindete Auswertung erfolgte. Um Präparate aus den Gewebebiopsien anzufertigen, wurden diese zunächst entwässert und anschließend in Paraffin eingebettet. Von dem so entstandenen Gewebestück wurden 2-3µm dicke Schnitte hergestellt, welche nach dem Aufbringen auf Glasobjektträger mit Toluidinblau gefärbt wurden. Die Bestimmung der MC-Anzahl erfolgte durch quantitative Histomorphometrie, wobei die MC aufgrund der Präsenz von multiplen metachromatischen zytoplasmatischen Granula identifiziert werden konnten. In der subepidermalen Dermis, retikulären Dermis und in der Subkutis wurden bei 400facher Vergrößerung im Lichtmikroskop die MC pro Mikroskopierfeld gezählt. Die MC-Zahl pro Mikroskopierfeld wurde auf die Anzahl pro mm<sup>2</sup> umgerechnet. Nach dem *End of study visit* erfolgte abschließend eine erneute nyktometrische Untersuchung.

## 2.6 Statistik

Die statistische Analyse wurde durch die *Assign Data Management Biostatistics GmbH* unter der Verwendung des *Statistical Analysis System (SAS)* Version 9.1.3 durchgeführt. Die statistische Analyse erfolgte an der *Intention-to-treat-Population (ITT)*, welche alle randomisierten Probanden einschließt, bei denen mindestens einmal die Studienmedikation appliziert wurde. Die Darstellung aller Ergebnisse erfolgte durch Angabe der Mittelwerte  $\pm$  SEM, bzw. für die volumetrischen Ergebnisse durch Angabe der Mediane  $\pm$  SEM. Zur Auswertung der volumetrischen Daten wurde die SPSS Version 13.0 verwendet. Um die statistische Signifikanzen der Veränderungen von der *baseline* zum Ende der Studie beurteilen zu können, wurde der paarige (*two-sided*) Wilcoxon-Test eingesetzt. Es wurde definiert, dass ein p-Wert  $\leq$  0,05 als statistisch signifikant bezeichnet werden kann. Um die Ergebnisse der individuellen

Bereichsmarkierung der Patienten, bei denen kein Matchingverfahren möglich war, verwenden zu können, wurde die Korrelation dieser beiden Verfahren mit Hilfe des Spearman Rank Testes betrachtet.

**Tabelle 4:** Tabellarische Übersicht des Studienablaufes

	<i>Screening visit</i>	<i>Entry visit</i>	<i>Telefonkontakt</i>	<i>End of study visit</i>
<i>Zeitlicher Verlauf in Tagen</i>	<i>-28 bis 0</i>	<i>0</i>	<i>7±1</i>	<i>14±1</i>
Patientenaufklärung	•			
Randomisierung		•		
Erhebung der medizinischen Krankengeschichte	•			
Körperliche und ophthalmologische Untersuchung	•			•
Überprüfung der Einschluss-/Ausschlusskriterien	•	•		•
Überprüfung der Begleitmedikation	•	•	•	•
Ausgabe der Studienmedikation		•		
Rückgabe der Studienmedikation				•
<b>Tägliche Applikation der Medikamente</b>		•	•	•
<i>Composite Score</i>		•		•
<i>Investigator/Patient Global Assessment</i>				•
Fotographische Dokumentation Volumetrie, Thermografie, Sonographie		•		•
Hautbiopsie				•
Blutentnahme, Schwangerschaftstest	•			•
Überprüfung der Nebenwirkungen		•	•	•

## 3. Ergebnisse

### 3.1 Randomisierte Studienpatienten

Im Studienverlauf konnten an den fünf teilnehmenden Zentren insgesamt mehr als die ursprünglich vorgegebenen 30 Patienten parallel eingeschlossen werden. Daher erfolgte am 22. Juni 2007 eine diesen Mehreinschluss bewilligende Änderung des Studienprotokolls. Die letzten Studienteilnehmer durften bis einschließlich zum 21. Juni 2007 gescreent und bis spätestens zum 4. Juli randomisiert werden. An den fünf teilnehmenden Zentren konnten insgesamt 43 Patienten in die Studie aufgenommen werden. Die Anzahl eingeschlossener Studienteilnehmer reduzierte sich jedoch auf 39 randomisierte Patienten, da ein Studienteilnehmer bereits vor Beginn des *Entry visit* von der Teilnahme zurücktrat und drei der Patienten teilweise gegen die Ein- und Ausschlusskriterien verstießen, weil sie Antihistaminika drei Tage vor Beginn der Studie einnahmen, ein positives Darier-Zeichen fehlte oder ein pathologischer Befund im Rahmen der allgemeinen, körperlichen Untersuchung vorlag. Die 39 randomisierten Patienten, von denen 26 (66,67%) dem weiblichen und 13 (33,33%) dem männlichen Geschlecht angehörten, wiesen ein durchschnittliches Alter von 45,1 Jahren auf, wobei der jüngste Proband 20 Jahre und der älteste Proband 75 Jahre alt war. Die 39 randomisierten Patienten teilten sich wie folgt auf die fünf Zentren auf: Universität Köln: 13 Patienten; Charité - Universitätsmedizin Berlin: 11 Patienten; Technische Universität München: 6 Patienten, Universität Mainz: 5 Patienten; sowie die Ludwig-Maximilians Universität München: 4 Patienten. Der *Screening visit*, *Entry visit*, sowie *End of study visit* und damit auch die Studienphase der zweiwöchigen Medikamentenapplikation wurde von allen 39 randomisierten Patienten absolviert. Die durchschnittliche Studiendauer der Probanden betrug  $32,6 \pm 1,51$  Tage; die Medikamente wurden über einen Zeitraum von durchschnittlich  $15,6 \pm 0,45$  Tagen aufgetragen.

### 3.2 Abweichungen vom Studienprotokoll

25 Patienten verstießen gegen 35 Vorschriften des Studienprotokolls, wobei sich diese Verstöße in 28 kleine und 7 große aufteilten (Tabelle 5 und 6). Die 28 kleineren Abweichungen vom Studienprotokoll wurden als die Studienergebnisse nicht beeinflussend beurteilt. Da weniger als 20% - nämlich 17,95% (entsprechend 7 großen Abweichungen) - der randomisierten Patienten gegen Vorschriften des Studienprotokolls verstießen, musste keine zusätzliche Analyse mit der *pre-protocol-population* durchgeführt werden. Die statistische Auswertung erfolgte daher an der *ITT-Population* von 39 Patienten.

**Tabelle 5:** Detaillierte Beschreibung der kleineren Abweichungen vom Studienprotokoll

Anzahl	Art der Deviation
3	<i>Verstoß gegen die ordnungsgemäße Anwendung der Studienmedikamente:</i> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Ein Patient führte die Behandlung auf allen drei Arealen zu drei verschiedenen Zeitpunkten nicht durch</li> <li>• Ein Patient führte zwei Tage vor dem Ende der 14-tägigen Applikation die Behandlung auf einem Areal nicht durch</li> <li>• Die Anwendung der Medikamente erfolgte 16 anstatt 14 Tage</li> </ul>
6	<i>Verstoß gegen die zeitliche Vorgaben:</i> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Entry visit</i> erfolgte später als 28 Tage nach dem <i>Screening Visit</i> (N=3)</li> <li>• <i>End of study visit</i> erfolgte nicht 14 Tage nach dem <i>Entry visit</i></li> <li>• Telefonkontakt erfolgte früher als 6 Tage nach dem <i>Entry visit</i></li> <li>• Ophthalmologische Untersuchung erfolgte später als 2 Wochen nach dem <i>End of study visit</i></li> </ul>
1	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Einnahme eines nichtsteroidalen Antirheumatikums an einem Tag</li> </ul>
2	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bilirubinwerte <math>\geq 1,5</math> mg/dl</li> </ul>
1	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Biopsie wurde nicht durchgeführt</li> </ul>
1	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Studienmedikation wurde nicht zurückgegeben</li> </ul>
9	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Randomisierung erfolgte nicht entsprechend der Vorschriften</li> </ul>
1	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Die Markierungen der Areale wurden durch den Patienten nicht nachgezeichnet. Es erfolgte jedoch eine korrekte Auftragung und Biopsie.</li> </ul>
4	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Schwangerschaftstest wurde nicht durchgeführt</li> </ul>

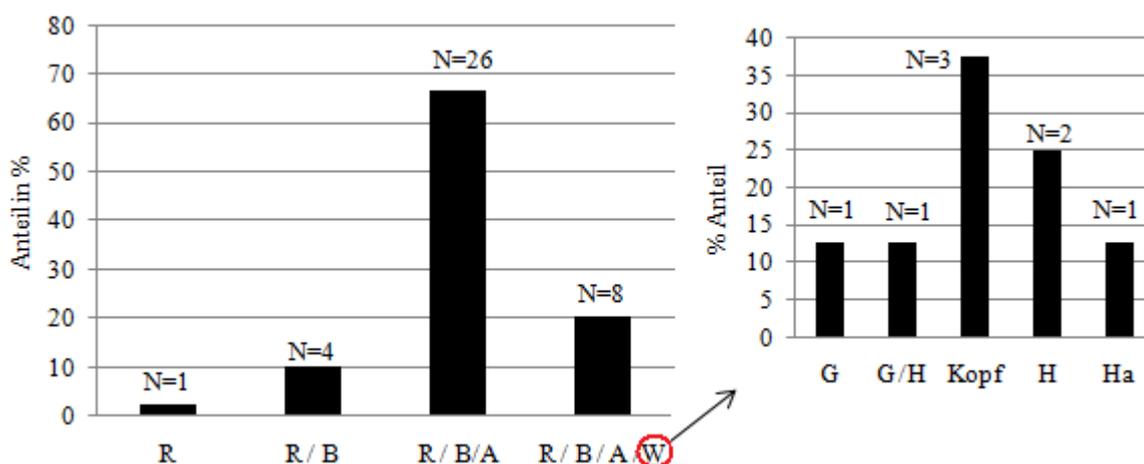
**Tabelle 6:** Detaillierte Beschreibung der großen Abweichungen vom Studienprotokoll

Anzahl	Art der Deviation
4	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Entblindung der Studienmedikamente durch den Patienten</li> </ul>
1	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Einnahme von Colimune® mit dem Wirkstoff Cromoglicinsäure während der gesamten Studie</li> </ul>
1	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Der <i>End of study visit</i> wurde nicht 14 Tage nach dem <i>Entry visit</i> durchgeführt, ohne Hinweis, dass der Patient die Medikamente weiter auftrug</li> </ul>
1	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Die markierten Areale wurden durch den Patienten leicht versetzt eingezeichnet</li> </ul>

### 3.3 Das klinische Bild der Mastozytose

Den 39 randomisierten Patienten wurde die Diagnose der Mastozytose durchschnittlich  $106,1 \pm 14,06$  Monate, mit einer Spannweite von 9 - 330 Monaten, vor der Teilnahme an der MICUMA-Studie gestellt. Die zuletzt durchgeführte Bestimmung der Tryptasekonzentration im Serum zeigte einen durchschnittlichen Wert von  $42,8 \pm 7,97 \mu\text{g/l}$ , mit einer Spannweite von 2,9 – 189,0

$\mu\text{g/l}$ . 28 (71,79%) der 39 Patienten wiesen eine kutane Form der Mastozytose mit makulopapulösen Hautveränderungen (MPCM) auf, wohingegen die restlichen 11 (28,21%) Patienten von einer ISM mit Hautmanifestation betroffen waren. 38 (97,44%) der 39 randomisierten Patienten zeigten am gesamten Integument mehr als 50 Läsionen. Nur bei einem (2,56%) Patienten konnten weniger Läsionen, nämlich zwischen 11 bis 50, gezählt werden. 92,31% (N=36) der Patienten zeigten bis zu 1 cm durchmessene Hautläsionen. Die restlichen 7,69% (N=3) der teilnehmenden Patienten zeigten Läsionen mit einem Durchmesser zwischen 1-3 cm. Die von den Läsionen am häufigsten betroffenen Hautregionen waren bei 66,67% der Patienten (N=26) die Kombination von Rumpf, Beine und Arme (Abbildung 30).



**Abbildung 30:** Prozentuale Darstellung der Manifestationsorte der Läsionen für 39 Probanden. R= Rumpf, B= Beine, A= Arme, W= weitere, G= Gesicht, H= Hals, K= Kopf, Ha= Haaransatz

Die Applikation der Studienmedikamente erfolgte bei der Mehrheit der Patienten an den Oberschenkeln. Auch Abdomen, Rücken, Schultern oder Beine dienten als Auftragungsort. 64,10% (N=25) der Patienten erhielten bereits vor Beginn der MICUMA-Studie ein weites Spektrum an verschiedenen Therapien zur Behandlung der Mastozytose. 21 der 25 Patienten wurden bereits kontinuierlich oder bei Bedarf mit verschiedenen Antihistaminika behandelt. Dazu zählen Antihistaminika wie Zyrtec® (Cetirizin), Tavegil® (Clemastin), Fenistil® (Dimetinden), Telfast® (Fexofenadin), Ebastel® (Ebastin), Antihistaminika mit dem Wirkstoff Loratadin und mit dem Wirkstoff Levocetirizin, wie Xusal®. Zwei Patienten führten bereits eine lokale Therapie mit dem Glukokortikoid Betamethason durch. Ein ureahaltiges, topisch aufzutragendes Medikament wurde bei einem der Patienten vor der MICUMA-Studie angewandt. 11 Patienten erhielten ferner eine Bestrahlung in Form von UVA-1, UVB, PUVA oder einer Bade-PUVA. Die restlichen 14 Patienten (35,9%) gaben an, bisher keine Therapieoptionen genutzt zu haben.

### 3.4 Begleitmedikation und -erkrankungen

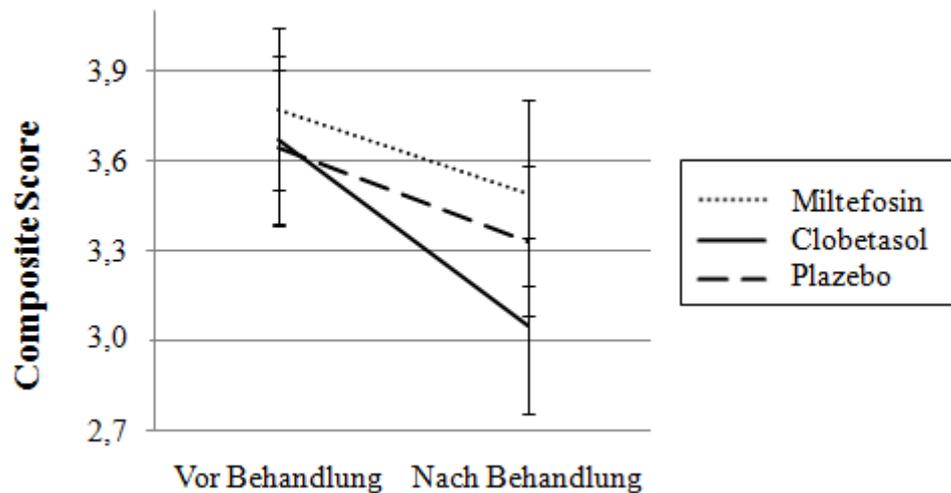
17 Patienten (43,6%) nahmen während der Studie regelmäßig mindestens ein Begleitmedikament ein. Die häufigste Indikation war das Vorliegen einer Hypertonie. Die insgesamt 40 verschiedenen Präparate setzten sich vor allem aus Medikamenten, die das Renin-Angiotensin-System beeinflussten (12,8%), Calcium-Kanal Blockern (10,3%) und Schilddrüsenpräparaten (10,3%) zusammen. Ferner wurde mit je 7,7% die Einnahme von Anästhetika und Sexualhormonen und Modulatoren des Genitalsystems dokumentiert. Diuretika, antiinflammatorische und antirheumatische Medikamente, Antihypertensiva, Vitamine, sowie Medikamente für die Behandlung von Atemwegserkrankungen, Knochenerkrankungen und des Diabetes mellitus wurden studienbegleitend von je 2,6% eingenommen. Alle benannten Begleitmedikamente wurden vor der Studie als die Studienergebnisse nicht beeinflussend eingeschätzt. 24 (61,5%) der 39 randomisierten Studienpatienten litten unter insgesamt 57 Begleiterkrankungen. Allergien (23,1%, N=9), Hypertonie (15,4%, N=6), Erkrankungen des muskuloskelettalen Systems und Bindegewebes (10,3% N=4) wie z.B. Osteosklerose oder Osteoporose stellten neben metabolischen Störungen (12,8%, N=5) wie Diabetes mellitus oder Gicht häufig auftretende Begleiterkrankungen dar. Ferner wurden endokrine Störungen (10,3%, N=4) wie Hypothyreose und Beeinträchtigungen des Gastrointestinaltraktes (10,3%, N=4) dokumentiert.

### 3.5 Überprüfung der Wirksamkeit

#### 3.5.1 Subjektive Analogskalen

##### 3.5.1.1 *Composite Score*

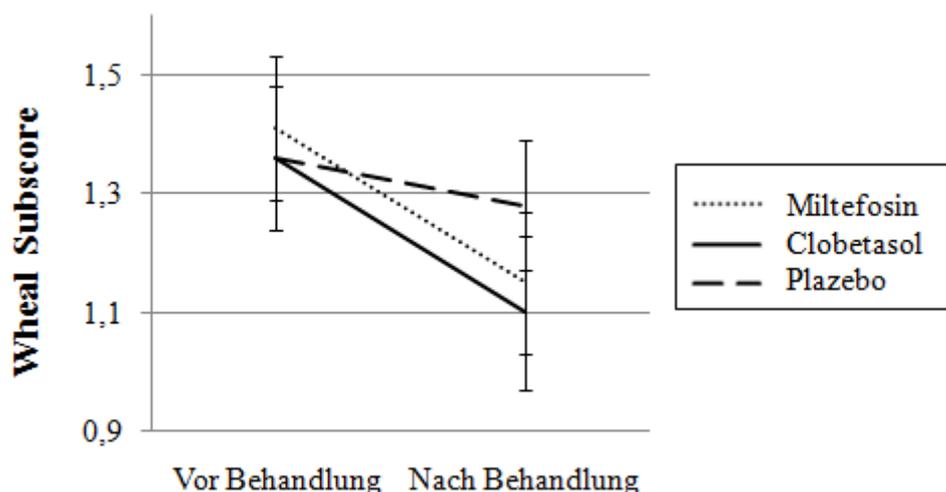
Nach zweiwöchiger Therapie zeigte der *Composite Score* auf den Arealen, die mit Miltefosin, Plazebo und Clobetasol therapiert wurden, tendenziell eine Reduktion, für welche jedoch keine statistische Signifikanz aufgezeigt werden konnte. Miltefosin bedingte im Vergleich zu Clobetasol und Plazebo die schwächste Reduktion um  $0,28 \pm 0,18$  Scorepunkte von  $3,77 \pm 0,27$  auf  $3,49 \pm 0,31$ . Die stärkste Abnahme des *Composite Scores* vom *Entry visit* zum *End of study visit* wurde durch Clobetasol bewirkt. Er sank nach zweiwöchiger Behandlung um  $0,62 \pm 0,19$  Scorepunkte von  $3,67 \pm 0,28$  auf  $3,05 \pm 0,29$ . Plazebo bedingte eine Reduktion um  $0,31 \pm 0,05$  Scorepunkte (Abbildung 31).



**Abbildung 31:** Veränderung des *Composite Scores* vom *Entry visit* zum *End of study visit* für Miltefosin, Clobetasol und Plazebo. MW  $\pm$  SEM, N=39.

### 3.5.1.1.1 Urtikarielle Veränderung (*Wheal Subscore*)

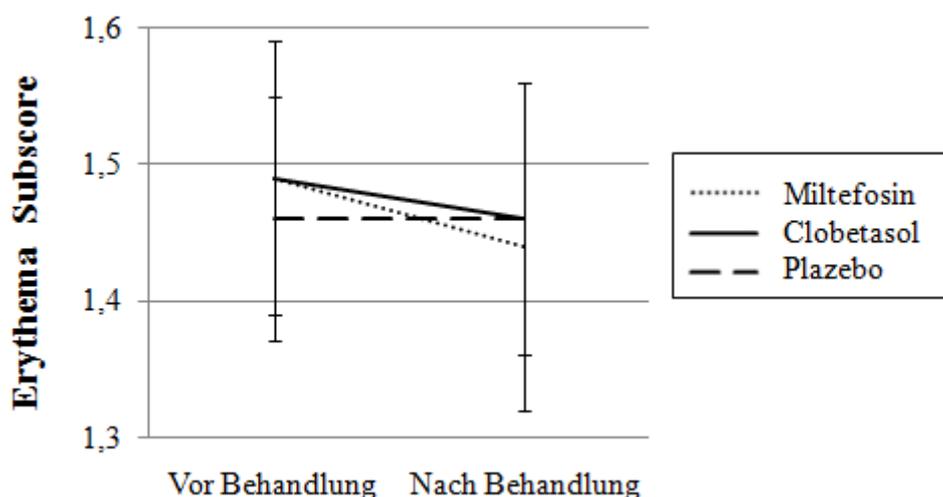
Der Parameter der subjektiv beurteilten urtikariellen Veränderung nach mechanischer Provokation zeigte kongruent zum *Composite Score* eine Abnahme nach medikamentöser Therapie für alle drei Medikamente. Allerdings konnten auch bei der Beurteilung der urtikariellen Veränderung und damit des Darier-Zeichens keine statistischen Signifikanzen, sondern nur tendenzielle Ergebnisse ermittelt werden. Miltefosin und Clobetasol bewirkten hinsichtlich der Ausprägung eine vergleichbar starke Reduktion des Scores um jeweils  $0,26 \pm 0,11$  Wertepunkte. Für Plazebo konnte lediglich eine Reduktion um  $0,08 \pm 0,09$  gezeigt werden (Abbildung 32).



**Abbildung 32:** Veränderung des *Wheal Subscores* vom *Entry visit* zum *End of study visit* für Miltefosin, Clobetasol, Plazebo. MW  $\pm$  SEM, N=39.

### 3.5.1.1.2 Erythematöse Veränderung (*Erythema Subscore*)

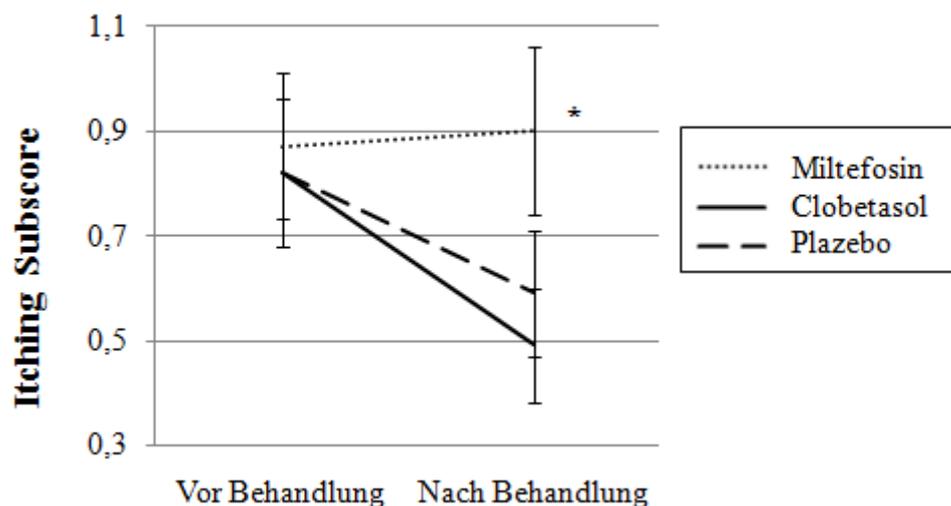
Für den *Erythema Subscore* konnten keine statistischen Unterschiede für Miltefosin, Clobetasol oder Plazebo ermittelt werden. Die stärkste tendenzielle Reduktion um  $0,05 \pm 0,07$  Scorepunkte konnte nach medikamentöser Therapie mit Miltefosin von  $1,49 \pm 0,90$  auf  $1,44 \pm 0,12$  gezeigt werden. Clobetasol bedingte eine tendenzielle Reduktion um  $0,03 \pm 0,07$  Scorepunkte. Auf den mit Plazebo behandelten Arealen konnte bezogen auf die erythematöse Entwicklung infolge mechanischer Reizung keine Veränderung im Vergleich zum *Entry visit* gezeigt werden (Abbildung 33).



**Abbildung 33:** Veränderung des *Erythema Subscores* vom *Entry visit* zum *End of study visit* für Miltefosin, Clobetasol und Plazebo. MW ± SEM, N=39.

### 3.5.1.1.3 Veränderung des Juckreizes (*Itching Subscore*)

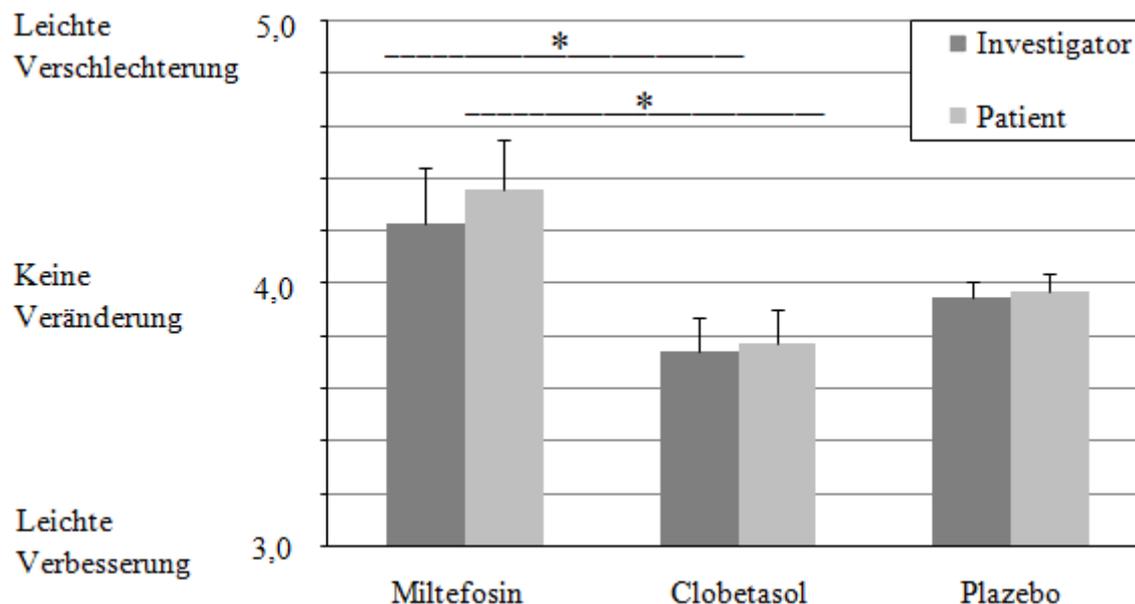
Nach zweiwöchiger Therapie mit Miltefosin konnte ein statistisch signifikanter Anstieg um  $0,03 \pm 0,09$  Scorepunkte von  $0,87 \pm 0,14$  auf  $0,90 \pm 0,16$  Wertepunkte für den Parameter Juckreiz gezeigt werden. Statistisch signifikante Unterschiede konnten zwischen Miltefosin und Plazebo von  $p=0,04$  und zwischen Miltefosin und Clobetasol von  $p=0,01$  aufgezeigt werden. Die tendenziell stärkste Reduktion des subjektiv durch den Patienten beschriebenen Juckreizes betrug  $0,33 \pm 0,09$  Scorepunkte und trat nach Behandlung mit Clobetasol auf. Die zweiwöchige Behandlung mit Plazebo bedingte eine Abnahme um  $0,23 \pm 0,09$  Wertepunkte (Abbildung 34).



**Abbildung 34:** Veränderung des *Itching Subscores* vom *Entry visit* zum *End of study visit* für Miltefosin, Clobetasol und Plazebo. MW  $\pm$  SEM, N=39, \*statistische Signifikanz zwischen Miltefosin und Plazebo: p=0,04, sowie zwischen Miltefosin und Clobetasol: p=0,01.

### 3.5.1.2 Global efficacy assessment – Investigator and Patient

Nach der Therapie mit Clobetasol konnte im Vergleich zu der Behandlung mit Miltefosin eine statistisch signifikante Verbesserung (p=0,05) des durch den Prüfarzt subjektiv beurteilten klinischen Bildes der Mastozytose nachgewiesen werden. Die mit Clobetasol behandelten Areale wurden mit  $3,74 \pm 0,13$  Scorepunkten beurteilt und zeigen damit im Vergleich zu den mit Miltefosin therapierten Behandlungsfeldern, die mit  $4,23 \pm 0,21$  Punkten bewertet wurden, eine stärkere allgemeine Verbesserungen des klinischen Bildes. Areale die mit Plazebo behandelt wurden, erhielten  $3,95 \pm 0,06$  Scorepunkte und zeigten damit keine Veränderung im Vergleich zu der Zeit vor Studienbeginn. Vergleichbar beurteilten die Patienten die Wirksamkeit der Medikamente, wobei der *Patient Global efficacy assessment* eine statistisch signifikante Verbesserung (p=0,02) des Hautbefundes durch Clobetasol im Vergleich zu Miltefosin aufzeigte. Die mit Clobetasol behandelten Areale erhielten eine Bewertung mit  $3,77 \pm 0,13$  Scorepunkten, im Vergleich zu Miltefosin, die mit  $4,36 \pm 0,19$  beurteilt wurden (Abbildung 35).



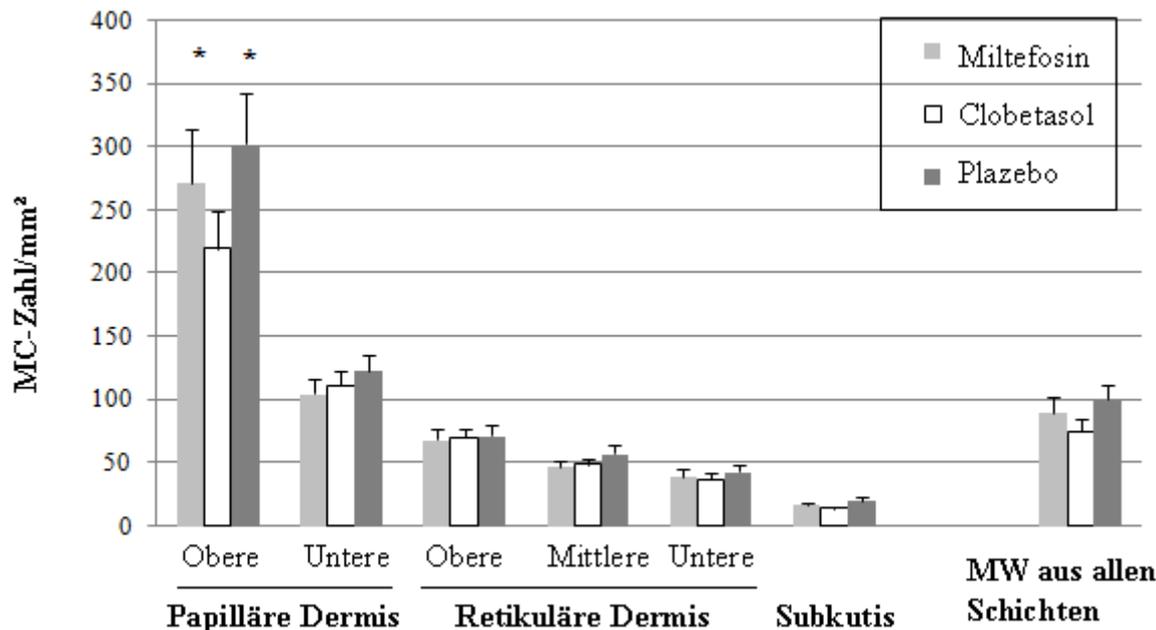
**Abbildung 35:** Beurteilung möglicher Veränderungen nach der Therapie mit Miltefosin, Clobetasol und Plazebo mit Hilfe des *Global efficacy assessment*, jeweils unabhängig durch den Patienten und Prüfarzt eingeschätzt. 3,0= leichte Verbesserung, 4,0= keine Veränderung und 5,0= leichte Verschlechterung. MW  $\pm$  SEM, N=39, \*statistisch signifikante Unterschiede zeigten sich zwischen Miltefosin und Clobetasol für die Beurteilung durch den Patienten:  $p=0,02$  (Prüfarzt:  $p=0,05$ ).

### 3.5.2 Objektive Beurteilung

#### 3.5.2.1 Biopsien

Zur objektiven Beurteilung der Wirksamkeit von Miltefosin im Vergleich zu Clobetasol und zum Plazebo wurde bei 38 der 39 randomisierten Patienten innerhalb jedes Behandlungsareals eine Stanzbiopsie durchgeführt. Anschließend erfolgte mit Hilfe der quantitativen Histomorphometrie eine Zählung der MC pro  $\text{mm}^2$  (Abbildung 36). Dabei wurde die MC-Zahl von der oberen papillären Dermis bis hin zur Subkutis bei 28 bis 38 Patienten bestimmt, da nicht in allen Exzidaten alle Schichten aufgezeigt werden konnten. Die Biopsien, welche aus den mit Clobetasol behandelten Testarealen exzidiert wurden, wiesen innerhalb der oberen papillären Dermis im Vergleich zu Miltefosin ( $p=0,02$ ) und auch zu Plazebo ( $p=0,00$ ) statistisch signifikant weniger MC/ $\text{mm}^2$  auf. Eine mittlere MC-Anzahl/ $\text{mm}^2$  von  $219,57 \pm 29,70$  innerhalb der oberen papillären Dermis konnte in den Biopsien ermittelt werden, welche aus den mit Clobetasol behandelten Arealen stammten. Für die aus den mit Miltefosin behandelten Testfeldern entnommenen Gewebeproben, konnte eine mittlere MC-Anzahl/ $\text{mm}^2$  von  $272,10 \pm 41,33$  aufgezeigt werden. Tendenziell, jedoch ohne statistisch signifikanten Nachweis, wurden nach

Applikation von Miltefosin im Vergleich zu Plazebo weniger MC innerhalb der oberen papillären Dermis gezählt ( $p=0,30$ ). Demnach konnten innerhalb der oberen papillären Dermis mit  $302,73 \pm 39,27$  die meisten MC/mm<sup>2</sup> in den Gewebeproben detektiert werden, die zuvor eine zweiwöchige Behandlung mit Plazebo erfuhren.



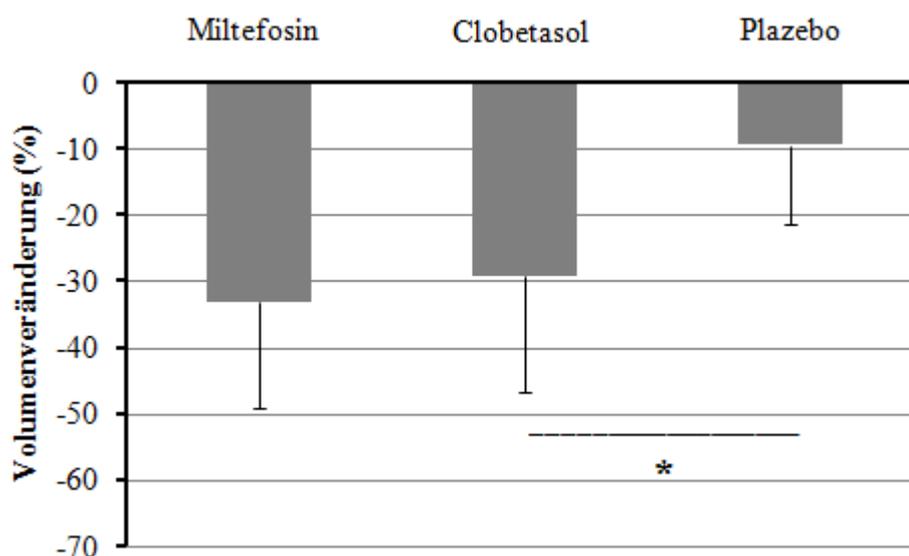
**Abbildung 36:** Anzahl der MC pro mm<sup>2</sup> nach 14-tägiger Behandlung mit Miltefosin, Clobetasol und Plazebo. MW  $\pm$  SEM, N=28-38. \*statistisch signifikante Unterschiede zwischen Clobetasol und Plazebo:  $p=0,00$ ; sowie zwischen Clobetasol und Miltefosin:  $p=0,02$ .

Die Ergebnisse der quantitativen Histomorphometrie zeigten für die Probiopsien aller drei Behandlungsareale eine von der oberen papillären Dermis bis zur Subkutis hin abnehmende Anzahl der MC pro mm<sup>2</sup>. Die innerhalb der oberen papillären Dermis aufgezeigten medikamentenabhängigen Unterschiede hinsichtlich der MC-Anzahl konnten in den darunter liegenden Schichten nicht derartig ausgeprägt dargestellt werden. Statistisch signifikante Unterschiede der drei angewandten Medikamente hinsichtlich der MC-Anzahl innerhalb der unteren papillären Dermis bis zur Subkutis konnten nicht berechnet werden. Der Mittelwert der MC-Anzahl aller Hautschichten von der oberen papillären Dermis bis hin zur Subkutis zeigte, dass die Biopsien, welche aus den mit Clobetasol behandelten Testarealen stammten, mit  $74,78 \pm 10,48$  MC/mm<sup>2</sup> die wenigsten Zellen aufwiesen. Innerhalb der Biopsien, die aus den mit Miltefosin behandelten Arealen entnommen wurden, konnten  $90,17 \pm 11,88$  MC/mm<sup>2</sup> gezählt werden und enthielten daher im Vergleich zu den Gewebeproben aus den mit Plazebo

behandelten Arealen, in denen  $100,39 \pm 11,77$  MC/mm<sup>2</sup> ermittelt wurden, tendenziell weniger MC pro mm<sup>2</sup>.

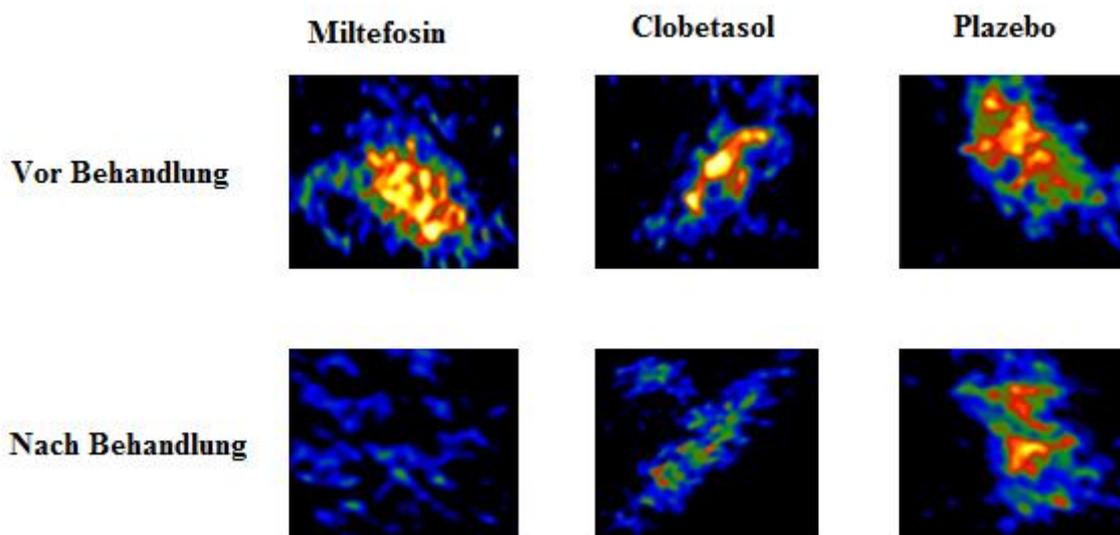
### 3.5.2.2 Volumetrie

Da die Berechnung der Quaddelvolumina nicht bei allen Patienten mit Hilfe der Matchingmethode erfolgen konnte, wurde als zusätzliches Verfahren die oben beschriebene individuelle Bereichsmarkierung durchgeführt. Die Ergebnisse konnten nur verwendet werden, wenn eine Korrelation zwischen diesen beiden Verfahren nachgewiesen wurde. Mit Hilfe des Spearman Rank Testes wurde ein Korrelationswert von 0,9767 ermittelt, der eine Korrelation der beiden Verfahren bestätigte und demzufolge die Ergänzung der fehlenden gematchten Daten durch die Ergebnisse der individuellen Bereichsmarkierung erlaubte. Die volumetrischen Aufnahmen wurden an einer Untergruppe von insgesamt neun Patienten der Berliner Charité durchgeführt. Nur bei 7 bis 9 Patienten konnten die Aufnahmen ausgewertet werden, da einerseits technische Probleme auftraten und andererseits die Patienten zum Teil die Testareale abweichend vom *Entry visit* nachzeichneten und dementsprechend ein Auffinden der ursprünglich gemessenen Quaddeln nicht möglich war. Aufgrund der geringen Anzahl an Patienten wurde nicht der Mittelwert, sondern der Median betrachtet. Die von der Zeit vor mechanischer Reizung bis 30 Minuten nach Provokation berechnete AUC der Quaddelvolumina, auf den mit Clobetasol behandelten Arealen, zeigte vom *Entry visit* zum *End of study visit* eine Reduktion von  $29,17 \pm 11,96\%$  (Abbildung 37).



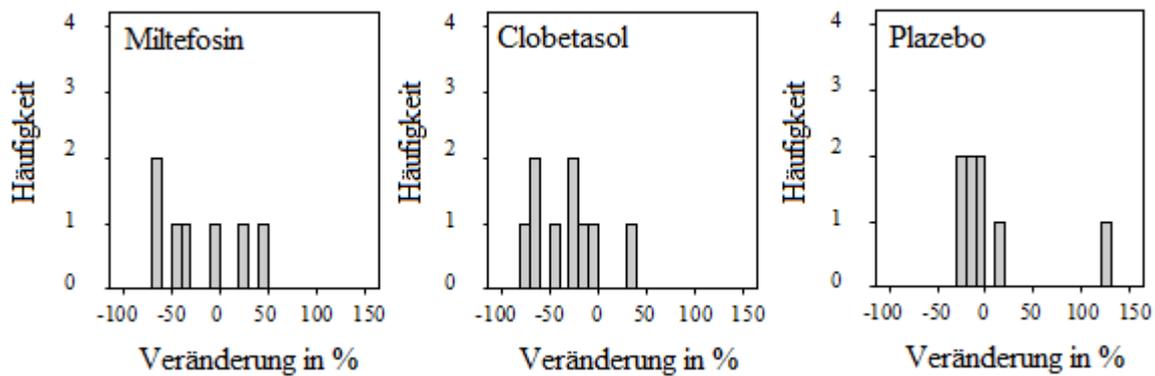
**Abbildung 37:** Prozentuale Veränderung der AUC vom *Entry visit* zum *End of study visit*. Median  $\pm$  SEM; Miltefosin: N=7, Plazebo: N=8, Clobetasol: N=9. \*Statistisch signifikante Unterschiede konnten für Clobetasol und Plazebo gezeigt werden:  $p=0,03$ .

Im Vergleich zum Plazebo konnte eine um 19,68% statistisch signifikante, stärkere Reduktion der AUC ermittelt werden ( $p=0,03$ ). Eine vergleichbar starke Reduktion der AUC von  $33,12 \pm 15,94\%$  wurde nach Behandlung mit Miltefosin gemessen. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen Miltefosin und Plazebo ( $p=0,09$ ), sowie zwischen Miltefosin und Clobetasol ( $p=0,74$ ) konnten jedoch nicht aufgezeigt werden.



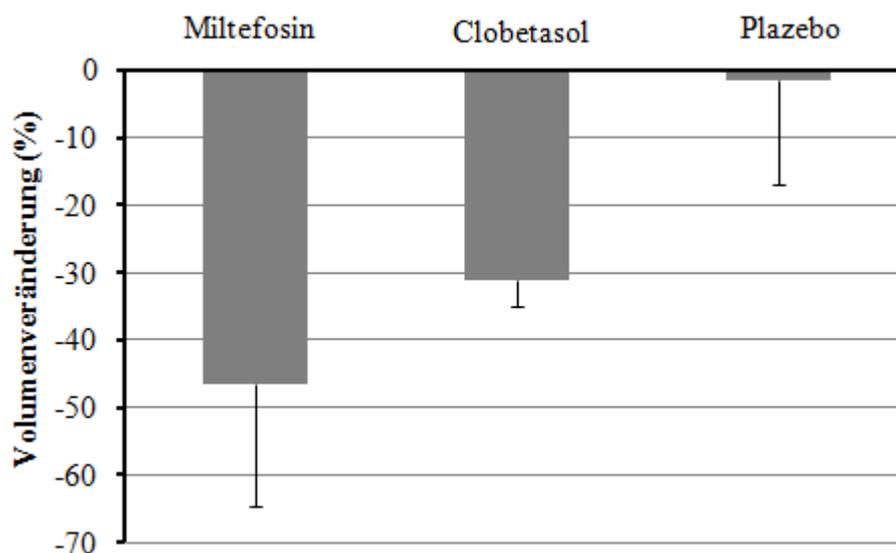
**Abbildung 38:** Volumetrische Aufnahmen eines Beispielpatienten nach der mechanischen Provokation, aufgenommen mit Hilfe der PRIMOS Messtechnik. Die Farben repräsentieren unterschiedliche Höhen, wobei gelb hohen Werten und blau niedrigen Werten zugeordnet ist. Verglichen werden Quaddeln auf den drei verschiedenen Arealen, jeweils vor und nach medikamentöser Therapie mit Miltefosin, Clobetasol und Plazebo. Die Aufnahmen des Beispielpatienten untermauern die prozentuale Veränderung der AUC, indem sie eine deutliche Abnahme der Quaddelvolumina nach der Therapie mit Miltefosin zeigen, welche der geringer ausgeprägten Reduktion nach Therapie mit Clobetasol überlegen ist. Die Aufnahmen der Quaddelvolumina nach Behandlung mit Plazebo zeigen keine relevanten Veränderungen.

Für Clobetasol konnte eine maximale Reduktion der AUC von 70,37% ermittelt werden. Für Plazebo beträgt diese 23% und für Miltefosin 67,98% (Abbildung 39). In Einzelfällen konnte nach der medikamentösen Therapie eine Zunahme der AUC beobachtet werden. In diesem Zusammenhang ist dem Histogramm eine maximale Zunahme der AUC nach Therapie mit Plazebo von 127,14% zu entnehmen, sowie eine maximale Zunahme um 41,54% nach Behandlung mit Miltefosin und 37,91% nach Behandlung mit Clobetasol.

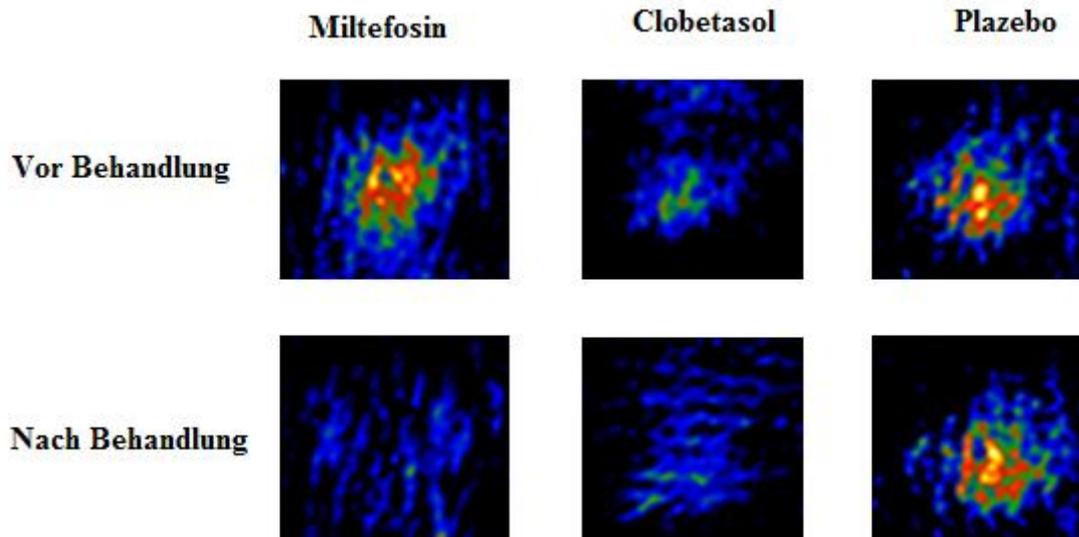


**Abbildung 39:** Histogramm zur graphischen Häufigkeitsverteilung der prozentualen Veränderung der AUC und daher der Quaddelvolumina für Miltefosin (N=7), Clobetasol (N=9) und Plazebo (N=8). Die Häufigkeit entspricht der Anzahl der Patienten.

Ähnliche Tendenzen der AUC sind für die Veränderung der Volumina der Läsionen vor mechanischer Reizung festzustellen, jedoch konnten keine statistisch signifikanten Werte aufgezeigt werden. Die über einen Zeitraum von 14 Tagen mit Miltefosin behandelten Läsionen zeigten eine Volumenreduktion von  $46,52 \pm 18,19\%$ . Die Betrachtung der Volumina nach Therapie mit Clobetasol ließ eine Reduktion um  $31,09 \pm 15,32\%$  erkennen (Abbildung 40).

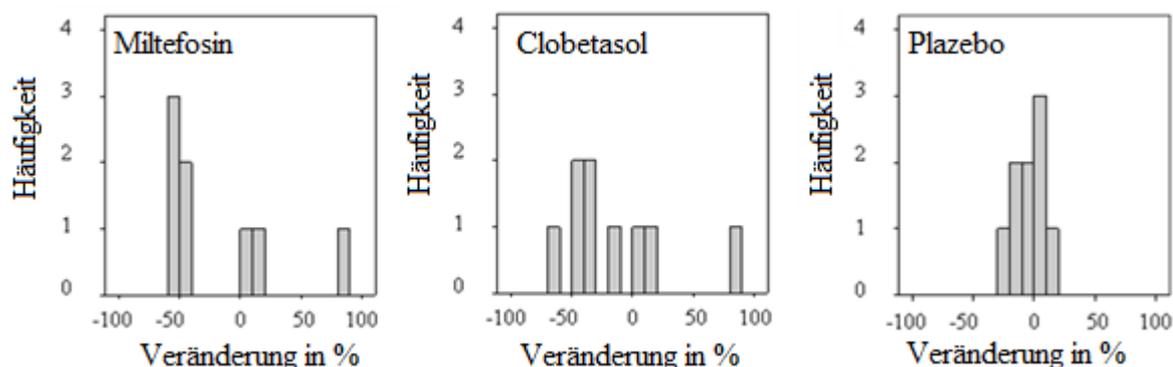


**Abbildung 40:** Prozentuale Veränderung der Volumina der Läsionen vom *Entry visit* zum *End of study visit*. Median  $\pm$  SEM; Miltefosin: N=8, Plazebo: N=9, Clobetasol: N=9.



**Abbildung 41:** Volumetrische Aufnahmen der Läsionen eines Beispielpatienten vor der mechanischen Provokation, aufgenommen mit Hilfe der PRIMOS Messtechnik. Die Farben repräsentieren unterschiedliche Höhen, wobei gelb hohen Werten und blau niedrigen Werten zugeordnet ist. Verglichen werden Läsionen auf den drei verschiedenen Arealen, jeweils vor und nach medikamentöser Therapie mit Miltefosin, Clobetasol und Plazebo. Die Aufnahmen des Beispielpatienten untermauern die prozentuale Veränderung der Volumina der Läsionen, indem sie eine deutliche Abnahme der Volumina der Läsionen nach der Therapie mit Miltefosin zeigen, welche der geringer ausgeprägten Reduktion nach Therapie mit Clobetasol überlegen ist. Die Aufnahmen der Quaddelvolumina nach Behandlung mit Plazebo zeigen keine relevanten Veränderungen.

Die maximale Reduktion der Volumina der Läsionen zeigte für Clobetasol die stärkste Ausprägung mit 64,10%, im Vergleich zu Plazebo mit 23,68% und Miltefosin mit 57,62% (Abbildung 42). In Einzelfällen konnte auch nach der medikamentösen Therapie eine Zunahme beobachtet werden. Für Clobetasol konnte ein maximaler Anstieg der Volumina von 89,87%, für Miltefosin von 84,40% und für Plazebo von 17,59% bestimmt werden.



**Abbildung 42:** Histogramm zur graphischen Häufigkeitsverteilung der prozentualen Veränderung der Volumina der Läsionen für Plazebo (N=9), Clobetasol (N=9) und Miltefosin (N=8). Die Häufigkeit entspricht der Anzahl der Patienten.

Mit Hilfe der volumetrischen Daten der prozentualen Veränderung der AUC wurde außerdem eine Fallzahlschätzung zur Analyse der Unterschiede zwischen Miltefosin und Plazebo kalkuliert. Ausgehend von einem Signifikanzniveau von  $\alpha = 0,05$ , zweiseitigem Test und einer Power von 80% müssten bei 43 Personen die volumetrischen Messungen durchgeführt werden, um einen signifikanten Unterschied zwischen Miltefosin und Plazebo mittels Wilcoxon-Test zeigen zu können.

### 3.5.2.3 Thermografie

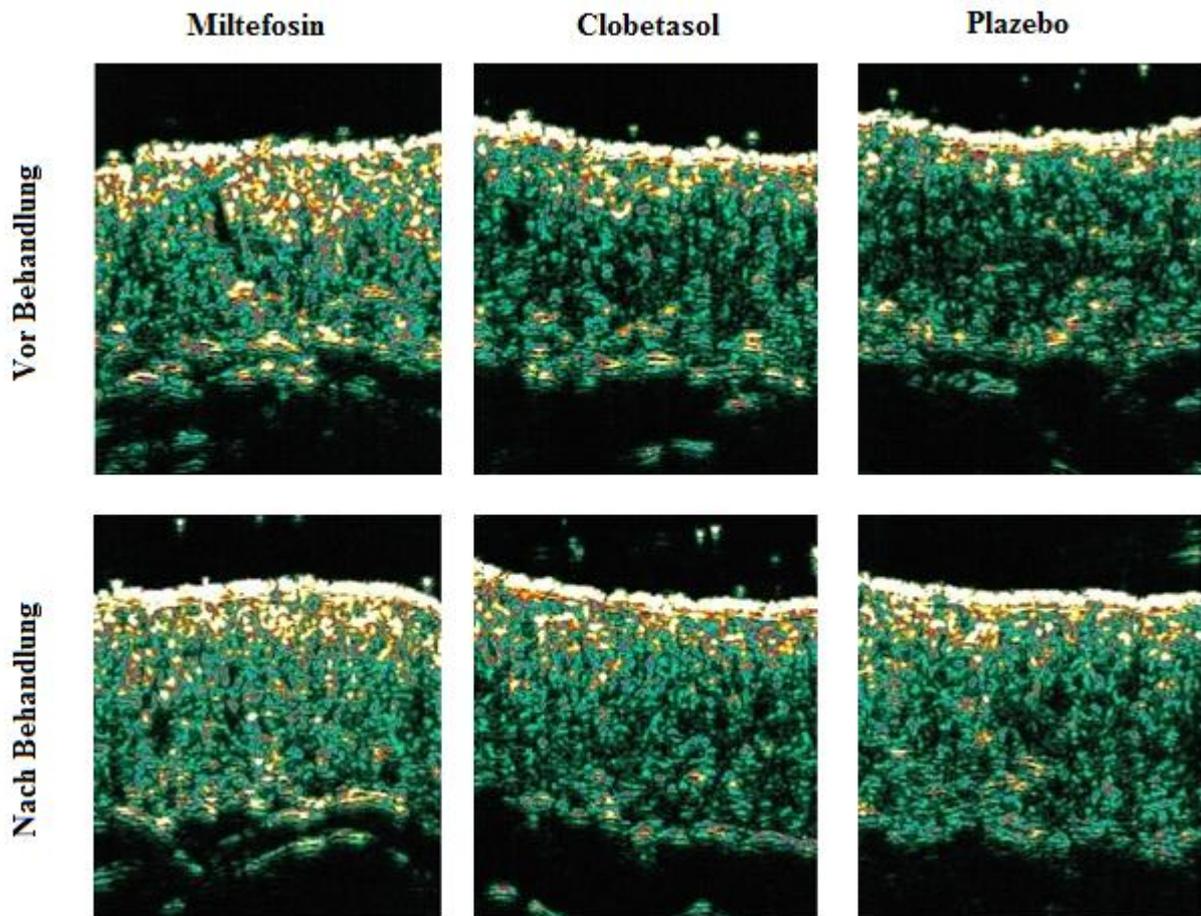
Die Ergebnisse der Thermografie sind nur eingeschränkt verwertbar und wurden als nicht aussagekräftig eingeschätzt. Die Beurteilung der Temperaturveränderungen war aufgrund multipler und sehr kleiner Läsionen und Quaddeln und der damit verbundenen schweren oder gar nicht möglichen Abgrenzung, nicht durchführbar. Ein Matchen der Thermografiebilder, wie es im Rahmen der volumetrischen Messungen erfolgte, war nicht möglich, sodass die Temperaturveränderungen innerhalb der Areale im Zeitverlauf nur fehlerbehaftet berechnet werden konnten.

## 3.6 Überprüfung der Sicherheit

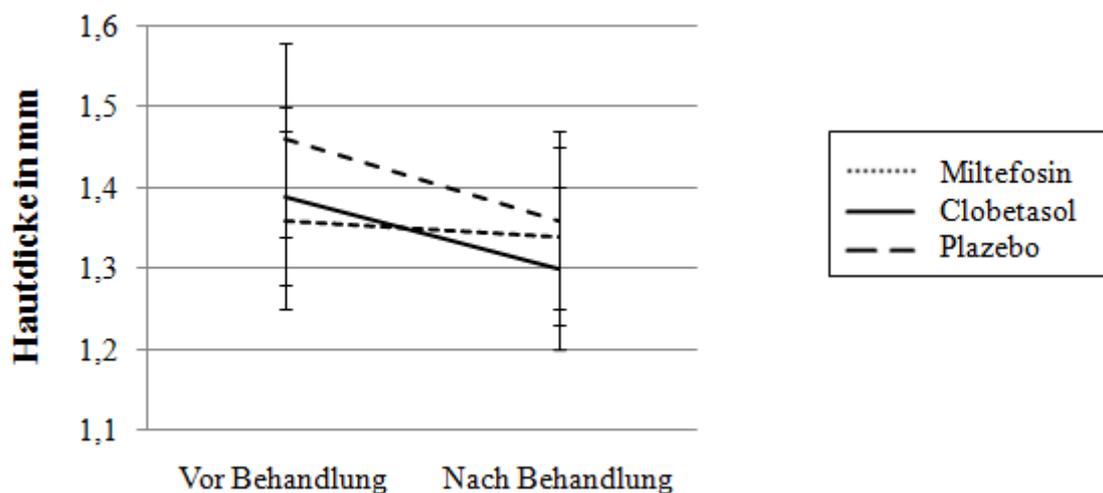
### 3.6.1 Sonographie – Detektion möglicher Veränderungen der Hautdicke

Weder für Clobetasol, noch für Miltefosin oder die Negativkontrolle konnten statistisch signifikante Veränderungen der Hautdicke nach zweiwöchiger Therapie ermittelt werden. Die tendenziell stärkste Reduktion von  $0,10 \pm 0,06$  mm wurde nach Behandlung mit Plazebo gemessen. Für Clobetasol konnten Reduktionen um  $0,09 \pm 0,06$  mm und für Miltefosin um  $0,02$

$\pm 0,06$  mm dokumentiert werden. Keine der Messwerte wurde als klinisch relevant im Sinne einer atrophischen Hautveränderung beurteilt (Abbildung 43 und 44).



**Abbildung 43:** Sonogramme eines Beispielpatienten vor und nach der medikamentösen Therapie mit Miltefosin, Clobetasol und Plazebo. Keine Therapie bedingte klinisch relevante Hautveränderungen in Form von Atrophie.



**Abbildung 44:** Veränderung der Hautdicke vom *Entry visit* zum *End of study visit* für Miltefosin, Clobetasol, Plazebo. MW  $\pm$  SEM, N= 39.

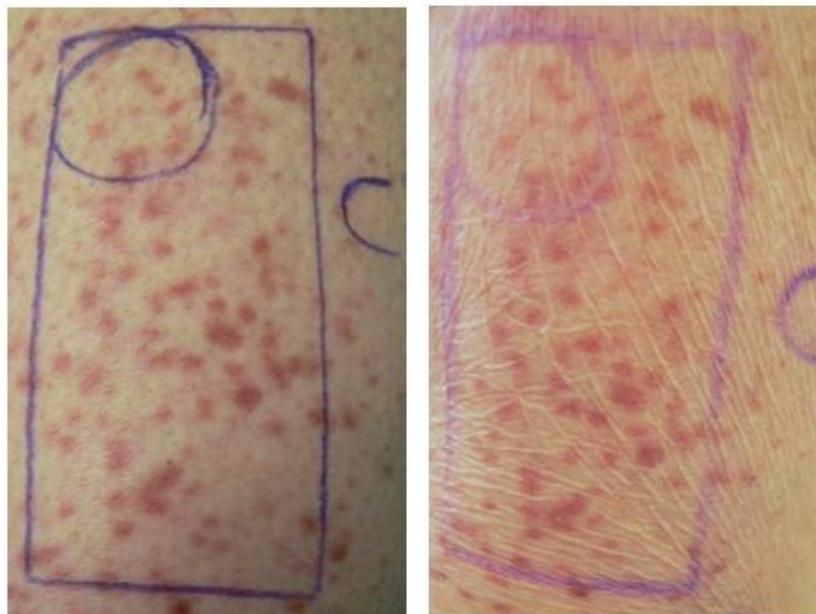
### 3.6.2 Nebenwirkungen

Nebenwirkungen, die in der Zeit ab der ersten Applikation der Studienmedikamente auftraten - *treatment-emergent adverse events* (TEAEs) - wurden von insgesamt 20 Patienten (51,3%) berichtet. Keine der bei den 20 Probanden aufgetretenen 27 TEAEs wurde durch die Prüferärzte auf einer Skala mit den Auswahlmöglichkeiten „stark“, „mittel“ oder „mild“ als „stark“ eingestuft. Nach der Beurteilung der Prüferärzte wurden 24 der aufgetretenen 27 Nebenwirkungen durch die applizierte Studienmedikation ausgelöst. 22 dieser TEAEs traten auf den mit Miltefosin behandelten Arealen auf. Dabei handelte es sich um trockene Hautveränderungen, Ekzem- und Erythementwicklung, sowie in einem Fall um eine vom Prüferarzt als Irritation der Haut beschriebene Veränderung. Nach der Therapie mit Plazebo beschrieb ein Patient Schmerzen innerhalb dieses Behandlungsareals. Auf den mit Clobetasol behandelten Arealen zeigten sich keine Nebenwirkungen. Bei einer Patientin zeigte der Mesotest für das rechte Auge eine veränderte Hell-Dunkeladaptation, die vom Investigator als durch die Medikamente ausgelöst beurteilt wurde. Der Großteil der Nebenwirkungen bildete sich zurück, bei sechs Patienten wurde eine Weiterbeobachtung der Nebenwirkungen versäumt (Tabelle 7).

**Tabelle 7:** Auflistung der durch die Medikamente und nicht durch die Medikamente (non-TEAEs) bedingten TEAEs. Bei einer Patientin traten zwei Ekzeme zu unterschiedlichen Zeitpunkten und Ausprägungen auf den mit Miltefosin behandelten Arealen auf. Dieses multiple Auftreten derselben Nebenwirkung wird in der Tabelle nur einmal aufgeführt.

	N	% Anteil an der ITT	Anzahl der Rückbildungen	Anzahl der fehlenden Weiterbeobachtungen	Medikation der Areale in denen TEAEs auftraten
<b>Durch Medikamente bedingte TEAEs</b>					
Exsikkose	16	41	14	2	Miltefosin
Ekzem	2	5,1	0	2	Miltefosin
Erythem	2	5,1	2	0	Miltefosin
Irritation	1	2,6	1	0	Miltefosin
Schmerzen	1	2,6	0	1	Plazebo
Ophthalmologische Abnormitäten	1	2,6	0	1	
<b>Nicht durch Medikamente bedingte TEAEs</b>					
Abszess	1	2,6	1	0	
Kopfschmerzen	1	2,6	1	0	
Hautbrennen	1	2,6	1	0	

Die häufigsten durch die Studienmedikation ausgelösten Nebenwirkungen waren trockene Hautveränderungen (41%), die bei allen Patienten durch die Behandlung mit Miltefosin hervorgerufen wurden (Abbildung 45).



**Abbildung 45:** Fotografische Dokumentation der Behandlungsareale eines Beispielpatienten vor (links) und nach (rechts) medikamentöser Therapie mit Miltefosin. Die Aufnahmen zeigen trockene Hautveränderungen infolge der 14-tägigen Behandlung.

Die Ergebnisse der ophthalmologischen Untersuchungen vor und nach medikamentöser Therapie wurden mit einander verglichen und auf mögliche Erhöhungen der Blendempfindlichkeit und somit auf eine Verschlechterung der Hell-Dunkel-Adaptation geachtet. Nur eine Patientin zeigte nach der zweiwöchigen Therapie Abweichungen von den Untersuchungen vor der Behandlung. Der Aufforderung sich einer weiteren ophthalmologischen Untersuchung zu unterziehen, ist die Patienten nicht nachgegangen. Bei einem Patienten trat eine non-TEAE in Form einer Bronchitis auf, die sich ebenfalls zurückbildete. Die aufgetretenen unerwünschten Arzneimittelwirkungen führten bei keinem der Patienten zu einer Unterbrechung oder zu einem Absetzen der Studienmedikation, eine therapeutische Intervention war nicht notwendig. Ferner ist kein Todesfall eingetreten.

Die Laborparameter zeigten nach der medikamentösen Therapie nur diskrete Veränderungen (Tabelle 8). Keine der aufgetretenen Abweichungen von den Normalwerten wurde von den Prüfarzten als durch die Studienmedikation verursacht beurteilt. Der Hauptteil der

Abweichungen von den Normalwerten wurde als klinisch nicht relevant bewertet oder auf die Begleitmedikation, sowie technische Fehler zurückgeführt.

**Tabelle 8:** Veränderung der Laborparameter vom *Entry visit* zum *End of study visit* mit Abweichungen von den Normalwerten

<i>Laborparameter</i>	Veränderung vom <i>Screening visit</i> zum <i>End of study</i> <i>visit</i>	Laborparameter außerhalb der Normalwerte <i>Screening visit</i>		Laborparameter außerhalb der Normalwerte <i>End of study visit</i>	
		<i>Mittelwert</i> ± <i>SEM</i>	<i>N</i>	%	<i>N</i>
<b><i>Hämatologie</i></b>					
Erythrozyten [T/l]	-0,08 ± 0,04	6	15,4	5	12,8
Thrombozyten [G/l]	-13,72 ± 5,52	1	2,6	1	2,6
Leukozyten [G/l]	0,07 ± 0,3	8	20,5	7	17,9
<b><i>Klinische Chemie</i></b>					
AST [U/l]	0,23 ± 1,16	0	0	1	2,6
ALT [U/l]	1,52 ± 1,63	5	12,8	6	15,4
Bilirubin [µmol/l]	-1,14 ± 0,63	5	12,8	3	7,7
Alk. Phosphatase [U/l]	-0,88 ± 1,44	2	5,1	2	5,1
Kreatinin [µmol/l]	0,82 ± 1,39	1	2,6	2	5,1
Kalium [mmol/l]	0,25 ± 0,16	1	2,6	3	7,7
Calcium [mmol/l]	-0,03 ± 0,02	3	7,7	0	0
Natrium [mmol/l]	0,26 ± 0,41	0	0	1	2,6

Die Vitalparameter systolischer und diastolischer Blutdruck, sowie die Herzfrequenz zeigten nach der Behandlung keine auf die medikamentöse Therapie zurückzuführenden Veränderungen. Nach der zweiwöchigen Therapie mit Miltefosin, Clobetasol und Plazebo wurden im Rahmen der allgemeinen körperlichen Untersuchung keine neu aufgetretenen Abnormitäten der untersuchten Organsysteme diagnostiziert. Eine verminderte Anzahl der Abnormitäten am *End of study visit* ist nicht auf die Studienmedikation zurückzuführen. Auch die gemessenen Parameter Temperatur in °C und Gewicht in kg zeigten nach medikamentöser Therapie keine Veränderungen. Bei keiner der teilnehmenden Patientinnen konnte im *Screening visit* oder *End of study visit* eine Schwangerschaft mittels Urinschnelltest nachgewiesen werden.

**Tabelle 9:** Auflistung der Abnormitäten im Rahmen der allgemeinen körperlichen Untersuchung für den *Screening Visit* und *End of study visit*. Im *End of study visit* konnten keine neu aufgetretenen Veränderungen der untersuchten Organsysteme beobachtet werden. Eine Verminderung der Anzahl der Abnormitäten am *End of study visit* ist nicht auf die Studienmedikation zurückzuführen.

<b>Betroffenes Organsystem</b>	<b>Screening visit</b>		<b>End of study visit</b>	
	<b>Abnormitäten</b>			
	<i>N</i>	%	<i>N</i>	%
Abdomen	4	10,3	4	10,3
Allergien	11	28,2	8	20,51
Rücken	0	0	0	0
Ohren, Nase, Rachen	1	2,56	1	2,56
Extremitäten	0	0	0	0
Augen	4	10,3	3	7,69
Allgemeine Erscheinung	0	0	0	0
Herz	0	0	0	0
Lunge	0	0	0	0
Hals, Schilddrüse	2	5,13	2	5,13
Nervensystem	0	0	0	0
andere	7	18	3	7,69
Haut	39	100	39	100

## 4. Diskussion

Zahlreiche Arbeiten und Studien der vergangenen Jahre zur Therapie der Mastozytose weisen daraufhin, dass gegenwärtig keine optimale Behandlungsoption zur Verfügung steht. Dies spiegelt sich auch am Patientenkollektiv der vorliegenden Arbeit wieder, von denen über die Hälfte der Probanden vor der Studie mindestens eine Form der Therapie erhielten, ohne jedoch von einer langfristigen, kurativen Wirkung zu profitieren. MICUMA stellt die erste klinische Studie dar, in der die Anwendung von Miltefosin zur Behandlung der CM beleuchtet wird, um eine mögliche Alternative zur bisherigen Therapie zu finden. Die Wirksamkeit und Verträglichkeit von Miltefosin wurde bereits mit guten Ergebnissen in zahlreichen klinischen Studien erforscht und findet bei parasitären Erkrankungen wie der viszeralen und kutanen Leishmaniose, bei der Behandlung des T-Zell-Lymphoms der Haut und bei kutanen Metastasen des Brustkarzinoms Anwendung, sofern eine Operation, Bestrahlung, Hormon- oder Chemotherapie erfolglos sind<sup>105</sup>. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass Miltefosin im Vergleich zu Plazebo tendenziell eine Verbesserung der betrachteten Parameter bewirkt und darüber hinaus in seiner hier angewendeten Zusammensetzung im Vergleich zu Dermoxinale®, einem Präparat das bereits bei der symptomatischen Behandlung der CM zum Einsatz kommt, eine vergleichbare Wirksamkeit ausübt, jedoch zusätzliche Nebenwirkungen verursacht. Es zeigt sich außerdem ein Zusammenhang zwischen der Therapie mit Miltefosin und der statistisch signifikanten Zunahme des subjektiv beschriebenen Juckreizes, sowie reversiblen, trockenen Hautveränderungen.

Im Einzelnen zeigen wir für Miltefosin, dass der zur Beschreibung der Wirksamkeit betrachtete und mittels Analogskala subjektiv beurteilte *Composite Score* nach 14-tägiger Therapie tendenziell, ohne statistische Signifikanz im Vergleich zu den anderen betrachteten Medikamenten, die schwächste Reduktion aufweist. Insbesondere zeigen wir für den *Wheal-* und *Erythema Subscore* nach der Therapie mit Miltefosin eine tendenzielle, jedoch nicht statistisch signifikante, Abnahme und damit eine Reduktion des Darier-Zeichens. Die schwächer ausgeprägte Reduktion des *Composite Scores* nach der Therapie mit Miltefosin im Vergleich zum Plazebo, ist durch einen statistisch signifikanten Anstieg des subjektiv beurteilten Juckreizes infolge mechanischer Reizung nach Behandlung mit Miltefosin zu erklären. Dabei ist zu berücksichtigen, dass der Scorepunkt lediglich auf einen Mittelwert von  $0,90 \pm 0,14$  ansteigt, wobei ein Wert von 1 als milder Ausprägungsgrad definiert ist. Juckreiz infolge dermalen Applikation von Miltefosin trat parallel zu der vorliegenden Arbeit im Rahmen klinischer Studien auf, zeigte jedoch eine große prozentuale Spannweite. Demnach berichten Clive *et al.*

nach lokaler Therapie von Hautmetastasen des Mammakarzinoms lediglich bei 12% der Probanden über das Auftreten von lokalem Juckreiz. Die Behandlung des kutanen T-Zell-Lymphoms mit Miltefosin in der gleichen Dosierung und vergleichbaren Anwendungsdauer, führte laut Dumontet *et al.* bei 58% der Patienten zum Auftreten von lokalem Pruritus. Diese Studien verdeutlichen, dass der Juckreiz eine Miltefosin-bedingte Nebenwirkung darstellt, der auch bei der Behandlung von Erkrankungen auftritt, die im Vergleich zur CM normalerweise nicht mit Juckreiz assoziiert sind. Analog zu unseren Beobachtungen wurde der Juckreiz jedoch lediglich als mild und reversibel beurteilt. Demzufolge bedurften die Symptome nur in Einzelfällen mit starker Ausprägung des Einsatzes von Medikamenten, welcher innerhalb der MICUMA-Studie nicht von Nöten ist<sup>124-127</sup>. Die innerhalb der vorliegenden Arbeit erfolgten, zur objektiven Beurteilung der Quaddelvolumina an einer Subpopulation durchgeführten volumetrischen Messungen veranschaulichen, dass Miltefosin tendenziell, jedoch nicht statistisch signifikant im Vergleich zu Placebo eine Reduktion der Quaddelvolumina nach mechanischer Reizung bewirkt. Diese Reduktion ist Korrelat für eine verminderte Mediatorfreisetzung, als Resultat einer möglichen inhibitorischen Wirkung von Miltefosin auf die MC-Degranulation oder einer verminderten, mittels histomorphometrischen Untersuchungen dargestellten MC-Anzahl. Zusätzlich zeigen wir eine tendenzielle Abnahme der Volumina der Läsionen nach der Therapie mit Miltefosin im Vergleich zum Placebo. Fehlende statistische Signifikanzen sind mit einer geringen Fallzahl von maximal 9 Patienten zu erklären. Trotzdem können wir zeigen, dass die volumetrischen Messungen hinsichtlich der Quaddelvolumina die gleichen Tendenzen aufweisen, wie sie bereits durch die subjektive Beurteilung beschrieben werden. In der Literatur wird über keine klinische Studie berichtet, bei der eine dreidimensionale Oberflächenmessung in Form der PRIMOS-Messtechnik zur Volumenbestimmung von Quaddeln bei Patienten mit CM zum Einsatz kommt. Die MICUMA-Studie zeigt, dass diese Messtechnik bei Patienten mit Mastozytose objektive und differenzierte Aussagen über die Volumina der Läsionen und Quaddeln liefert. Auch für die zukünftige Beurteilung der Wirksamkeit von Medikamenten bei Patienten mit Mastozytose oder anderen, mit dem Auftreten von Quaddeln assoziierten Erkrankungen, wie der Urtikaria, scheint die Methodik der Volumenbestimmung vielversprechend. Demzufolge ist der Einsatz an einem größeren Probandenkollektiv im Rahmen folgender Studien indiziert.

Die Anordnung der MC innerhalb der Exzidate, die zur Beurteilung der Wirkung auf die MC entnommen wurden, entspricht der in der Literatur beschriebenen typischen Verteilung bei Patienten mit Mastozytose. Der Großteil der MC wird in der oberen papillären Dermis, unmittelbar unter der Basalmembran, gezählt. In den folgenden Schichten nimmt die MC-Anzahl

ab und erreicht in der Subkutis das Minimum<sup>32</sup>. Die Exzidate der vorliegenden Arbeit weisen insbesondere in der oberen papillären Dermis nach der Therapie mit Miltefosin im Vergleich zum Placebo eine geringere MC-Anzahl auf. Diese Reduktion lässt vermuten, dass Miltefosin möglicherweise nicht nur über eine Beeinflussung der *Rafts* und der Signaltransduktion oder über die Inhibition von Enzymsystemen, wie z.B. der Proteinkinase C wirkt, sondern wahrscheinlich eine Apoptose, wie sie für Tumorzellen beschrieben wird, induziert. Auffällig ist, dass der therapiebedingte Effekt der MC-Reduktion in den Schichten unterhalb der oberen papillären Dermis nur geringfügig bis gar nicht ausgeprägt ist. Eine unzureichende Penetration der topisch applizierten Medikamente ist als Ursache für dieses Phänomen anzunehmen. Die Penetrationsfähigkeit wird von einer Vielzahl von Faktoren, wie beispielsweise der chemischen Struktur, bestimmt. Voraussetzung für einen schnellen Transfer durch die Haut ist eine gute Lipidlöslichkeit, eine ausreichende Wasserlöslichkeit und ein geringes Molekulargewicht. HePC zeigt ein solch amphiphiles Verhalten in Kombination mit einem geringen Molekulargewicht von 407 Dalton und lässt daher bereits eine gute Penetration vermuten. Um diese zu steigern, kann Miltefosin, wie in der vorliegenden Arbeit verwirklicht, in einer Mischung aus drei 3-alkoxypropylenglycol, nämlich propyl-, hexyl- und nonyloxypropylenglycol, mit je unterschiedlicher Kettenlänge, gelöst werden. Vor allem die kurzkettigen Alkylglycole sind amphiphile Moleküle, die gute Löslichkeitseigenschaften für lipophile Moleküle bieten. Wie bereits an der Blut-Hirn-Schranke von Ratten gezeigt, ermöglichen sie die Penetration durch biologische Membranen und fungieren auf diese Weise als Penetrationenhancer<sup>87, 128</sup>. In Folgestudien soll zur Förderung der Wirksamkeit die kutane Penetration erhöht werden. Eine Möglichkeit besteht in der Steigerung der Lipophilie der Moleküle und Salbengrundlage. Auch eine Erhöhung der Hydratation des Stratum corneum, wie z.B. durch Okklusivverbände oder Harnstoff als Zusatzstoff, bedingt eine Verbesserung der Diffusion und kann die Penetration optimieren<sup>72</sup>. Es muss jedoch zwischen der Steigerung der Penetration und einer möglichen Irritation der Haut, herbeigeführt durch Zusatzstoffe und Okklusivverbände, abgewogen werden. Darüber hinaus kann eine Wirksamkeitssteigerung neben der Förderung der Penetration und damit verbundener erhöhter Wirkstoffkonzentration in der Haut durch weitere Modifikation, wie z.B. der Behandlungsdauer, erreicht werden. Als Grundlage für diese Hypothese dienen die Beobachtungen von Unger *et al.*<sup>128</sup>. Indem sie Patienten mit Hautmetastasen des Mammakarzinoms behandelten und die ersten Miltefosin-induzierten Veränderungen der Läsionen nicht vor der vierten Behandlungswoche auftraten, zeigten sie, dass eine Behandlungsdauer länger als zwei Wochen zur Beurteilung der Wirksamkeit nötig ist. Bedenken, dass durch eine verlängerte Behandlungsdauer Nebenwirkungen gehäuft auftreten, konnten

durch Burk *et al.* widerlegt werden<sup>129</sup>. Dementsprechend sank die Risikorate für unerwünschte Nebenwirkungen signifikant, je länger die Therapie fortgeführt wurde. Weil das antineoplastische Therapeutikum zuvor noch nie bei Patienten mit CM/ISM zur Anwendung kam, wählten wir in der vorliegenden Arbeit zunächst einen kurzen Behandlungszeitraum von zwei Wochen. In möglichen Folgestudien zur CM soll Miltefosin über einen längeren Behandlungszeitraum topisch aufgetragen werden, weil die durchgeführte Phase II Studie keinen Hinweis auf klinisch relevante, irreversible Nebenwirkungen erbringt, die gegen eine längere Behandlungsperiode sprechen. Im Unterschied zu der vorliegenden Arbeit wurde in weiteren Studien, wie bei Leonard *et al.*, Clive *et al.* oder Terwogt *et al.*, Miltefosin über einen Zeitraum von mindestens 8 Wochen appliziert. Trat eine Remission der Läsionen auf, wurde Miltefosin weitere vier Wochen aufgetragen<sup>124-127, 130</sup>. Entsprechend der Fachinformation wird dieses Prozedere ebenfalls für die Behandlung von Hautmetastasen des Mammakarzinoms empfohlen, um bei hinreichender Sicherheit ein Ansprechen der Therapie beurteilen zu können. Grischke *et al.* fanden dabei nach achtwöchiger Behandlung eine 26%ige Ansprechrates<sup>126</sup>. Dagegen zeigte Dumontet *et al.* beim kutanen T-Zell-Lymphom und vergleichbarer Anwendung eine Ansprechrates von 58%<sup>125</sup>. Es ist zu vermuten, dass durch eine verlängerte Anwendungsdauer vergleichbare Ergebnisse in Bezug auf Wirksamkeit und Ansprechrates auch bei der CM erzielt werden können.

Des Weiteren erscheint der Einsatz einer anderen Applikationsform als der dermalen zur Steigerung der hier beobachteten Wirksamkeit vielversprechend. Die orale Verabreichung von Miltefosin erfolgt bereits bei der kutanen und viszeralen Leishmaniose<sup>131-134</sup>. Es konnte eine große Spannweite der Ansprechrates aufgezeigt werden, die bei einer jeweils 28-tägigen Therapie mit 150 mg/d nach Soto *et al.* von 53% bis 97% reichte<sup>89, 135</sup>. Nebenwirkungen im Gastrointestinaltrakt, wie Nausea, Erbrechen und Diarrhö sind typische, durch die orale Gabe von Miltefosin induzierte Symptome. Einmalig wurde das Auftreten des Steven-Johnson-Syndroms beschrieben. Außerdem wurden Veränderungen des Blutbildes berichtet, die sich als leichte Erhöhung der Leberenzyme, speziell der AST und ALT im Serum manifestierten. Ein Anstieg von Kreatinin, der Leukozyten, der Thrombozyten und des Hämoglobins wurde zusätzlich beschrieben<sup>89, 131-133</sup>. Diese durch Miltefosin induzierten Nebenwirkungen konnten zusätzlich tierexperimentell nachgewiesen werden, wobei insbesondere bei hohen Dosen von 6-10 mg/kg KG marginale Kreatininanstiege im Serum, Erhöhungen des Harnstoff- und Stickstoffspiegels im Serum, Elektrolytverschiebungen, Protein- und Hämoglobinurie neben chronischen Nephropathien beschrieben wurden. Bei männlichen Ratten traten infolge hoher oraler Dosen Atrophien der Geschlechtsorgane auf, ebenso wurden embryotoxische

Nebenwirkungen berichtet. Die orale Anwendung bedingt hohe mittlere Wirkstoffspiegel im Serum, die beim Menschen nach der Einnahme von 150 mg Miltefosin/d ca. 67 nmol/ml betragen. Im Gegensatz dazu bedingen selbst mehrmonatige dermale Anwendungen von täglich bis zu 450 mg Miltefosin beim Menschen keine über der Nachweisgrenze von 1 nmol/ml liegenden Wirkstoffspiegel<sup>105</sup>. Es ist zu vermuten, dass ein durch orale Gabe bedingter, erhöhter Wirkstoffspiegel im Serum im Vergleich zur dermalen Applikation eine gesteigerte Wirksamkeitsrate ermöglicht. Die orale Verabreichung und damit verbundener erhöhter Nutzen bedarf jedoch im Hinblick auf die beschriebenen Nebenwirkungen einer gewissenhaften Abwägung. Gemäß der berichteten hohen Wirksamkeitsraten und der vorwiegend als mild bis moderat, sowie reversibel beschriebenen Nebenwirkungen, stellt die orale Gabe bei gründlicher und engmaschiger Kontrolle der Nieren-, Leber-, sowie Blutwerte und bei Gewährleistung der Kontrazeption, eine mögliche Applikationsform für die Behandlung der CM dar<sup>132, 133</sup>. Analog den bereits erfolgten klinischen Studien zur Behandlung der kutanen Leishmaniose können täglich orale Dosen von 2,5 mg/kg KG über einen Zeitraum von 28 Tagen verabreicht werden<sup>131</sup>. Die intravenöse Injektion als weitere alternative Applikationsform stellt keine Option dar, weil diese in einer Hämolyse gipfelt. Neben der großen Anzahl an Läsionen, die sich innerhalb der vorliegenden Arbeit bei 97% der Patienten auf über 50 belaufen, ist die intrakutane Injektion aufgrund von beobachteten extensiven Ulzera und Hautveränderungen um die Einstichstelle kontraindiziert<sup>136</sup>. Auch eine Modifikation der Konzentration in Folgestudien zur Wirksamkeitssteigerung stellt keine Alternative dar. Burk *et al.* untersuchten im Rahmen einer Phase I Studie mit Tumorpatienten die maximal tolerierte Dosis von Miltefosin. Sie verglichen die Effekte von lokal applizierter 2, 4, 6 und 8%iger Miltefosinlösung, die sie innerhalb der ersten Woche einmal und anschließend zweimal täglich auftrugen. Nach Therapie mit 8%iger Miltefosinlösung traten statistisch signifikante Hautirritationen auf, weshalb die lokale Anwendung von 6%iger Lösung empfohlen wird<sup>129</sup>. Aufgrund der vermehrt auftretenden Nebenwirkungen ist eine Erhöhung der Konzentration von der in der vorliegenden Arbeit verwendeten 6%igen Lösung auf eine 8%ige zur Steigerung der Wirksamkeit in Folgestudien kontraindiziert.

Eine weitere Möglichkeit zur Wirkungssteigerung in Folgestudien stellt die Erhöhung der applizierten Dosis dar. Grundlage für diese Hypothese bilden die Ergebnisse der MIMACT-Studie, die zeigten, dass die anti-IgE vermittelte Histaminfreisetzung bei humanen MC *in vitro* durch Miltefosin dosisabhängig, mit einer maximalen Hemmung bei 25 µM, inhibiert wird<sup>104</sup>. Es gilt zu überprüfen, ob analog zu den experimentellen Ergebnissen die Inhibition der Mediatoren *in vivo* und folglich die Symptome der CM dosisabhängig sind. Trotz möglicher

Wirkungssteigerungen muss einer Dosiserhöhung der hier eingesetzten 0,5 ml Miltex®/ d im Rahmen klinischer Studien eine gewissenhafte Risiko-Nutzen Abwägung voraus gehen. Burk *et al.* untersuchten innerhalb einer Phase I Studie die maximal tolerierte Dosis von Miltex® pro Applikation. Bei Läsionen mit einer begrenzten Größe von 100 cm<sup>2</sup> betrug diese 6 Tropfen pro 10 cm<sup>2</sup> (entsprechend 15 ml Miltex®). Auf nicht ulzerierten Läsionen mit einer Fläche bis zu 500 cm<sup>2</sup> wurden 4 Tropfen pro 10 cm<sup>2</sup> toleriert (entsprechend 10 ml Miltex®). Das Auftreten von Ulzerationen limitiert die tägliche Applikation auf 5 ml. Laut Fachinformation für die Behandlung des Mammakarzinoms soll eine Anwendung von mehr als 5 ml Miltex®/ d nur unter ärztlicher Kontrolle erfolgen, da die tägliche Auftragung von 10 ml auf einer Fläche von ca. 2.000 cm<sup>2</sup> in einem Fall zu Übelkeit und Erbrechen führte<sup>129</sup>. Ob die beschriebene Erhöhung der Tropfenanzahl pro 10 cm<sup>2</sup> ebenfalls auf die Behandlung von Patienten mit CM übertragbar ist und eine Wirksamkeitssteigerung bedingen kann, muss in Folgestudien überprüft werden. Dabei soll die tägliche Applikation von 5 ml Miltex®/ d nicht überschritten werden.

Bezüglich der Verträglichkeit können wir zeigen, dass Miltefosin nach 14-tägiger Therapie keine atrophischen Hautveränderungen verursacht, wie beispielsweise durch Burk *et al.* beschrieben<sup>129</sup>. Demnach traten diese bei 5,6% der Patienten auf, deren Hautmetastasen täglich mit zwei Tropfen 6%iger Miltefosinlösung pro cm<sup>2</sup> über eine mediane Behandlungszeit von 14 Wochen behandelt wurden. In der vorliegenden Arbeit treten unter Therapie mit Miltefosin andere lokale Nebenwirkungen auf, die sich in Form von Ekzem- und Erythembildung und bei weniger als der Hälfte der Probanden als trockene Hautveränderungen manifestieren. Diese werden lediglich als mild bis moderat eingeschätzt, führen bei keinem Patienten zu einem Abbruch der Behandlung und bedürfen keiner medikamentösen Intervention. Außerdem können wir bei allen weiter beobachteten Probanden eine Reversibilität der trockenen Veränderungen beschreiben. Die benannten Nebenwirkungen sind bereits aus präklinischen Studien bekannt, innerhalb derer die dermale, vierwöchige Applikation bei Schweinen eine dosisabhängige Entstehung von Erythemen, Hyper- und Parakeratosen, Dermatitis und epidermaler Hyperplasie hervorrief. Die dermale Applikation auf skarifizierter Haut bei Kaninchen führte zu einer geringen bis mäßigen Irritation. Erst hohe dermale Dosen von 5 g Miltex®/kg KG verursachten bei Ratten infolge einer 24-stündigen okklusiven Verabreichung vereinzelt Degenerationen und Nekrosen<sup>105</sup>. Im Rahmen klinischer Studien traten ebenfalls trockene, durch Miltefosin induzierte Hautveränderungen auf, die hinsichtlich ihrer Häufigkeit eine unterschiedlich starke Ausprägung zeigten. Dementsprechend berichteten Grischke *et al.* bei 10%, Clive *et al.* bei 28% und Namer *et al.* bei 80,8% der Patienten, die sich einer Therapie der kutanen Metastasen des

Mammakarzinoms unterzogen, über trockene Hautveränderungen<sup>124, 126, 137</sup>. Zusätzlich wird in der Literatur parallel zu der vorliegenden Arbeit über subjektive Hautveränderungen wie Brennen, Pruritus, Spannungsgefühl und Schmerz, sowie über objektive Veränderungen in Form von Desquamation und Erythementwicklung berichtet, die ebenfalls bezogen auf die prozentuale Ausprägung Schwankungen zeigten<sup>124-126, 130</sup>. Um zu zeigen welcher Bestandteil von Miltex® die Hautveränderungen bedingt, applizierten Hilgard und Klenner bei Ratten lokal eine Mixtur bestehend aus 3-Alkyloxypropylenglycol und Wasser und induzierten damit keine Hautveränderungen. Im Gegensatz dazu bedingte die lokale Applikation von Miltex® bei Ratten reversible Hautveränderungen in Form von Hautrötung, gefolgt von Desquamation nach der Beendigung der Therapie. Hilgard und Klemmer konnten auf diese Weise zeigen, dass die durch Miltex® bedingten Hautveränderungen dem aktiven Wirkstoff Miltefosin und nicht den Bestandteilen in denen HePC gelöst ist, zuzuschreiben sind<sup>87</sup>. Um eine Reduktion der aufgetretenen unerwünschten Nebenwirkungen innerhalb möglicher Folgestudien zu realisieren, sollen pflegende Cremes, wie wasserhaltige Paraffinemulsionen oder Vaseline, aufgetragen werden. Diese sollen frühzeitig das Auftreten von trockenen Hautveränderungen, die mögliche therapeutische Effekte von Miltefosin innerhalb der Studie zusätzlich maskiert haben können, verhindern oder diese therapieren. Derartige Modifikationen der Externgrundlage können zusätzlich die Penetrationseigenschaften beeinflussen. Speziell ein hoher Anteil an Paraffinkomponenten behindert den transepidermalen Wasserverlust und führt vergleichbar mit der Okklusion zu einer Hydratation der Epidermis<sup>69</sup>. Die rückfettenden Cremes können laut Fachinformation 2-3 Stunden nach der Auftragung von Miltefosin appliziert werden<sup>105</sup>. Terwogt *et al.* beschreiben eine gleichzeitige Auftragung von 10% Vaseline zusammen mit Miltefosin um lokalen Nebenwirkungen frühzeitig vorzubeugen oder diese zu minimieren<sup>130</sup>. Erst bei fortbestehenden Symptomen, denen mit Hilfe pflegender Cremes nicht entgegen gewirkt werden kann, soll eine Reduktion des Behandlungszeitraumes oder der Standarddosis in Erwägung gezogen werden<sup>124, 125, 127, 130</sup>. Diese Modifikation kann jedoch eine eingeschränkte Wirksamkeit zur Folge haben. Gemäß den Empfehlungen der Fachinformation und bereits in klinischen Studien beispielsweise bei Grischke *et al.* realisiert, soll Miltefosin in der ersten Behandlungswoche einmal täglich dermal appliziert und nur bei Verträglichkeit in den darauffolgenden Wochen zweimal täglich aufgetragen werden<sup>126</sup>. Diese einwöchige tägliche Anwendung ist hilfreich um die Entstehung von möglichen Nebenwirkungen frühzeitig zu erkennen und diesen entgegen wirken zu können. Aufgrund der kurzen Studiendauer der vorliegenden Phase II Studie von nur zwei Wochen, verspricht eine einwöchige Therapie mit einmal täglicher und anschließender einwöchiger Therapie mit zweimal täglicher Applikation,

wenig Erfolge. Folgestudien mit einem längeren Behandlungszeitraum sollen daher das von Grischke *et al.* beschriebene Prozedere übernehmen.

Zur Beurteilung möglicher systemischer Nebenwirkungen überprüfen wir in der vorliegenden Arbeit Labor- sowie Vitalparameter und führen körperliche Untersuchungen vor und nach Therapie durch. Es gibt keinen Hinweis auf klinisch relevante Veränderungen der benannten Parameter. Diese Ergebnisse sind parallel zu Beobachtungen in präklinischen Studien, in denen weder nach einer Einzeldosisapplikation, noch nach vierwöchiger täglicher Applikation von Miltefosin systemische Nebenwirkungen auftraten. Beim Menschen konnte infolge dermalen Applikation lediglich eine niedrige systemische Verfügbarkeit gemessen werden. Demzufolge bedingt die dermale Applikation von Miltefosin keine Wirkstoffspiegel, die zu systemischen Nebenwirkungen führen. In klinischen Studien zur Behandlung von Hautmetastasen oder T-Zell-Lymphomen mit Miltefosin berichten außer Leonard *et al.* oder Dumontet *et al.* weitere Autoren über das Ausbleiben systemischer Toxizität, selbst wenn das Präparat bei gleicher Dosierung über einen längeren Zeitraum als in der vorliegenden Studie eingesetzt wurde<sup>124-127</sup>. Es sind jedoch Einzelfälle bekannt, bei denen nach lokaler Applikation Veränderungen der Laborwerte in Form von leicht erhöhtem Serumkreatinin, Transaminasen, Leukozyten und Thrombozyten auftraten. Deren Kausalität wurde nicht vollständig geklärt und ein Zusammenhang mit Miltefosin nicht sicher ausgeschlossen<sup>105</sup>. Zusätzlich können sich klinisch relevante, okulotoxische Veränderungen durch die orale Gabe von HePC präsentieren. In einem 27-tägigen Tierexperiment trat bei Ratten, die täglich mit 34,8 mg/kg KG HePC systemisch behandelt wurden, eine Degeneration des retinalen Pigmentepithels, sowie der Photorezeptoren auf. Theischen *et al.* führten anlässlich der tierexperimentellen Ergebnisse bei insgesamt 23 Patienten, die im Rahmen einer Phase II Studie eine Behandlung mit Miltefosin aufgrund ihrer metastasierenden, kolorektalen und bronchialen Karzinome erfuhren, Untersuchungen zur Beurteilung des Visus, des intraokularen Druckes, des Farbsehens und des Gesichtsfeldes durch. Zusätzlich kam die Elektrookulographie (EOG) und Elektroretinographie (ERG), Spaltlampenuntersuchung und Ophthalmoskopie mit Fotodokumentation zum Einsatz. Die Patienten erhielten innerhalb der ersten Woche 100 mg/d per os, in den folgenden Wochen 150 mg/d und somit eine ungefähr 16-fach geringere Dosis als im Tierexperiment. Der mediane Behandlungszeitraum betrug 8 Wochen. 71% der Patienten zeigten im EOG eine größere Blendempfindlichkeit unter der Therapie mit Miltefosin, die bei den meisten Patienten nach Beendigung der Therapie reversibel war. Bei einigen Patienten begann die Rückbildung bereits vor Therapieende. Theischen *et al.* konnten zeigen, dass Miltefosin analog zu den tierexperimentellen Studien beim Menschen eine reversible Funktionsstörung des retinalen

---

Pigmentepithels herbeiführte, jedoch keine weiteren funktionellen oder morphologischen Veränderungen bedingte<sup>123</sup>. Tierexperimentell konnte infolge dermalen Applikation, die zu einem Plasmaspiegel von 5 nmol Miltefosin/ml führte, keine Beeinträchtigung der Funktionalität der Retina beobachtet werden. Aufgrund dessen ist bei Menschen das Risiko von sogar reversiblen Beeinträchtigungen der Retina gering. Eine regelmäßige Kontrolle der Hell-Dunkeladaptation wird laut Fachinformation zu Beginn der Behandlung und im halbjährigen Abstand empfohlen<sup>105</sup>. Dementsprechend führen wir in der vorliegenden Arbeit vor und nach medikamentöser Therapie ophthalmologische Untersuchungen durch. Mit Ausnahme einer Patientin zeigt keiner der Probanden am Ende der Studie eine Veränderung der Hell-Dunkeladaptation. Weil die Patientin der Aufforderung, sich einer weiteren ophthalmologischen Untersuchung zu unterziehen, jedoch nicht folgte, konnte eine mögliche Kausalität zwischen den aufgetretenen Veränderungen und der medikamentösen Therapie nicht eindeutig geklärt werden.

Um die Wirksamkeit von Miltefosin mit bereits bei der CM zum Einsatz kommenden topischen Medikamenten zu vergleichen und damit den Stellenwert von Miltefosin als eine mögliche therapeutische Alternative beurteilen zu können, wird als Positivkontrolle das symptomatisch wirkende Clobetasol eingesetzt. Im Einzelnen zeigen wir, dass die 14-tägige Therapie mit Clobetasol eine tendenzielle Abnahme des *Composite Scores* bewirkt, die im Vergleich zu Miltefosin und Placebo am stärksten ausgeprägt ist. Dies beinhaltet eine Abnahme des *Erythema Scores*, der für Clobetasol im Vergleich zu Miltefosin eine schwächer ausgeprägte Abnahme aufweist. Darüber hinaus bedingen Clobetasol und Miltefosin eine vergleichbare Reduktion des Darier-Zeichens. Im Gegensatz zu Miltefosin nimmt der Juckreiz nach der Behandlung mit Clobetasol tendenziell ab. Die subjektive Einschätzung durch den Patienten und Prüfarzt in Form des *Global efficacy assessment* weist im Vergleich zu Clobetasol eine statistisch signifikante, diskrete Verschlechterung nach der Therapie mit Miltefosin auf. Mit Hilfe der volumetrischen Aufnahmen können wir für Miltefosin und Clobetasol annähernd gleich stark ausgeprägte Reduktionen der AUC und der Volumina der Läsionen nachweisen. Die Wirksamkeit von 0,05% Clobetasol bei der Behandlung der kutanen Manifestationen im Rahmen der Mastozytose wurde bereits innerhalb zahlreicher klinischer Studien überprüft. Obwohl ein Hauptteil der Studien unter andern Bedingungen, wie z.B. längerer Behandlungsdauer oder dem Einsatz von Okklusivverbänden durchgeführt wurde und trotz der häufig geringen Anzahl an Probanden, die eine kritische Betrachtung der Studien notwendig machen, zeigen sich zu der vorliegenden Arbeit analoge Ergebnisse. Beispielsweise behandelten Higgins *et al.* einen unter CM leidenden Patienten über einen Zeitraum von 4 Wochen mit 0,05% Clobetasol und konnten auf diese Weise

eine deutliche kosmetische Verbesserung der Makulae nachweisen<sup>138</sup>. Auch die Behandlung mit Clobetasol über einen Zeitraum von 6 Wochen unter okklusiven Bedingungen führte zu einer Verbesserung des klinischen Bild mit einer Abflachung der Läsionen und einer Reduktion des Darier-Zeichens<sup>139-141</sup>. Die sechswöchige, okklusive Behandlung mit einem anderen stark wirksamen Steroid der Klasse IV, wie z.B. Betamethasondipropionat, bedingte ebenfalls eine Reduktion des Pruritus, des Darier-Zeichens und der Hyperpigmentierung<sup>142</sup>. Die lediglich temporäre Wirkung der Steroide als limitierender Faktor, die aufgrund fehlender *follow-ups* in der vorliegenden Arbeit nicht betrachtet wird, konnte in klinischen Studien wie beispielsweise durch Higgins *et al.* aufgezeigt werden<sup>138</sup>. Im Gegensatz dazu existieren jedoch auch Fälle, bei denen eine partielle Besserung des klinischen Erscheinungsbildes in Folge der lokalen Therapie mit Clobetasol mehrere Jahre anhielt<sup>140</sup>.

Innerhalb der vorliegenden Arbeit können wir mit Hilfe der histomorphometrischen Untersuchungen zeigen, dass Exzidate der mit Clobetasol behandelten Areale weniger MC im Vergleich zu Miltefosin aufweisen. Die Studien von Higgins *et al.* und Barton *et al.* zeigten vergleichbare Ergebnisse, da eine Reduktion des Histamingehaltes im Gewebe, sowie eine Reduktion der MC-Anzahl, die bis zu 24 Wochen nach Beendigung der Therapie anhielt, beschrieben wurde<sup>138, 143</sup>. Ferner demonstrieren Lavker *et al.*, Lehmann *et al.* und Pipkorn *et al.* bei gesunden Probanden nach vier- bzw. sechswöchiger Applikation von Clobetasol - mit oder ohne Okklusion - innerhalb der dritten Woche eine Reduktion des Histamingehaltes im Gewebe, die jedoch reversibel war. Ab der dritten Woche der Behandlung konnten außerdem MC-Populationen im Elektronenmikroskop gezeigt werden, die typische Zeichen von degenerativen und apoptotischen Zellen zeigten. Nach sechswöchiger Therapie konnten keine MC mehr gezählt werden. Zwei Wochen nach dem Absetzen der Therapie konnten mittels Elektronenmikroskop Zellen dargestellt werden, die charakteristische Eigenschaften der MC aufwiesen und als neue, in der Haut reifende MC interpretiert wurden<sup>144-146</sup>.

Im Rahmen der MICUMA-Studie werden nach der zweiwöchigen, täglichen Anwendung von Dermoxinale® die steroidtypischen lokalen oder systemischen Nebenwirkungen, vor allem atrophische Hautveränderungen, nicht beobachtet. Die Patienten erhalten eine totale Dosis von 3,5 g pro Woche und damit eine um das 14-fache geringere Menge als die maximal erlaubte totale Dosis. Das innerhalb der Studie ausbleibende Auftreten der beschriebenen Nebenwirkungen, die hauptsächlich infolge einer länger als zwei Wochen dauernden, großflächigen Therapie auftreten, ist mit dieser geringen Dosis und der kurzen Applikationszeit zu begründen.

Mit Hilfe der MICUMA-Studie weisen wir für Miltefosin im Vergleich zu Clobetasol tendenziell eine annähernd gleich stark ausgeprägte Reduktion der Parameter nach, die zur Beurteilung der Wirksamkeit untersucht werden. Obwohl wir innerhalb der Studie für Miltefosin im Vergleich zu Clobetasol stärker ausgeprägte unerwünschte Nebenwirkungen beobachten, muss berücksichtigt werden, dass diese einerseits durch die beschriebenen Modifikationen reduziert oder verhindert werden können und andererseits in Folgestudien und voraussichtlich in der klinischen Anwendung zur Wirkungssteigerung eine deutlich längere Behandlungszeit als zwei Wochen gewählt werden muss. Vergleicht man die Nebenwirkungen von Clobetasol und Miltefosin, die infolge einer längeren Anwendungsdauer auftreten, zeigt sich jedoch ein erhöhtes Risiko für Steroid-spezifische Nebenwirkungen und ein reduziertes Risiko für unerwünschte Miltefosin-bedingte Nebenwirkungen<sup>129</sup>. Es muss jedoch kritisch betrachtet werden, dass beide Therapieformen Limitationen bei der Behandlung der Mastozytose zeigen. So ist die dermale, flächenhafte Auftragung der Medikamente begrenzt. Für Dermoxinale® wird nach einer flächenhaften Applikation von mehr als 10% der Körperoberfläche ein vermehrtes Auftreten von Nebenwirkungen beschrieben und bei Therapie mit mehr als 5 ml Miltex®/d die ärztliche Beobachtung aufgrund möglicher systemischer Nebenwirkungen empfohlen. Weiterer Limitationsfaktor ist die lediglich temporäre Wirksamkeit, die für Dermoxinale® bei der Behandlung von Patienten mit Mastozytose beschrieben wurde. Auch bei der lokalen Behandlung der Hautmetastasen des Mammakarzinoms oder dem kutanen T-Zell-Lymphom mit Miltefosin trat die Symptomatik nach Beendigung der Therapie erneut auf. In diesem Zusammenhang werden in der Literatur von unterschiedlich langen medianen Ansprechdauern berichtet, die sich nach Terwogt *et al.* auf 18 Wochen, nach Leonard *et al.* auf 26 Wochen oder nach Dumontet *et al.* auf 12 Monate beliefen. Auch ein Wiederauftreten der kutanen Leishmaniose nach Beendigung der Therapie wurde beschrieben<sup>134</sup>. In Folgestudien soll deshalb mit Hilfe längerer *follow-up* Zeiträume überprüft werden, ob ein erneutes Auftreten der Symptomatik nach Beendigung der Therapie auch auf die Mastozytose übertragen werden kann. Neben den benannten Modifikationen innerhalb klinischer Studien zur Wirksamkeitssteigerung von Miltefosin, sollen darüber hinaus weitere experimentelle Grundlagenforschungen in Erwägung gezogen werden. Obwohl die MIMACT- und MICUMA-Studie eine Wirkung auf die IgE-abhängige und -unabhängige Mediatorfreisetzung aus den humanen MC und ein Effekt auf das klinische Erscheinungsbild MC-bedingter Erkrankungen zeigt, bleiben einige Fragen zum grundsätzlichen Wirkmechanismus offen. Experimentelle Studien sollen helfen, den Wirkmechanismus von Miltefosin auf MC detailliert zu verstehen und die Effekte auf der zellulären Ebene am Rezeptor, auf die Transkription, Translation und die Signaltransduktion

näher zu beleuchten. Diese Erkenntnisse können einen verbesserten Einsatz von Miltefosin bei der klinischen Anwendung ermöglichen. Darüber hinaus gestatten experimentelle Studien eine Beurteilung und Beschreibung möglicher Apoptosemechanismen als vermutliche Ursache für eine reduzierte MC-Anzahl. Histologische Untersuchungen, die bereits im Rahmen der MICUMA-Studie erfolgten, können ebenfalls dazu dienen, charakteristische Apoptosezeichen der MC darzustellen. Biopsien, die im Rahmen längerer *follow-ups* mehrere Wochen nach Beendigung der Therapie entnommen werden, können zusätzlich zeigen, ob Miltefosin auch nach dem Absetzen inhibitorische Wirkung auf die Mediatorfreisetzung und MC-Anzahl ausübt oder ob nach Ausbleiben der Therapie die Wirkung wegfällt.

Da Miltefosin und Clobetasol in der vorliegenden Arbeit eine Wirkung auf die Symptomatik der Mastozytose ausüben, bietet die Kombination beider Therapieformen einen weiteren Ansatzpunkt bei der Behandlung der Mastozytose, den es zu untersuchen gilt. Eine Kombination der beiden Medikamente mit unterschiedlichem Wirkmechanismus lässt einen synergistischen Effekt vermuten. Zusätzlich können Miltefosin-bedingte Nebenwirkungen mit Hilfe der topischen Steroidtherapie reduziert werden<sup>147</sup>. Durch Kombination beider Medikamente können diese bei Aufrechterhaltung der Wirkstärke in ihrer Konzentration reduziert werden und dadurch weniger Nebenwirkungen bedingen.

Innerhalb möglicher Folgestudien zur Behandlung der Mastozytose sollen außerdem Veränderungen des Studiendesigns vorgenommen werden, die zu einer besseren Erfassung der Wirksamkeit beitragen können. Um Veränderungen des klinischen Bildes besser beurteilen zu können, soll anstelle der Analogskala mit den drei Bewertungspunkten „Erythem“, „Quaddel“ und „Juckreiz“, eine differenziertere Skala verwendet werden. Eine Möglichkeit bietet der *scoring index of mastocytosis* (SCORMA), der in Anlehnung an die Bewertungsskala der atopischen Dermatitis, den *scoring index of atopic dermatitis* (SCORAD), entwickelt wurde. Der SCORMA, bestehend aus drei Teilen, beschreibt mit Hilfe einer quantitativen Skala die Ausdehnung der Hautbeteiligung (A), die Aktivität der Läsionen (B) und die subjektive Symptomatik (C). Im Rahmen des Teilscores A wird die Beteiligung der Haut prozentual, mit einem maximalen Ergebnis von 100, angegeben. Teilscore B beschreibt die vier Parameter Pigmentierung/Erythem, Bläschenbildung, Elevation und die Ausprägung des Darier-Zeichens mit Hilfe einer Analogskala mit den Werten 0= keine, 1= milde, 2= moderate und 3= starke Ausprägung und kann damit eine maximale Punktzahl von 12 erreichen. Der Teilscore C beschreibt subjektive Symptome wie provozierende Faktoren, Ausprägung des Flush, Diarrhö, Pruritus und Knochenschmerz. Weil die Einschätzung mit Hilfe der visuellen Analogskala mit den Werten von 0 bis 10 erfolgt, beträgt die maximal erreichbare Punktzahl 50. Während dem

Verlauf und der Behandlung der Mastozytose ist die Zu- oder Abnahme der Aktivität der Läsionen der erste objektiv messbare Aspekt, der sich ändert. Bei der Berechnung des SCORMA wird deshalb, in Anlehnung an den SCORAD, die Aktivität der Läsionen mit drei multipliziert:  $A+3B+C$ . Zur Gesamtberechnung des SCORMA werden außerdem die Scores A, B und C auf 20 gleichgesetzt. Dies erfolgte durch Division von A mit 5 (maximales Ergebnis:  $100/5=20$ ), durch Multiplikation von B mit  $5/3$  (maximales Ergebnis:  $12 \times 5/3=20$ ) und durch Multiplikation von C mit  $2/5$  (maximales Ergebnis:  $50 \times 2/5=20$ ). Daraus ergibt sich die Berechnungsformel  $A/5+ 5B +2/5C$ <sup>148</sup>. Der SCORMA bietet eine differenzierte Möglichkeit Veränderungen des Krankheitsbildes, die im Laufe der Erkrankung auftreten, zu erfassen. Im Rahmen der MICUMA-Studie kommen bereits Teile des Scores B zur Beurteilung der Ausprägung der Mastozytose zum Einsatz. In Folgestudien kann der SCORMA zur Einschätzung der Ausprägung genutzt werden, um auf diese Weise zusätzliche Aussagen über die prozentuale Ausdehnung und die Elevation der Läsionen zu gewinnen und um neben dem Juckreiz auch eine Beurteilung der subjektiven Beschwerden, wie Flush oder Diarrhö, zu treffen. Die drei Scores im Einzelnen und in ihrer Addition sollen in Folgestudien beurteilt werden, um eine umfassendere Beschreibung der Veränderungen und damit eine differenzierte Darstellung der Wirksamkeit zu ermöglichen.

Neben den beschriebenen Modifikationen der Anwendung von Miltefosin in Folgestudien muss ebenfalls ein Augenmerk auf andere Möglichkeiten der Therapie gelegt werden. Ansatzpunkt für die zukünftige Therapie der Mastozytose könnte daher die Konzentration auf die Ursache der Mastozytose, eine Punktmutation des kodierenden Genes für den Kit-Rezeptor, sein. Neue Ansätze berücksichtigen sich daher, ähnlich wie in der vorliegenden Arbeit, die Hemmung von Signaltransduktionswegen. Diese erfolgt mittels selektiver Inhibition der Rezeptortyrosinkinaseaktivität, wobei die Aufmerksamkeit auf der Funktion des Kit-Rezeptors liegt. Durch selektive Inhibition soll dem proliferativen und antiapoptotischen Effekt des SCF entgegen gewirkt werden. Zum Einsatz kam bereits STI571 (Imatinibmesylat), ein 2-Phenylaminopyrimidin-Derivat, das Hemmungen des Wildtyp Kit-Rezeptors und der mutierten juxtamembranären Domänen des Kit-Rezeptors (Austausch von Valin gegen Glycin im Codon 560) bewirkte. Resistenzen bestehen jedoch für die c-Kit-Mutation Asp816Val<sup>3</sup>. Kürzlich wurden Verbindungen wie Dasatinib, Midostaurin oder Hypothemycin gefunden, die c-KIT mit D816V-Mutationen hemmen. Diese Multikinaseinhibitoren, die weniger spezifisch als Imatinib sind, kamen bereits bei Patienten mit schwerer SM zum Einsatz. Aufgrund von Bedenken möglicher Mutagenität, Teratogenität und wegen fehlendem Wissen über mögliche

---

Langzeitschädigungen muss der mögliche Einsatz bei der CM in der Zukunft erforscht werden<sup>149</sup>.

In Bezug auf unsere Studienziele zeigen wir mit der vorliegenden Arbeit, dass Miltefosin und Clobetasol im Vergleich zum Plazebo tendenziell eine Verbesserung der Symptome der CM bewirken können. Die subjektiv und objektiv beurteilten Quaddelvolumina und damit das Darier-Zeichen, die subjektiv beurteilte erythematöse Veränderung und die MC-Anzahl zeigen für Clobetasol und Miltefosin tendenzielle Reduktionen, die bezüglich der Ausprägung annähernd vergleichbar sind. Trockene, lokale Hautveränderungen und vermehrtes Auftreten von Juckreiz, bedingt durch die angewendete Zusammensetzung, werden als Nachteile für die Therapie mit Miltefosin im Vergleich zu Clobetasol aufgezeigt. Dies erklärt eine schlechtere Beurteilung des *Global Efficacy Assessment* am Ende der Behandlung durch den Patienten und den Prüfarzt im Vergleich zu Clobetasol.

An die vorliegende Phase II Studie, eine therapeutische Pilotuntersuchung zur Überprüfung der Wirksamkeit nach Kurzzeitanwendung, soll sich eine Phase III Studie anschließen. Diese soll an einem größeren Patientenkollektiv mit einer längerfristigen Behandlungsdauer und benannten Modifikationen durchgeführt werden. Überdies soll Miltefosin zur Überprüfung der Wirkung auf die MC auch bei allergischen oder anderen MC-vermittelten Erkrankungen, wie beispielsweise der Urtikaria, zum Einsatz kommen. Zukünftig müssen weitere experimentelle und klinische Studien durchgeführt werden, um die hier gewonnenen vielversprechenden Ansätze zum Einsatz von Miltefosin, speziell bei der CM, aber auch anderen MC-vermittelten Erkrankungen zu vertiefen und die Wirksamkeit weiter zu steigern. Auf diese Weise könnte Miltefosin auch als Alternative bei Patienten zum Einsatz kommen, bei denen eine Behandlung mit Steroiden keine therapeutische Wirkung zeigt. Die mit der vorliegenden Arbeit gesammelten Erkenntnisse, sowie die Aufdeckung von Schwächen der verwendeten Formulierung können daher den Weg für eine optimale Anwendung von Miltefosin bei der Behandlung MC-vermittelter Erkrankungen bereiten.

## 5. Zusammenfassung

Die Mastozytose ist auf eine abnorm gesteigerte Proliferation und Akkumulation von Mastzellen in einem oder mehreren Organsystemen zurückzuführen. Die häufigste Form der kutanen Mastozytose ist die makulopapulöse kutane Mastozytose, die sich mit ovalen bis runden, rötlichen bis tief-braunen Makulae oder Papeln präsentiert, die am gesamten Integument, mit Präferenz des Rumpfes und der Oberschenkel, auftreten. Die Freisetzung von Mediatoren aus den akkumulierten Mastzellen bedingt ein heterogenes Spektrum an Symptomen, zu denen unter anderem das Darier-Zeichen zählt. Die Freisetzung der Mediatoren kann IgE-unabhängig, beispielsweise durch Substanz P, Calcium Ionophore oder physikalische Stimuli oder IgE-abhängig erfolgen. Letztere wird durch die Interaktion von multivalenten Antigenen mit IgE, das an dem Oberflächenrezeptor FcεRI gebunden vorliegt und der damit einhergehenden Quervernetzung der Oberflächenrezeptoren ermöglicht. Erst dadurch transloziert der im inaktiven Zustand ausgeschlossene Oberflächenrezeptor in die als *Lipid Rafts* bezeichneten cholesterol- und sphingolipidreichen Mikrodomänen der Mastzellplasmamembran. Diese *Rafts* enthalten Tyrosinkinasen, deren Interaktion mit dem FcεRI für die Initiierung der darauffolgenden Signaltransduktion unabdingbar ist. Die in der Degranulation mündenden Kaskaden erfolgen über verschiedene Signalwege, an denen unter anderem Phospholipase Cγ, PI3K und MAPK/ERK beteiligt sind. Die gegenwärtig zum Einsatz kommende medikamentöse Intervention erfolgt symptomatisch und basiert auf der Reduktion dieser Mediatorfreisetzung, deren Antagonisierung oder der Mastzellreduktion. Im Mittelpunkt stehen Kortikosteroide, Antihistaminika und Psoralen-UVA-Phototherapie, die jedoch keine kurativen Therapieoptionen darstellen. Weil klinische Studien zur medikamentösen Behandlung an einem großen Patientenkollektiv fehlen und gegenwärtige Therapieempfehlungen oftmals auf Einzelfallberichten beruhen, besteht die Notwendigkeit intensiver Forschung zur Entwicklung alternativer Therapieoptionen. Es ist bekannt, dass das Etherlipid Miltefosin, welches bereits bei der Behandlung von Tumoren und parasitären Erkrankungen mit guten Ergebnissen zum Einsatz kommt, zelluläre Prozesse beeinflusst, die für die IgE-abhängige und -unabhängige Mastzellaktivierung essentiell sind. Dazu gehört die Inhibition der PI-PLC, PLCγ, PKC und PI3K und des proliferationsfördernden MAPK/ERK-Signalweges. Neuere Studien postulieren außerdem eine Miltefosin-bedingte Interaktion und Modifikation der *Lipid Rafts*, welche reich an Komponenten sind, die eine zentrale Rolle bei der IgE-abhängigen und -unabhängigen Signaltransduktion und Degranulation haben. Dazu gehören beispielsweise PKC, PI3K, MAPK,

G-Proteine oder Grb2. Auch integrale Membranproteine, die an der Exocytose beteiligt sind, wie beispielsweise SNAP-Rezeptoren, sind mit den *Lipid Rafts* assoziiert. Es ist daher zu vermuten, dass die Mastzelldegranulation sowohl durch eine Miltefosin-bedingte Inhibition von Komponenten der Signaltransduktion, als auch durch eine Modifikation der *Lipid Rafts* und deren Komponenten beeinträchtigt wird. Auf der Grundlage einer zuvor durchgeführten experimentellen Studie, die eine Miltefosin-bedingte Reduktion der anti-IgE-unabhängigen und -abhängigen Histaminfreisetzung bei humanen Mastzellen *in vitro* zeigte, kam Miltefosin erstmals bei einer mastzellvermittelten Erkrankung zum Einsatz. Ziel der Studie war es, die Wirksamkeit von Miltefosin im Vergleich zu einer Negativkontrolle, Hametum® Extrakt, zu erfassen. Zusätzlich wurde die Wirksamkeit und Verträglichkeit von Miltefosin mit einer Positivkontrolle, Dermoxinale®, verglichen. Die Studie erfolgte randomisiert, doppelblind, plazebo- und aktivkontrolliert. 39 Patienten, die unter einer chronischen, stabilen, symptomatischen, makulopapulösen kutanen Mastozytose oder indolenten systemischen Mastozytose mit Hautmanifestation litten, applizierten über 14 Tage je 10 Tropfen der drei Studienmedikamente zweimal täglich auf einem 50 cm<sup>2</sup> großen Areal epikutan, nicht-okklusiv. Zur Beurteilung möglicher Veränderungen wurde vor und nach medikamentöser Therapie der *Composite Score* infolge Provokation des Darier-Zeichens erhoben. Dieser setzt sich aus den Parametern Quaddel-, Erythem- und Juckreizentwicklung zusammen und wird mittels subjektiver Analogskala eingestuft. Die dreidimensionale Oberflächenmessung in Form der Volumetrie mit Hilfe der PRIMOS-Messtechnik erfolgte neben der thermographischen Messung zur objektiven Beurteilung. Abschließend wurden Stanzbiopsien entnommen und diese mittels quantitativer Histomorphometrie analysiert. Ophthalmologische und körperliche Untersuchungen, sowie sonographische Messungen dienten neben Blutentnahmen als Sicherheitsparameter möglicher Nebenwirkungen. Die Phase II Studie zeigte nach Kurzzeitanwendung bezogen auf unsere Zielsetzung, dass:

1. Miltefosin im Vergleich zur Negativkontrolle tendenziell, jedoch nicht statistisch signifikant, eine höhere Wirksamkeit bei der Behandlung der kutanen Mastozytose besitzt. Dies zeigt sich durch eine stärkere Reduktion des objektiven *Wheal*- und *Erythema-Subscores*, der ausgeprägten Reduktion der Volumina der Quaddeln und Läsionen, sowie durch eine geringe Mastzellanzahl im oberen Stratum papillare.
2. Miltefosin im Vergleich zu Dermoxinale® in den objektiven und subjektiven Beurteilungsverfahren eine tendenzielle, annähernd gleich stark ausgeprägte Wirksamkeit besitzt.

---

3. Miltefosin im Vergleich zu Dermoxinale® ein nicht statistisch signifikantes, größeres Spektrum an lokalen Nebenwirkungen, hauptsächlich in Form von trockenen Hautveränderungen bedingt. Im Vergleich zur Negativkontrolle stieg der Juckreiz nach der zweiwöchigen Therapie mit Miltefosin statistisch signifikant an. Die aufgetretenen Nebenwirkungen wurden als mild bis moderat und reversibel eingeschätzt. Möglicherweise bedingen sie eine Maskierung positiver Effekte von Miltefosin.

Die Ergebnisse stellen wichtige Ansätze für weitere Studien dar und spielen eine zentrale Rolle für den zukünftigen Einsatz von Miltefosin bei mastzellvermittelten Erkrankungen. Durch Modifikationen verschiedener Parameter wie beispielsweise der zeitlichen Anwendung und Penetrationseigenschaften scheint eine Wirksamkeitssteigerung in Folgestudien denkbar.

## 6. Summary

Mastocytosis is related to an abnormal increase in proliferation and accumulation of mast cells in at least one organ. Maculopapular cutaneous mastocytosis is the most common manifestation of cutaneous mastocytosis, which presents itself with oval or circular reddish-brown macules and papules symmetrically distributed over the entire integument with a preference for trunk and thighs. Mediator release from accumulated mast cells leads to a heterogeneous spectrum of symptoms – Darier’s Sign among others. Mediator release can take place by IgE-independent mechanisms, initiated by Substance P, Calcium Ionophore or physical stimuli. On the other hand, an IgE-dependent pathway, where interaction of multivalent antigen with IgE, bound to the FcεRI on the mast cell surface, is the initiating step of mediator release, is known. Here, cross linking takes place afterwards and by that inactivated cell surface receptors are allowed to translocate into cholesterol and sphingolipid rich micro domains, called *Lipid Rafts*. Protein tyrosine kinases are intracellular components of *Lipid Rafts* and are able to bind to the FcεRI transmembrane β-chain. This is a prerequisite for the following signal transduction. PLCγ, PI3K and MAPK/ERK are involved in different pathways and cascades which lead to degranulation. Current pharmacotherapy focuses on the reduction of mediator release, its antagonisation or on lowering the mast cell quantity and is always symptomatically. Although steroids, antihistamines or Psoralen-UVA phototherapy are the most important treatment options, no curative intervention is known. There is a need for intensive research and the development of alternative therapeutical methods, because existent recommendations are based on single case reports, and clinical trials with a high number of patients are missing. The etherlipid miltefosine is successfully used in the treatment of patients with cancer and parasitic disease and known to influence a number of cellular processes essential for IgE-dependent and IgE-independent mast cell activation. Examples are the inhibition of PI-PLC, PLCγ, PKC, PI3K and MAPK/ERK signal pathway, which has a beneficial effect on cell proliferation. Latest studies revealed an interaction between miltefosine and *Lipid Rafts*, containing components, which play an important role in the IgE-dependent and IgE-independent signal transduction and degranulation, e.g. PKC, PI3K, MAPK, G proteins and Grb2. Integral membrane proteins, SNAP-receptors for instance, are involved in exocytosis and associated with *Lipid Rafts* as well. Therefore it is conjecturable that mast cell degranulation is impaired by both a miltefosine related inhibition of signal transduction components and a direct modification of *Lipid Rafts* and its components. *Miltefosine effects on human skin mast cell activation* (MIMACT), a previously performed

---

experimental trial, showed a miltefosine related reduction of IgE-dependent and -independent histamine release from human mast cells after stimulation with anti-IgE *in vitro*. The aim of our *Miltefosine in Cutaneous Mastocytosis* (MICUMA)-study was to demonstrate the efficacy of miltefosine in comparison with Hametum® extract, which served here as a negative control. Additionally we compared efficacy and tolerability of miltefosine with Dermoxinale®, serving as a positive control. Miltefosine was used here for the first time in the treatment of a mast cell mediated disorder. 39 patients suffering from a chronic, stable, symptomatic maculopapular cutaneous mastocytosis or from an indolent systemic mastocytosis with skin involvement were included in our randomized, double blind, placebo and actively controlled trial. They applied 10 drops of each medication per 50 cm<sup>2</sup> skin area twice a day over a total of 14 days in an epicutaneous and non occlusive manner. We provoked Darier`s Sign before and after therapy. In order to assess any changes related to our medical intervention we collected a *Composite Score*, which consists of a *Wheal-*, *Erythema-* and *Itching Subscore*, using a subjective analogue scale. For an objective evaluation we performed thermographic and volumetric imaging. With the aid of the PRIMOS measurement technique, skin surface was measured in a three dimensional mode for the first time in a clinical trial. At the end of the treatment period skin biopsies were taken and analyzed by quantitative histomorphometry. To detect adverse effects we undertook ophthalmologic and clinical examinations, sonographic imaging of the skin and we collected blood samples. Concerning our aims in this phase II clinical trial using short term application we found that:

1. Miltefosine has a better efficacy by trend in the treatment of cutaneous mastocytosis in comparison with our negative control, without reaching statistical significance. We found a higher reduction in our objective *Wheal-* and *Erythema Subscore*. The volume of the skin lesions and wheals was distinctively reduced after treatment with miltefosine, and a lower quantity of mast cells was located in the upper papillary layer of the dermis.
2. Miltefosine has nearly the same efficacy by trend in our objective and subjective assessment procedures in comparison with Dermoxinale®, albeit without reaching statistical significance.
3. Miltefosine has a wider range of local adverse effects, especially in terms of dry skin changes, in comparison with Dermoxinale, without reaching statistical significance. In contrast, a statistically significant increase of itching occurred after two-week therapy with miltefosine compared to our negative control. The effects mentioned were evaluated as mild or moderate and reversible but they might have masked more positive effects of miltefosine.

Our results play an important role for the future treatment of mast cell mediated diseases with miltefosine and for the design of subsequent studies. By modifying several parameters, e.g. a longer application period and improved skin penetration characteristics an increased efficacy of topical miltefosine treatment is probable.

---

## 7. Literaturverzeichnis

1. Escribano L, Akin C, Castells M, Orfao A, Metcalfe DD. Mastocytosis: current concepts in diagnosis and treatment. *Ann Hematol* 2002; 81(12):677-690.
2. Golkar L, Bernhard JD. Mastocytosis. *Lancet* 1997; 349(9062):1379-1385.
3. Inhoff O, Röckmann H, Finger S, Schadendorf D, Goerdt S. Mastozytosen - Diagnostik, Klassifikation, Therapie, aktuelle pathophysiologische Ansätze. *Akt Dermatol* 2005; 31:359-364.
4. Rueff F, Dugas-Breit S, Bauer C, Placzek M, Przybilla B. Mastocytosis -- clinical picture and diagnosis. *Dtsch Med Wochenschr* 2006; 131(28-29):1616-1621.
5. Soter NA. Mastocytosis and the skin. *Hematol Oncol Clin North Am* 2000; 14(3):537-55, vi.
6. Stein DH. Mastocytosis: a review. *Pediatr Dermatol* 1986; 3(5):365-375.
7. Valent P. Biology, classification and treatment of human mastocytosis. *Wien Klin Wochenschr* 1996; 108(13):385-397.
8. Valent P, Escribano L, Parwaresch RM et al. Recent advances in mastocytosis research. Summary of the Vienna Mastocytosis Meeting 1998. *Int Arch Allergy Immunol* 1999; 120(1):1-7.
9. Hartmann K, Henz BM. Classification of cutaneous mastocytosis: a modified consensus proposal. *Leuk Res* 2002; 26(5):483-484.
10. Nettleship E, Tay W. Rare forms of urticaria. *BMJ* 1869; 2:323-324.
11. Nettleship E. Chronic urticaria, leaving brown stains: nearly two years' duration. *BMJ* 1869; 2:323.
12. Sangster A. An anomalous mottled rash, accompanied by pruritus, factitious urticaria and pigmentation, "urticaria pigmentosa"? *Trans Clin Soc London* 1878; 11:161-163.
13. Sézary A, Levy-Coblentz G, Chauvillon P. Dermographisme et mastocytose. *Bulletin Société Françoise Dermatologie et Syphilligologie* 1936; 43:359-361.
14. Ehrlich P. Beiträge zur Kenntnis der Anilinfärbungen und ihrer Verwendung in der mikroskopischen Technik. *Arch Mikr Anat* 1877; 13:263-264.
15. Unna PG. Beiträge zur Anatomie und Pathogenese der Urticaria simplex and pigmentosa. *Monatsschrift Praktische Dermatologie* 1887; 6:9.
16. ELLIS JM. Urticaria pigmentosa; a report of a case with autopsy. *Arch Pathol (Chic)* 1949; 48(5):426-435.
17. Katsamba AD, Karpouzis AJ, Koumantaki-Mathioudaki E, Jorizzo JL. Mastocytosis with skin manifestations: current status. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 1999; 13(3):155-165.

18. Hartmann K, Henz BM. Mastocytosis: recent advances in defining the disease. *Br J Dermatol* 2001; 144(4):682-695.
19. Longley J, Duffy TP, Kohn S. The mast cell and mast cell disease. *J Am Acad Dermatol* 1995; 32(4):545-561.
20. Hartmann K, Henz BM. Cutaneous mastocytosis -- clinical heterogeneity. *Int Arch Allergy Immunol* 2002; 127(2):143-146.
21. Hermine O, Lortholary O, Leventhal PS et al. Case-control cohort study of patients' perceptions of disability in mastocytosis. *PLoS ONE* 2008; 3(5):e2266.
22. Valent P, Horny HP, Escribano L et al. Diagnostic criteria and classification of mastocytosis: a consensus proposal. *Leuk Res* 2001; 25(7):603-625.
23. Wolff K, Komar M, Petzelbauer P. Clinical and histopathological aspects of cutaneous mastocytosis. *Leuk Res* 2001; 25(7):519-528.
24. Apter AJ, Rothe MJ. Referred for management of mastocytosis. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1997; 79(1):21-26.
25. Brockow K. Urticaria pigmentosa. *Immunol Allergy Clin North Am* 2004; 24(2):287-316, vii.
26. Allison MA, Schmidt CP. Urticaria pigmentosa. *Int J Dermatol* 1997; 36(5):321-325.
27. Skrabbs CC. Darier sign: a historical note. *Arch Dermatol* 2002; 138(9):1253-1254.
28. Rogalski C, Haustein U-F, Paasch U, Schmoranz B, Friedrich T, Nenoff P. Systemische Mastozytose - Klassifikation, Symptome, assoziierte Erkrankungen, aktuelle Therapietrends. *Akt Dermatol* 2001; 27:53-57.
29. Hoffmann KM, Moser A, Lohse P et al. Successful treatment of progressive cutaneous mastocytosis with imatinib in a 2-year-old boy carrying a somatic KIT mutation. *Blood* 2008; 112(5):1655-1657.
30. Marone G, Spadaro G, Granata F, Triggiani M. Treatment of mastocytosis: pharmacologic basis and current concepts. *Leuk Res* 2001; 25(7):583-594.
31. Wahn U, Seger R, Wahn V, Holländer GA. Pädiatrische Allergologie und Immunologie. 4. Auflage ed. München; Jena: ELSEVIER, URBAN& FISCHER Verlag; 2005.
32. Weber A, Knop J, Maurer M. Pattern analysis of human cutaneous mast cell populations by total body surface mapping. *Br J Dermatol* 2003; 148(2):224-228.
33. Janssens AS, Heide R, den Hollander JC, Mulder PG, Tank B, Oranje AP. Mast cell distribution in normal adult skin. *J Clin Pathol* 2005; 58(3):285-289.
34. Cherukuri A, Dykstra M, Pierce SK. Floating the raft hypothesis: lipid rafts play a role in immune cell activation. *Immunity* 2001; 14(6):657-660.

35. Dykstra M, Cherukuri A, Sohn HW, Tzeng SJ, Pierce SK. Location is everything: lipid rafts and immune cell signaling. *Annu Rev Immunol* 2003; 21:457-481.
36. Galli SJ, Kalesnikoff J, Grimaldeston MA, Piliponsky AM, Williams CM, Tsai M. Mast cells as "tunable" effector and immunoregulatory cells: recent advances. *Annu Rev Immunol* 2005; 23:749-786.
37. Rivera J, Gilfillan AM. Molecular regulation of mast cell activation. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 117(6):1214-1225.
38. Duggan J, Jamal G, Tilley M et al. Functional imaging of microdomains in cell membranes. *Eur Biophys J* 2008; 37(8):1279-1289.
39. Pike LJ. Rafts defined: a report on the Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function. *J Lipid Res* 2006; 47(7):1597-1598.
40. Draber P, Draberova L. Lipid rafts in mast cell signaling. *Mol Immunol* 2002; 38(16-18):1247-1252.
41. Van LF, Leo O. Membrane lipid rafts: new targets for immunoregulation. *Curr Mol Med* 2002; 2(6):557-570.
42. Pike LJ. Lipid rafts: bringing order to chaos. *J Lipid Res* 2003; 44(4):655-667.
43. Brown DA. Lipid rafts, detergent-resistant membranes, and raft targeting signals. *Physiology (Bethesda)* 2006; 21:430-439.
44. Davey AM, Krise KM, Sheets ED, Heikal AA. Molecular perspective of antigen-mediated mast cell signaling. *J Biol Chem* 2008; 283(11):7117-7127.
45. Dykstra M, Cherukuri A, Pierce SK. Rafts and synapses in the spatial organization of immune cell signaling receptors. *J Leukoc Biol* 2001; 70(5):699-707.
46. Gosse JA, Wagenknecht-Wiesner A, Holowka D, Baird B. Transmembrane sequences are determinants of immunoreceptor signaling. *J Immunol* 2005; 175(4):2123-2131.
47. Wilson BS, Pfeiffer JR, Oliver JM. Observing FcepsilonRI signaling from the inside of the mast cell membrane. *J Cell Biol* 2000; 149(5):1131-1142.
48. Jahn T, Leifheit E, Gooch S, Sindhu S, Weinberg K. Lipid rafts are required for Kit survival and proliferation signals. *Blood* 2007; 110(6):1739-1747.
49. Puri N, Roche PA. Ternary SNARE complexes are enriched in lipid rafts during mast cell exocytosis. *Traffic* 2006; 7(11):1482-1494.
50. Zhang M, Murphy RF, Agrawal DK. Decoding IgE Fc receptors. *Immunol Res* 2007; 37(1):1-16.
51. Draberova L, Lebduska P, Halova I et al. Signaling assemblies formed in mast cells activated via Fcepsilon receptor I dimers. *Eur J Immunol* 2004; 34(8):2209-2219.

- 
52. Kambayashi T, Koretzky GA. Proximal signaling events in Fc epsilon RI-mediated mast cell activation. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 119(3):544-552.
  53. Siraganian RP. Mast cell signal transduction from the high-affinity IgE receptor. *Curr Opin Immunol* 2003; 15(6):639-646.
  54. Kawakami T, Galli SJ. Regulation of mast-cell and basophil function and survival by IgE. *Nat Rev Immunol* 2002; 2(10):773-786.
  55. Kraft S, Novak N. Fc receptors as determinants of allergic reactions. *Trends Immunol* 2006; 27(2):88-95.
  56. Metcalfe DD. Mast cells and mastocytosis. *Blood* 2008; 112(4):946-956.
  57. Rivera J, Cordero JR, Furumoto Y et al. Macromolecular protein signaling complexes and mast cell responses: a view of the organization of IgE-dependent mast cell signaling. *Mol Immunol* 2002; 38(16-18):1253-1258.
  58. Kopec A, Panaszek B, Fal AM. Intracellular signaling pathways in IgE-dependent mast cell activation. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz )* 2006; 54(6):393-401.
  59. Suzuki Y, Yoshimaru T, Inoue T, Ra C. Mitochondrial Ca<sup>2+</sup> flux is a critical determinant of the Ca<sup>2+</sup> dependence of mast cell degranulation. *J Leukoc Biol* 2006; 79(3):508-518.
  60. Gigl G. Mediator liberation from mast cells. *Pharm Unserer Zeit* 1985; 14(4):97-108.
  61. Tatemoto K, Nozaki Y, Tsuda R et al. Immunoglobulin E-independent activation of mast cell is mediated by Mrg receptors. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 349(4):1322-1328.
  62. Kiorpelidou D, Gaitanis G, Bassukas ID. Darier's sign: a model for studying dermatographism. *Indian J Dermatol Venereol Leprol* 2008; 74(3):271-272.
  63. Stokes AJ, Shimoda LM, Koblan-Huberson M, Adra CN, Turner H. A TRPV2-PKA signaling module for transduction of physical stimuli in mast cells. *J Exp Med* 2004; 200(2):137-147.
  64. Hines C. The diverse effects of mast cell mediators. *Clin Rev Allergy Immunol* 2002; 22(2):149-160.
  65. Castells M, Austen KF. Mastocytosis: mediator-related signs and symptoms. *Int Arch Allergy Immunol* 2002; 127(2):147-152.
  66. Surjushe A, Jindal S, Gote P, Saple DG. Darier's sign. *Indian J Dermatol Venereol Leprol* 2007; 73(5):363-364.
  67. Kiszewski AE, Duran-Mckinster C, Orozco-Covarrubias L, Gutierrez-Castrellon P, Ruiz-Maldonado R. Cutaneous mastocytosis in children: a clinical analysis of 71 cases. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2004; 18(3):285-290.
  68. Worobec AS, Metcalfe DD. Mastocytosis: current treatment concepts. *Int Arch Allergy Immunol* 2002; 127(2):153-155.

- 
69. Korting HC, Sterry W. Diagnostische Verfahren in der Dermatologie: Dermatika und Kosmetika. Berlin, Wien: Blackwell; 2001.
  70. Fachinformation Dermoxin®. GlaxoSmithKline GmbH & Co KG und Effipharm GmbH - Stand September 2004;1-3.
  71. Lavker RM, Schechter NM, Guzzo C, Lazarus GS. Aggressive topical corticosteroid therapy: a novel approach to mast-cell-dependent cutaneous disorders. *Dermatologica* 1987; 175(5):213-216.
  72. Weber M, Lautenschlager S. Dermatologische Therapie: Einsatz topischer Steroide. *Schweiz Med Forum* 2006; 6:341-348.
  73. Brito JM, Mermelstein CS, Tempone AJ, Borojevic R. Mast cells can revert dexamethasone-mediated down-regulation of stem cell factor. *Eur J Pharmacol* 2001; 414(1):105-112.
  74. Yamaguchi M, Hirai K, Komiya A et al. Regulation of mouse mast cell surface Fc epsilon RI expression by dexamethasone. *Int Immunol* 2001; 13(7):843-851.
  75. Schäfer-Korting M, Korting HC. Bronchial asthma and inflammatory dermatoses. Topical glucocorticoid treatment. *Pharm Unserer Zeit* 2003; 32(4):306-313.
  76. James MP. The treatment of urticaria pigmentosa. *Clin Exp Dermatol* 1982; 7(3):311-320.
  77. Pels R, Sterry W, Lademann J. Clobetasol propionate--where, when, why? *Drugs Today (Barc)* 2008; 44(7):547-557.
  78. Clark AR, Lasa M. Crosstalk between glucocorticoids and mitogen-activated protein kinase signalling pathways. *Curr Opin Pharmacol* 2003; 3(4):404-411.
  79. Barnes PJ. Molecular mechanisms and cellular effects of glucocorticosteroids. *Immunol Allergy Clin North Am* 2005; 25(3):451-468.
  80. Finotto S, Mekori YA, Metcalfe DD. Glucocorticoids decrease tissue mast cell number by reducing the production of the c-kit ligand, stem cell factor, by resident cells: in vitro and in vivo evidence in murine systems. *J Clin Invest* 1997; 99(7):1721-1728.
  81. van der Luit AH, Budde M, Ruurs P, Verheij M, van Blitterswijk WJ. Alkyl-lysophospholipid accumulates in lipid rafts and induces apoptosis via raft-dependent endocytosis and inhibition of phosphatidylcholine synthesis. *J Biol Chem* 2002; 277(42):39541-39547.
  82. van der Luit AH, Budde M, Verheij M, van Blitterswijk WJ. Different modes of internalization of apoptotic alkyl-lysophospholipid and cell-rescuing lysophosphatidylcholine. *Biochem J* 2003; 374(Pt 3):747-753.
  83. van der Luit AH, Vink SR, Klarenbeek JB et al. A new class of anticancer alkylphospholipids uses lipid rafts as membrane gateways to induce apoptosis in lymphoma cells. *Mol Cancer Ther* 2007; 6(8):2337-2345.

84. Vink SR, van der Luit AH, Klarenbeek JB, Verheij M, van Blitterswijk WJ. Lipid rafts and metabolic energy differentially determine uptake of anti-cancer alkylphospholipids in lymphoma versus carcinoma cells. *Biochem Pharmacol* 2007; 74(10):1456-1465.
85. Gomez-Serranillos IR, Minones J, Jr., Dynarowicz-latka P, Miniones J, Iribarnegaray E. Miltefosine-cholesterol interactions: a monolayer study. *Langmuir* 2004; 20(3):928-933.
86. Jendrossek V, Belka C. Inhibition der Signaltransduktion als therapeutisches Prinzip. *Onkologie* 2003; 9:1088-1101.
87. Hilgard P, Klenner T. Experimental pharmacology of Miltex and its constituents. *Drugs of Today* 1994; 30(Suppl B):13-20.
88. Rakotomanga M, Loiseau PM, Saint-Pierre-Chazalet M. Hexadecylphosphocholine interaction with lipid monolayers. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1661(2):212-218.
89. Soto J, Arana BA, Toledo J et al. Miltefosine for new world cutaneous leishmaniasis. *Clin Infect Dis* 2004; 38(9):1266-1272.
90. Wieder T, Orfanos CE, Geilen CC. Induction of ceramide-mediated apoptosis by the anticancer phospholipid analog, hexadecylphosphocholine. *J Biol Chem* 1998; 273(18):11025-11031.
91. Baburina I, Jackowski S. Apoptosis triggered by 1-O-octadecyl-2-O-methyl-rac-glycero-3-phosphocholine is prevented by increased expression of CTP:phosphocholine cytidyltransferase. *J Biol Chem* 1998; 273(4):2169-2173.
92. Beckers T, Voegeli R. Molecular targets of miltefosine. *Drugs of Today* 1994; 30(Suppl. B):5-12.
93. Heczko B, Slotte JP. Effect of anti-tumor ether lipids on ordered domains in model membranes. *FEBS Lett* 2006; 580(10):2471-2476.
94. Zarembek V, Gajate C, Cacharro LM, Mollinedo F, McMaster CR. Cytotoxicity of an anti-cancer lysophospholipid through selective modification of lipid raft composition. *J Biol Chem* 2005; 280(45):38047-38058.
95. Arthur G, Bittman R. The inhibition of cell signaling pathways by antitumor ether lipids. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1390(1):85-102.
96. Ruiter GA, Zerp SF, Bartelink H, van Blitterswijk WJ, Verheij M. Anti-cancer alkyl-lysophospholipids inhibit the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt/PKB survival pathway. *Anticancer Drugs* 2003; 14(2):167-173.
97. Uberall F, Oberhuber H, Maly K, Zaknun J, Demuth L, Grunicke HH. Hexadecylphosphocholine inhibits inositol phosphate formation and protein kinase C activity. *Cancer Res* 1991; 51(3):807-812.
98. van der Luit AH, Budde M, Zerp S et al. Resistance to alkyl-lysophospholipid-induced apoptosis due to downregulated sphingomyelin synthase 1 expression with consequent sphingomyelin- and cholesterol-deficiency in lipid rafts. *Biochem J* 2007; 401(2):541-549.

- 
99. Munoz-Martinez F, Torres C, Castanys S, Gamarro F. The anti-tumor alkylphospholipid perifosine is internalized by an ATP-dependent translocase activity across the plasma membrane of human KB carcinoma cells. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1778(2):530-540.
  100. Ausili A, Torrecillas A, Aranda FJ et al. Edelfosine is incorporated into rafts and alters their organization. *J Phys Chem B* 2008; 112(37):11643-11654.
  101. Holowka D, Baird B. Fc(epsilon)RI as a paradigm for a lipid raft-dependent receptor in hematopoietic cells. *Semin Immunol* 2001; 13(2):99-105.
  102. Grosman N. Effects of the ether phospholipid AMG-PC on mast cells are similar to that of the ether lipid AMG but different from that of the analogue hexadecylphosphocholine. *Immunopharmacology* 1991; 22(1):39-47.
  103. Grosman N. Effect of the anti-neoplastic agents edelfosine (ET-18-OCH<sub>3</sub>), ilmofosine (BM 41.440) and the hexadecylphosphocholine analogues D-20133 and D-21266 on histamine release from isolated rat mast cells. *Immunopharmacology* 1999; 44(3):211-221.
  104. Weller K, Artuc M, Jennings G et al. Miltefosine inhibits human mast cell activation and mediator release both in vitro and in vivo. *J Invest Dermatol* 2009; 129(2):496-498.
  105. Fachinformation Miltex®, Baxter 2004. Baxter Oncology GmbH, 33790 Halle/Westfalen - Stand September 2004;1-3.
  106. Altmeyer P, Hoffmann K, el Gammal S. Allgemeine Ultraschallphänomene. *Hautarzt* 1990; 41(Suppl 10):124-129.
  107. Dill-Müller D, Maschke J. Ultrasonography in dermatology. *JDDG* 2007; 5(8):689-707.
  108. el Gammal S, Altmeyer P, Auer T et al. Der Stellenwert der 20, 50 und 100 MHz Sonographie in der Dermatologie. *Akt Dermatol* 1995; 21:11-21.
  109. Breitbart EW, Hicks R, Rehpenning W. Possibilities of ultrasound diagnosis in dermatology. *Z Hautkr* 1986; 61(8):522-526.
  110. Garbe C, Blum A. Ultraschalldiagnostik der Haut und Lymphknoten. Darmstadt: Steinkopff Verlag; 1999.
  111. Hoffmann K, Holzle E, Ulrich J, Il-Muller D, Blum A, Gottlob P. Guidelines for quality assurance in ultrasound diagnosis in dermatology. Guideline of the Ultrasound in Dermatology Subgroup of the Physical procedures in Dermatology Subcommittee January 2000. *Hautarzt* 2001; 52(4):304-311.
  112. Schäfer-Hesterberg G, Schoengen A, Sterry W, Voit C. Use of ultrasound to early identify, diagnose and localize metastases in melanoma patients. *Expert Rev Anticancer Ther* 2007; 7(12):1707-1716.
  113. Jacobi U, Chen M, Frankowski G et al. In vivo determination of skin surface topography using an optical 3D device. *Skin Res Technol* 2004; 10(4):207-214.

114. Jaspers S, Hopermann H, Sauermann G, Hoppe U, Lunderstädt R, Ennen J. Rapid in vivo measurement of the topography of human skin by active image triangulation using a digital micromirror device. *Skin Res Technol* 1999; 5:195-207.
115. Levy JL, Pons F, Agopian L, Besson R. Subjective Evaluation and Objective Measurement Methods in Cosmetic Dermatology. *Med Laser Appl* 2004; 19:223-229.
116. Tanzi EL, Alster TS. Comparison of a 1450-nm diode laser and a 1320-nm Nd:YAG laser in the treatment of atrophic facial scars: a prospective clinical and histologic study. *Dermatol Surg* 2004; 30(2 Pt 1):152-157.
117. Friedman PM, Skover GR, Payonk G, Kauvar AN, Geronemus RG. 3D in-vivo optical skin imaging for topographical quantitative assessment of non-ablative laser technology. *Dermatol Surg* 2002; 28(3):199-204.
118. Stüttgen G, Flesch U. *Dermatologische Thermographie*. Weinheim; Deerfield Beach, Florida; Basel: Edition Medizin; 1984.
119. Di CA. Thermography and the possibilities for its applications in clinical and experimental dermatology. *Clin Dermatol* 1995; 13(4):329-336.
120. Issing K, Weiler EM, Krause W, Friederich HC. Physical, physiological, diagnostic and therapeutic aspects of thermography in clinical dermatology. *Z Hautkr* 1985; 60(19):1506, 1511-1506, 1512.
121. Hanau A, Stucker M, Gambichler T et al. Noninvasive diagnosis of skin functions. *Hautarzt* 2003; 54(12):1211-1223.
122. Stüttgen G, Flesch U, Siebel T. Development of erythema in thermographic images. *Hautarzt* 1981; 32(12):622-628.
123. Theischen M, Bornfeld N, Becher R, Kellner U, Wessing A. Hexadecylphosphocholine may produce reversible functional defects of the retinal pigment epithelium. *Ger J Ophthalmol* 1993; 2(2):113-115.
124. Clive S, Gardiner J, Leonard RC. Miltefosine as a topical treatment for cutaneous metastases in breast carcinoma. *Cancer Chemother Pharmacol* 1999; 44 Suppl:S29-S30.
125. Dumontet C, Thomas L, Berard F, Gimonet JF, Coiffier B. A phase II trial of miltefosine in patients with cutaneous T-cell lymphoma. *Bull Cancer* 2006; 93(11):E115-E118.
126. Grischke EM, Kaufmann M, Schmid H, Bastert G. Use of Miltefosin in Cutaneously Metastasized Carcinoma of the Breast - An Innovative Treatment Concept for Topical Treatment of Skin Metastases. *Geburtsh Frauenheilk* 1996; 56:596-599.
127. Leonard R, Hardy J, van TG et al. Randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter trial of 6% miltefosine solution, a topical chemotherapy in cutaneous metastases from breast cancer. *J Clin Oncol* 2001; 19(21):4150-4159.
128. Unger C, Sindermann H, Peukert M, Hilgard P, Engel J, Eibl H. Hexadecylphosphocholine in the topical treatment of skin metastases in breast cancer patients. *Prog Exp Tumor Res* 1992; 34:153-159.

129. Burk K, David M, Junge K, Sindermann H. Overview on the clinical development of miltefosine solution (MilteX®) for the treatment of cutaneous breast cancer. *Drugs of Today* 1994; 30(Suppl B):59-72.
130. Terwogt JM, Mandjes IA, Sindermann H, Beijnen JH, ten Bokkel Huinink WW. Phase II trial of topically applied miltefosine solution in patients with skin-metastasized breast cancer. *Br J Cancer* 1999; 79(7-8):1158-1161.
131. Soto J, Rea J, Balderrama M et al. Efficacy of miltefosine for Bolivian cutaneous leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 2008; 78(2):210-211.
132. Stojkovic M, Junghans T, Krause E, Davidson RN. First case of typical Old World cutaneous leishmaniasis treated with miltefosine. *Int J Dermatol* 2007; 46(4):385-387.
133. Sundar S, Jha TK, Thakur CP et al. Oral miltefosine for Indian visceral leishmaniasis. *N Engl J Med* 2002; 347(22):1739-1746.
134. Zerpa O, Ulrich M, Blanco B et al. Diffuse cutaneous leishmaniasis responds to miltefosine but then relapses. *Br J Dermatol* 2007; 156(6):1328-1335.
135. Soto J, Soto P. Miltefosine: oral treatment of leishmaniasis. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2006; 4(2):177-185.
136. Eibl H. Tödliche Tropenkrankheit jetzt heilbar. Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie MPIbc Göttingen News 2000; 6(3):1-4.
137. Namer M, Catimel G, Mauriac L et al. 6% Miltefosine Solution (mil) Locally used as Single Palliative Therapy in Cutaneous Metastases from Breast Cancer. *Ann Oncol* 1994; 5(Suppl. 8):38.
138. Higgins EM, Humphreys S, Duvivier AW. Urticaria pigmentosa--response to topical steroids. *Clin Exp Dermatol* 1994; 19(5):438-440.
139. Mateo JR. Mastocytoma: topical corticosteroid treatment. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2001; 15(5):492-494.
140. Sidhu S, Wakelin SH, Wojnarowska F. Prolonged remission of urticaria pigmentosa following topical steroid therapy under hydrocolloid occlusion. *Clin Exp Dermatol* 1997; 22(6):302-303.
141. Taylor G, Waojnarowska F, Chia Y, Kennedy C. Treatment of urticaria pigmentosa by corticosteroids applied under a hydrocolloid dressing. *EJD* 1993; 3(4):276-278.
142. Guzzo C, Lavker R, Roberts LJ, Fox K, Schechter N, Lazarus G. Urticaria pigmentosa. Systemic evaluation and successful treatment with topical steroids. *Arch Dermatol* 1991; 127(2):191-196.
143. Barton J, Lavker RM, Schechter NM, Lazarus GS. Treatment of urticaria pigmentosa with corticosteroids. *Arch Dermatol* 1985; 121(12):1516-1523.
144. Lavker RM, Schechter NM. Cutaneous mast cell depletion results from topical corticosteroid usage. *J Immunol* 1985; 135(4):2368-2373.

- 
145. Lehmann P, Zheng P, Lavker RM, Kligman AM. Corticosteroid atrophy in human skin. A study by light, scanning, and transmission electron microscopy. *J Invest Dermatol* 1983; 81(2):169-176.
  146. Pipkorn U, Hammarlund A, Enerback L. Prolonged treatment with topical glucocorticoids results in an inhibition of the allergen-induced weal-and-flare response and a reduction in skin mast cell numbers and histamine content. *Clin Exp Allergy* 1989; 19(1):19-25.
  147. Dummer R, Krasovec M, Roger J, Sindermann H, Burg G. Topical administration of hexadecylphosphocholine in patients with cutaneous lymphomas: results of a phase I/II study. *J Am Acad Dermatol* 1993; 29(6):963-970.
  148. Heide R, Middelkamp Hup MA, Mulder PG, Oranje AP. Clinical scoring of cutaneous mastocytosis. *Acta Derm Venereol* 2001; 81(4):273-276.
  149. Jensen BM, Akin C, Gilfillan AM. Pharmacological targeting of the KIT growth factor receptor: a therapeutic consideration for mast cell disorders. *Br J Pharmacol* 2008; 154(8):1572-1582.

## 8. Anhang

### Danksagung

Mein Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Professor Dr. med. Marcus Maurer, für die Überlassung des Themas der vorliegenden Arbeit, die Möglichkeit innerhalb seiner Arbeitsgruppe diese Arbeit durchführen und anfertigen zu können, seine kontinuierliche Betreuung, fachliche Unterstützung und konstruktiven Diskussionen.

Herrn Dr. Frank Siebenhaar und Herrn Dr. Martin Metz möchte ich für die Betreuung während der Durchführung der Studie, sowie für die Ratschläge und konstruktive Kritik bei der Erstellung der Dissertation, danken. Bedanken möchte ich mich außerdem für das stets freundliche und angenehme Arbeitsklima innerhalb der gesamten Arbeitsgruppe, die Hilfsbereitschaft und ständige Ansprechbarkeit bei Fragen. Speziell Nikki Rooks danke ich für die Einarbeitung und stetige Hilfe.

Dem Unternehmen JADO Technologies GmbH danke ich für die zur Verfügung gestellten Medikamente, Materialien und die effektive Zusammenarbeit und Unterstützung.

Ich danke den Zentren der Universitäts-Hautklinik Mainz, Köln, der Ludwig-Maximilians Universität München und der Technischen Universität München für die freundliche Kooperation bei der Durchführung der Studie.

Für die methodische und technische Unterstützung der sonographischen Messungen danke ich Herrn Dr. med. Gregor Schäfer-Hesterberg und Herrn Dimitrios Papakostas. Der GF Messtechnik GmbH, speziell Frau Susanne Glombitza, gilt mein Dank für die Betreuung und Beratung im Rahmen der volumetrischen Messungen.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern Karin und Wolfgang Schoepke, meinem Bruder Oliver Schoepke, sowie meinem Freund Adrian Schalow, die mich nicht nur während der Doktorarbeit, sondern innerhalb meines gesamten Studiums und darüber hinaus unterstützt, motiviert und mir stets Geduld und Zuspruch entgegengebracht haben.

## **Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

---

## Publikationsliste

### Paper:

Hartmann K, Siebenhaar F, Belloni B, Brockow K, Eben R, Hartmann B, Ruëff F, Schoepke N, Staubach P, Weber A, Maurer M. Topical treatment with the raft modulator miltefosine – a novel therapeutic option for cutaneous mastocytosis? *Br J Dermatol – in progress*

### Vorträge:

Schoepke N, Siebenhaar F, Metz M, Maurer M. Topical treatment with miltefosine can reduce the size of skin lesions and wheal formation in cutaneous mastocytosis (First results of the MICUMA trial). 11. Treffen der Arbeitsgemeinschaft Mastzellen und Basophile der ADF vom 6. bis 7. Dezember 2007 in München.

### Abstracts:

Siebenhaar F, Schoepke N, Metz M, Maurer M. Topical treatment with miltefosine can reduce the size of skin lesions and wheal formation in cutaneous mastocytosis (First results of the MICUMA trial). 11. Treffen der Arbeitsgemeinschaft Mastzellen und Basophile der ADF vom 6. bis 7. Dezember 2007 in München.

Hartmann K, Siebenhaar F, Beloni B, Brockow K, Eben R, Hartmann B, Rueff F, Schoepke N, Staubach P, Weber A, Maurer M. Effect of Topical Miltefosine on Cutaneous Mastocytosis: First Results of the MICUMA Trial. 20. Mainzer Allergie-Workshop vom 7. bis 8. März 2008 – Kurzvorträge und Poster zu aktuellen Themen in der Allergologie und klinischen Immunologie.

## Eidesstattliche Erklärung

„Ich, Nicole Schoepke, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: *Wirksamkeit und Verträglichkeit des Raft-Interventionstherapeutikums Miltefosin bei der Behandlung der kutanen Mastozytose* selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift