

Aus dem
Charité Centrum für Neurologie, Neurochirurgie und Psychiatrie
Klinik für Neurologie und Institut für Experimentelle Neurologie
Charité - Universitätsmedizin Berlin, Campus Mitte

DISSERTATION

**Neurotoxizität und Pharmakokinetik des experimentellen Tumorthapeutikums
Salinomycin im Mausmodell**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

von
Hanna Münzfeld
aus Bonn.

Datum der Promotion: 01.03.2019

Vorwort

Auszüge dieser Arbeit wurden vorab veröffentlicht:

W. Boehmerle, H. Muenzfeld, A. Springer, P. Huehnchen, and M. Endres, “Specific targeting of neurotoxic side effects and pharmacological profile of the novel cancer stem cell drug salinomycin in mice.,” *J. Mol. Med. (Berl)*., vol. 92, no. 8, pp. 889–900, Aug. 2014.

INHALTSVERZEICHNIS

Vorwort	2
I. Abkürzungsverzeichnis	6
II. Abbildungsverzeichnis	10
III. Tabellenverzeichnis	11
IV. Fußnotenverzeichnis	11
V. Zusammenfassung	12
VI. Abstract	13
1 EINLEITUNG	15
1.1 Grundzüge der Zytostatikatherapie	15
1.1.1 Nomenklatur und geschichtlicher Überblick	15
1.1.2 Epidemiologischer Hintergrund und klinische Anwendung	16
1.1.3 Limitationen der medikamentösen Tumorthherapie und Tumorstammzellkonzept	17
1.2 Klinischer Hintergrund: Nebenwirkungen der Zytostatikatherapie	19
1.2.1 Chemotherapie-induzierte Neuropathie	19
1.2.2 Präklinische Forschung	21
1.3 Salinomycin	23
1.3.1 Eckdaten zu Salinomycin und Anwendungsgebiete	23
1.3.2 Zellulärer Wirkmechanismus	24
1.3.3 Stand der Forschung zur Entwicklung von Salinomycin für die Humanmedizin	25
1.3.4 Nebenwirkungsspektrum von Salinomycin <i>in vivo</i>	26
1.3.5 Effekte von Salinomycin auf neuronale Zellen	27
1.4 Fragestellung und Zielsetzung dieser Arbeit	29
2 METHODIK	30
2.1 In-Vivo-Modell, Studiendesign	30
2.1.1 Poweranalyse, Versuchsgruppenzuordnung, Tierhaltung	30
2.1.2 Injektionsprotokoll	31
2.1.3 Dosisfindungsstudie	31
2.1.4 Interventionsstudie	31
2.1.5 Aufbereitung der Pharmaka, Applikationsmechanismen, Pumpenimplantation	32

2.2 Pharmakokinetische Untersuchung mittels Flüssigkeitschromatografie/Massenspektrometrie	33
2.2.1 Blutentnahmeprotokoll	33
2.2.2 Probenaufbereitung	33
2.3 Verhaltensanalyse	34
2.3.1 RotaRod	34
2.3.2 Von Frey Haar-Test	36
2.3.3 Catwalk	37
2.3.4 Hot-/Cold-Plate-Test	38
2.4 Elektrophysiologie	39
2.5 Laborchemische Untersuchung in der Interventionsstudie	40
2.6 Histologie	41
2.6.1 Paraffineinbettung	41
2.6.2 Hämatoxylin/Eosin (HE)-Färbung	41
2.7 Software und statistische Auswertung	42
3 ERGEBNISSE	43
3.1 Dosisfindungsstudie	43
3.2 Poweranalyse	45
3.3 Pharmakokinetische Untersuchung mittels Flüssigkeitschromatografie/Massenspektrometrie	45
3.3.1 Bestimmung der Werte	45
3.4 Tiermodell und Interventionsstudie mit CGP-37157	47
3.5 Verhaltensanalyse	48
3.5.1 RotaRod	48
3.5.2 Von Frey Haar-Test	49
3.5.3 Hot-/Cold Plate Test	50
3.5.4 Catwalk	52
3.6 Elektrophysiologie	55
3.7 Laborchemische Untersuchung in der Interventionsstudie	56
3.7.1 Hämatopoese	56
3.7.2 Klinische Chemie	57
3.8 Histologische Untersuchung der inneren Organe	59

3.8.1 Leber	59
3.8.2 Nieren	60
3.8.3 Skelettmuskulatur	60
3.8.4 Herzmuskulatur	60
4 DISKUSSION	62
4.1 Zentrale Ergebnisse dieser Arbeit	62
4.2 Dosisfindungsstudie und Pharmakokinetik	63
4.3 Tiermodell der Salinomycin-induzierten Neuropathie und Intervention mit CGP-37157	68
4.4 Zusammenfassung und Ausblick	77
VII. Literaturverzeichnis	79
VIII. Anhang	87
IX. Lebenslauf	91
X. Publikation und Anteilserklärung	92
XI. Eidesstattliche Versicherung	94
XII. Danksagung	95

I. Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
Δ	Delta (griech.), Differenz
ABC-Transporter	ATP binding cassette-Transporter (engl.), Ionen-transporter mit Adenosin-Triphosphat-Bindungsdomäne
Akt	Gen, das für Proteinkinase-Isoformen kodiert
ALT	Alanin-Aminotransferase
AML	Akute myeloische Leukämie
ANOVA	Analysis of variance (engl.), Varianzanalyse
<i>a priori</i>	lat. für vorab
Aqua dest.	destilliertes Wasser
AST	Aspartat-Aminotransferase
ATP	Adenosin-Triphosphat
ATPasen	Kurzform von Adenosintriphosphatasen
AUC	area under the curve (engl.), Fläche unter der Kurve
BALB/c	Genotyp, Mausstamm
C57BL/6J	Genotyp, Mausstamm
Ca ²⁺	Calcium
CD-Profil	Cluster of Differentiation (engl.), zelluläre Oberflächenmarker
CGP 37157 / CGP	selektiver Inhibitor der mitochondrialen Na ⁺ /Ca ²⁺ -Austauschers
CIPN	Chemotherapie-induzierte Polyneuropathie
CK	Kreatinkinase
CLL	Chronisch lymphatische Leukämie
Cl/F	Plasmaclearance-Volumen
C _{max}	Plasmaspitzenkonzentration
Cs ²⁺	Caesium
CSC	cancer stem cells (engl.), Tumorstammzellen
CTR	control (engl.), Kontrolle
CYP2D6	hepatischer Enzymkomplex
CYP3A4	hepatischer Enzymkomplex
<i>de novo</i>	lat. für „von neuem“
DMSO	Dimethylsulfoxid

EMG	Elektromyografie, Untersuchung der elektrischen Muskelaktivität
EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
ENG	Elektroneurografie
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EU	Europäische Union
<i>f</i>	hier: Effektgröße
F-Welle	motorische Spätantwort durch retrograde Leitung der α -Motoneurone
F-Wellen-Latenz	Latenzzeit zum Eintreffen der F-Welle (motorische Spätantwort)
fl	Femtoliter
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
G	Gauge od. Gage (engl.), u.a. Maßeinheit für Kanülengröße
g	Gramm
G ₀	Ruhephase des Zellzyklus
GLDH	Glutamatdehydrogenase
h	Stunde
HE	Hämatoxylin/Eosin
HER-2/neu	epizellulärer Wachstumsrezeptor, auch: Bezeichnung für codierendes Gen
Hz	Hertz
<i>in vivo</i>	lat. für „im lebenden Organismus“ (hier: Tiermodell)
<i>in vitro</i>	lat. für „im Glas“, Synonym für: außerhalb des lebenden Organismus
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
K ⁺	Kalium
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
l	Liter
LaGeSo	Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin
Lat	latency (engl.), Latenzzeit
LDH	Lactatdehydrogenase
ln	mathematische Logarithmusfunktion
mA	Milliampère
MCHC	mittlere korpuskuläre Hämoglobinkonzentration
MCV	mittleres korpuskuläres Volumen

MDR	multi drug resistance (engl.), gesteigerte Chemoresistenz
mg	Milligramm
MIT	Massachusetts Institute of Technology
mm ²	Quadratmillimeter
mmol	Millimol
MNLG	motorische Nervenleitgeschwindigkeit
MRC	minimal reportable concentration (engl.), minimal nachweisbare Konzentration
MRSA	Methicillin-resistenter Staphylococcus aureus
MRT	mean residence time (engl.), mittlere systemische Verweildauer
MS	Massenspektrometrie
ms	Millisekunde
MSAP	motorisches Summenaktionspotenzial
mV	Millivolt
N ₂ O	Di-Stickstoffmonoxid, Stickoxydul, Lachgas
Na ⁺	Natrium
Na ⁺ /K ⁺ -ATPase	Natrium-Kalium-ATPase, ATP-abhängiger Ionentransporter
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumphosphat
NaH ₂ PO ₄ ⁻	Natriumdihydrogenphosphat
NCV	nerve conduction velocity (engl.), Nervenleitgeschwindigkeit (NLG)
NCX	Na ⁺ /Ca ²⁺ -Austauscher
NLG	Nervenleitgeschwindigkeit
N-Lost	Stickstoff-Lost
nm	Nanometer
nM	nanomolar/ Nanomol
O ₂	Sauerstoff
p.o.	per os, lat. für oral
PEG	Polyethylenglykol
PI ₃	Phosphatidylinositoltriphosphat
PTEN	Phosphatase-Tensin-Homolog
PTFE	Polytetrafluorethylen
rpm	rounds per minute (engl.) Umdrehungen pro Minute
SAL	Salinomycin
sec / Sek.	Sekunde

SNAP	sensory nerve action potential (engl.), sensibles Nervenaktionspotenzial
spp.	species, lat. für Spezies
t_{\max}	Absorptionsgeschwindigkeit, Zeit zum Erreichen der Plasmaspitzenkonzentration
TRP	„transient receptor potential“-Ionenkanäle
$t_{1/2}$	Plasmahalbwertszeit
(U)HPLC	(ultra) high pressure liquid chromatography (engl.) für (Ultra-) Hochdruck-Flüssigkeitschromatografie
UV	ultraviolett
V_{\max}	Maximale Geschwindigkeit
V_z/F	Verteilungsvolumen in der terminalen Phase, hier: nach i.p.-Gabe
WHO	World Health Organisation (engl.), Weltgesundheitsorganisation
Wnt	intrazellulärer Signalweg
γ -GT	Gamma-Glutamyltransferase
λ_z	hier: Eliminationsgeschwindigkeitskonstante
μg	Mikrogramm
μm	Mikrometer
μmol	Mikromol
3R-Konzept	Richtlinie in der tierexperimentellen Forschung, für engl.: replace, reduce, refine
^{14}C	radioaktives Kohlenstoff-Atom

II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematisches Konzept der Tumorstammzellhypothese	19
Abbildung 2: Chemische Struktur von Salinomycin	24
Abbildung 3: Zeitleiste der Blutentnahmen an Tag 1 der Dosisfindungsstudie zur HPLC-Analyse	33
Abbildung 4: Zeitleiste der Interventionsstudie	34
Abbildung 5: RotaRod-Apparatur	35
Abbildung 6: Experimentaufbau im Von Frey Haar-Test	36
Abbildung 7: Catwalk-System	38
Abbildung 8: Hot/Cold-Plate zur Untersuchung der Thermozeption	39
Abbildung 9: Schematische Darstellung der ENG-Messung	40
Abbildung 10: Vereinfachte Darstellung der Ableitung des SNAP	40
Abbildung 11: Kaplan-Meier-Überlebenskurve für die tägliche intraperitoneale Injektion von 5 mg/kg KG bzw. 10 mg/kg KG SAL	44
Abbildung 12: Veränderung der SNAP-Amplitude im Neuropathiescreening	44
Abbildung 13: Plasmakonzentrations-Zeit-Kurve nach einmaliger intraperitonealer Injektion von 5 mg/kg KG SAL	47
Abbildung 14: Gewichtsverlauf während der Interventionsstudie	48
Abbildung 15: Ergebnisse des RotaRod-Tests	49
Abbildung 16: Ergebnisse des Von Frey Haar-Tests	50
Abbildung 17: Veränderung der gruppenspezifischen Reaktionslatenzzeit im Cold Plate-Test	51
Abbildung 18: Darstellung des gruppenübergreifend stabilen Reizantwortverhaltens im Hot Plate-Test	52
Abbildung 19: Veränderungen des „duty cycle“-Parameters im Catwalk-Test	54
Abbildung 20: Veränderung des „print area“-Parameters im Catwalk-Test	54
Abbildung 21: Ergebnisse der elektrophysiologischen Untersuchung	55
Abbildung 22: Repräsentative Ausschnitte der histologischen Untersuchung	61

III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Versuchsgruppenzuordnung der Interventionsstudie	32
Tabelle 2: Pharmakokinetische Parameter nach i.p.-Injektion von 5 mg/kg KG SAL	46
Tabelle 3: Blutparameter nach 28-tägiger Behandlung mit Salinomycin	58

IV. Fußnotenverzeichnis

1: Weitere Polyetherantibiotika	24
2: Internetadresse für online-basierte Randomisierungen	30

V. Zusammenfassung

Einleitung: Salinomycin (SAL) ist ein Polyether-Antibiotikum, das in der Veterinärmedizin zur Therapie von Kokzidieninfektionen eingesetzt wird. Im Jahr 2009 wurde bekannt, dass SAL eine bemerkenswerte Zytotoxizität gegenüber diversen Tumorentitäten und Tumorstammzellen aufweist.[1] Insbesondere die Eradikation von Tumorstammzellen, sowie die Chemoresistenz von Tumorzellen gelten als zentrale Herausforderungen in der onkologischen Therapie. Die zytotoxische Wirksamkeit von Salinomycin gründet pathophysiologisch auf einer Störung der intrazellulären Ionenhomöostase inklusive der Beeinflussung Calcium-vermittelter Signalkaskaden, sowie der Apoptoseinduktion.[2] Hieraus ergibt sich ein vielversprechendes Potenzial zur Etablierung der Substanz in der medikamentösen Tumorthherapie. Dem gegenüber steht jedoch ein gravierendes neuromuskuläres Nebenwirkungsprofil von SAL bei Überdosierung, dessen Mechanismen bis dato nicht hinreichend geklärt sind.[3] Zudem besteht lediglich eine spärliche Datenlage zur Pharmakokinetik und dem Risikoprofil unter Langzeittherapie. Beides ist in der Translation der Substanz für einen Einsatz in der Humanmedizin essentiell.

Zielsetzung: Ziel dieser Arbeit war die Definition einer nebenwirkungsarmen täglichen Salinomycin-Dosis sowie die Erstellung eines pharmakokinetischen Modells nach intraperitonealer (i.p.) Gabe in der C57Bl/6J-Maus. Anschließend sollte das neurotoxische Nebenwirkungsprofil von SAL unter Langzeittherapie charakterisiert und ein pharmakologischer Ansatz zur Neuroprotektion evaluiert werden.

Methodik: Anhand eines *in vivo*-Modells erfolgte zunächst eine Dosisfindungsstudie, in der eine tägliche i.p.-Dosis von 5 bzw. 10 mg/kg Körpergewicht (KG) Salinomycin getestet wurde.[1],[4] Die Pharmakokinetik wurde mittels Hochdruck-Flüssigkeitschromatografie untersucht. Auf Basis dieser Daten erfolgte eine SAL-Langzeittherapie mit 5 mg/kg SAL über 28 Tage. Anhand von Verhaltensanalysen und Elektrophysiologie wurden die neurotoxischen Nebenwirkungen analysiert und zeitgleich ein neuroprotektiver Ansatz mittels pharmakologischer Blockade des mitochondrialen $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Antiporters getestet. Die Beurteilung systemischer Effekte erfolgte durch Blutuntersuchungen und der histologischen Analyse entnommener Organe.

Ergebnisse: Salinomycin besitzt eine geringe therapeutische Breite *in vivo*. Eine Dosis von 5 mg/kg KG erwies sich in der Maus als gut verträglich. 30 Minuten nach i.p.- Injektion zeigten Plasmaspitzenkonzentrationen im niedrig-mikromolaren Bereich. Die systemische Elimination erfolgte innerhalb von fünf Stunden. Laborchemisch und histologisch ergaben

sich keine Hinweise auf spezifische Endorganschäden, sodass eine Dosis von 5 mg/kg KG in der Maus als systemisch nebenwirkungsarm anzusehen ist. Unter Langzeittherapie ergaben sich jedoch charakteristische Merkmale einer sensiblen Neuropathie. Zentrale Befunde waren eine markante mechanische und Kälte-Allodynie sowie subtile Gangbildveränderungen. Elektrophysiologisch zeigte sich ein vorwiegend axonales Schädigungsmuster. Über die pharmakologische Blockade des mitochondrialen Na⁺/Ca²⁺-Austauschers mit CGP-37157 ließ sich eine partielle Prävention der neurotoxischen Nebenwirkungen erzielen.

Schlussfolgerung: Die vorliegende Studie liefert pharmakologische Eckdaten zu Salinomycin für nachfolgende präklinische Studien. Es wurde *in vivo* ein substanzspezifisches Risikoprofil für die Weiterentwicklung des Wirkstoffs in experimentellen und klinischen Anwendungen generiert. Darüber hinaus gelang es, einen vielversprechenden Ansatz zur Behandlung der neurologischen Nebenwirkungen von Salinomycin zu etablieren.

VI. Abstract

Introduction: Salinomycin is a polyether antibiotic commonly used in agriculture and veterinary medicine to prevent and treat coccidial infections. In 2009, it was shown to exert profound cytotoxic efficacy against cancer stem cells and a variety of multidrug resistant tumor cells both *in vitro* and *in vivo*. [1] Although several studies found the drug to exhibit promising anti-tumor properties, numerous veterinary case reports describe accidental intoxications with Salinomycin suggesting a severe toxicity of the substance. [2], [3] To date, there is only scarce pharmacological data as well as safety information on the compound. However, both are essential for drug safety evaluation with regard to a translational use of this substance in the clinical setting.

Objective: The aim of this study was to define a well-tolerated daily dose of SAL and to characterize the pharmacokinetic profile. Furthermore, we aimed to assess the systemic and neurotoxic side effects of Salinomycin and to investigate an interventional approach to reduce neurotoxicity *in vivo*.

Methods: We designed an *in vivo* model for chronic treatment with Salinomycin in C57Bl/6J mice over a period of 28 days and assessed the pharmacokinetic profile after single intraperitoneal injection by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. In a second cohort, we examined the systemic and neurotoxic side effects of the drug using behavioural assessment, electrophysiology of the tail nerve, blood analysis, as well as

histological examination of internal organs. We further investigated whether neurotoxic effects can be prevented by targeting the intracellular calcium homeostasis through pharmacological inhibition of the mitochondrial $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger.

Results: Salinomycin has a small therapeutic range in which a dose of 5 mg/kg body weight is well tolerated in mice. Pharmacokinetic analysis displayed low micromolar peak concentrations at 30 minutes after intraperitoneal administration and a systemic elimination within 5 hours. We observed low systemic toxicity in the analysis of blood parameter and the histological examination of extracted organs. Interestingly, animals treated with a daily dose of 5 mg/kg salinomycin developed characteristic features of a predominantly axonal sensory polyneuropathy. This was characterized by mechanical and cold allodynia, distinct alterations in gait as well as lowered sensory nerve action potential amplitudes and partially reduced nerve conduction velocities in the electrophysiological testing. However, inhibition of the mitochondrial $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger did, in part, prevent the emergence of Salinomycin-induced neuropathy *in vivo*.

Conclusion: Our study delivers benchmark data on the pharmacokinetic properties of Salinomycin and provides safety information for further preclinical and future translational trials. In addition, we established an interventional approach to prevent neurotoxic side effects of Salinomycin.

1 EINLEITUNG

1.1 Grundzüge der Zytostatikatherapie

1.1.1 Nomenklatur und geschichtlicher Überblick

Der britische Mediziner Thomas Sydenham (1624 – 1689) sagte einst: „Nur derjenige darf den Namen eines wahren Arztes beanspruchen, der Heilmittel besitzt, die den spezifischen Charakter einer Erkrankung gänzlich aufheben“. Was schon vor mehr als 300 Jahren das Wesen der Medizin in ihrer Suche nach dem Verständnis von Ätiologie und Pathogenese von Erkrankungen und der Erforschung kausaler Therapien zu charakterisieren suchte, spiegelt sich auch in der Entwicklung der modernen Tumorthherapie wieder. Der Arzt und Wissenschaftler Paul Ehrlich (1854-1915) leistete um die Jahrhundertwende an der Berliner Charité Pionierarbeit mit seiner Forschung zu der Genese von Tumorerkrankungen und Immunreaktionen sowie bei der Suche nach spezifischen Therapeutika zur Behandlung von Infektionskrankheiten. Er prägte den Begriff der „Chemotherapie“, als er mit Salvarsan (Arsphenamin) das erste (antimikrobielle) „Chemotherapeutikum“ zur Behandlung der Syphilis entwickelte. Heute wird die Bezeichnung „Chemotherapeutikum“ meist synonym verwendet mit „Zytostatikum“, das sich aus dem Griechischen „κύτος“, „κύτταρο“ (*cyto*) für „Zelle“ und „στατική“ (*statikos*) für „anhaltend, zum Stillstand bringen“ oder aus dem Lateinischen von „stare“ für „stehen“ ableitet. Die konventionelle, also „die Zellen anhaltende“ Zytostatikatherapie richtet sich nach heutigem Verständnis ausschließlich gegen bösartige Neubildungen des Körpers. Die „Chemo“-Therapie von Infektionskrankheiten ist weitestgehend durch den Begriff der „antimikrobiellen Therapie“ unter Verwendung von Antibiotika ersetzt.

Die Ursprünge der modernen Chemotherapie liegen in der Entwicklung des Schwefel-Lost (S-Lost, Senfgas) als chemischer Kampfstoff während des 1. Weltkriegs. Dessen weniger toxisches Derivat Stickstoff-Lost (N-Lost, Bis-(2-chlorethyl)-methylamin, Mechlorethamin) fand als Muttersubstanz der DNA-Alkylanzien ab 1942 Einsatz in der Humanmedizin: die Wissenschaftler Louis S. Goodman und Alfred Gilman, sowie der Arzt Gustaf E. Lindskog testeten den „Substanz X“ (auch: „synthetic lymphocidal chemical“, N-Lost) benannten Wirkstoff erstmals an dem Patienten „J. D.“, der an einem malignen Lymphom litt. „Wundersamerweise“, so publizierten die Forscher damals, „wurde der Krebs erweicht“, der Tumor am Hals des Patienten bildete sich zurück, wenngleich ihr Patient wenig später an einem erneuten Progress der Erkrankung verstarb.[5]

Nach seiner Entdeckung der platinhaltigen Zytostatika 1965 prägte Barnett Rosenberg ab Ende der 1960er-Jahre die Erforschung von Substanzwirkungen auf zellulärer und mechanistischer Ebene. Der zentrale Wegbereiter für ein tiefgreifendes Verständnis der Tumorgenese und

zytostatischer Wirkmechanismen war jedoch erst die grundlegende Identifikation der spezifischen Malignitätsprinzipien von Tumorzellen durch Hanahan und Weinberg im Jahr 2000. Ihnen zufolge lässt sich die Malignität von Tumorzellen auf sechs zentrale Störungen der Zellphysiologie zurückführen: ein unbegrenztes, dysreguliertes Wachstum, die Immunität gegenüber Wachstumsinhibition, eine mangelnde Fähigkeit zur selbstinduzierten Apoptose, ein unbegrenztes Replikationsvermögen, die nachhaltige Angiogenese, sowie Gewebeeinfiltration und Fernmetastasierung.[6] An diesen zentralen Prinzipien setzen moderne Zytostatika an, indem sie in Proliferations-, Stoffwechsel und Mitoseprozesse eingreifen. Aufgrund ihrer intensiven Zellteilungs- und Wachstumsrate sind Tumorzellen gegenüber klassischen Zytostatika besonders empfindlich. Die gemeinsame Endstrecke der konventionellen Substanzen mündet in der Induktion von zellulären Apoptoseprogrammen.[7]

In Abgrenzung zu den konventionellen Substanzen konnten in den vergangenen Jahren über das zelluläre und molekulare Verständnis der onkogenen Prinzipien, der intra- und interzellulären Signalprozesse und der Identifikation immunhistologischer Eigenschaften des Tumorgewebes die sogenannten „molecularly targeted therapies“ entwickelt werden. Diese neueren Substanzen wirken über selektive Interaktion mit tumorspezifisch exprimierten molekularen Strukturen oder Stoffwechselcharakteristika wie Oberflächenrezeptoren, Membranproteine oder Zellproteasen und versprechen so eine zielgerichtete zytostatische Wirkung. Die Entwicklung des Tyrosinkinaseinhibitors Imatinib (Imatinibmesilat, Glivec®) zur Behandlung der Chronisch myeloischen Leukämie sowie des Gastrointestinalen Stromatumors, oder auch des monoklonalen Antikörpers Trastuzumab (Herceptin®), dessen Einsatz in der Therapie des HER-2 (Herceptin)-exprimierenden Mammakarzinoms bedeutende Erfolge erbrachte, stellen etablierte Beispiele dar.[8], [9]

1.1.2 Epidemiologischer Hintergrund und klinische Anwendung

Malignome und ihre Komorbiditäten besitzen, neben Erkrankungen des kardiovaskulären Systems und der Psyche, in westlichen Industrienationen eine hohe Mortalität und Morbidität. Laut Weltgesundheitsorganisation (WHO) beträgt die geschätzte weltweite Lebenszeitprävalenz circa 39,6% (Stand 2012). Im Jahr 2012 stellten Malignom-Erkrankungen mit einer Inzidenz von 14,1 Millionen und 8,2 Millionen Todesfällen (13% aller weltweiten Todesfälle) die zweithäufigste Todesursache weltweit dar. In Deutschland betrug die Fünf-Jahres-Prävalenz im Jahr 2012 1,6 Millionen bei einer Gesamtpopulation von 81 Millionen Einwohnern.[10]–[12] In den kommenden zwei Dekaden wird weltweit ein absoluter Anstieg der jährlichen Inzidenzen von Tumorerkrankungen um bis zu 70% auf circa 22 Millionen Neudiagnosen erwartet. Nach

derzeitigem Stand erkranken in Deutschland jeder zweite Mann (51%) und 43% aller Frauen an einer bösartigen Neoplasie.[12], [13]

Eine primäre antineoplastische Behandlung erfolgt heute insbesondere bei systemisch-generalisierten Neoplasien (v.a. des blutbildenden Systems), als neoadjuvante oder adjuvante Therapie bei soliden Malignomen, zur palliativen Therapie bei Inoperabilität des Primärtumors, sowie bei nicht kurativ behandelbaren Metastasen oder Tumorrezidiven. Auch werden Zytostatika unter strenger Indikationsstellung zur Immunsuppression bei nicht-malignen Erkrankungen des rheumatologischen Formenkreises, Autoimmunerkrankungen, chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen oder zur Prophylaxe von Abstoßungsreaktionen nach Organtransplantationen eingesetzt.

1.1.3 Limitationen der medikamentösen Tumorthherapie und Tumorstammzellkonzept

Die medikamentöse antineoplastische Therapie vieler Tumore zeigt insbesondere im initialen Therapiestadium gute Erfolge. Eine breite Evidenzlage verdeutlicht dennoch, dass Tumorzellen im Verlauf einer Therapie vermehrt Resistenzen gegenüber zytostatischen Wirkstoffen ausbilden können. Diese Chemoresistenz (multi drug resistance, MDR) ist ein im Detail noch wenig verstandenes Phänomen. Ihr liegen adaptive Prozessen zu Grunde, die Tumorzellen im Verlauf einer Zytostatikatherapie unterlaufen können. Eine verminderte Aufnahme des Zytostatikums nach intrazellulär bzw. ein gesteigerter Export des Wirkstoffs nach extrazellulär, die unmittelbare intrazelluläre Inaktivierung der Substanz, Modifikationen der zellulären Zielstruktur, als auch die Aktivierung alternativer, onkogener oder antiapoptotischer Signalwege in den Tumorzellen wurden als kritische Prozesse in der Resistenzentwicklung identifiziert.[14] Daraus ergibt sich eine zunehmende Ineffizienz der rein medikamentösen Therapie mit der Notwendigkeit zur Modifikation oder Eskalation der Behandlungsstrategie. Häufig werden auch (Lokal-)Rezidive oder spontanen singuläre Metastasen ohne zunächst bekannten Primarius (ca. 20-45% bei Mamma- oder Prostatakarzinomen) nach einer längeren tumorfreien Zeit (Remission) beobachtet.[15], [16]

Die Gründe hierfür werden in der funktionellen, und genetischen und epigenetischen Diversität und den hierarchischen Entwicklungsstufen der Tumorzellen vermutet. Eine Arbeitsgruppe um John Dick lieferte mit Ihrer Erstbeschreibung von humanen AML-Zellen (Akute myeloische Leukämie) mit Stammzeleigenschaften den Grundstein zu der heutzutage weltweit anerkannten „Tumorstammzell-Hypothese“.[17] Die Hypothese stellt ein alternatives Konzept zu der streng monoklonalen Entität und Organisation eines Tumors dar. Sie geht von der Annahme aus, dass die heterogene Tumormasse einer hierarchischen Differenzierungsstruktur unterliegt und von Tumorzellen mit Stammzeleigenschaften (cancer stem cells, CSC) unterhalten wird. Diese

Tumorstammzellen, so belegt eine Vielzahl von *in vitro*- und *in vivo*-Arbeiten, besitzen ein pluripotentes Differenzierungspotenzial und die Fähigkeit zur Selbsterneuerung, Proliferation, Migration, sowie *de novo*-Tumorinitiation.[18] Auch im klinischen Kontext konnten CSC bei Patienten während und auch nach einer Chemotherapie nachgewiesen werden.[19],[20] Der Ursprung der CSC ist bis dato jedoch noch nicht eindeutig geklärt.

Das Tumorstammzellkonzept wirft somit nicht nur Fragen hinsichtlich der Genese und Organisation von Tumoren auf, sondern stellt auch neue Anforderungen an die medikamentöse Behandlung von Malignomen. Während differenzierte Tumorzellen durch einen gesteigerten Metabolismus, als auch der hohen Mitoserate einer Strahlen- als auch Zytostatikatherapie in besonderem Maße zugänglich sind, besitzen die CSC Eigenschaften, die eine noch nicht geschlossene Lücke in der Therapie maligner Neoplasien darstellen. So konnte gezeigt werden, dass CSC temporär oder dauerhaft in der G₀-Phase des Zellzyklus behaftet sind. Sie sind währenddessen nicht oder nur schwach proliferativ, metabolisch kaum aktiv und entziehen sie sich jenen Wirkstoffen, die primär mit der mitotischen Aktivität und intrazellulären Stoffwechselprozessen interferieren. Disseminierte, nicht eradizierte Tumorzellen und Tumorstammzellen, so die Hypothese, verbleiben nach einer systemischen antineoplastischen Therapie im Organismus und werden durch ihre Fähigkeit zur *de novo*-Tumorformation für das spontane Auftreten von Lokalrezidiven und Fernmetasen verantwortlich gemacht.[21]

Die Eradikation von MDR-Tumorzellen und CSC stellt aktuell eine zentrale Herausforderung in der medikamentösen Malignomtherapie dar. Die sich hieraus ergebende Notwendigkeit zur Eskalation des Behandlungsregimes, das Auftreten von Lokalrezidiven oder Fernmetastasen bedeuten für den Patienten nicht nur einen erheblichen Leidensdruck im Bezug auf die Tumorerkrankung an sich, sondern auch hinsichtlich der Komorbiditäten und Nebenwirkungen der Therapie.

Abbildung 1:

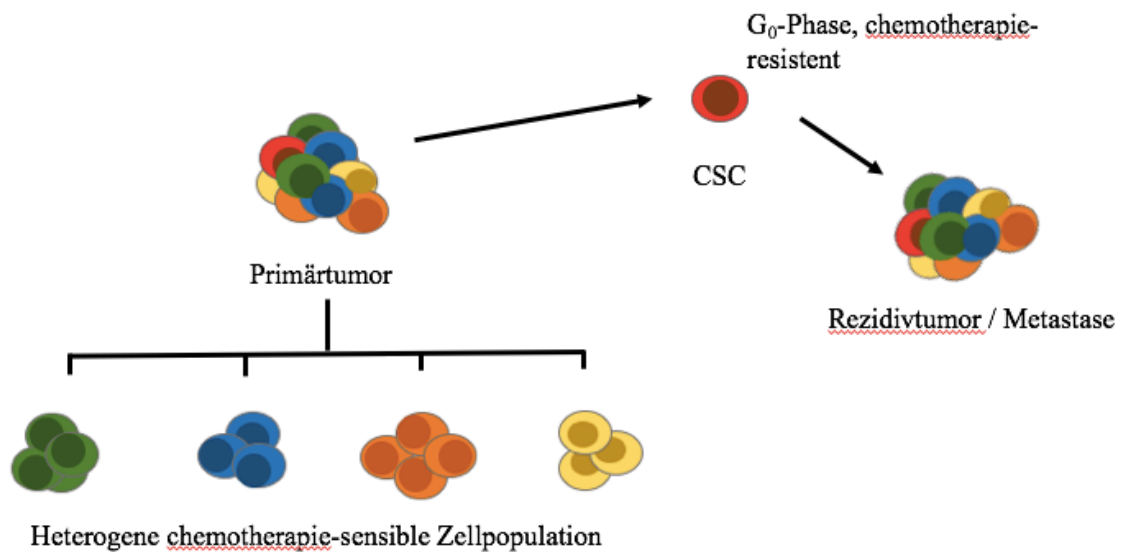


Abbildung 1: Schematisches Konzept der „Tumorstammzellhypothese“ mit Darstellung einer Tumorzell-Subpopulation mit Stammzellcharakteristika (rot). Abbildung modifiziert nach Naujokat & Steinhart [138]

1.2 Klinischer Hintergrund: Nebenwirkungen der Zytostatikatherapie

1.2.1 Chemotherapie-induzierte Neuropathie

Trotz der Bestrebungen, in der pharmakologischen Therapie von Malignomen möglichst selektiv die maligne Zellpopulation anzugreifen, unterliegen auch die gesunden Zellen des Organismus der systemischen Wirkung der Zytostatika. Die Chemotherapie-induzierte Polyneuropathie (CIPN) ist, neben Störungen des hämatopoetischen Systems und Symptomen wie Übelkeit, Erbrechen oder Haarverlust, eine der häufigsten und unangenehmsten Nebenwirkungen.

Die Pathophysiologie der CIPN ist hierbei nur unzureichend verstanden. Man erklärt sich die Vulnerabilität neuronaler Strukturen gegenüber systemisch applizierten Substanzen dadurch, dass sowohl erste Neuron der Sensibilität als auch autonome Neurone in Ganglien außerhalb der Blut-Hirn-Schranke liegen. Sie sind umgeben von fenestriertem Kapillarendothel, das kaum eine Diffusionsbarriere für toxische Metabolite darstellt.[22] Einige substanzspezifische Mechanismen, wie etwa die direkt toxische Schädigung der Myelinscheide (Demyelinisierung) oder des Axons (Platinderivate), die Behinderung der axonalen Transportmechanismen (Taxane, Vincristin) oder die Störung der zellulären Proteinhomeostase (Proteasominhibitoren, bspw. Bortezomib) wurden hierzu beschrieben.[23]

Auf zellulärer Ebene konnte für verschiedene Substanzen u.a. eine kritische Störung der Mitochondrienfunktion, des intrazellulären Calcium-Signalings als auch eine Dysfunktion der TRP-Ionenkanäle (engl.: transient receptor potential) identifiziert werden. [24], [25]

Die CIPN manifestiert sich vorwiegend als axonale, sensible Neuropathie mit längenabhängigem, distalem Beginn und zeigt ein symmetrisches, „handschuh- und sockenförmiges“ Verteilungsmuster.[26] Sie unterliegt einer Substanzspezifität und korreliert für gewöhnlich mit der Kumulativdosis, der Therapiedauer und dem Applikationsregime. Zu den Leitsymptomen zählen in erster Linie sensible Störungen wie Kribbelparästhesien, ein brennendes oder pelziges Hautgefühl, eine Hyp- bzw. Hyperalgesie oder Allodynie auf mechanische Reize, Beeinträchtigungen der Temperaturdiskrimination und des Vibrationsempfindens sowie neuropathische Schmerzphänomene. Darüber hinaus können die Wahrnehmung von Wund- oder viszeralen Schmerzen beeinträchtigt sein und Störungen der Propriozeption auftreten.

Eine (neuro-)muskuläre Schädigung manifestiert sich häufig durch eine initiale Schwäche der distalen Extremitätenmuskulatur (Verlust der Zehenspreizung und Dorsalextension des Fußes, Atrophie der Musculi interossei) oder in tonischen Muskelkontraktionen oder -fibrillationen sowie in Schluckbeschwerden. Sie sind den sensiblen Symptomen für gewöhnlich untergeordnet, unter Therapie mit Brentuximab Vedotin, Thalidomid, im Akutstadium der Oxaliplatin-Neuropathie sowie nach Erreichen der Vincristin-Kumulativdosis sind sie jedoch nicht zu vernachlässigen.[23] Autonome Symptome sind seltener, können aber insbesondere unter der Therapie mit Vincaalkaloiden auftreten. Zu diesen zählt eine gestörte Schweiß-, Tränen- und Speichelsekretion, trophische Störungen mit Ödemneigung, Ulzerationen und Osteoarthropathie sowie eine reduzierte Regulation vegetativer Funktionen. Hier stehen, neben Blasenmotilitätsstörungen und der erektilen Dysfunktion, v.a. die ausgeprägte Obstipationsneigung mit Gefahr eines paralytischen Ileus im Vordergrund.

Die CIPN kann sich ab der ersten Zytostatikagabe manifestieren und auch noch Jahre nach Beendigung der Chemotherapie wieder auftreten oder fortschreiten. Dieses sogenannte „coasting“-Phänomen ist insbesondere für platinhaltige Substanzen charakteristisch. Von Paclitaxel ist bekannt, dass die Substanz v.a. zu Therapiebeginn ein akutes Schmerzsyndrom mit Arthralgien und Myalgien hervorrufen kann.[26], [27]

Eine 2014 veröffentlichte Metaanalyse umfasst insgesamt 31 Studien (4179 Patienten) zur epidemiologischen Datenlage der CIPN im Jahr 2013. Die Inzidenzen weisen deutliche Unterschiede hinsichtlich der Zytostatika-Substanzklasse, der erreichten Kumulativdosis sowie der Dauer der Behandlung auf. Substanzübergreifend fanden sich Gesamtprävalenzen der CIPN von 68,1% im ersten Monat nach Ende der Chemotherapie, 60% nach drei Monaten, sowie 30%

nach sechs oder mehr Monaten nach Abschluss der Behandlung. Die divergierende Datenlage, so die Autoren, ließe sich auf die unterschiedlichen klinischen Scoring-Systeme der Studien und die Abhängigkeit von neurophysiologischen Messmethoden zurückführen.[28] Windebank et al. stellten zudem fest, dass in einigen der untersuchten Studien Messungen zur Detektion früher Symptommanifestationen fehlten.[23]

Eine weitere Metaanalyse von 2012 untersuchte anhand von 22 Studien mit kumulativ 13.683 Tumorpatienten die Prävalenz des neuropathischen Schmerzsyndroms. Sie umfasst dabei rein tumorassoziierte Schmerzen und durch die Tumorthherapie hervorgerufene Schmerzsymptome. Hier findet sich eine Gesamtprävalenz des neuropathischen Schmerzes von 19% (rein neuropathische Schmerzen) bis 39,1% (gemischt-neuropathische Schmerzen). Die Prävalenz von neuropathischen Schmerzsymptomen als Anteil an allen tumorassoziierten Schmerzen liegt in dieser Analyse zwischen 18,7% und 21,4%. Zudem verdeutlicht die Analyse auch eine direkte Assoziation neuropathischer Schmerzsymptome zu der Chemotherapie.[29]

Während sich Begleitsymptome wie Zytostatika-induziertes Erbrechen, als auch hämatologische Nebenwirkungen durch eine medikamentöse antiemetische Therapie, Transfusionsbehandlung oder Gabe von hämatopoetischen Wachstumsfaktoren gut behandeln lassen, sind hinsichtlich der neurotoxischen Nebenwirkungen bis dato weder Präventionsstrategien noch kausale Therapieoptionen verfügbar. Die therapeutischen Ansätze beschränken sich auf häufig nur unzureichend effektive Optionen wie Opioide und Lokalanästhetika sowie Antikonvulsiva und trizyklische Antidepressiva. Einzig die Reduktion der Chemotherapiedosis ermöglicht eine partielle Symptomkontrolle, was jedoch eine nicht zu unterschätzende Wirkungsminderung der onkologischen Therapiestrategie impliziert. Das Auftreten neuropathischer Symptome lässt sich jedoch für gewöhnlich in einen klaren zeitlichen Zusammenhang mit der Chemotherapie setzen. Demnach wäre eine neuroprotektive Begleittherapie grundsätzlich gut einzuleiten. Da die zugrunde liegenden, zellulären Pathomechanismen der CIPN jedoch noch nicht eingehend verstanden und keine kausalen Präventions- und Therapieoptionen verfügbar sind, kommt der präklinischen und klinischen Forschung derzeit eine übergeordnete Notwendigkeit zu.

1.2.2 Präklinische Forschung

Die Erforschung der Chemotherapie-induzierten Neuropathie stützt sich im präklinischen Bereich, neben zellulären und molekularbiologischen Aspekten, im Wesentlichen auf Tiermodelle. Die meisten der bis dato etablierten Modelle wurden an Mäusen und Ratten entwickelt. Die tierexperimentelle Forschung ermöglicht es, pathophysiologische Merkmale der CIPN

nachzuvollziehen und stellt einen essentiellen Schritt in der bench to bedside-Translation protektiver bzw. therapeutischer Ansätze dar.[30], [31]

Die Charakterisierung des neuropathischen Musters im Tiermodell stützt sich auf drei Säulen:

1. der Phänotyp, basierend auf Verhaltensveränderungen
2. die Elektroneurografie (ENG) des peripheren Nervensystems
3. die Histologie beteiligter Nervenstrukturen

Verhaltensbiologische Testungen der Mechanozeption und Thermästhesie stellen aufgrund ihrer verhältnismäßig guten Übertragbarkeit in die Humanmedizin weiterhin den Goldstandard in der präklinischen CIPN-Diagnostik dar. Für die „gängigen“ Zytostatika, wie Taxane, Vincaalkaloide, Platinderivate oder Bortezomib existieren hierzu zwar bereits eine Vielzahl von Tiermodellbasierten Untersuchungen, deren Vergleichbarkeit und Reproduzierbarkeit aufgrund methodischer Differenzen jedoch limitiert ist.[32],[33] Im Optimalfall erfolgt eine verhaltensbasierte CIPN-Diagnostik anhand eines geeigneten Modells unter Einschluss aller o.g. diagnostischer Säulen, unter Verwendung standardisierter und validierter Testverfahren, sowie eines ausreichenden Beobachtungszeitraums. Idealerweise sollten folgende Punkte dabei integriert werden:

1. Dosisitrationsstudien, die das neurotoxische Nebenwirkungsprofil ab einer Schwellendosis bis hin zu einer submaximalen, neurotoxischen Kumulativdosis abbilden, sowie Untersuchungen im Bereich der humanen Äquivalenzdosis.
2. standardisierte und vergleichbare Applikationswege (intravenös (i.v.), intraperitoneal (i.p.) und per os (p.o.)) und zeitliche Applikationsschemata.
3. Verhaltensanalysen unter Verwendung eines geeigneten Tiermodells inklusive der Untersuchung von Motorik, Sensibilität und nozizeptiver und neuropathischer Schmerzempfindung.
4. ENG gut zugänglicher peripherer Nerven mit Bestimmung von sensiblen oder motorischen Nervenleitgeschwindigkeiten (NLG/NCV), Amplitude des Aktionspotenzials, Refraktärzeit.
5. histopathologische Analysen beteiligter nervaler und ggfs. muskulärer Strukturen, bedarfsweise mit Erweiterung um immunhistochemische Untersuchungen.

Neben der prä-/klinischen Erforschung der neurotoxischen Nebenwirkungen kommt auch dem fortschreitenden Verständnis der Malignomentitäten und ihrer Charakteristika ein übergeordneter Stellenwert zu, um noch selektivere antineoplastische Therapiekonzepte entwickeln und die Nebenwirkungen limitieren zu können. Insbesondere die Identifikation potenter Substanzen zur Eradikation der CSC steht dabei im Mittelpunkt aktueller Forschungsbemühungen. Einige

vielversprechende Substanzen, wie das Antibiotikum Salinomycin, befinden sich in präklinischen oder frühen klinischen Entwicklungsphasen.[34]

1.3 Salinomycin

1.3.1 Eckdaten zu Salinomycin und Anwendungsgebiete

Salinomycin (SAL) ist ein monovalent-carbocyclisches Polyether-Antibiotikum mit antimikrobiellen und antineoplastischen Eigenschaften. Die Substanz kann durch Tankgärung, Abfiltration, Aufreinigung mittels Flüssigkeitschromatografie und nachfolgender Auskristallisierung unter Vakuum aus dem *Streptomyces albus*-Stamm Nr. 80614 isoliert werden. Sie liegt in Reinform als freie Säure oder farbloses Salinomycin-Natriumsalz vor.[35] Die chemische Struktur wurde erstmals 1973 von Kinashi et. al. beschrieben und der Familie der monozyklischen Polyether-Antibiotika zugeordnet (Abbildung 2).[36]

Salinomycin (Summenformel der freien Säure: $C_{42}H_{70}O_{11}$) hat ein Molekulargewicht von 751 kDa (Kilodalton), der Schmelzpunkt liegt bei 113 °C (Grad Celsius), das UV-Absorptionsspektrum (ultraviolett) liegt bei einer Wellenlänge von 285 nm (Nanometer).[36] Salinomycin besitzt aufgrund seiner Molekularstruktur lipophile Eigenschaften und ist als Natriumsalz gut löslich in Ethylacetat, Ethylether, Aceton, Benzen, Chloroform und Methanol. Es ist schwer löslich in N-Hexan und praktisch unlöslich in Wasser. Das Löslichkeitsprodukt in Wasser beträgt 3,4 mg/ml. SAL liegt in neutralem oder basischem Milieu stabil gelöst vor und ist instabil in saurer Umgebung.[35], [36] Eine vollständige *de novo*-Synthese der Substanz gelang erstmals Kocienski et al. 1998, kürzlich konnten zudem Amid-Derivate mit einem erweiterten antimikrobiellen Wirkspektrum synthetisiert werden.[37], [38]

Das Salinomycin-Natriumsalz wird hauptsächlich in der Veterinärmedizin als Futtermittelzusatzstoff zur Behandlung und Prävention von Kokzidieninfektionen verwendet. Es wirkt, mit Ausnahme der Enterobakterien, bakterizid gegen gram-positive Keime wie *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium spp. (species)*, *Sarcina lutea*, *Micrococcus flavus*, *Plasmodium falciparum*, *Eimeria spp.*, sowie gegen einige Fadenpilze und Protozoen. Die Amid-Derivate der Substanz zeigen eine erweiterte antimikrobielle Effektivität im gram-positiven Bereich sowie gegen den *Methicillin-resistenten Staphylococcus aureus* (MRSA).[38]

Aufgrund seines breiten antimikrobiellen Wirkspektrums verändert Salinomycin die intestinale Mikroflora und fördert so die Nährstoffaufnahme im Darm. Es wird daher auch als Leistungsförderer in Rinder-, Schweine- und Truthahnmast eingesetzt.[40], [41] Dies ist in der Europäischen Union allerdings seit Erlass einer EU-Futtermittelzusatzverordnung (Nr. 183/2003 Art. 11, Abs. 2) im Jahr 2006 verboten.

Abbildung 2:

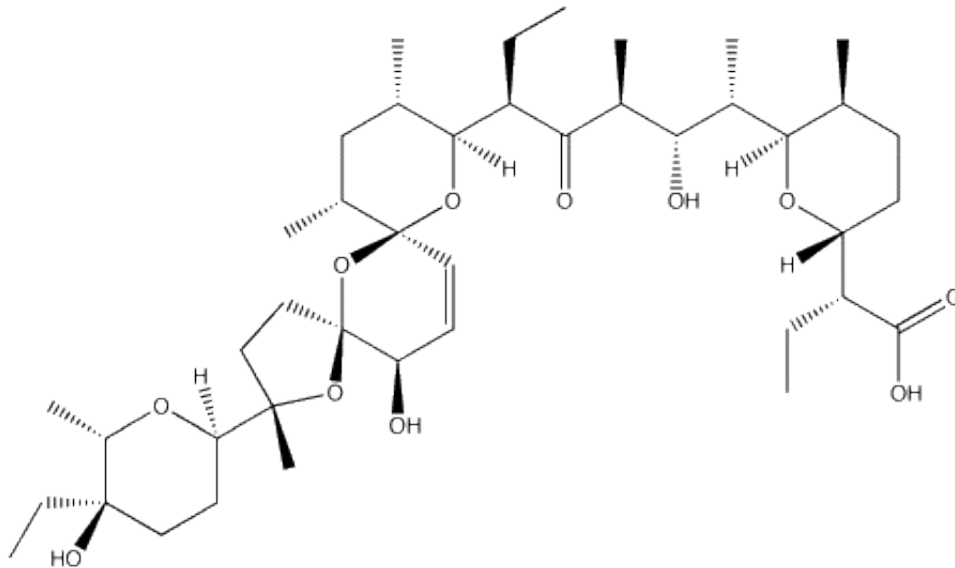


Abbildung 2: Chemische Struktur von Salinomycin mit dne charakteristischen trizyklischen Polyketal-Ringen. Abbildung modifiziert nach Kinashi et al. und Miyazaki et al..[35], [36]

1.3.2 Zellulärer Wirkmechanismus

Auf zellulärer Ebene wirkt Salinomycin, wie auch verwandte Polyetherantibiotika¹, aufgrund der strukturbedingten Lipophilie als natürliches Ionophor.[42] Durch Einlagerung in lipidhaltige Zellmembranen und Chelatbildung mit Ionen induziert Salinomycin den transmembranären bidirektionalen Diffusionstransport von Kationen entlang des elektrochemischen Gradienten. Monovalente Kationen, vor allem Kalium (K^+), aber auch Natrium (Na^+) oder Caesium (Cs^+) werden dabei effektiver transportiert als divalente Ionen wie Calcium (Ca^{2+}) oder Magnesium (Mg^{2+}). [2], [42] Salinomycin lagert sich sowohl in die Zytoplasmamembran, als auch intrazellulär in die äußere und innere Mitochondrienmembran sowie das Endoplasmatische Retikulum (ER) ein.[41] Der provozierte Ionenshift (hauptsächlich Na^+ und K^+ -Einstrom) verläuft nicht elektroneutral und führt zu einer Depolarisation des Ruhemembranpotenzials. Hieraus ergibt sich die Beeinflussung einer Vielzahl elektrochemisch vermittelter, intrazellulärer Signalkaskaden - inklusive der Entkopplung der mitochondrialen oxidativen Phosphorylierung durch einen aberranten Kaliumtransport über die innere Mitochondrienmembran.[2], [42] Die konsekutiv verminderte Adenosin-Triphosphat (ATP)-Produktion einerseits, sowie die mit einem exzessiven ATP-Verbrauch einhergehende, massive Stimulation der Natrium-Kalium-ATPasen (Na^+/K^+ -ATPasen) zur Gegenregulation des verschobenen Ladungsgleichgewichts andererseits, führen

¹ Iasalocid, Monensin, Laidlomycin, Maduramicin, Semiduramicin, Narasin und Nigericin

schlussendlich zu dem Zusammenbruch des zellulären Energiemetabolismus und der Induktion zellspezifischer Apoptoseprogramme.[2], [42], [43]

1.3.3 Stand der Forschung zur Entwicklung von Salinomycin für die Humanmedizin

Salinomycin trat erstmalig 2009 im Rahmen eines umfassenden Screenings nach neuen antineoplastischen Substanzen in den Fokus öffentlichen Interesses. Im Rahmen der Studie von Gupta et al. wurden 16.000 Substanzen mit bekannter biologischer Aktivität mittels Hochdurchflusszytometrie auf ihre zytostatische Wirksamkeit getestet. Das zentrale Novum dieser Arbeit lag in der Detektion von Salinomycin und seiner ausgeprägten Zytotoxizität gegenüber Mammakarzinomzellen und Mammakarzinom-CSC. Die Autoren der Studie konnten zeigen, dass SAL die Stammzellfraktion *in vitro* ausgesäeter Tumorzellen selektiv und um ein Vielfaches effektiver reduziert als Paclitaxel, ein klassisches Zytostatikum in der Therapie des Mammakarzinoms. Neben der Induktion zellulärer Differenzierungsmechanismen sowie gesteigerter Nekrose- und Apoptosevorgänge konnte auch eine signifikante Tumorsphärenregression durch Salinomycin identifiziert werden. In einem translationalen Ansatz in einem immunodefizienten BALB/c-Mausmodell bestätigten sich diese Ergebnisse auch *in vivo*. Salinomycin bewirkte hier sowohl eine im Vergleich zu Paclitaxel 100-fach effektivere Tumorregression als auch eine signifikant geringere Fernmetastasierung. Darüber hinaus zeigte sich auch *in vivo* die bemerkenswerte, selektive Reduktion der Stammzellsubpopulation implantierter Tumorzellen.[1]

Diese wegweisenden Daten lassen somit auf eine neue therapeutische Option durch Schluss der „Stammzell-Lücke“ in der zytostatischen Behandlung von Neoplasien hoffen. Das Spektrum der nachfolgend angestoßenen Studien reicht von *in vitro*- und *in vivo*-Untersuchungen an Tumorzellen solider und nicht solider Malignome bis hin zu einer ersten experimentellen Applikation von Salinomycin im Menschen. Im Zuge dessen ließ sich in erster Linie das Phänomen der Apoptoseinduktion in verschiedenen Tumorentitäten durch Salinomycin eingehender darstellen sowie verschiedene Effekte auf Genexpressionsebene aufzeigen.[44], [45] Zentrale, bisher identifizierte Wirkmechanismen von Salinomycin umfassen die Umgehung der zellulären und ABC (ATP-binding cassette)-Transporter-vermittelten Chemoresistenzen, die Inhibition von p-Glykoprotein sowie sensibilisierende Eigenschaften gegenüber Doxorubicin, Etoposid und ionisierenden Strahlen. Gleichfalls unterstützt Salinomycin die Wirkung antimitotischer Substanzen (Paclitaxel, Docetaxel und Vinblastin) durch Induktion eines G₂-Phasenarrests im Zellzyklus.[46]–[49] Synergistische zytotoxische Effekte von SAL zeigten sich zudem in verschiedenen *in vitro*-Modellen in Kombination mit 5-Fluoruracil, Trastuzumab,

Gemcitabin, Imatinib, oder dem TRAIL-Schema (von engl.: tumor necrosis factor apoptosis inducing ligand) zur Therapie des Glioblastoms. Auch in Cisplatin-resistenten Tumorzellen unterschiedlicher Entitäten konnten unter Salinomycinbehandlung pro-apoptotische und zytotoxische Mechanismen beschrieben werden. Zusammenfassend wurde die Zytotoxizität von Salinomycin sowie dessen spezifische Wirksamkeit auf CSC bisher an einem breiten Spektrum humaner Tumorentitäten, wie dem Mammakarzinom, dem Magen- und kolorektalem Karzinom, dem Bronchialkarzinom, dem cholangio- und hepatozellulärem Karzinom, Plattenepithelkarzinomen, dem Osteosarkom, dem Prostatakarzinom und an CLL-Zellen (Chronisch lymphatische Leukämie) untersucht. [50]–[57]

Jüngste Arbeiten suggerieren eine Schlüsselfunktion der PTEN/PI₃-Kinase/Akt/Wnt/β-Catenin-Signalwege in der spezifischen Wirkung von Salinomycin auf CSC.[58]-[62] Diese Signalkaskaden besitzen eine zentrale Rolle in der embryologischen Differenzierung von Geweben, jedoch auch in der Regulation von Stamm- und Progenitorzellen sowie in der Tumorgenese. Auch in der Ausprägung der Chemoresistenz konnte eine Beteiligung dieser Signalwege aufgezeigt werden.[63]-[65] Sie werden zur Zeit, neben anderen, als selektive Zielstrukturen für die antineoplastische Therapie von Tumorstammzellen untersucht.[63],[66], [67] Zusammenfassend ergibt sich aus den bisher publizierten Arbeiten eine vielversprechende Perspektive zur Etablierung von Salinomycin in der medikamentösen Tumorthherapie.

1.3.4 Nebenwirkungsspektrum von Salinomycin *in vivo*

Neben dem breiten Einsatzgebiet und dem potenten Wirkungsspektrum der Ionophoren-Antibiotika, verdeutlicht eine breite Evidenzlage allerdings ein nicht zu unterschätzendes Nebenwirkungspotenzial der Substanzen. Dies sind in erster Linie veterinärmedizinische Fallberichte über versehentliche, akute und chronische Intoxikationsvorfälle bei Tieren (u.a. Pferde, Schweine, Rinder, Truthähne, Alpakas, Schafe, Hunde, Kaninchen und Katzen), die mit Salinomycin oder verwandten Substanzen behandelt wurden.

Im Vordergrund der beschriebenen Symptome steht dabei die charakteristische Kardio- und Myotoxizität der Ionophorenantibiotika sowie das spezifische, katecholaminerge kardiozirkulatorische und neuromuskuläre Nebenwirkungsprofil von Salinomycin. Dies umfasst Akutsymptome wie Tachykardie und/oder Tachyarrhythmie, Jugularvenenstauung, (Tachy-) Dyspnoe, pulmonale Rasselgeräusche, Schweißneigung und intestinale Atonie. Ophistotone Körperhaltungen und ein generalisiertes epileptisches Ereignis wurden ebenfalls beobachtet. Die Beschreibungen fulminanter Intoxikationsverläufe verdeutlichen dabei in erster Linie einen Zusammenbruch des kardiopulmonalen Systems. Darüber hinaus wird vielfach über eine

zunehmende muskuläre Schwäche mit rigider Extremitätenmotorik, Stand- und Gangataxie, sowie eine von distal aufsteigende, progrediente Parese der Hinter- und Vorderläufe berichtet. Die überwiegende Anzahl der Vorfälle verlief letal, lediglich in einigen mildereren Verläufen konnte eine vollständige Erholung der Symptomatik nachvollzogen werden.[68]-[79]

Eine Publikation aus dem Jahr 2004 berichtet darüber hinaus erstmals von einer humanen Salinomycinvergiftung eines 35-jährigen Landwirts, der versehentlich SAL-Granula (geschätzte Dosierung: 1 mg/kg Körpergewicht (KG)) inhaliert und verschluckt hatte. Auch hier bot sich ein fulminanter Verlauf mit vorwiegend neuro- und myopathischen Befunden wie Sensibilitätsstörungen, Gang- und Standataxie, Paresen beider Beine, sowie einer Rhabdomyolyse. Die Symptomatik remittierte im Verlauf einiger Wochen vollständig.[3]

Laboranalysen sowie histologische Befunde aus *post mortem*-Untersuchungen der Herz- und Skelettmuskulatur intoxikierter Tiere stützen die klinischen Beobachtungen und suggerieren neben der direkt-toxischen Schädigung von Lunge, Herz und Skelettmuskulatur ein markantes neuropathisches Läsionsmuster. [68], [69], [73], [75]

Parallel zu der Erforschung der kardiotoxischen Effekte von Salinomycin an isolierten Hunde- und Kaninchenherzen erfolgte auch eine wissenschaftliche Aufarbeitung der Vorfälle hinsichtlich der neuromuskulären Schädigungen.[100]-[102]. In diesem Zusammenhang beschrieben Van der Linde-Sipman et al. 1999 erstmals anhand einer retrospektiven histomorphologischen Untersuchung die Degeneration peripherer Nerven bei SAL-intoxikierten Katzen.[69] Pakozdy et al. konnten nachfolgend, ebenfalls an Katzen, anhand von Elektroneurografie (ENG) und Histologie die Ausprägung einer sensomotorischen Polyneuropathie nach Salinomycinintoxikation identifizieren.[73]

Das ausgeprägte Nebenwirkungsprofil steht folglich in einem Kontrast zu der vielversprechenden zytotoxischen Wirksamkeit von Salinomycin auf maligne Zellen und verdeutlicht die Notwendigkeit der Erforschung der Substanznebenwirkungen auf systemischer und neurologischer Ebene.

1.3.5 Effekte von Salinomycin auf neuronale Zellen

Boehmerle et al. untersuchten auf Basis des aus der Literatur abzuleitenden neurotoxischen Nebenwirkungsprofils die SAL-induzierten Effekte in einer zytostatisch effektiven, niedrig-mikromolaren Dosierung auf murine sensible Spinalganglienneurone und Schwann'sche Zellen. Analog zu den Befunden von Mitani et al. induziert SAL auch in neuronalen Zellen eine Alteration des zellulären und mitochondrialen Ruhemembranpotenzials. Anders als in Tumorzellen jedoch, scheint in neuronalen Zellen dem Calcium-Signaling eine zentrale Rolle in der Genese der neurotoxischen Effekte zuzukommen. So konnte eine Ca^{2+} - und Cytochrom C-vermittelte

Aktivierung intrazellulärer Caspase-Kaskaden identifiziert werden, die in der Induktion zellulärer Apoptosevorgänge münden. Eine kritische Stellung wurde in dieser Arbeit zudem der funktionellen Störung des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers (NCX) beigemessen. [2], [80]

Der NCX ist ein ubiquitär vorkommender, bidirektional funktionierender Antiporter der Zell- und äußeren Mitochondrienmembran. Er spielt eine wichtige Rolle in der Regulation der intrazellulären Natrium- und Calciumhomöostase, indem er physiologisch 1 Ca^{2+} - Ion im Austausch gegen 3 Na^+ - Ionen aus dem Zytosol eliminiert und somit netto für einen Ladungstransport über die Zellmembran sorgt.[81] Die treibende Kraft für den sekundär aktiven NCX-Transport ist ein durch Na^+/K^+ -ATP-asen (genauer: $3\text{Na}^+/\text{2K}^+$ -Adenosintriphosphatasen) generierter elektrochemischer Natrium-Gradient über der Membran (durch ATP-Hydrolyse vermittelte aktive Elimination von 3 Na^+ -Ionen nach extrazellulär im Austausch gegen 2K^+ -Ionen). Der elektrochemische Gradient bricht, so die Hypothese, unter den ionophoren Effekten von Salinomycin (Dysregulation des elektrochemischen Gleichgewichts und zelluläre Energiedepletion, vergl. Kap. 1.3.2) ein. Unter dieser Konstellation arbeitet der NCX nunmehr passiv dem elektrochemischen Gradienten entsprechend in die entgegengesetzte Richtung und triggert eine massive Akkumulation von Calcium im Zytosol. Hieraus resultiert eine Stimulation Ca^{2+} -vermittelter intrazellulärer Signalkaskaden mit konsekutiver Ca^{2+} -abhängiger Zelltod-Induktion. Darüber hinaus, so konnte gezeigt werden, bewirkt die mitochondriale Energiedepletion eine exzessive Freisetzung von Cytochrom C, welches ebenfalls apoptotische Mechanismen aktiviert.

Interessanterweise konnten in dieser Arbeit *in vitro* die Salinomycin-induzierten neurotoxischen Effekte, spezifisch die Alteration des mitochondrialen Membranpotenzials und die Cytochrom C-Freisetzung durch Behandlung mit CGP-37157 (CGP), einem selektiven Inhibitor des mitochondrialen NCX-Kanals, deutlich reduziert werden. Die Dysfunktion des NCX-Kanals lässt sich demnach nicht nur als ein zentraler Mechanismus der SAL-vermittelten Neurotoxizität identifizieren, die selektive pharmakologische Blockade dieses Antiporters mit CGP-37157 bietet darüber hinaus einen vielversprechenden Ansatzpunkt zur medikamentösen Neuroprotektion unter Salinomycinexposition. [80], [81]

1.4 Fragestellung und Zielsetzung dieser Arbeit

Das Antibiotikum Salinomycin zeigt neben seiner antineoplastischen Wirkung auf maligne Tumorzellen insbesondere bemerkenswerte zytotoxische Effekte auf Tumorzellen mit Stammzeleigenschaften. Dieser neuartige Wirkmechanismus stellt eine potenzielle Ergänzung zu herkömmlichen Therapieschemata dar und lässt auf ein großes Potenzial für die pharmakologische Tumorthherapie hoffen. Eine Reihe veterinärmedizinischer Fallstudien sowie jüngere Arbeiten zu Salinomycin lassen jedoch ein gravierendes Nebenwirkungsprofil vermuten. Die detaillierten antineoplastischen Wirkmechanismen der Substanz, als auch die Genese der Neurotoxizität, sind dabei noch nicht vollends verstanden. Eine fundierte Datenlage zur Sicherheit der Substanz im Organismus, sowie zur Pharmakokinetik des Wirkstoffs liegen bis dato nicht vor.

Ziel dieser Arbeit ist es, Salinomycin in einer Dosis im zytostatischen Wirkungsbereich in der Langzeittherapie auf systemische Nebenwirkungen zu untersuchen. Darüber hinaus sollen grundlegende pharmakokinetische Daten nach einmaliger intraperitonealer Injektion generiert werden. Auf Basis vorangegangener Arbeiten dieser Arbeitsgruppe zum Wirkmechanismus von Salinomycin auf neuronale Zellen soll zudem ein präklinisches Mausmodell zur Charakterisierung des neurotoxischen Nebenwirkungsprofils etabliert und ein neuroprotektiver Ansatz mit CGP-37157 *in vivo* evaluiert werden. In dieser Arbeit werden folgende Fragestellungen behandelt:

1. Salinomycin wird in einer Dosisfindungsstudie in zwei unterschiedlichen Dosierungen in der Maus getestet. Welche täglich applizierte Dosis ist gut tolerabel? Sind systemische oder neurotoxische Nebenwirkungen erkennbar?
2. Welche Pharmakokinetik zeigt sich nach intraperitonealer Gabe?
3. Entwickeln sich unter SAL-Langzeittherapie in therapeutischer Dosierung systemische und/oder neurologische Defizite, wie in vorangegangenen veterinärmedizinischen Kasuistiken dargelegt? Welche Charakteristika des Nebenwirkungsprofils sind aus Verhaltensanalyse, Elektrophysiologie, Labordiagnostik und Histologie ableitbar? Sind die Befunde reversibel?
4. CGP-37157 erwies sich in der Zellkultur als neuroprotektiv gegenüber Salinomycin-induziertem Zelltod in Spinalganglienneuronen und Schwann'schen Zellen. Lässt sich der neuroprotektive Effekt *in vivo* reproduzieren?

2 METHODIK

2.1 In-Vivo-Modell, Studiendesign

Die vorliegende *in-vivo*-Studie erfolgte in der C57Bl6/J-Maus und wurde in zwei Abschnitte unterteilt. Zunächst wurde eine Dosisfindungsstudie zur Evaluation der systemischen Verträglichkeit von Salinomycin (SAL) im Organismus und Ermittlung einer in der Maus nebenwirkungsarmen täglichen Dosis durchgeführt. Getestet wurden an je 10 Tieren zwei unterschiedliche Salinomycin-Dosierungen mittels intraperitonealer Applikation. Zudem erfolgten Screeninguntersuchungen hinsichtlich der Ausprägung eines neuropathischen Phänotyps. Auf Basis dieser Daten schloss sich eine Interventionsstudie an, in der ein Polyneuropathie-Tiermodell zur Charakterisierung der Salinomycin-induzierten Neuropathie etabliert und ein neuroprotektiver, medikamentöser Ansatz mit CGP-37157 getestet wurde.

2.1.1 Power-Analyse, Versuchsgruppenzuordnung, Tierhaltung

In bisher etablierten CIPN-Tiermodellen ist unter Annahme einer Normalverteilung der Messwerte mit einer Standardabweichung von circa 20% zu rechnen. Eine biologische Effektgröße wird ab ca. 40% ($f = 0,4$) als klinisch relevant betrachtet. Basierend auf Ergebnissen des Neuropathiescreenings der Dosisfindungsstudie erfolgte eine *a priori*-Poweranalyse zur Berechnung der benötigten Versuchsgruppengröße in der Interventionsstudie. Vorab festgelegt wurde ein Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$, sowie eine Testpower von 0.8 ($1-\beta$). Zudem wurde eine Ausfallrate von $n = 4$ Tieren (1 Tier/Gruppe) einkalkuliert (vergl.: 3.3.2 Poweranalyse). Diese ist durch Komplikationen der intraperitonealen Applikation und die individuelle Prädispositionen einzelner Tiere gegenüber der Toxizität der verabreichten Substanzen bedingt, die einen vorzeitigen Versuchsabbruch nach u.g. ARRIVE-Kriterien erfordern können.

Für beide Studienabschnitte wurden in Summe 72 neun Wochen alte, männliche C57Bl6/J-Mäuse (Charles River Laboratories GmbH, Sulzfeld, Deutschland) verwendet. Um wurfbedingte Confounder-Effekte zu verhindern, erfolgte eine internetbasierte Randomisierung² der Käfigverteilung und die randomisierte Zuteilung jedes Käfigs zu einer der folgenden vier Versuchsgruppen (vergl. auch Tabelle 1): [83], [84]

SAL = Salinomycin (in der Dosisfindungsstudie mit Dosisangabe)

SAL/VEH = Salinomycin-Monotherapie

SAL/CGP = Salinomycin + CGP (Interventionsgruppe)

VEH/CGP = CGP-Monotherapie

² www.randomgenerator.com

VEH bzw. VEH/VEH = Kontrollgruppe

Je zwei Käfige bildeten eine Gruppe (n = 10):

Dosisfindungsstudie (30 Tiere): SAL 5 mg/kg KG, SAL 10 mg/kg KG, Kontrolle (VEH)

Interventionsstudie (40 Tiere): SAL/VEH, SAL/CGP (CGP-37157), VEH/CGP, VEH/VEH

Die Unterbringung erfolgte zu jeweils fünf Tieren pro Käfig in temperaturstabiler (20°C) und reizangereicherter Umgebung bei einem 12:12 Stunden Tag/Nacht-Zyklus (7-19 Uhr). Wasser und Futter standen den Tieren ad libitum zur Verfügung. Die Haltung der Versuchstiere, sowie sämtliche experimentelle Prozeduren fanden unter Berücksichtigung der Animal Welfare Guidelines (ARRIVE-Leitlinien) [84] statt und unterlagen der Vorabgenehmigung durch das Landesamt für Gesundheit und Soziales (LaGeSo Berlin, Deutschland). Die Versuchstiere unterliefen eine tägliche Gewichtskontrolle sowie Begutachtung auf äußerliche Auffälligkeiten, abnorme Verhaltensweisen oder Anzeichen von Stress - jeweils vor einer Messung oder Injektion.

2.1.2 Injektionsprotokoll

Der Injektionszeitraum betrug in beiden Studienabschnitten 28 Tage, es schloss sich eine Beobachtungszeit von 7 Tagen an. Nach 35 Tagen wurden die Tiere unter tiefer Isoflurannarkose dekapitiert. In der Interventionsstudie wurde vor der Dekapitation eine finale Blutentnahme zur Labordiagnostik vorgenommen, anschließend erfolgte die Entnahme der inneren Organe zur histologischen Beurteilung.

2.1.3 Dosisfindungsstudie

In der Dosisfindungsstudie erhielten je 10 Tiere eine tägliche intraperitoneale Injektion mit einer Salinomycin-Testdosis von 5 mg/kg KG oder 10 mg/kg KG. Die Kontrollgruppe (VEH) wurde mit der Kontrolllösung aus DMSO (Dimethylsulfoxid, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) in Polyethylenglykol (PEG, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) im Verhältnis 1:1 behandelt.

2.1.4 Interventionsstudie

Auf Basis der Daten der Dosisfindungsstudie wurde in der Interventionsstudie eine intraperitoneal applizierte SAL-Dosis von 5 mg/kg KG (SAL/VEH) gegenüber einer additiven Behandlung mit CGP-37157 (BIOTREND Chemikalien, Köln, Deutschland; im Folgenden: CGP) (SAL/CGP), einer isolierten CGP-Therapie (VEH/CGP), als auch einer Kontrollgruppe (VEH/VEH) getestet. CGP wurde über ein subkutan implantiertes Pumpensystem verabreicht.

2.1.5 Aufbereitung der Pharmaka, Applikationsmechanismen, Pumpenimplantation

Salinomycin-Natrium (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland, im Folgenden: SAL) wurde jeweils in DMSO in einer Konzentration von 8 mg/ml gelöst und mit Aqua dest. auf ein Injektionsvolumen von 2 mg/ml verdünnt. In der Dosisfindungsstudie wurde eine Dosierung von 5 mg/kg KG bzw. 10 mg/kg KG, in der Interventionsstudie von 5 mg/kg KG SAL appliziert. Die Injektionsvolumina betragen 2,5 ml/kg KG (5 mg/kg KG) bzw. 5 ml/kg KG (10 mg/kg KG). Als Kontrollsubstanz (VEH bzw. VEH/VEH) diente DMSO verdünnt mit Aqua dest. in einer Konzentration von 2 mg/ml (Injektionsvolumen: 2,5 ml/kg KG). Die Injektionen erfolgten intraperitoneal mittels 1 ml-Spritze mit 29G-Kanüle (Omnican 0,33 x 12,7 mm, B Braun, Melsungen, Deutschland). CGP-37157 wurde in DMSO in einer Konzentration von 2 mg/ml gelöst und der Interventionsstudie über eine subkutan implantierte osmotische Pumpe (Alzet, Modell 1004, Durect Corporation, Cupertino, CA, USA, 0,6 x 1,5 cm) verabreicht. Die Pumpen wurden zuvor steril mit CGP-37157 oder der Kontrolllösung (DMSO in PEG, Verhältnis 1:1) gefüllt. Die Implantation erfolgte unter Isoflurananästhesie (1-1,5%, 60% N₂O in O₂, Dräger Vapor 19.3, Lübeck, Deutschland) subkutan dorsolateral rechts oder links des Hüftgelenks einen Tag vor Beginn der Interventionsstudie. Für den Wundverschluss wurde nicht resorbierbares Nahtmaterial (Ethibond USP 6-0, ETHICON Deutschland, Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt, Deutschland) verwendet. Postoperativ erfolgte eine topische Lokalanästhesie mit Xylocain Gel 2% (AstraZeneca GmbH, Wedel, Deutschland). Die über die Pumpe verabreichte Dosisrate lag bei ca. 5 mg/kg/h (125 µg/24 Std.).

Tabelle 1:

Gruppe	i.p.	Pumpe
SAL/VEH	SAL	DMSO/PEG
SAL/CGP	SAL	CGP
VEH/CGP	DMSO + Aqua dest.	CGP
VEH/VEH	DMSO + Aqua dest	DMSO/PEG

Tabelle 1: Versuchsgruppenzuordnung der Interventionsstudie

Abbildung 3:

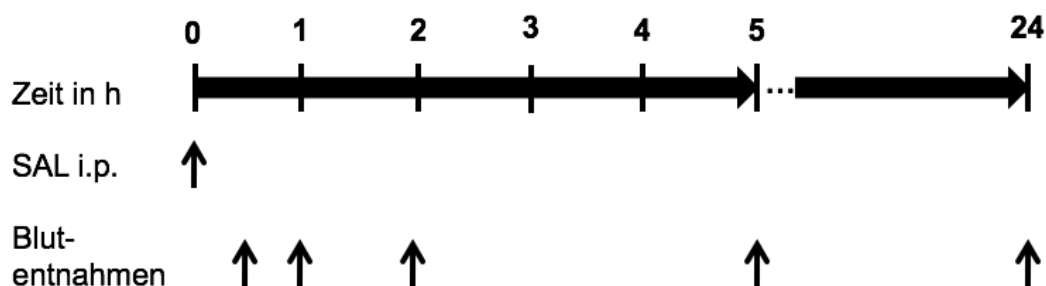


Abbildung 3: Zeitleiste der Blutentnahmen an Tag 1 der Dosisfindungsstudie. Intraperitoneale Injektion von 5 und 10 mg/kg KG SAL (SAL i.p.) und Zeitpunkte der Blutprobenentnahmen aus der Schwanzvene.

2.2 Pharmakokinetische Untersuchung mittels Flüssigkeitschromatografie/ Massenspektrometrie

2.2.1 Blutentnahmeprotokoll

An Tag 1 der Dosisfindungsstudie erfolgten die Blutentnahmen zur Analyse der SAL-spezifischen Pharmakokinetik nach i.p.-Injektion von 5 mg/kg KG bzw. 10 mg/kg KG SAL. Dazu wurde nach ½, 1, 2, 5 und 24 Stunden je zwei Tieren pro Dosisgruppe und Zeitpunkt mittels heparinierter Monoküvette (S-Monovette 1,2 ml, Lithium-Heparin, Sarstedt, Deutschland) und 23G Kanüle (Sterican 0,50 x 16 mm, B Braun, Melsungen, Deutschland) Blut aus der Schwanzvene entnommen (Abbildung 3).

2.2.2 Probenaufbereitung

Das Material wurde in 1,5 ml Eppendorfgefäßen konserviert und bei 1000 g und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Der Plasmaüberstand wurde abpipettiert und in flüssigem Stickstoff bei -196°C kryokonserviert. Die Probenaufbereitung erfolgte nach einem von Chéneau et al. publizierten Protokoll für Monensin.[85] Zur Proteinausfällung wurde das aufgetaute Plasma in einer Verdünnung von 1:3 mit Acetonitril (Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) versetzt und für 10 Minuten bei Raumtemperatur in einem mechanischen Vortexmischer mit 100 rpm inkubiert. Anschließend erfolgte die Zentrifugation mit 36.000 g bei 4°C für zehn Minuten sowie die Filtration des Überstands durch einen 0,2 µm PTFE-Spritzenfilter in sterile Probengefäße.

Die Durchführung der HPLC-basierten Analyse der SAL-Konzentrationen im Plasma erfolgte im Institut für Chemie und Biochemie der Freien Universität Berlin (für eine detaillierte Beschreibung siehe Anhang).

2.3 Verhaltensuntersuchungen

Die Verhaltenstestungen wurden jeweils an zwei aufeinander folgenden Tagen zwischen 10 und 18 Uhr in einem schallgeschützten Verhaltenslabor durchgeführt. Falls am Tag der Verhaltenstestungen zudem Injektionen durchgeführt wurden, erfolgten die Injektionen im Anschluss an die Verhaltensuntersuchungen, um eine Beeinflussung der Leistungsfähigkeit der Tiere zu vermeiden. Vor Beginn der pharmakologischen Behandlung wurden Baseline-Daten erhoben, es schlossen sich ein mittlerer Messzeitpunkt (Tag 18/19) und ein später Messzeitpunkt (Tag 34/35) an (Abbildung 4). Die Durchführung der tierexperimentellen Untersuchungen erfolgte Untersucher-verblindet nach folgender Reihenfolge:

Tag 1: RotaRod, Catwalk

Tag 2: Von Frey Hair-Test, Hot/Cold Plate-Test, Elektrophysiologie

Abbildung 4:

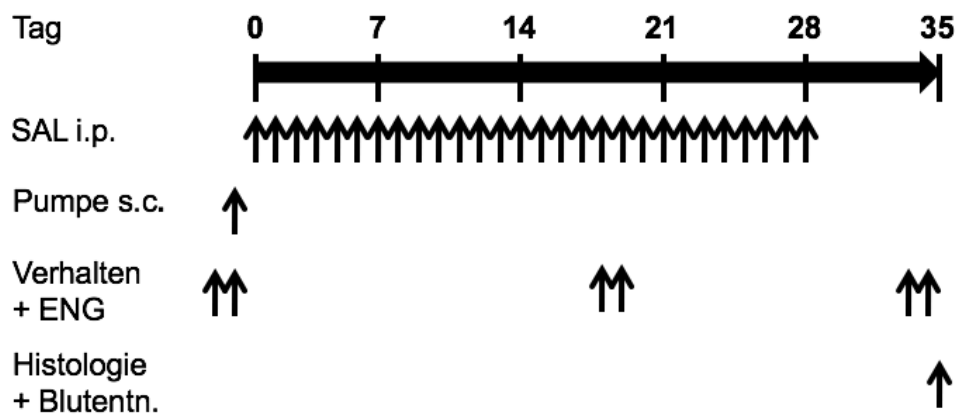


Abbildung 4: Zeitlinie der Interventionsstudie mit täglichen Injektionen (SAL i.p.), Pumpenimplantation (Pumpe s.c.) sowie Verhaltenstests und Elektrophysiologie (ENG) vor Beginn der Experimente, an Tag 18/19 und Tag 34/35 sowie Zeitpunkt der finalen Blutentnahme und Histologie. Abbildung modifiziert nach Boehmerle et al. [95]

2.3.1 RotaRod

Das RotaRod (TSE Systems GmbH, Bad Homburg, Deutschland) ist eine Methode zur Untersuchung von Lokomotion, Koordination und Balancevermögen.[86] Sie setzt sich aus der Messapparatur an sich und einer computerbasierten Software (RotaRod TSE 4.2) zusammen. Die Apparatur besteht aus abgetrennten, je ca. 5 cm breiten Kompartimenten auf einem 10 cm über dem Boden angebrachten, sich drehenden Zylinder (Durchmesser ca. 5 cm). Auf diesen werden die Versuchstiere ohne Sichtkontakt zueinander platziert. Der Zylinder rotiert bei gleichbleibender oder graduell zu- oder abnehmender Geschwindigkeit rückwärts um die eigene Achse und fordert

die Tiere zu einer aktiven Vorwärtsbewegung und Balancekontrolle auf (Abbildung 5). Ein Berührungssensor in der Bodenplatte detektiert, zu welchem Zeitpunkt und bei welcher Drehgeschwindigkeit das Versuchstier die Balance verliert und hinunterfällt. Vor Aufzeichnung der Baseline-Werte unterliefen die Tiere an vier aufeinanderfolgenden Tagen ein habituelles Training nach etabliertem Protokoll.[87] Dabei wurde die Zeit, die die Tiere pro Trainingseinheit auf dem Rad verblieben, sukzessive von 70 auf 300 Sekunden erhöht. Fiel ein Tier versehentlich vom Rad, wurde es erneut darauf platziert. Nach absolvierter Laufzeit wurden die Tiere ausschließlich vom Rad herunter wieder in den Käfig gesetzt, um das Antrainieren eines habituellen „Fall-Verhaltens“ zu vermeiden. Die Aufzeichnung der Baseline-Daten erfolgte am vierten Tag. Die Messungen erfolgten nach Studienprotokoll (vergl. Zeitleiste, Abbildung 4). Untersucht wurde die Latenzzeit bis das Versuchstier vom Rad fiel. Pro Tier erfolgten drei Durchgänge, aus denen dann ein Mittelwert gebildet wurde.

Abbildung 5:

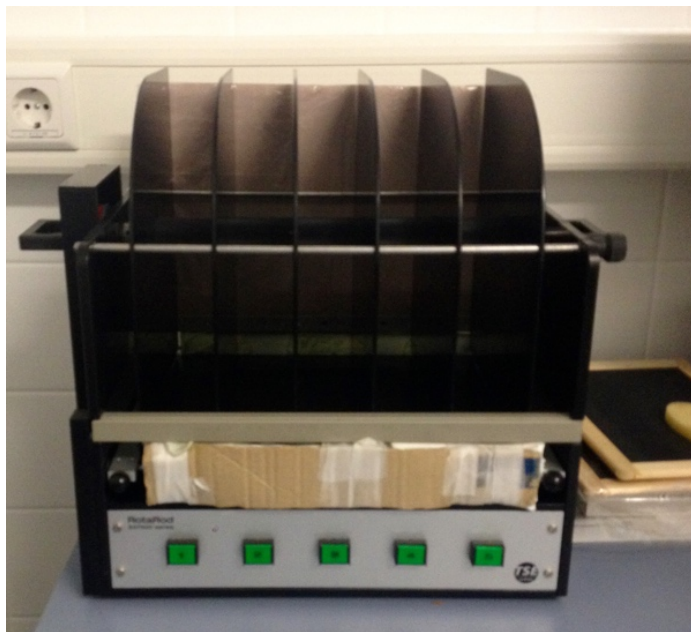


Abbildung 5: RotaRod-Apparatur mit fünf abgetrennten Kompartimenten und mittelständigem Laufrad.

2.3.2 Von Frey Haar-Test

Der Von Frey Haar-Test dient der Untersuchung der Mechano- und Nozizeption und wird zur Charakterisierung von Veränderungen der Reiz-Reaktionsbeziehung bei taktiler Stimulation angewandt.[88] Dazu werden die Tiere in einer invertierten Plexiglasbox platziert. Ein netzartiges Metallgitter bildet den Boden. Durch die Löcher in dem Metallboden wird manuell von kaudal mit sogenannten „Von Frey-Haaren“ (Polypropylen-Filamente) mit definierter Steifigkeit für eine Dauer von fünf Sekunden ein orthogonal gerichteter, graduell zunehmender Druck auf die Plantarfläche einer Hinterpfote appliziert. Dies provoziert bei Überschreitung der nozizeptiven Toleranzschwelle zunächst einen Aversionsreflex der stimulierten Pfote, gefolgt von einer reflektorischen Adduktions- und Flektionsbewegung der Extremität. Der zur Induktion dieses Nozizeptor-Reflexes benötigte Druck wurde hier über ein 0.5 mm^2 -Filament an einen digitalen Sensor (IITC, Woodland Hills, California, USA) übermittelt. Die Reizschwelle wurde in Gramm (g) gemessen, eine maximale Druckobergrenze wurde bei 10 g eingestellt. Zur Habituation wurden die Tiere zehn Minuten vor Beginn der Untersuchungen an drei aufeinanderfolgenden Tagen der Testumgebung ausgesetzt. Pro Messzeitpunkt wurden fünf Messwerte pro Tier gemittelt (vergl. Zeitleiste, Abbildung 4).

Abbildung 6:



Abbildung 6: Experimentaufbau im Von Frey Haar-Test. mit Mesh-Boden und abgetrennten Plexiglasboxen.

2.3.3 Catwalk

Die softwaregestützte Catwalk-Methode (Noldus Information Technology, Niederlande) ist ein teilautomatisches Verfahren zur Analyse von Gangmustern und Bewegungsabläufen im Kleintier.[89] Die Konstruktion besteht aus einem 1,3 m langen, lichtgeschützten Gang mit einem durch interne Reflektion grünen Lichts illuminierten Glasboden. Das Versuchstier soll den Gang möglichst flüssig und störungsfrei durchqueren. Durch Kontakt der Pfoten mit dem Glasboden werden Veränderungen im Reflektionswinkel des Lichts hervorgerufen. Dies wird von einer unterhalb des Glasbodens angebrachten Kamera detektiert und in digitale Parameter umgewandelt (Abbildung 6). Die Auswertung erfolgte mittels Catwalk XT8.1-Software (Noldus Information Technology, Niederlande). Um Störfaktoren zu minimieren, erfolgte die Untersuchung in einem abgedunkelten, durch Rotlicht illuminierten, schallgeschützten Raum. Die Tiere wurden vorab in einen separaten Käfig umgesetzt, ihr vertrauter Käfig wird als Zielreiz am Ende des zu durchquerenden Gangs platziert. Eine Trainingsperiode von vier konsekutiven Tagen zur Habituation erfolgte vor Aufzeichnung der Baseline-Daten. Jedes Tier wurde einzeln analysiert. Ausschlussfaktoren für einen erfolgreichen Durchlauf waren eine Geschwindigkeitsvariation >60% oder eine Richtungsumkehr. Jeder von der Software als „erfolgreich“ gewertete Lauf wurde anschließend manuell reevaluiert, um Fehlmessungen der Software auszuschließen. Pro Tier und Messzeitpunkt wurden je sechs Läufe gemittelt.

Folgende Parameter wurden analysiert:

- 1) „print area“: Kontaktfläche der Pfote in mm^2 mit dem Boden während der Standphase
- 2) „stance phase“: Standphase, Dauer (in Sekunden) des Kontakts der Pfote mit dem Glasboden während eines „Schritts“ / „step cycles“ (stance phase + swing phase)
- 3) „swing phase“: Schwungphase, Dauer (in Sekunden) von einem Bodenkontakt zum nächsten in der Vorwärtsbewegung.
- 4) „duty cycle“: Dauer der Standphase als Prozentanteil der „step cycle“-Dauer (in Sek.), berechnet aus: $\text{stance phase} / (\text{stance phase} + \text{swing phase}) \times 100$
- 5) „step cycle“: Dauer eines Schritts einer Extremität (stance phase + swing phase), (in Sek.)

Abbildung 7:

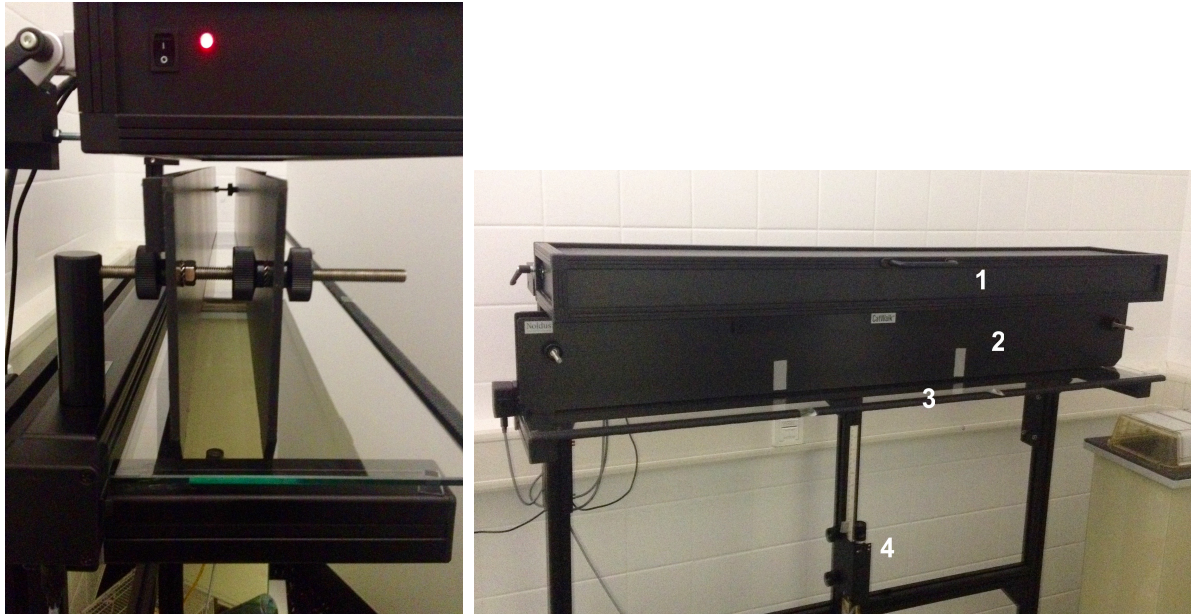


Abbildung 7: Catwalk-System. Links: Ansicht von vorne mit breitenverstellbarem Gang, Deckel und Glasboden. Rechts Seitansicht mit Glasboden (3), Wänden (2), geschlossenem Deckel (1) und unterhalb der Apparatur angebrachter Kamera (4).

2.3.4 Hot/Cold-Plate Test

Die Untersuchung der Thermozeption erfolgte mit einer temperaturregulierbaren Plattform (Hot/Cold-Plate Analgesia Meter, IITC, Woodland Hills, CA, USA). Zentrales Element ist eine Metallplatte (circa 10 x 20 cm) mit einem daran angeschlossenen Temperatursensor, die ein konstantes Temperaturniveau im Bereich von -10°C bis $+70^{\circ}\text{C}$ aufrechterhalten kann. Die Platte wird von einer Plexiglasbox umfasst, in die das Versuchstier platziert wird. Zur Habituation an die Umgebung wurde jedes Tier an drei aufeinanderfolgenden Tagen für je 30 Minuten auf die auf Raumtemperatur (21°C) angepasste Platte gesetzt und die Plexiglasbegrenzung angebracht.

Zur Untersuchung einer kälteassoziierten Allodynie wurde ein vorbeschriebenes Protokoll adaptiert. [90] Hierzu erfolgte zunächst die Kühlung der Platte auf eine Temperatur von 4°C und Einstellung eines temperaturstabilen Zustands über fünf Minuten. Anschließend wurde jedes Versuchstier einzeln auf die Platte gesetzt, der Deckel geschlossen und das Verhalten des Versuchstiers mit einer Kamera aufgezeichnet. Die Untersuchungsspanne betrug 120 Sekunden.

Die Untersuchung einer wärmeinduzierten Allodynie wurde schematisch identisch durchgeführt. Die Platte wurde dabei in Anlehnung an ein von Bannon und Malmberg publiziertes Protokoll auf 50°C erwärmt; der Messzeitraum betrug 60 Sekunden.[91] In beiden Untersuchungsszenarien wurden jeweils die Latenzzeit (in Sekunden) bis zur ersten klaren Reaktionsantwort gemessen.

Als typische, aversiv-vermeidende Reaktionsmuster wurden vorab definiert:

- 1) Flexions- oder Extensionsbewegungen der Pfoten oder der Hinterläufe
- 2) Spreizbewegungen der Pfoten und Zehen
- 3) Sprünge

Abbildung 8:

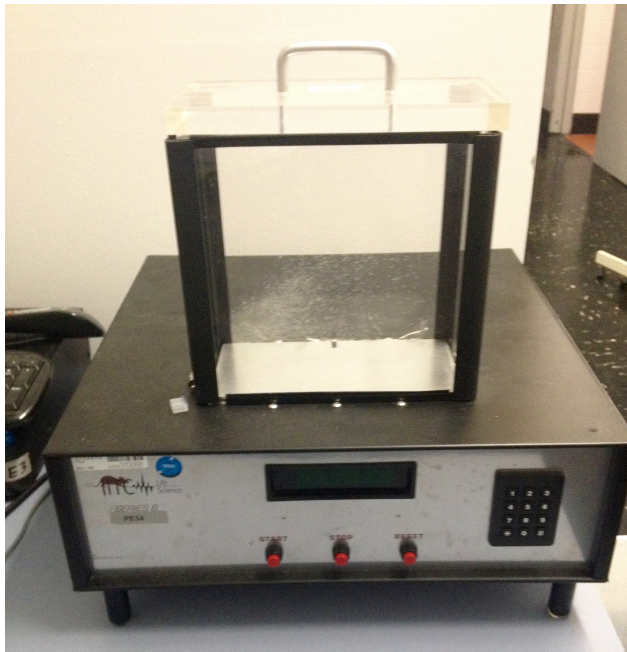


Abbildung 8: Hot/Cold-Plate zur Untersuchung der Thermozeption mit temperaturregulierbarer Metallplatte, Plexiglasbegrenzung mit Deckel, digitaler Temperatur- und Zeitangabe, sowie Bedienfeld.

2.4 Elektrophysiologie

Die ENG-Untersuchung wurde nach einem Protokoll von Wang et. al. unter Verwendung eines Dantec Keypoint Electromyography System (Natus Medical Inc., Planegg, Deutschland) durchgeführt.[92] Unter kontinuierlicher volatiler Anästhesie mit Isofluran (1-1,5% in O₂) erfolgte die Insertion je eine Feinnadel-Stimulationselektrode an der Schwanzbasis (Anode), sowie einer Ableitungselektrode (Kathode) 5 cm distal in das Weichteilgewebe des Schwanzes. Eine Erdungsableitung wurde zwischen Stimulations- und Ableitungselektrode nicht-invasiv angelegt. Pro Tier und Messung wurden in Reihe 50 supramaximale Stimuli (0,1 ms) mit einer Stromstärke von 0,1 mA und einer Frequenz von 1 Hz appliziert und je u.g. Parameter und Messzeitpunkt ein Mittelwert gebildet.

Gemessen wurden:

- 1) die antidrome Nervenleitgeschwindigkeit (NCV, V_{\max} in [ms]) zwischen Anode und Kathode

- 2) das sensible Summenaktionspotenzial (sensory nerve action potential, SNAP) in Amplitude [mV]
- 3) die zeitliche Latenz (Lat) in [sec] bis zum Eintreffen des SNAP

Abbildung 9:

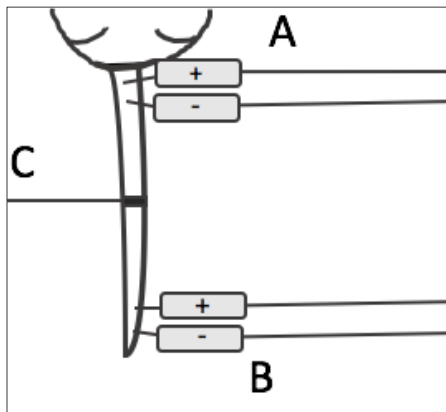


Abbildung 10:

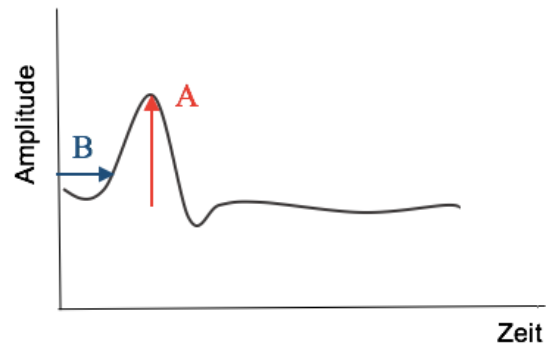


Abbildung 9: Schematische Darstellung der ENG-Messung mit A) Stimulationskomplex (Anode), B) Ableitungskomplex (Kathode) und C) Erdung.

Abbildung 10: Vereinfachte Darstellung der Ableitung des SNAP mit A) Amplitude und B) Latenzzeit

2.5 Laborchemische Untersuchung in der Interventionsstudie

Nach den abschließenden ENG-Messungen wurden die Versuchstiere mit Isofluran tief anästhesiert und der linke Ventrikel nach Eröffnung der Thoraxhöhle mit einer 1,2 ml-Lithium-Heparin-Monoküvette (S-Monovette, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) punktiert. Im Anschluss erfolgte die Dekapitation der Versuchstiere.

Die Probenanalyse erfolgte in einem Routinelabor (SynLab Vet., Berlin, Deutschland). Folgende Parameter wurden bestimmt: Hämoglobin [g/l], Hämatokrit [l/l], MCV [fl], MCHC [g/dl], Leukozyten [G/l], Thrombozyten [G/l], AST [U/l], ALT [U/l], γ -GT [U/l], GLDH [U/l], Albumin [g/l], Gesamteiweiß [g/l], Kreatinin [μ mol/l], Harnstoff [mmol/l], Triglyceride [mmol/l]. Das Blutbild wurde mittels Fluoreszenz-Durchflusszytometrie mit Hilfe eines Sysmex XT 2000i (Sysmex Inc., Lincolnshire, IL, USA) erstellt. Die laborchemischen Parameter wurden mittels eines Beckman Coulter AU680-Systems (Beckman Coulter Inc., Brea, CA, USA) erhoben.

2.6 Histologie

Nieren, Leber, Herz und ein Teil des Musculus rectus femoris auf mittlerer Höhe (rechts oder links) wurden mittels nachfolgendem Protokoll für die histologische Analyse aufbereitet:

2.6.1 Paraffineinbettung

1. Fixierung in 4% Paraformaldehyd mit Phosphatpuffer (0,2 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4^-$, 0,2 M Na_2HPO_4 in Aqua dest., pH 7,4)
2. Lagerung bei 4°C
3. Herauswaschen der Fixationslösung mit Aqua dest.
4. Entwässerung der Gewebe in aufsteigenden Ethanol-Konzentrationen (70% < 80% < 90% < 96%)
5. Inkubation der Gewebe mit Rotihistol (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
6. Einbettung in 60°C warmes Paraffin und Auskühlung
7. Anfertigung von 5 µm-Schnitten mittels Rotationsmikrotom (Leica HM300).
8. Auflagerung der Gewebeschnitte auf Glasobjektträger

2.6.2 Hämatoxylin/Eosin (HE)-Färbung

1. Entparaffinieren der Schnitte in Rotihistol
2. Rehydratisierung in absteigenden Ethanol-Konzentrationen (96% > 90% > 80% > 70%)
3. Waschen in Aqua dest.
4. Kernfärbung mit Haemalum (Hämatoxylin)-Lösung nach Mayer (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
5. Zytoplasmafärbung mit 1% Eosin (Morphisto, Frankfurt am Main, Deutschland)
6. Dehydratisierung in aufsteigenden Ethanolkonzentrationen (70% > 80% > 90% > 96%)
7. Eindeckeln mit VitroClud (Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland)

Die Mikrografien repräsentativer Organausschnitte wurden mit einem Leica DMI 3000B Mikroskop und einer Leica DFC 420C Kamera, sowie der Leica LAS Software (Leica Microsystems, Switzerland, Ltd.) erstellt. Für die Abbildung der Organübersichtsaufnahmen wurde ein invertierter Weißlicht-Tisch (Kaiser RS1, Buchen, Deutschland), eine Roper Scientific PM-Kamera (Roper Scientific GmbH, Planegg/Martinsried, Deutschland), sowie eine MCID Core 7.0 Software (InterFocus Imaging Ltd., Cambridge, Großbritannien) verwendet.

Die Mikroskopie der Gewebe erfolgte hinsichtlich histomorphologischer Charakteristika wie Gewebeatrophie, Nekrose, Fibrose, Kernatypien, Vakuolenbildung und zellulären Infiltrationen.[93]

2.7 Software und statistische Auswertung

Erstellung und Layout dieser Arbeit erfolgte mit dem Textverarbeitungsprogramm Microsoft Word (Microsoft Corporation, Redmont, WA, USA), die deskriptive Datenerfassung wurde mittels Microsoft Excel (Microsoft Corporation, Redmont, WA, USA) durchgeführt. Die Poweranalyse und deren grafische Darstellung erfolgte mittels G*Power (Universität Düsseldorf [94]). Sämtliche andere Diagramme und Abbildungen wurden mit GraphPad Prism (GraphPad, La Jolla, Kalifornien, USA) erstellt. Alle angegebenen Daten liegen als Mittelwert \pm Standardfehler (SEM, standard error of the mean) vor. Die statistische Analyse erfolgte unter Verwendung von SigmaPlot (Systat, Richmond, CA, USA) mittels uni- oder multivariater Varianzanalysen (One- oder Two-Way-ANOVA). Ein Shapiro-Wilk-Test wurde zur Überprüfung einer Normalverteilung der Wertepaare angewandt. Lag eine Normalverteilung vor, schloss sich ein Holm-Sidak Posthoc-Test an. Bei Werten außerhalb der Normalverteilung, wurde ein Test nach Dunn angewandt. In der Analyse der im Catwalk-Test generierten Parameter ergaben sich einzelne Werte mit einer Abweichung größer der zweifachen Standardabweichung vom Mittelwert. Diese Werte und das korrespondierende Wertepaar (rechte/linke Vorder- oder Hinterpfote) wurden von der statistischen Analyse ausgeschlossen. Pro Versuchsgruppe ergaben sich dabei zwischen null und zwei nicht eingeschlossener Tiere. Als Signifikanzniveau wurde das 95% Konfidenzintervall gewählt und ein $p < 0.05$ als statistisch signifikant definiert. Signifikanzen sind in allen Abbildungen mit * gekennzeichnet.

3 ERGEBNISSE

3.1 Dosisfindungsstudie

In der Dosisfindungsstudie wurden eine tägliche Dosis von 5 mg/kg KG sowie 10 mg/kg KG SAL getestet. Primäre Endpunkte dieser Untersuchung waren das Überleben der Tiere bis zum Ende der Injektionen (Tag 28) und des anschließenden Beobachtungszeitraums bis zum Tag 35 (Ende der Versuchsreihe). Sekundärer Endpunkt war die systemische Verträglichkeit der Dosierungen, die anhand täglicher Begutachtung der Tiere und der Gewichtskontrolle evaluiert wurde. Darüber hinaus erfolgte ein Screening auf die Ausprägung eines neuropathischen Phänotyps mittels ENG und Von Frey-Test.

Über den Beobachtungszeitraum von 35 Tagen konnten die mit 5 mg/kg KG SAL behandelten Tiere ihr Ausgangsgewicht von 25,5 g +/- 0,9 g auf einem konstanten Niveau halten. Die täglichen Injektionen von 5 mg/kg KG induzierten in dieser Gruppe keine äußerlichen Anzeichen relevanter systemischer Beeinträchtigungen.

Die intraperitoneale Applikation von 10 mg/kg KG führte rasch bei allen behandelten Tieren zu schweren Anzeichen einer systemischen Intoxikation. Die Tiere zeigten innerhalb von 30 min bis 1h nach Salinomycin-Injektion bereits kein adäquates Futter-, Trink-, Sozial- und Fluchtverhalten mehr und nahmen eine gekrümmte Haltung ein. Auffällig waren zudem glasige, eingesunkene Bulbi und eine sichtbare Piloerektion. Darüber hinaus demonstrierten die Tiere in dieser Gruppe markante Beeinträchtigungen des Bewegungsablaufs mit Betonung der Hinterläufe. Hierzu zählten eine motorische Verlangsamung sowie uni- oder bilaterales Hinterherziehen der hinteren Extremitäten. Bei einigen Tieren bot sich eine schnell progrediente, vollständige Paraparese beider Hinterläufe. Auch wurde vereinzelt das Absetzen dunkelrot eingefärbten Urins beobachtet. Falls die betroffenen Tiere während der engmaschigen Nachbeobachtung keine deutliche Verbesserung des Allgemeinzustands zeigten, erfolgte die unverzügliche Euthanasie des Versuchstiers durch zervikale Dislokation nach EU-Richtlinie für tierexperimentelles Arbeiten (2010/63/EU) und institutsinterner Verordnung (FEM-Forschungseinrichtung für Experimentelle Medizin, Charité Universitätsmedizin Berlin). Insgesamt acht (von n=10) Tiere der 10 mg/kg-Gruppe verstarben innerhalb der ersten zwei Injektionstage, Eines an Tag 3, sowie Eines an Tag 5 nach Beginn der Injektionen. Die Kaplan-Meier-Kurve (Abbildung 11) stellt das Überleben in Prozent ab Tag 1 der Dosisfindungsstudie dar.

Abbildung 11:

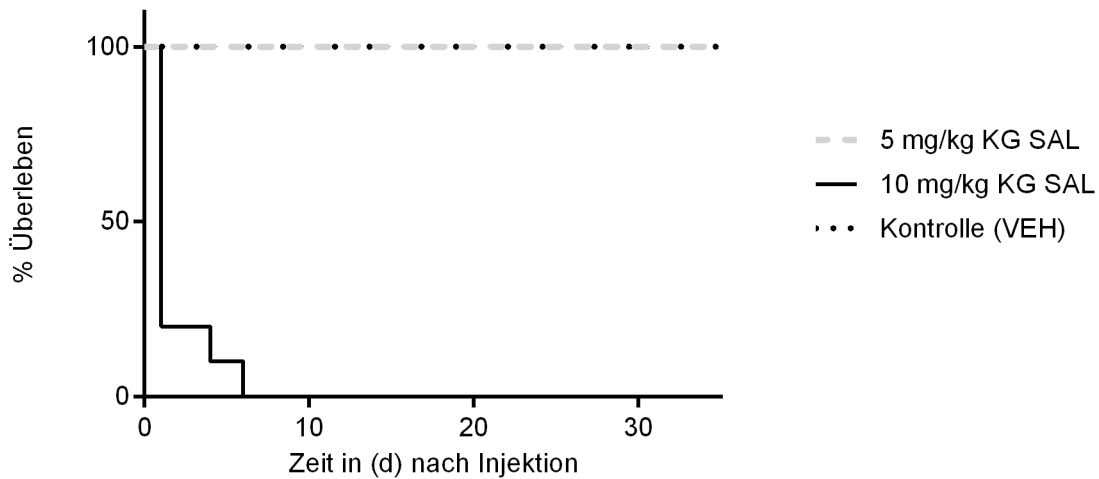


Abbildung 11: Kaplan-Meier-Überlebenskurve für die tägliche intraperitoneale Injektion von 5 mg/kg KG und 10 mg/kg KG SAL. Abbildung modifiziert nach Boehmerle et al. [95].

Im Neuropathiescreening zeigte sich unter 5 mg/kg KG SAL eine Verringerung der SNAP-Amplitude in der SAL-Gruppe, sodass von einer messbaren Neurotoxizität bei Unterschreiten der systemisch toxischen Schwellendosis ausgegangen wurde.

Abbildung 12:

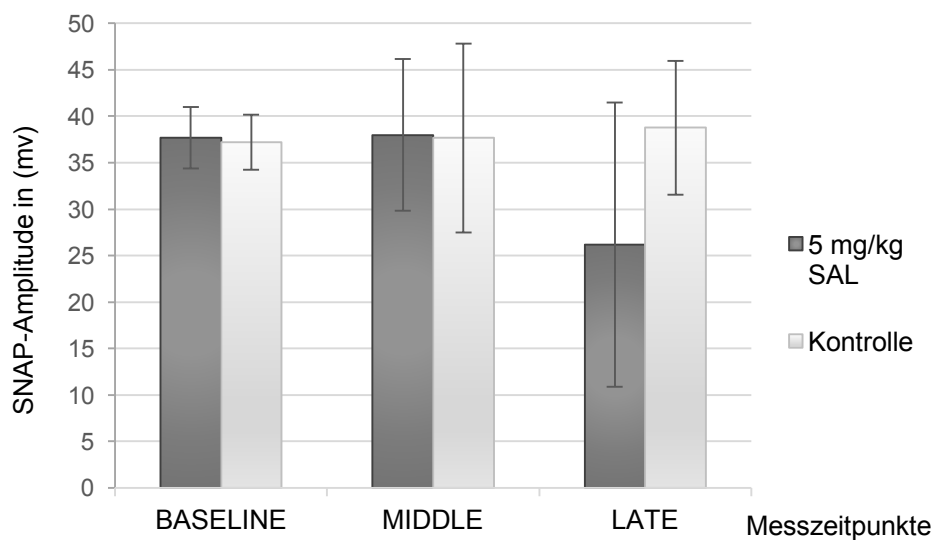


Abbildung 12: Veränderung der SNAP-Amplitude im Neuropathiescreening (ENG) unter einer SAL-Dosis von 5 mg/kg KG (n = 4 Tiere) sowie der unbehandelten Kontrolle (n = 9 Tiere).

3.2 Poweranalyse

Basierend auf den Screening-Daten für 5 mg/kg/KG SAL erfolgte eine a priori-Poweranalyse zur Berechnung der Teststärke, sowie der benötigten Gruppengröße der Interventionsstudie. Vorab definiert wurden eine Testpower von 0.8 und ein Signifikanzniveau von $\alpha = 0.05$. Die computerbasierte Poweranalyse ergab eine Mindestversuchsgruppenstärke von $n = 20$ Tieren bei einer Effektgröße von 0,86. Unter Kalkulation einer Ausfallquote von $n = 4$ (1 Tier/Gruppe) und um noch subtilere Effekte detektieren zu können, erfolgte die Interventionsstudie mit 5 mg/kg Salinomycin an $n = 40$ Tieren bei einer Versuchsgruppengröße von $n = 10$ Tieren/Gruppe.

3.3 Pharmakokinetische Untersuchung mittels Flüssigkeitschromatografie/ Massenspektrometrie

Zum Studienzeitpunkt bestand lediglich eine dünne Datenlage zur Sicherheit und zur Pharmakodynamik von Salinomycin im Organismus. In der pharmakokinetischen Analyse sollten grundlegende pharmakokinetische Parameter von Salinomycin *in vivo* gewonnen und bei einem vermuteten engen therapeutischen Zielbereich eine validierte Methode zu Monitoring der Serumspiegel etabliert werden. Die Ultrahochdruck-Flüssigkeitschromatografie mit Tandem-Massenspektrometrie (UHPLC-MS/MS) ermöglicht es, Salinomycin-Plasmaspiegel im niedri-gnanomolaren (1nM) bis hoch-mikromolaren (100 μ M) Bereichen zu quantifizieren.[96]

Untersucht wurden Serumkonzentrationen nach einmaliger intraperitonealer Injektion von 5 mg/kg und 10 mg/kg KG SAL; aus den generierten Daten wurde ein pharmakodynamisches Modell mittels softwarebasierter Ein-Kompartiment-Analyse erstellt. In der Hochdosisgruppe zeigten zwei Versuchstiere dabei schwere Symptome nach Injektion, sodass aufgrund der notwendigen richtliniengerechten Euthanasie der betroffenen Tiere in dieser Gruppe zum 5 h, sowie zum 24 h-Zeitpunkt lediglich je ein Tier zur Verfügung stand.

3.3.1 Bestimmung der Werte

Die maximale Plasmakonzentration (C_{\max}) sowie der Zeitpunkt der maximalen Konzentration (t_{\max}) wurden aus den gemessenen Daten übernommen. Die Plasma-Halbwertszeit ($t_{1/2}$) wurde über folgende Formel berechnet:

$$(t_{1/2}) = \ln 2 / \lambda * z$$

mit $\lambda * z$ = Eliminationsgeschwindigkeitskonstante

Die Fläche unter der Plasmakonzentrations-Zeit-Kurve (AUC_{0-t_n} , Area under the curve) beschreibt die absolute Dosisexposition über die Zeit und wurde mittels logarithmisch-linearer Trapezregel näherungsweise bestimmt.

In beiden Dosisgruppen zeigten sich bereits 30 Minuten nach Injektion maximale Plasmaspiegelkonzentrationen auf vergleichbarem Niveau. Diese lagen in der Niedrigdosisgruppe (5 mg/kg KG) bei 1.716 ± 233 nM, in der Hochdosisgruppe (10 mg/kg KG) bei 1.476 ± 54 nM. Zwischen dem 1h - 2h-Zeitpunkt, so verdeutlicht Abbildung 13, stellt sich nach intraperitonealer Applikation einer näherungsweise „steady state“ der Serumkonzentrationen um 700 nM (5 mg/kg), respektive 1000 nM (10 mg/kg) ein. Dieser liegt bei ca. der Hälfte der Plasmaspitzenkonzentration (vergl. 2h-Zeitpunkt). Die Berechnung ergab eine Plasmahalbwertszeit von $t_{1/2} = 117$ Minuten bei einer mittleren systemischen Verweilzeit (MRT, engl. mean residence time) von 83 Minuten. Zum 5 h-Zeitpunkt zeigen sich weiter rasch exponentiell abnehmende Plasmapiegel, die innerhalb von 24 h für 5 mg/kg KG SAL bereits unter die minimale Nachweisgrenze (MRC, minimal reportable concentration) gefallen waren

In der Hochdosisgruppe bot sich eine geringfügig verzögerte Eliminationskinetik: nach 24h konnte in dieser Dosierung noch ein SAL-Plasmaspiegel von 2 nM gemessen werden. Abbildung 13 illustriert den Verlauf der Salinomycin-Plasmakonzentrationen in beiden Dosisgruppen über die Zeit.

Tabelle 2:

Parameter	Unit	5 mg/kg SAL
C_{max}	nmol/l	1716
t_{max}	h	0,5
$t_{1/2}$	min	117
MRT	min	83
$AUC_{0-\infty}$	mg/l*h	2,07
V_z/F	l/kg	6,85
Cl/F	l/kg/h	2,43

Tabelle 2: Pharmakokinetische Parameter nach i.p.-Injektion von 5 mg/kg KG SAL. Berechnung anhand offener Ein-Kompartiment-Analyse.

Abbildung 13:

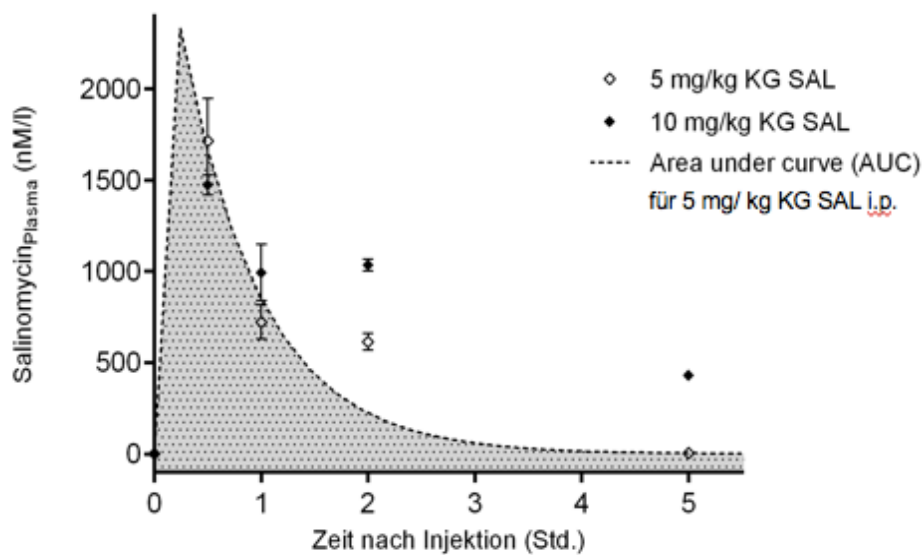


Abbildung 13: Plasmakonzentrations-Zeit-Kurve nach einmaliger intraperitonealer Injektion von 5 mg/kg KG SAL (Rauten) mit AUC für 5 mg/kg KG SAL. Bestimmung mittels Ein-Kompartiment-Analyse. Abbildung modifiziert nach Boehmerle et al.[95]

3.4 Tiermodell und Interventionsstudie mit CGP-37157

Basierend auf den Ergebnissen der Dosisfindungsstudie erfolgte die Interventionsstudie mit einer SAL-Dosierung von 5 mg/kg KG. Ziel dieser Studie war die multimodale Charakterisierung einer Salinomycin-induzierten Neuropathie unter Langzeittherapie. Weitergehend wurde ein neuroprotektiver pharmakologischer Ansatz mit CGP-37157 getestet. Zentrales Element ist die verhaltensbasierte Analyse des neuropathischen Phänotyps.

Im Verlauf der Studie zeigte sich, analog zu der initialen Dosisfindungsstudie, eine gute systemische Verträglichkeit der täglichen Salinomycingabe in einer Dosis von 5 mg/kg KG. Auch unter CGP-Therapie (VEH/CGP) sowie in der SAL/CGP-Gruppe ergaben sich keine äußeren Anzeichen einer relevanten systemischen Beeinträchtigung oder additiven Toxizität.

Es bot sich eine physiologische, kontinuierliche Gewichtszunahme der Kontrollgruppe (VEH/VEH) sowie der Tiere unter CGP-Therapie (VEH/CGP) (Abbildung 14). Im Vergleich zur Kontrollgruppe ergab sich in der mit SAL behandelten Versuchsgruppe (SAL/VEH) ein mittlerer Gewichtsverlust von $3 \pm 2\%$ ($p < 0.05$ im Vergleich zur Kontrolle, Tag 35) im Verlauf des Experiments. Die Gruppe der mit Salinomycin und CGP therapierten Tiere (SAL/CGP) hielt das Gewicht um das Ausgangsniveau konstant ($p < 0.05$ zur Kontrolle) (Abbildung 14).

Abbildung 14:

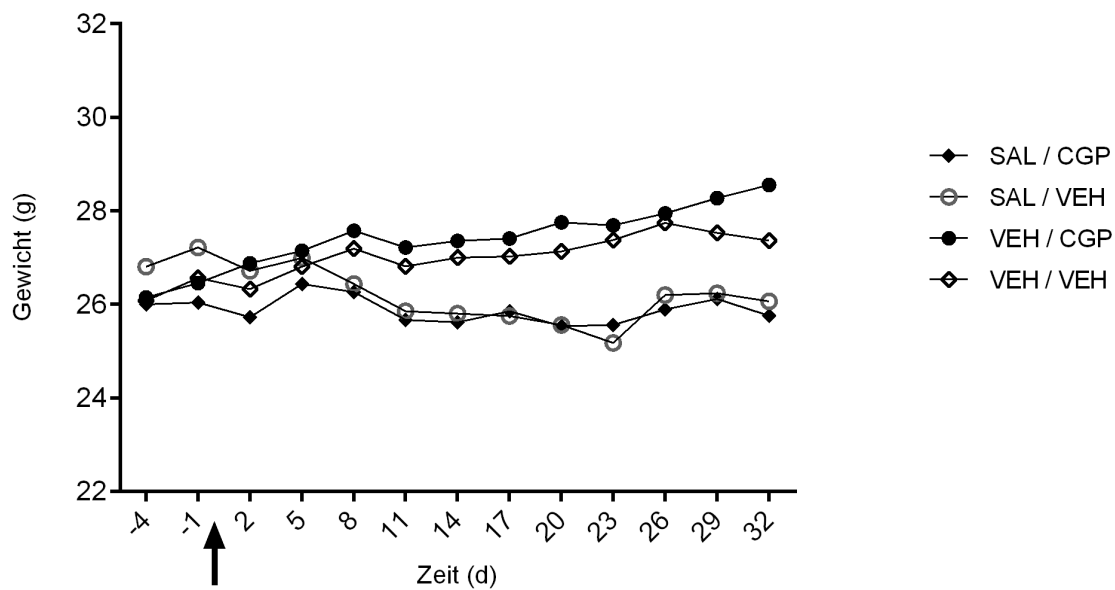


Abbildung 14: Gewichtsverlauf über den Versuchszeitraum. Darstellung in Gramm (g). Pfeil: Start des Injektionsprotokolls. Abbildung modifiziert nach Boehmerle et al.[95]

3.5 Verhaltensanalyse

Die Verhaltensanalyse ist zentrales Element des hier etablierten Tiermodells. Sie dient der Evaluation der vorbeschriebenen sensomotorischen Defizite nach Salinomycinintoxikation und Überprüfung dieser mittels validierter Verfahren auf eine Reproduzierbarkeit unter therapeutischer Dosierung. Die Versuchstiere wurden jeweils vor Aufnahme des Injektionsprotokolls (Baseline), zu einem mittleren Zeitpunkt (Tag 17/18) sowie nach Beendigung des Beobachtungszeitraums (später Messzeitpunkt, Tag 34/35) untersucht.

3.5.1 RotaRod

Vor dem Hintergrund der vorbeschriebenen Effekte auf das Bewegungssystem unter SAL-Intoxikation dient der RotaRod-Test der Überprüfung des lokomotorischen Leistungsvermögens unter therapeutischer SAL-Langzeitgabe. Die hier generierten Daten verdeutlichen ein zu allen Messzeitpunkten konstantes Leistungsniveau der Tiere in allen Versuchsgruppen mit einer durchschnittlichen drop down-Zeit nach im Mittel $165,67 \pm 6,43$ Sekunden. Hieraus ergeben sich keine messbaren Defizite in der motorischen Leistungsfähigkeit und im Balancevermögen unter Salinomycin- und/oder CGP-Langzeittherapie (Abbildung 15).

Abbildung 15:

RotaRod

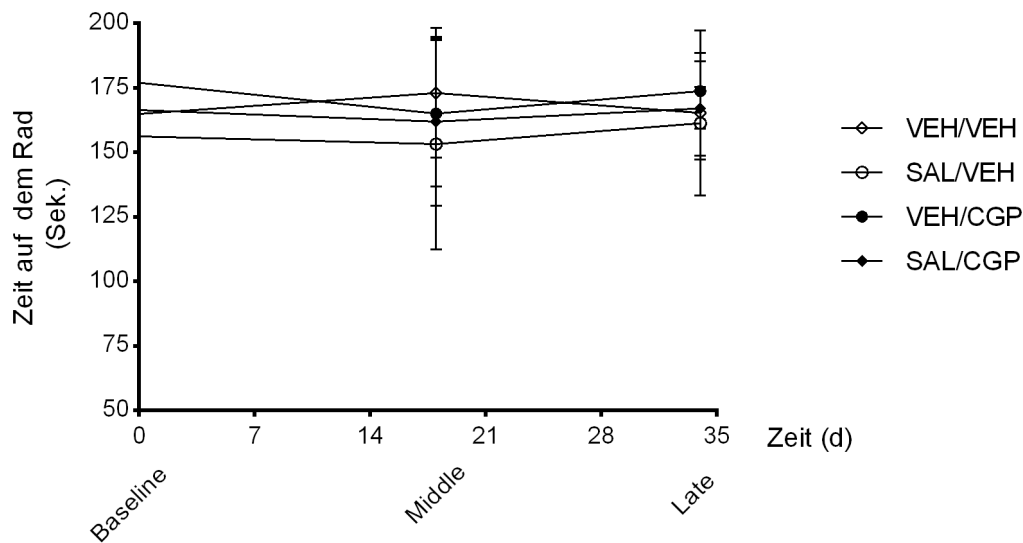


Abbildung 15: Ergebnisse des RotaRod-Tests mit Darstellung einer vergleichbaren motorischen Leistungsfähigkeit in allen vier Versuchsgruppen über den gesamten Untersuchungszeitraum. Abbildung modifiziert nach Boehmerle et al. [95].

3.5.2 Von Frey Haar-Test

Die Überprüfung einer durch taktile Stimulation induzierten nozizeptor-vermittelten Reflexreaktion stellt in der tiermodellbasierten Diagnostik von Sensibilitätsstörungen weiterhin den Goldstandard dar.[88],[97] Unsere Daten verdeutlichen ein nahezu konstantes Reizantwortverhalten der Tiere in der Kontrollgruppe bei einem mittleren Schwellenwert von $4,118 \text{ g} \pm 0,03 \text{ g}$ über den gesamten Testzeitraum hinweg. In der Gruppe der mit Salinomycin therapierten Tiere (SAL/VEH) zeigt sich eine Reduktion des mittleren Schwellenwerts um $5 \pm 3\%$ (nicht signifikant, vergl. zur Kontrolle) zum mittleren Messzeitpunkt sowie eine Abnahme um $20 \pm 3\%$ ($p < 0,01$ vergl. zur Kontrolle) auf im Mittel $3,276 \text{ g} \pm 0,584 \text{ g}$ nach 35 Tagen. In der Gruppe der mit Salinomycin und CGP (SAL/CGP) behandelten Tiere stellt sich ein vergleichbarer Verlauf wie unter SAL-Monotherapie mit einem Abfall des Schwellenwerts um $20\% \pm 18\%$ auf $3,28 \text{ g} \pm 0,618 \text{ g}$ (nicht signifikant, vergl. zur Kontrolle) nach 35 Tagen dar. Unter CGP-Monotherapie (VEH/CGP) hingegen lässt sich eine Erhöhung des Reizschwellenwerts um $11\% \pm 7\%$ auf $4,58 \text{ g} \pm 0,32 \text{ g}$ zum späten Messzeitpunkt erkennen. Zusammenfassend ergibt sich hieraus eine Abnahme des Reizschwellenwerts um circa 20% unter SAL-Monotherapie als auch unter SAL/CGP-Behandlung sowie eine gering gegenläufige Tendenz mit Erhöhung der Reizschwelle unter CGP-Monotherapie.

Abbildung 16:

Von Frey Haar-Test

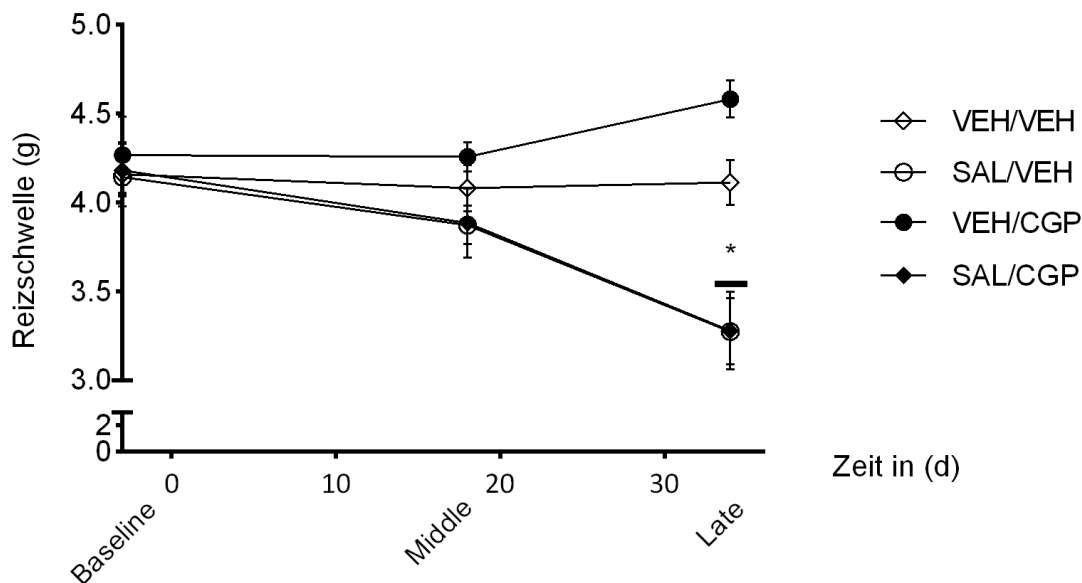


Abbildung 16: Ergebnisse des Von Frey Haar-Tests mit Veränderung der Reizantwortschwellen über den Versuchszeitraum. Zum späten Messzeitpunkt (Late) zeigt sich eine signifikante Reduktion der mechanischen Reizschwelle in der SAL/VEH-Gruppe ($p < 0,05$) und geringer ausgeprägt in der SAL/CGP-Gruppe (nicht signifikant). Reizschwellenanstieg in VEH/CGP-behandelten Tieren zum späten Messzeitpunkt (Late). Abbildung modifiziert nach Boehmerle et al.[95].

3.5.3 Hot/Cold Plate Test

Ziel dieser Untersuchung war die Detektion pathologisch abgeschwächter, übersteigerter oder qualitativ abweichender Empfindungen auf thermische Reize, die für einen CIPN-Phänotyp häufig charakteristisch sind. Gemessen wurde die Latenzzeit (in Sek.) bis zur Demonstration einer vorab definierten aversiven Abwehrreaktion.

Im Cold Plate-Test zeigt sich in der Kontrollgruppe (VEH/VEH) ein zu allen Messzeitpunkten konstantes Reizantwortverhalten mit einer Reaktionslatenz von im Mittel $86,7 \pm 4,77$ Sekunden (Abbildung 17). In der SAL/VEH-Versuchsgruppe ergibt sich zum mittleren Messzeitpunkt nach 18 Tagen eine mit $57\% \pm 15\%$ ($p < 0,05$ vergl. zur Kontrolle) signifikant verkürzte Latenz zur Reaktion, während sich in der SAL/CGP-Gruppe eine Reduktion der Latenz um $30\% \pm 20\%$ (nicht signifikant) abzeichnet. Zum späten Messzeitpunkt nach 35 Tagen boten die Tiere in der SAL/VEH-Gruppe hingegen ein konträres Reaktionsmuster auf die Kältestimulation: sie verharrten ruhig und ohne sichtbare Agitation während der Messperiode auf der gekühlten Platte, was sich in den dargestellten Daten widerspiegelt. In der SAL/CGP-Gruppe zeigt sich zu diesem

Zeitpunkt wiederum eine Verringerung der Latenz um $38\% \pm 24\%$ (nicht signifikant, vergl. zur Kontrolle) (Abbildung 17).

Die Hot Plate-Untersuchung ergab keine gruppenspezifischen Baseline-Abweichungen. Die dargestellten Daten verdeutlichen ein zu allen Messzeitpunkten gruppенübergreifend stabiles Reizantwortverhalten (Abbildung 18).

Abbildung 17:

Cold Plate

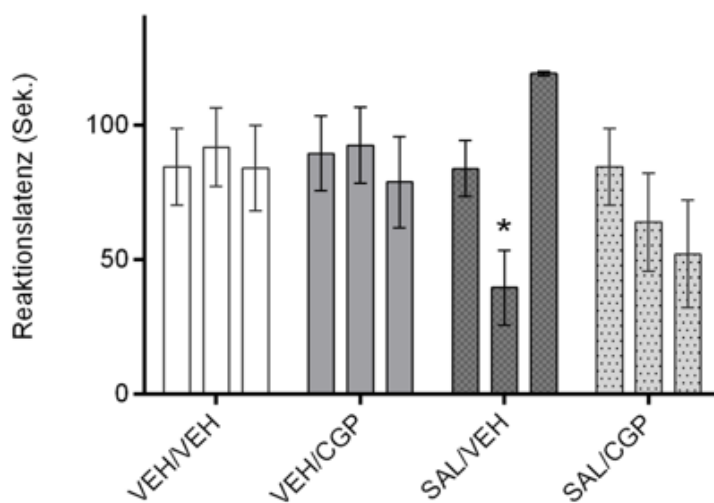


Abbildung 17: Veränderung der gruppenspezifischen Reaktionslatenzzeit im Cold Plate-Test im zeitlichen Verlauf der drei Messreihen mit signifikanter Verringerung der Latenzzeit an Tag 19 (mittlerer Zeitpunkt) in der SAL/VEH-Gruppe (dunkelgrauer Balken, $p < 0,05$ vergl. zur Kontrolle). Nach 35 Tagen zeigten die SAL-Tiere keine Reaktion auf den Kältestimulus mehr, während eine verzögerte Entwicklung dieser Tendenz in der SAL/CGP-Gruppe erkennbar ist (hellgrau-gepunkteter Balken, nicht signifikant).

Abbildung 18:

Hot Plate

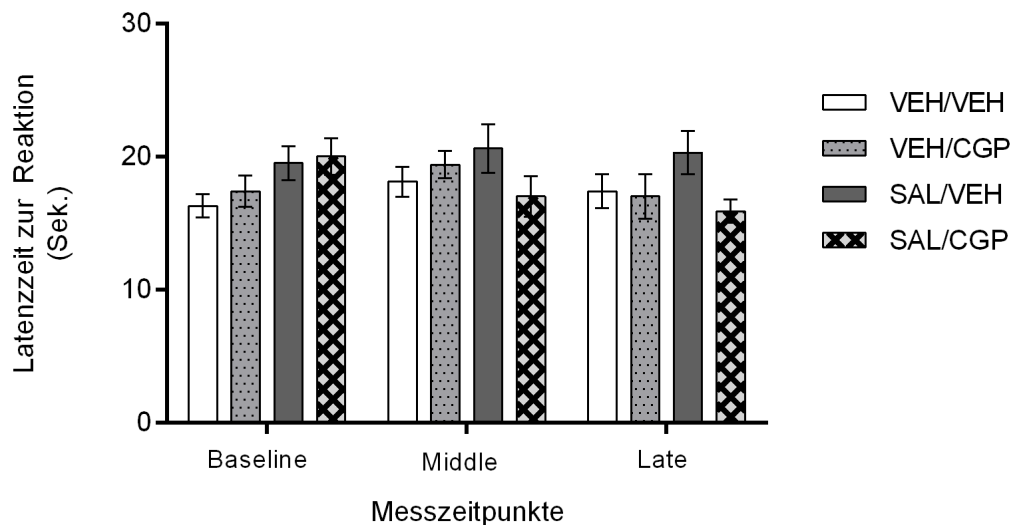


Abbildung 18: Darstellung des gruppenübergreifend stabilen Reizantwortverhaltens im Hot Plate-Test. Abbildung modifiziert nach Boehmerle et al.[95].

3.5.4 Catwalk

Ziel der Catwalk-Untersuchung war die Detektion subtiler Gangbildveränderungen unter SAL-Langzeittherapie. Es wurden für jede Pfote separat (vorne rechts, vorne links, hinten rechts, hinten links) spezifische Lokomotionsparameter generiert, die in der statistischen Auswertung für die Vorder- und die Hinterläufe jeweils summiert analysiert wurden.

Die Auswertung der Daten der Vorderläufe ergab keine signifikanten Veränderungen zwischen den Versuchsgruppen oder im Vergleich der Messzeitpunkte und wird aus Praktikabilitätsgründen nicht dargestellt.

Die Analyse der für beide Hinterläufe in Summe generierten Parameter zeigte nach 18 sowie 34 Tagen, unter anderem, in folgenden Parametern Abweichungen auf:

1) Duty cycle:

Der “duty cycle” ist ein dynamischer Parameter im Gangablauf. Er wird definiert als prozentual-zeitlicher Anteil der „step cycle“-Dauer (in Sekunden) und nach folgender Formel berechnet:

$$\text{duty cycle} = \text{stance phase} / (\text{stance phase} + \text{swing phase}) \times 100$$

Der “duty cycle” repräsentiert die Phase des Bodenkontakts als zeitlichen Anteil an der Bodenkontakt- und Schwungphase des Bewegungsablaufs.

Nach 18 Tagen Behandlungsdauer verdeutlicht sich in der SAL/VEH-Gruppe eine Reduktion des “duty cycle”-Wertes um $7\% \pm 1\%$ (nicht signifikant, vergl. zur Kontrolle) sowie eine Reduktion um $6\% \pm 1\%$ in der SAL/CGP-Gruppe (nicht signifikant, vergl. zur Kontrolle). An Tag 34 zeigen die Daten der SAL/VEH-Tiere eine Abnahme des “duty cycle” um $10\% \pm 1\%$ ($p < 0.05$, vergl. zur Kontrolle, Abbildung 19), zudem bietet sich auch eine Verringerung des Werts um $8\% \pm 1\%$ in der SAL/CGP-Gruppe (nicht signifikant vergl. zur Kontrolle, vergl. auch Abbildung 19).

2) Print area

Die “print area” beschreibt die Gesamtauflagefläche beider Hinterpfoten während der Bodenkontaktphase im Gangablauf (“step cycle”). In der SAL/VEH-Gruppe zeigt sich zum mittleren Messzeitpunkt eine Verminderung der Auflagefläche um $13\% \pm 2\%$ (nicht signifikant, vergl. zur Kontrolle) sowie eine noch deutlichere Verringerung um $53\% \pm 1\%$ am späten Messzeitpunkt ($p < 0.001$ vergl. zur Kontrolle; $p < 0.05$ im Vergleich zu SAL/CGP). In der SAL/CGP-Gruppe, so lässt sich erkennen, ergibt sich eine Reduktion der “print area” um $3\% \pm 1\%$ (nicht signifikant, vergl. zur Kontrolle) an Tag 18 sowie um $33\% \pm 2\%$ ($p < 0.05$ vergl. zur Kontrolle) zum späten Messzeitpunkt an Tag 34 (vergl. Abbildung 20).

Zusammenfassend lassen sich mit Hilfe der Catwalk-Untersuchung spezifische, rein visuell nicht erkennbare Alterationen im Gangbild mit isolierter Manifestation in den distalen (hinteren) Extremitäten darstellen. Sowohl der “print area”-Wert, ein für die statische Phase des Bewegungsablaufs charakteristischer Lokomotions-Parameter, als auch der “duty cycle” (stellvertretend für die dynamische Komponente) weisen in der SAL/VEH-, aber auch in der SAL/CGP-Gruppe im Vergleich zu der unbehandelten Kontrollgruppe (VEH/VEH) nach Langzeit-Salinomycintherapie teils signifikante Abweichungen auf.

Abbildung 19:

Duty Cycle

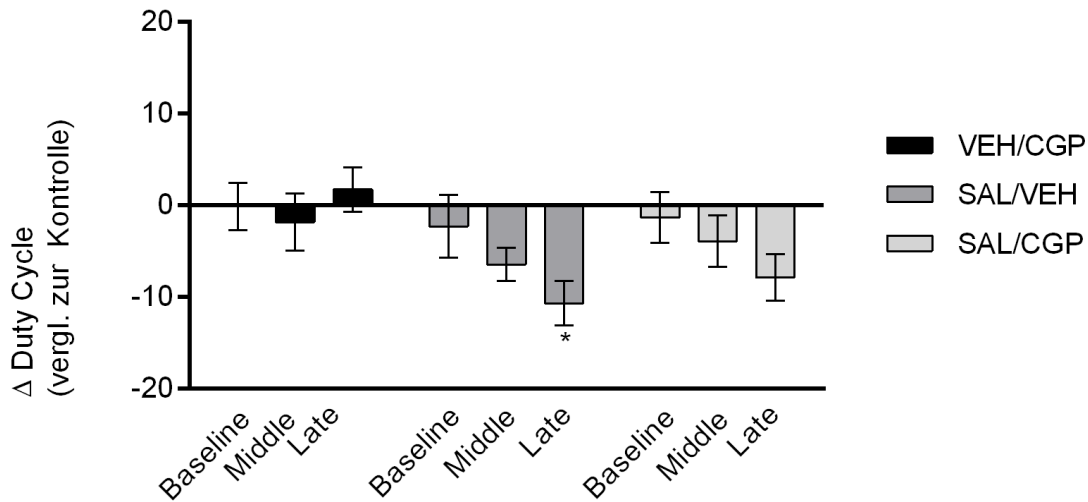


Abbildung 19: Veränderung des „duty cycle“-Parameters jeweils im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe (VEH/VEH) im Catwalk-Test mit signifikanter Reduktion in den SAL/VEH-Tieren ($p < 0,05$) sowie in den SAL/CGP-Tieren (nicht signifikant). Partielle Protektion der Effekte durch CGP in der SAL/CGP-Gruppe.

Abbildung 20:

Print Area

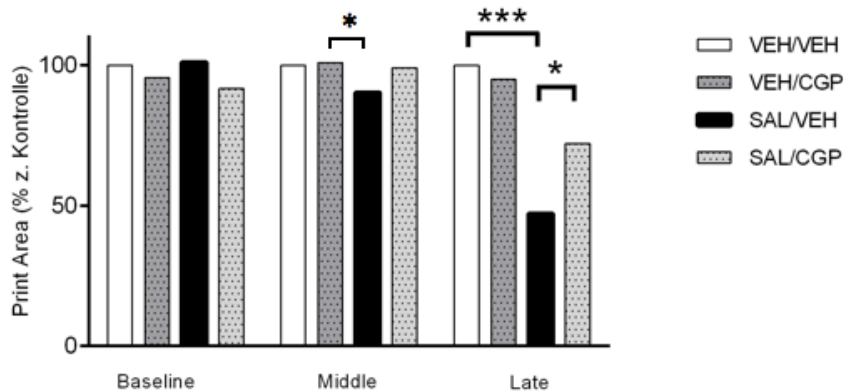


Abbildung 20: Veränderung des „print area“-Parameters im Catwalk-Test in % (Prozent) zur Kontrolle. In der SAL-Gruppe zeigt sich eine signifikante Reduktion ($p < 0,001$) des Parameters zum späten Messzeitpunkt (Late). Im Vergleich von SAL/VEH mit SAL/CGP ($p < 0,05$) zeigt sich eine partielle Protektion der Veränderungen durch Mitbehandlung mit CGP. Abbildung modifiziert nach Boehmerle et al.[95].

3.6 Elektrophysiologie

Die elektrophysiologische Untersuchung ist eine weitere elementare Säule in der Diagnostik von Nervenläsionen. Anhand der spezifischen Veränderung der Parameter des hier abgeleiteten sensiblen Summenaktionspotenzials (SNAP) können qualitative Aussagen über das Läsions- und Verteilungsmuster einer neuropathischen Schädigung im peripheren Nervensystem getroffen werden.[98]

Zentrales Ergebnis der hier durchgeführten Messungen ist ein progredienter, signifikanter Amplitudenverlust des sensiblen Summenaktionspotenzials in der SAL/VEH-Gruppe im Verlauf der Interventionsstudie. Zum mittleren Messzeitpunkt nach 19 Tagen Behandlungsdauer zeigt sich eine Reduktion des SNAP um $17\% \pm 8\%$ ($p < 0,05$ vergl. mit SAL/CGP). Nach Abschluss der Injektionen (Tag 34) verdeutlichen die Daten eine weitere Reduktion der SNAP-Amplitude in der SAL/VEH-Gruppe um kumulativ $43\% \pm 4\%$ ($p < 0,01$ vergl. zur Kontrolle; $p < 0,05$ vergl. mit SAL/CGP). Gleichzeitig zeigt sich eine Reduktion der mittleren Nervenleitgeschwindigkeit in der SAL/VEH-Gruppe zum mittleren Zeitpunkt um $10\% \pm 5\%$ (nicht signifikant, vergl. zur Kontrolle) sowie um $12\% \pm 3\%$ nach 35 Tagen ($p < 0,05$, vergl. zur Kontrolle).

In der SAL/CGP-Gruppe lässt sich zum mittleren Messzeitpunkt (Tag 19) keine signifikante Veränderung in der Nervenleitgeschwindigkeit oder dem SNAP ableiten. An Tag 35 zeigt sich in dieser Gruppe eine Reduktion der Amplitude des SNAP um $12\% \pm 9\%$ (nicht signifikant, vergl. zur Kontrolle). Abbildung 21 illustriert die Ergebnisse der ENG-Messungen.

Abbildung 21:

ENG

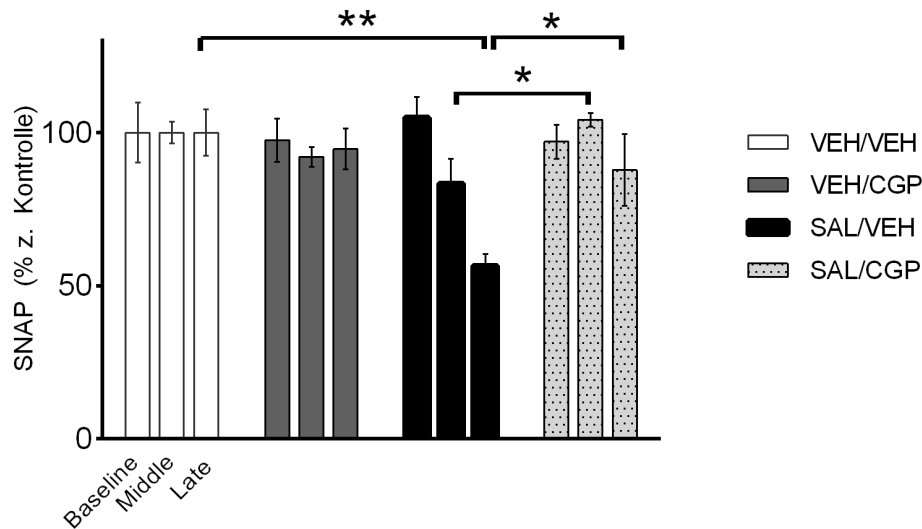


Abbildung 21: Ergebnisse der ENG-Messung mit Reduktion des SNAP in der SAL/VEH-Gruppe und partielle Protektion des Effekts durch Mitbehandlung mit CGP (SAL/CGP). Darstellung als % (Prozent) vergl. zur Kontrolle.

3.7 Laborchemische Untersuchung in der Interventionsstudie

Die laborchemische Analyse erfolgte zur Evaluation organspezifischer Schädigungen unter therapeutischer Salinomycin- und/oder CGP-Behandlung basierend auf einer Reihe veterinärmedizinischer Berichte, die im Vorfeld histologische und laborchemische Nachweise gravierender Endorganschäden nach Salinomycinintoxikation aufzeigen konnten.[72], [75]

Nach Abschluss der Interventionsstudie erfolgte dazu die Anfertigung eines differenzierten Blutbilds sowie eine laborchemische Analyse stoffwechsel- und organassoziiierter Parameter. Die Beurteilung erfolgte unter Hinzunahme der durch das Labor angegebenen Referenzwerte.

3.7.1 Hämatopoese

Die Blutbildanalyse bietet ein gruppenübergreifend heterogenes Bild der hämatopoetischen Marker. Auffällig ist eine milde Erythrozytose von im Median 10,14 [T/l] in der SAL-Gruppe bei ebenfalls erhöhten Hämatokritwerten (Median: 0,48 [l/l]) in dieser Gruppe - eine Konstellation wie bei milder Dehydratation. Weitergehend zeigt sich über alle Versuchsgruppen hinweg eine milde Leuko- und Thrombozytopenie, letztere ist in der SAL/CGP-Gruppe mit im Median 596 [G/l] am geringsten ausgeprägt. Das mittlere korpuskuläre Volumen der Erythrozyten (MCV),

sowie die mittlere korpuskuläre Hämoglobinkonzentration (MCHC) als Indices für die Erythropoese-Qualität und Substratverfügbarkeit ergeben keine pathologischen Hinweise.

3.7.2 Klinische Chemie

Funktion und Parenchymintegrität des hepatobiliären Systems wurden mittels Bestimmung der hepatischen Enzyme Aspartat-Aminotransferase (AST), Alanin-Aminotransferase (ALT), GLDH (Glutamatdehydrogenase) und γ -GT (Gammaglutamyltransferase) untersucht. Sämtliche in dieser Analyse untersuchten Leberparameter verdeutlichen gruppenübergreifend vergleichbare Werte. Die Plasma-Albuminfraktion zeigt ebenfalls keine relevante Normwertabweichung. Einzig auffällig ist eine gruppenübergreifende, geringfügige Verminderung des Serumproteingehalts mit einer Abweichung vom unteren Grenzwert von im Mittel $7\% \pm 6,9\%$.

Die Untersuchung der Nierenfunktion mittels Kreatinin- und Serum-Harnstoffanalyse zeigt für beide Parameter keine richtungsweisenden Normwertabweichungen. Auch die Analyse des Serum-Triglyceridgehalts ergibt keinen klaren Befund.

Erhöhte Hämolyseindices, wie in den veterinärmedizinischen Berichten beschrieben, lassen sich in Zusammenschau der CK- (Kreatinkinase) und LDH-Parameter (Lactatdehydrogenase) sowie unter Berücksichtigung der Blutbildanalyse nicht ableiten.[72]

Zusammenfassend ergeben die laborchemischen Untersuchungen mittels Blutbildbestimmung und Analyse der organspezifischen Parameter keine eindeutigen pathologischen Befunde unter SAL-Langzeittherapie. Eine additive Toxizität durch CGP kann ebenfalls nicht nachgewiesen werden. Tabelle 3 (folgende Seite) gibt einen Überblick über die erhobenen Laborwerte.

Tabelle 3:

Versuchsgruppe/ Parameter	Referenz- bereich	VEH/VEH	VEH/CGP	SAL/VEH	SAL/CGP
Blutbild					
Leukozyten [G/l]	5,0 – 13,7	4,60	4,10	4,90	6,00
Erythrozyten [T/l]	7,9 – 10,1	9,72	9,93	10,14	9,95
Hämoglobin [g/l]	110 - 145	135,00	140,00	143,00	139,00
Hämatokrit [l/l]	0,37 – 0,46	0,46	0,46	0,48	0,46
MCV [fl]		45,60	46,00	46,70	46,40
MCH [pg]		14,10	14,20	14,10	13,90
MCHC [g/dl]		30,40	31,00	30,30	30,30
Thrombozyten [G/l]	600-1200	325,00	420,00	312,00	596,00
Neutrophile [%]	5 - 40	30	28	23	20
Stabkernige [%]		0	0	0	0
Lymphozyten [%]	30 - 90	60	62	60	64
Monozyten [%]	0 - 10	8	8	9	14
Eosinophile [%]	0 - 5	1	1	3	2
Basophile [%]	0-2	1	1	1	0
Leberfunktion					
AST (GOT) [U/l]	55 - 124	140,00	59,00	84,00	137,00
ALT (GPT) [U/l]	28 - 184	38,00	26,00	35,00	34,00
γ-GT [U/l]		<5	<5	<5	<5
GLDH [U/l]		13,50	5,05	9,60	15,75
Albumin [g/l]		27,45	24,25	28,90	23,60
Protein gesamt [g/l]	54 - 78	52,50	46,50	52,00	50,00

Nierenfunktion					
Kreatinin	<159	16,10	19,30	15,95	16,25
Harnstoff		11,17	8,54	8,21	8,18
CK		400,00	86,00	243,00	1722,00
LDH		1041,00	378,00	901,00	770,00
Blutfette					
Triglyceride		0,89	1,03	1,58	1,12

Tabelle 3: Blutparameter nach 28-tägiger Behandlung mit Salinomycin. Die angegebenen Werte liegen als Median aus fünf Tieren/Versuchsgruppe vor. Abbildung modifiziert nach Boehmerle et al. [95]

3.8 Histologische Untersuchung der inneren Organe

Neben laborchemischen Veränderungen boten einige veterinärmedizinische Fallstudien auch Nachweise histomorphologischer Läsionen nach systemischer SAL-Intoxikation. [68], [69], [72], [75] Zur Evaluation dieser unter therapeutischer SAL-Langzeittherapie wurden nach Abschluss der Interventionsstudie Herz, Leber, Nieren und Skelettmuskulatur-Gewebe für die histologische Analyse asserviert. Die Auswertung erfolgte hinsichtlich spezifischer histopathologischer Kriterien (vergl. Kap. 2.6).[93]

3.8.1 Leber

In den Leberschnitten bietet sich ein im Überblick homogen erscheinendes Leberparenchym mit regulär angeordneten Leberzellbalken und Sinusoiden in radiärem Zulauf auf ein zentralständiges Gefäß. Die partiell erfassten Kapselanteile sind, bei teils größeren Schnittartefakten, weitestgehend unauffällig. Nekrosen, Vakuolisierungen oder fettige Umbauprozesse zeigen sich nicht. Vereinzelt finden sich Erythrozyten und mononukleäre Zellen. Hämorrhagien oder leukozytäre Infiltrationen sind nicht abgrenzbar. Die Hepatozyten sind überwiegend polygonal konfiguriert mit zentralständigen ovalen Zellkernen. Das umgebende Zytoplasma weist eine mäßige Eosinophilie auf.

Zusammenfassend lassen sich in der vergleichenden Übersichtsanalyse der Leberhistologie keine wegweisenden Auffälligkeiten in den einzelnen Versuchsgruppen erkennen. Abbildung 22, I. zeigt repräsentative Abbildungen von Lebergewebe aus allen vier Versuchsgruppen.

3.8.2 Nieren

Die Nierenlängsschnittpräparate stellen sich bei allen Versuchstieren von annähernd gleicher Größe und Konfiguration dar. Bis auf vereinzelte Schnittartefakte sind umgebende Kapselstrukturen gruppenübergreifend intakt. Die Mark-Rinden-Differenzierung sowie das Nierenbeckenkelchsystem sind durchweg erhalten, Letzteres ist nicht erweitert und ohne Konkrementnachweis. In Anlehnung an vorab publizierte Referenzwerte zeigt sich lichtmikroskopisch eine regelrechte Nephronanzahl.[99] Die Glomeruli erscheinen normotroph und mit intakter Basalmembran, das Kapillarkonvolut und die mesangialen Strukturen sind normkalibrig und nicht hypertrophiert. Das proximale Tubulusepithel ist normotroph, einschichtig kubisch konfiguriert, mit zentralständigen Nucleoli und von stark eosinophilem Charakter. Das Epithel des distalen Tubulus ist isoprismatisch, schwach eosinophil, ebenfalls normotroph und mit zentralständigen runden Zellkernen. Das bindegewebige Niereninterstitium ist lediglich geringfügig ausgeprägt und in allen Schnittebenen und Versuchsgruppen extravasatfrei. Zusammenfassend lässt sich in der lichtmikroskopischen Beurteilung der Nierenpräparate der Versuchstiere kein pathologischer Befund erkennen. Abbildung 22, II. zeigt eine Übersichtsabbildung sowie repräsentative Ausschnitte der Glomerulumarchitektur.

3.8.3 Skelettmuskulatur

Die in transversaler Schnittführung angefertigten Skelettmuskelpräparate weisen ein in allen Versuchsgruppen vergleichbares, homogenes Erscheinungsbild auf. Es zeigt sich eine regelrechte, normotrophe Muskelfaserarchitektur mit homogener Anordnung der polygonalen Myozyten. Diese weisen ein eosinophiles Zytoplasma und randständige Nucleoli auf. Basophile Strukturen oder Kernkettenanordnungen finden sich nicht. Das perimysiale Bindegewebe erscheint ohne fokale Zellinfiltrationen. Ferner zeigen sich keine Gewebeinhomogenitäten, Nekrose- oder Fibroseareale.

3.8.4 Herzmuskulatur

Die Aufarbeitung der Herzmuskelproben erfolgte in koronar geschnittenen Übersichtsabbildungen und Detailaufnahmen (Abbildung 20). Die Analyse der myokardialen Strukturen ist vor dem Hintergrund des spezifischen katecholaminergen Wirkprofils von SAL von besonderem Interesse.[68],[100]-[102] Unter lichtmikroskopischer Begutachtung zeigen sich in der Übersichtsaufnahme alle vier Herzhöhlen von gruppenübergreifend vergleichbarer, normaler Konfiguration. Das Myokard ist nicht hypertrophiert, zudem zeigten sich keine größeren dilatativen Veränderungen der Herzhöhlen. Bei vereinzelten Schnittartefakten kommen die

Herzklappen überwiegend erhalten und ohne Auflagerungen zur Darstellung. Die myokardiale Muskelfaserarchitektur zeigt sich lichtmikroskopisch in regelrecht „ungeordnetem“ Zellverbund. Die Kardiomyozyten an sich erscheinen durchweg homogen mit eosinophilem Zytoplast und mal zentral- und mal randständigen Nucleoli. Zeichen einer fettigen Involution, Vakuolisierung, Fibrosierung oder zelluläre Infiltrationen zeigen sich nicht. Unter der in dieser Studie verabreichten Dosierung von 5 mg/kg KG finden sich in keiner der Versuchsgruppen histomorphologische Charakteristika einer myokardialen Schädigung unter Salinomycin- und/oder CGP-Therapie (vergl. Abbildung 22, IV).

Abbildung 22:

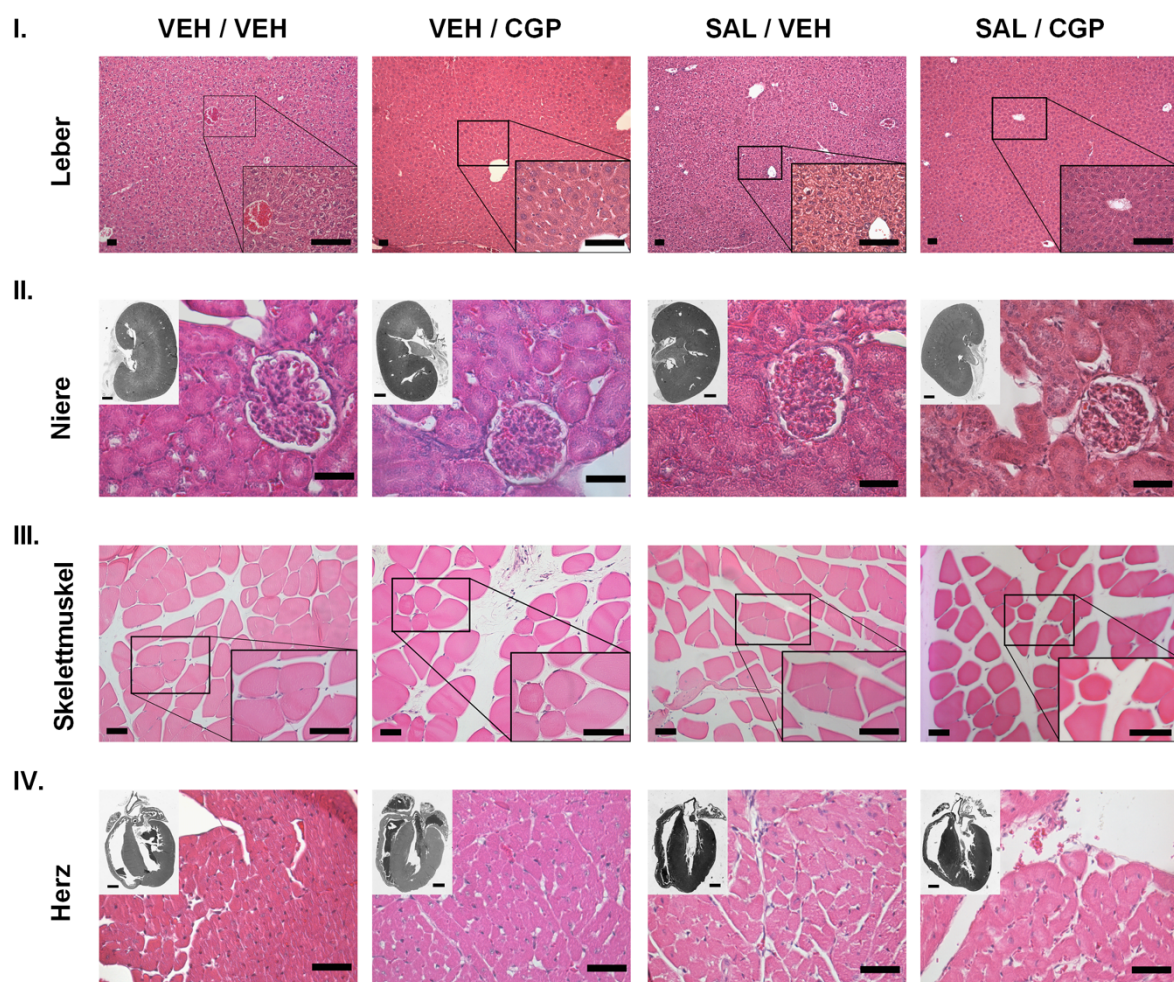


Abbildung 22, I.-IV.: Repräsentative Ausschnitte der Histologie der inneren Organe und der Skelettmuskulatur nach 28-tägiger Salinomycinbehandlung. Es zeigen sich keine histologischen Auffälligkeiten zwischen den Versuchsgruppen für I. Leber, II. Niere, III. Skelettmuskulatur, IV. Myokard. Skalierung: 100 µm. Abbildung modifiziert nach Boehmerle et al.[95].

4 DISKUSSION

Das Antibiotikum Salinomycin gilt aufgrund seiner nachgewiesenen zytotoxischen Wirksamkeit auf Tumorstammzellen und primär Chemotherapie-resistente Tumorzellen in der pharmakologischen Therapie von Neoplasien als vielversprechende Option.[1],[34],[137] Der potenzielle Nutzen durch einen Einsatz von Salinomycin in der Tumorthherapie steht jedoch in einem starken Kontrast zu dem nicht zu vernachlässigenden Nebenwirkungsprofil der Substanz. Insbesondere die Neurotoxizität von Salinomycin bleibt bis dato noch wenig beleuchtet. Die toxische Wirkung auf Nervenzellen ist jedoch eine gravierende, häufig auftretende und mitunter dosis- und therapielimitierende Nebenwirkung vieler Zytostatika.[23] Die Charakterisierung der Neurotoxizität von Salinomycin stellt daher einen wichtigen Schritt in der Evaluation des Wirkstoffs für einen Einsatz in der Humanmedizin dar. In dieser Arbeit sollten zunächst die Verträglichkeit von Salinomycin in der Langzeitanwendung untersucht und grundlegende Daten zur substanzspezifischen Pharmakodynamik in der Maus gewonnen werden. Ausgehend von den veterinärmedizinischen Fallberichten wurde das vermutete neuropathische Nebenwirkungsprofil verhaltensanalytisch und elektrophysiologisch charakterisiert. Zudem wurde auf Basis eines vorab untersuchten zellulären Wirkmechanismus von Salinomycin unter Blockade des mitochondrialen NCX mit CGP-37157 ein pharmakologischer Ansatz zur Prävention einer Salinomycin-induzierten Neuropathie getestet.[80]

4.1 Zentrale Ergebnisse dieser Arbeit

Die vorliegende Arbeit stellt folgende zentrale Punkte dar:

- Salinomycin ist in einer Dosierung von 5 mg/kg KG in der Maus gut verträglich, die doppelte Dosierung induziert letale Nebenwirkungen.
- Salinomycin unterliegt einer engen therapeutischen Breite und weist eine rasche systemische Anflutung innerhalb von 30 Minuten nach intraperitonealer Applikation auf.
- Im Langzeitverlauf induziert SAL in einer Dosierung von 5 mg/kg KG in der C57BL/6J-Maus eine vorwiegend sensible axonale Neuropathie.
- Die Co-Therapie mit CGP-37157 ist systemisch gut verträglich und übt keinen additiv toxischen Effekt aus.
- CGP-37157 besitzt einen partiell protektiven Effekt auf die Entwicklung einer SAL-induzierten Neuropathie.

4.2 Dosisfindungsstudie und Pharmakokinetik

In der zunächst durchgeführten Dosisfindungsstudie wurde die systemische Verträglichkeit zweier Salinomycin-Dosierungen *in vivo* getestet. Es zeigt sich, dass SAL in einer täglich intraperitoneal applizierten Dosierung von 5 mg/kg KG gut toleriert wird. Eine tägliche Dosis von 10 mg/kg KG hingegen induziert in der C57BL/6J-Maus schwere bis letale systemische Nebenwirkungen.

In der 5 mg/kg KG-Dosisgruppe fanden sich zu keinem Zeitpunkt äußerliche Hinweise auf relevante systemische Nebenwirkungen, was sich auch in dem konstanten Gewichtsverlauf dieses Kollektivs widerspiegelt. Diese Ergebnisse stützen weitestgehend vorab publizierte *in vivo*-Daten von Gupta et al., in deren Studie eine ebenfalls intraperitoneal applizierte SAL-Dosierung von 5 mg/kg KG (unter Verwendung eines äquivalenten Lösungsmittels (DMSO)) in einem immunodefizienten BALB/c-Mausmodell nebenwirkungsfrei getestet wurde.[1] Interessanterweise boten sich in einer Studie von Ojo et al. abweichende Erkenntnisse. In ihrer Arbeit wurden bereits in deutlich geringeren täglich verabreichten SAL-Dosierungen (1, 3 und 5 mg/kg KG SAL in DMSO; i.p.) in der BALB/c-Maus gravierende bis letale systemische Nebenwirkungen beobachtet.[4] Ein vergleichbares klinisches Bild bot sich in der hier vorliegenden Dosisfindungsstudie erst unter der signifikant höheren Dosierung von 10 mg/kg KG. Der sich dabei abzeichnende fulminante Verlauf führte binnen weniger Stunden bis Tage zu einem letalen Ausgang. Dabei ergaben sich zudem grundlegende Hinweise auf das charakteristische Bild einer Ionophoren-Intoxikation, wie der auffällig rötlich-braun eingefärbte Urin einiger Tiere, der eine Myoglobinurie im Sinne der eingangs beschriebenen Rhabdomyolyse annehmen lässt.

Vor dem Hintergrund des bekannten stark sympatikoadrenergen Wirkprofils von SAL, lässt sich aus den Fallberichten im Akutstadium einer Salinomycinintoxikation eine massive katecholaminerge Aktivierung mit Übergang in einen hämodynamischen Schockzustand annehmen.[72],[100],[101] Neben der histomorphologisch dokumentierten direkten Organtoxizität der Substanz, wäre dies durch funktionelles myokardiales Pump- oder/und respiratorisches Versagen erklärbar. Darüber hinaus suggerieren Berichte von Oligurie, Myoglobinurie sowie erhöhte laborchemische Nierenretentionswerte ein begleitendes (oder zu Grunde liegendes) akutes prä- oder intrarenales Nierenversagen, was sich pathophysiologisch durch den Zusammenbruch der Hämodynamik, direkt-toxische Schädigung der Niere durch Salinomycin oder als Folge der fulminanten Rhabdomyolyse („Crush-Niere“) begründen ließe.[77] Passend zu einer SAL-induzierten sympatikoadrenergen Aktivierung erscheinen auch die geringfügig erhöhten Hämatokrit- und Erythrozytenwerte der SAL-Gruppe der Interventionsstudie, was auf eine milde Dehydratation hinweisen könnte. Da ein dezidiertes klinisches Nebenwirkungsprofil in experimenteller Umgebung im Kleintiermodell jedoch nur

eingeschränkt beurteilbar ist, bedarf es weiterer Studien, um die oben aufgeführten Hypothesen zu überprüfen.

In Kenntnis der Interferenz von SAL mit der intrazellulären Calcium-Homöostase, so schlussfolgern Fahim et al. aus ihrer Untersuchung zu katecholaminergen Effekten von SAL an isolierten Hundeherzen, seien die potenten Effekte auf das kardiozirkulatorische System (u.a. erhöhte Schlagfrequenz, periphere Vasokonstriktion und Blutdrucksteigerung) durch eine vermehrte myokardiale Bereitstellung von Ca^{2+} erklärbar. Vergleichbar mit der Wirkung der in der Humanmedizin etablierten Digitalisglykoside (Digoxin, Digitoxin) führe dies zu einer erhöhten Schlagfrequenz und myokardialen Kontraktilitätssteigerung (positive Chrono- und Inotropie).[101] Gestützt wird diese Hypothese durch Daten von Gaide et al und Lattanzio et al., die unter Salinomycinexposition eine Natrium- und Calcium-vermittelte Steigerung der linksventrikulären Pumpfunktion, unter anderem aber auch auch proarrhythmogene Effekte am isolierten Kaninchenherzen messen konnten.[100],[102] Im Hinblick auf die initial dargelegten toxischen Effekte von Salinomycin finden sich auch bei der Digitalisüberdosierung phänotypisch vergleichbare kardiopulmonale und neuromuskuläre Nebenwirkungen sowie histopathologisch ähnliche Befunde.[103],[104] Vor dem Hintergrund der teils identischen zellulären Wirkmechanismen der beiden Substanzen mit Einflussnahme auf das intrazelluläre Ca^{2+} -Signaling sowie den $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher sind somit funktionelle Analogien anzunehmen.[102]-[104] Hieraus kann sich im Umkehrschluss eine potenziell additive Toxizität der beiden Substanzen bei zeitgleicher Applikation ergeben, was in weiterführenden pharmakologischen Studien näher zu beleuchten wäre.

Darüber hinaus verdeutlichen die gute Verträglichkeit der 5 mg/kg KG-Dosierung sowie die ausgeprägte Letalität unter 10 mg/kg KG, analog zu den Digitalisglykosiden, die äußerst enge therapeutische Breite von Salinomycin *in vivo*. Zudem lässt die erhebliche Befunddiskrepanz zwischen den beiden Maustämmen (BALB/c und C57BL/6J) die interindividuelle und tierartspezifische Empfindlichkeit gegenüber Salinomycin erkennen, die nicht nur Pferde und Hunde bekanntermaßen besonders sensitiv auf die Substanz reagieren lässt, sondern sich auch innerhalb einer Tierspezies heterogen ausprägen kann.[4],[105],[106]

Organspezifische Langzeitschäden, wie den veterinärmedizinischen Kasuistiken zu entnehmen ist, ließen sich in der vorliegenden Interventionsstudie hingegen in der Dosierung von 5 mg/kg KG SAL sowie einer begleitenden CGP-Behandlung nicht reproduzieren. Sowohl in der Laboranalyse als auch der histologischen Untersuchung der Endorgane finden sich keine wegweisenden Hinweise hinsichtlich funktioneller oder struktureller Schädigungen. Auch vorab publizierte Daten zur toxischen Wirkung von SAL auf mesenchymale Zellen aus humanem Knochenmark, sowie quantitative Veränderungen der Blutzellen konnten wir nicht reproduzieren.[107] Neben

den o.g. Hinweisen auf eine milde Dehydratation in der SAL-Gruppe, bietet sich in der Blutanalyse ein teils heterogenes Bild mit unspezifischen Normwertabweichungen. Dies ist dadurch zu erklären, dass sich in Nagetieren gelegentlich laborchemische Abweichungen erheben lassen, die keinen pathologischen Wert besitzen und durch Handling, Diät, Klima, Entnahmezeitpunkt, sowie Alter und Geschlecht der Tiere erklärbar sind.[108]-[110] Hierdurch wird die Interpretation der isolierten Laborparameter in gewissem Maße limitiert. Eine Wertung der Befunde erfolgte daher in dieser Studie, soweit am Kleintiermodell erkennbar, in Zusammenschau mit dem klinischen Bild. Die hier dargelegten Daten stellen somit lediglich die Basis für weitere Überprüfungen systemischer Interaktionen von SAL anhand geeigneterer (Tier-) Modelle.

Zusammenfassend verdeutlichen unsere Ergebnisse, dass eine Dosierung von 5 mg/kg KG in der Maus systemisch nebenwirkungsarm und gut beherrschbar erscheint. Vor dem Hintergrund der engen therapeutischen Breite der Substanz als auch gravierender Nebenwirkungen bei Überdosierung, erscheint es jedoch unerlässlich, eine Methode zum Monitoring der Plasmaspiegel zu etablieren, um die Sicherheit und therapeutische Wirksamkeit von Salinomycin zu gewährleisten.

Hierzu wurden in einem Teilprojekt grundlegende pharmakologische Daten zu Salinomycin *in vivo* generiert. Pharmakologisch-naiven Tieren wurden dazu SAL-Dosierungen von 5 mg/kg KG und 10 mg/kg KG intraperitoneal appliziert und die Plasmaspiegel zu vorab definierten Zeitpunkten nach Injektion mittels HPLC/Massenspektrometrie untersucht.

Der Berechnung liegt ein offenes Ein-Kompartiment-Modell zu Grunde. Es betrachtet den Organismus als einen einzigen Verteilungsraum (=Kompartiment, hier: Blutplasma) in dem das applizierte Pharmakon wirkt und geht dabei von der Annahme aus, dass der verabreichte Wirkstoff sich unmittelbar und gleichmäßig im untersuchten Kompartiment verteilt. Es ermöglicht eine grob vereinfachte Darstellung der SAL-Pharmakokinetik als Konzentrations-Zeit-Verlaufskurve und eine näherungsweise Abschätzung der systemischen Absorptions- und Eliminationsvorgänge nach einmaliger intraperitonealer Gabe.

Zur Charakterisierung des Absorptionsvorgangs werden in diesem Modell vorrangig die Zeit bis zum Erreichen der Plasmaspitzenkonzentration (t_{max}) und die maximale Plasmakonzentration (C_{max}) betrachtet. t_{max} gilt dabei als Maß für die Absorptionsgeschwindigkeit, da es sich annähernd proportional zur applizierten Dosis verhält und unabhängig von dem verwendeten pharmakologischen Modell ist. Weitergehend wird die integral-basierte Berechnung der bioäquivalenten Wirkstoffexposition (AUC-Wert), die Halbwertszeit ($t_{1/2}$) und der Eliminationsverlauf analysiert.

Unsere Untersuchung verdeutlicht ein rasches systemisches Anfluten (t_{max}) von Salinomycin mit maximalen Plasmaspiegeln (t_{max}) in beiden Dosisgruppen (5 und 10 mg/kg KG SAL) bereits circa

30 Minuten nach intraperitonealer Injektion mit ähnlich ausfallenden Plasmaspitzenkonzentrationen (C_{max}) im niedrig-mikromolaren Bereich. Weiterführend ergaben die Daten für 5 mg/kg KG SAL eine Eliminationshalbwertszeit von 117 Minuten. Die Plasmakonzentrations-Zeit-Kurve weist zunächst eine annähernd lineare, im Verlauf exponentielle Eliminationskinetik auf, worunter für SAL 5 mg/kg KG die Plasmakonzentration nach 24 Stunden unter die Nachweisgrenze gefallen war.

Vergleichbare Daten erhoben Atef et al. nach oraler (Kropf-) Gabe von 20 mg/kg KG SAL an Hühnern. In ihrer Messung boten sich maximale Plasmakonzentrationen ebenfalls 30 Min. nach Applikation bei einer nahezu äquivalenten Plasmahalbwertszeit von 1,96 Std. (entsprechend 117,6 Min.).[111] Neben der raschen systemischen Absorption fällt sowohl in unseren als auch in den Daten von Atef et al. eine relativ kurze terminale Halbwertszeit ins Auge, die sich weiter auch in Ergebnissen von Henri et al. im Vergleich zwischen oraler und intravenöser Applikation an Hühnern widerspiegelt (Plasmahalbwertszeit von 1.33 (oral) bis 1.79 Std. (i.v.), entsprechend 79,8-107,4 Min.).[111], [112] Insgesamt verdeutlichen diese Daten eine rasche systemische Absorption von SAL über alle bisher gezeigten Applikationswege. Es zeigt sich jedoch eine höhere Absorptionsrate nach intraperitonealer als nach oraler Applikation, was an eine vermehrte präsystemische Elimination nach p.o.-Gabe (ausgeprägter hepatischer first-pass-Effekt) denken lässt. Passend hierzu erscheint die systemische Eliminationshalbwertszeit in Kenntnis der Lipophilie der Substanz vergleichsweise kurz, was ebenfalls durch eine schnelle Metabolisierung oder durch distributive Prozesse erklärbar wäre.

Weitergehend fällt auf, dass die Eliminationskinetik in der 10 mg/kg-Gruppe trotz ähnlicher Plasmaspitzenkonzentrationen protrahierter verläuft. Hier ist zu erkennen, dass mit Erhöhung der Dosis neben der überproportionalen Zunahme der absoluten Wirkstoffexposition (AUC) auch die Halbwertszeit eine Konzentrations- bzw. Dosisabhängigkeit - ähnlich einer enzymatischen Sättigungskinetik - entwickelt. Die Hypothese verdichtet sich anhand einer Arbeit von Resham et al., in der dargelegt wird, dass SAL einer hohen intrinsischen Clearance unterliegt und in der Leber schnell enzymatisch in mono-, di- und trihydroxylierte Derivate metabolisiert wird.[113]

In diesem Zusammenhang beschreiben die Autoren erstmals die vorrangige Verstoffwechslung von Salinomycin über den hepatischen CYP3A4-Enzymkomplex und konnten eine inhibitorische Wirkung der Substanz auf CYP2D6 identifizieren.[113], [114]

Die protrahierte Elimination in der 10 mg/kg KG-Gruppe ließe sich somit möglicherweise über eine enzymatische Sättigungskinetik begründen. Alternativ wären, vor dem Hintergrund der Lipophilie, distributive Prozesse in andere Kompartimente zu diskutieren, was jedoch mittels des hier angewandten Ein-Kompartiment-Modells nicht zu erfassen ist.

Ferner erscheint das Volumen der terminalen Eliminationsphase (6,85 l/kg für 5 mg/kg KG SAL) in Anbetracht der lipophilen Eigenschaften von Salinomycin vergleichsweise gering, was eine hohe Plasmaproteinbindung der Substanz vermuten lässt. Dieses Phänomen konnte jüngst auch in der Untersuchung von Resham et al. belegt werden.[113] Die starke Bindung von SAL an Plasmaproteine ist insofern von übergeordneter Bedeutung für ein umfassendes therapeutisches Monitoring, da die gebundene Arzneimittelfraktion für gewöhnlich pharmakologisch inaktiv ist. Bei Plasmakonzentrationen im oberen therapeutischen Bereich kann es jedoch zu einer Absättigung der Bindungsstellen an Plasmaproteine kommen, was eine steigende Wirkstoffkonzentration im Blut mit Zunahme der freien (aktiven) Arzneimittelfraktion zur Folge hat.[115] Ferner bleibt auch die Bedeutung der hohen Proteinbindung für die hepatische Metabolisierung und deren Einfluss auf die Plasmaclearance sowie die lokale Toxizität von Salinomycin in der Niere bei Abfiltration des Serum-Albumins in der Bowman-Kapsel weiter zu beleuchten.

Bei bekannter, vorwiegend hepatischer Metabolisierung, konnte vorab bereits gezeigt werden, dass SAL zu 90% hepatobiliär über die Fäkalien, zu lediglich 5% renal und zu marginalen Anteilen mit der Ausatemluft ausgeschieden wird. Im kurzfristigen Zeitfenster von 48-72 Stunden nach oraler Gabe fanden sich in Radiocarbon-Messungen mit ¹⁴C-markiertem SAL (mit radioaktivem Kohlenstoff markiertes Salinomycin) zudem signifikante Substanzrückstände in Leber, Niere, Muskel und Fettgewebe, Herz und Haut, was sich ebenfalls auf die Lipophilie von SAL zurückführen ließe.[114] Interessanterweise konnten ZNS-Rückstände, trotz der lipophilen Struktur, bis dato nicht nachgewiesen werden. In diesem Zusammenhang spielen möglicherweise spezifische Resistenzmechanismen der Blut-Hirn-Schranke eine Rolle, für deren genauere Beschreibung es weiterer präklinischer Studien bedarf.

Unsere Daten zeigen zusammenfassend, dass Salinomycin nach intraperitonealer Gabe rasch systemisch absorbiert wird und eine Dosis von 5 mg/kg KG in der Maus nach ca. 30 Minuten Plasmaspitzenkonzentrationen im niedrig-mikromolaren Bereich erreicht. Salinomycin unterliegt aufgrund seiner ausgeprägten Lipophilie einer hohen Plasmaproteinbindung, was hinsichtlich der systemischen Steuerbarkeit von Salinomycin, insbesondere vor dem Hintergrund der engen therapeutischen Breite, berücksichtigt werden sollte. Gleichzeitig ist bekannt, dass die Affinität zur Bindung von SAL an humane Plasmaproteine deutlich geringer ausfällt als in murinem Blutplasma, was bezüglich der Translation der Substanz in die Humanmedizin von Bedeutung ist.[113] Die Metabolisierung erfolgt in erster Linie rasch enzymgebunden in der Leber; der vergleichsweise kurze Eliminationsvorgang weist jedoch eine nicht zu unterschätzende Dosisabhängigkeit auf. Darüber hinaus bleiben primär distributive Prozesse aufgrund des hier verwendeten Ein-Kompartiment-Modells zunächst unklar. Belegt sind jedoch SAL-Rückstände in

diversen Organsystemen bis zu drei Tage nach systemischer Aufnahme, was hinsichtlich in der Evaluation alternativer Applikationsformen und Dosisregimes beachtet werden sollte. Im Hinblick auf die hohe Plasmaproteinbindung und die vorrangig hepatische Metabolisierung bedarf es weiterführender präklinischer Studien sowohl zur Evaluation von Wechselwirkungen mit enzymatisch konkurrierenden Wirkstoffen und inhibitorisch agierenden Substraten als auch zur Einschätzung der Bedeutung einer Leber- und Niereninsuffizienz.

Grundsätzlich ermöglicht die Ein-Kompartiment-Analyse methodenbedingt jedoch nur eine grob vereinfachte Darstellung pharmakodynamischer Vorgänge, sodass an dieser Stelle nur eine näherungsweise Beschreibung der SAL-induzierten Kinetik erfolgen kann. Eine substanzielle Datenextrapolation vom Tier zum Menschen ließe sich in anknüpfenden pharmakologischen Studien unter Hinzunahme von Multi-Kompartiment-Modellen durchführen, was für die weitere Evaluation von Salinomycin hinsichtlich eines Einsatzes in der Humanmedizin unerlässlich ist. Die Hochdruck-Flüssigkeitschromatografie und Tandem-Massenspektrometrie bietet hierfür eine vergleichsweise einfach durchführbare und zuverlässige Methode, anhand derer zudem ein therapeutisches Monitoring von Salinomycin-Plasmaspiegeln im hoch-nanomolaren bis niedrig-mikromolaren Bereich möglich ist.

4.3 Tiermodell der Salinomycin-induzierten Neuropathie und Intervention mit CGP-37157

Aufbauend auf vorangegangenen *in vitro*-Untersuchungen dieser Arbeitsgruppe zu Ca^{2+} -vermittelter Neurotoxizität von SAL sowie den Erkenntnissen der Dosisfindungsstudie wurde in der vorliegenden Interventionsstudie ein Polyneuropathie-Tiermodell für Salinomycin mit einer systemisch gut tolerierten Dosierung (5 mg/kg KG) etabliert sowie ein neuroprotektiver Ansatz getestet. [80]

Im Gegensatz zu dem aus der vorangegangenen Dosisfindungsstudie nicht abzuleitenden systemischen Nebenwirkungsprofil (siehe Kap. 4.1), boten sich in diesem Teilprojekt mitunter markante, vorwiegend sensible peripher-neurologische Defizite. In der Summe der Befunde ließ sich ein in Teilaspekten von Van Der Linde-Sipman et al. und Pakozdy et al. vorbeschriebenes neuropathisches Muster nachvollziehen und die Ausprägung einer sensorischen, vorwiegend axonalen Polyneuropathie unter therapeutischer Salinomycin-Langzeittherapie beschreiben. [69], [73] Zudem konnten wir, aufbauend auf einem vorab identifizierten neuronalen Wirkmechanismus, demonstrieren, dass sich die Salinomycin-induzierte Neuropathie mittels spezifischer pharmakologischer Inhibition des mitochondrialen NCX mit CGP-37157 partiell reduzieren lässt. [80], [81]

Grundlegende Stärken der hier vorgestellten Arbeit liegen in dem zweiphasigen Studiendesign,

sowie der multimodalen methodischen Konzeption der Interventionsstudie unter Integration wesentlicher Komponenten der CIPN-Diagnostik. Durch statistische Einbeziehung der Ergebnisse der Dosisfindungsstudie in die Poweranalyse konnte in Anlehnung an das 3R-Konzept (Richtlinie 2010/63/EU) die Versuchstierzahl der Interventionsstudie auf ein Minimum reduziert werden. Entscheidend für verwertbare Resultate im Tiermodell ist in erster Linie eine Reduktion der Stressfaktoren für die Versuchstiere. Dies beinhaltet neben der Auswahl geeigneter Testmethoden anhand zuvor festgelegter Outcome-Parameter auch ein möglichst minimales Handling der Versuchstiere. Auch Faktoren wie Über- oder Untergewicht, eine physische Erschöpfung der Tiere, erlerntes Fehlverhalten oder das „Über-Training“ im Sinne einer Gewöhnung der Tiere an die Untersuchungsumgebung sind potenziell interferierende Variablen, die in der vorliegenden Arbeit durch eine standardisierte Vorbereitung in Anlehnung an Referenzarbeiten und durch störungsfreie Untersuchungsabläufe minimiert wurden. Die laborchemischen und histologischen Analysen ergänzen das am Kleintier äußerlich nur eingeschränkt beurteilbare Nebenwirkungsprofil und ermöglichen eine erste Risikostratifizierung unter therapeutischer Salinomycintherapie *in vivo*. Darüber hinaus lässt das Studiendesign nicht nur Vergleiche zwischen den Substanzkombinationen als auch den Bezug zu einer unbehandelten Kontrollgruppe zu, sondern erlaubt auch partielle Vergleiche mit der Datenlage zu CIPN-Tiermodellen.

Phänotypisch führend zeigten sich in unserer Untersuchung eine distal betonte, sensible Neuropathie mit einer früh einsetzenden Kälteallodynie sowie einer fortschreitenden, mechanischen Allodynie. Darüber hinaus ergaben sich subtile Veränderungen des Gangbilds mit einer isoliert distalen Manifestation in den Hinterläufen der Tiere. Eine motorische Komponente zeigte sich nicht.

Mit der Entwicklung einer Allodynie auf taktile Stimuli sowie thermische Reize ergeben sich unter Salinomycin-Langzeittherapie typische Kennzeichen Zytostatika-assoziiierter Neuropathien.[117] Auffällig erscheint in unserer Untersuchung vor allem die vergleichsweise früh und fulminant einsetzende Kälteallodynie sowie die qualitativen Veränderungen dieser im zeitlichen Verlauf der Studie. Interessant erscheint zudem die zeitliche Verzögerung der Manifestation der mechanischen Allodynie. Die SAL-Tiere (SAL/VEH) demonstrierten bereits am mittleren Messzeitpunkt deutliche Veränderungen im Cold Plate-Test, während sich in der Untersuchung der Mechanosensibilität (Von Frey-Test) allenfalls Tendenzen, jedoch noch keine statistisch signifikanten Unterschiede abbilden ließen. Eine substanzielle Vergleichsbasis bieten an dieser Stelle vorangegangene *in vivo*-Daten dieser Arbeitsgruppe, in der Boehmerle et al. methodisch einheitlich den CIPN-Phänotyp vier klassischer Zytostatika (Paclitaxel, Vincristin, Cisplatin, Bortezomib) in therapeutischer Humanäquivalenzdosis in der C57Bl6/-Maus untersuchten.[117]

Neben dem murinen Genotyp sind insbesondere ihre Methodenauswahl und Testdurchführung der vorliegenden Studie überwiegend identisch, was eine gute Vergleichbarkeit ermöglicht. Hier bestätigt sich die relativ zu Paclitaxel, Vincristin und Bortezomib zeitlich etwas verzögerte Manifestation der mechanischen Allodynie unter der hier getesteten SAL-Dosierung.

Auffällig ist zudem, dass sich für die mechanische Allodynie unter SAL in dem hier gewählten Zeitraum ein konstantes Fortschreiten beobachten ließ, während sich in der Untersuchung der Thermosensibilität in der SAL/VEH-Gruppe initial eine intensive Kälteallodynie manifestiert, die zum späten Messzeitpunkt in eine bemerkenswerte Hyp- bis Anästhesie umschlug. Letzteres lässt sich zunächst nicht durch ein Habituations-, oder ein stressinduziertes Verhalten erklären, da die Versuchstiere weder Anzeichen einer Distress-Situation erkennen ließen, als auch die Tiere der anderen Versuchsgruppen (SAL/CGP, CGP/VEH, VEH/VEH) zum gleichen Untersuchungszeitpunkt unveränderte Reaktionsmuster auf den Stimulus boten. Die Befunde suggerieren folglich SAL-induzierte Schädigungen auf zellulärer Ebene, was sich auch in der ergänzenden immunhistochemischen Untersuchung der TRPM8-Kanalexpression in den lumbalen sensiblen Spinalganglienneuronen der Versuchstiere bestätigte (nicht Teil dieser Arbeit, vergl. anteilige Publikation [95]).

Grundsätzlich erinnert v.a. die initiale Kälte-Hyperalgesie unter SAL an den neuropathischen Phänotyp der Platin-Komplexe. Insbesondere Cis- und Oxaliplatin bieten, in Abhängigkeit von Dosierung und Applikationsschema, in verschiedenen murinen Tiermodellen als auch im klinischen Kontext eine frühe, stark ausgeprägte Kälteallodynie sowie eine zeitlich versetzte Manifestation der mechanische Allodynie. [118]-[123] Ferner ist auch die hier gezeigte auffällige Verlaufsform der SAL-induzierten Kälteallodynie jener unter platinhaltigen Substanzen ähnlich: so beschreiben Ta et al. und Coriat et al. in ihren Beobachtungen unter Cis- und Oxaliplatin-Langzeittherapie im Tiermodell einen vergleichbaren Verlauf mit einer initialen Hyperalgesie sowie dem Umschlag in einen hypo- bis analgetischen Phänotyp.[118],[121] Limitierend in der Dateninterpretation und -vergleichbarkeit erscheint jedoch die bekannte, ausgeprägte Dosisabhängigkeit der platinhaltigen Substanzen, was dazu führt, dass sich unter abweichenden Dosierungen und zeitlichen Applikationsregimes teils deutlich divergierende phänotypische Befunde ergeben.[124] An dieser Stelle wären weitere tierexperimentelle Studien unter alternativen SAL-Dosierungen nötig, um eine Abhängigkeit des neuropathischen Phänotyps von Dosierung und zeitlichem Dosisregime zu evaluieren.

Hinsichtlich der Prävention der Allodynie ergibt sich aus unseren Daten bezüglich der mechanischen Allodynie kein anhaltender neuroprotektiver Effekt der additiven Therapie mit CGP in dem hier festgelegten zeitlichen Rahmen. Die Cold Plate-Daten verdeutlichen jedoch, dass die SAL/CGP-Tiere zwar - analog zu den SAL-Tieren - eine Kälteallodynie entwickeln, der zeitliche

Verlauf unter CGP jedoch verzögert imponiert. Inwiefern die SAL/CGP-Tiere zu einem noch späteren Zeitpunkt, wie unter SAL-Monotherapie, ebenfalls unempfindlich dem Stimulus gegenüber werden, bleibt offen. Die hier dargestellten Ergebnisse lassen möglicherweise eine lediglich protrahiert verlaufende Entwicklung der SAL-induzierten Veränderungen der Thermosensibilität unter CGP-Protektion vermuten. Es ist anzunehmen, dass CGP auch in dieser Modalität keinen nachhaltigen Schutz vor der Ausprägung einer SAL-Neuropathie bietet, sondern den Entwicklungsprozess lediglich hinauszögert. Vor dem Hintergrund der auffälligen Verlaufsform der Kältesensibilität als auch einigen veterinärmedizinischen Berichten, die mitunter von einer Reversibilität der SAL-induzierten neuropathischen Symptome zeugen, wäre ein längerer Beobachtungszeitraum interessant.[3]

Grundsätzlich limitierend in der Tiermodell-basierten Erforschung sensibler Phänomene ist, dass anhand der Bestimmung von thermischen oder mechanozeptiven Reizschwellen stets eine kombinierte sensorische und motorische Reaktion auf einen von extern applizierten Stimulus bewertet wird. Liegt eine begleitende Läsion auf motorischer Ebene vor, ist eine Verfälschung der sensiblen Reizschwelle durch die gestörte motorische Reaktionskomponente naheliegend. Eine zeitgleiche Testung auf motorische Defizite, beispielsweise anhand der RotaRod-Testung, erscheint daher unerlässlich. Zudem bieten die o.g. Verfahren lediglich die Evaluation artifiziell provozierter Schmerzphänomene. Spontane Sensationen, wie sie im klinischen Alltag häufig beobachtet werden, können hierüber nicht abgebildet werden.

An dieser Stelle liefert der `Catwalk` eine gute methodische Ergänzung. Die Untersuchung bietet in der tierexperimentellen Gangbildanalyse den entscheidenden Vorteil, dass die Interaktion des Untersuchers mit dem Versuchstier auf ein Minimum reduziert wird. Dies erlaubt eine bedeutende Stressreduktion für die Versuchstiere, was eine nahezu vollständige Elimination der potenziell beeinflussenden Variable bedeutet. Darüber hinaus wird die Detektion spontaner, nicht nur provozierter Reaktionsmuster ermöglicht und durch die computerbasierte Analyse wird zudem eine verbesserte Objektivität der Ergebnisse erzielt.[125] Der Catwalk ermöglicht somit in Zusammenschau mit spezifischen sensomotorischen Funktionstestungen eine sinnvolle Ergänzung hinsichtlich der Erforschung subtiler Gangbildveränderungen sowie Spontansensationen, was bereits erfolgreich in der tiermodellbasierten Forschung zu unilateralen Nervenläsionen, inflammatorischen Neuropathien und jüngst auch zu der Zytostatika-induzierten Polyneuropathie gezeigt werden konnte.[87],[126],[127]

Auch die SAL-induzierte mechanische Allodynie spiegelt sich in den Catwalk-Ergebnissen wieder: unsere Daten der Hinterpfoten-Analyse zeigen für die SAL-Tiere eine signifikante Reduktion des duty cycle-Parameters. Als prozentualer Anteil am gesamten Bewegungsablauf

(Stand- und Schwungphase) repräsentiert der duty cycle den „Schwunganteil“. Eine Verkürzung der Schwungphase bedeutet zunächst einen insgesamt räumlich verkürzten Gangzyklus, was sich im Sinne eines trippelnd anmutenden Gangbilds interpretieren lässt. Diesen Phänotyp boten in der vorliegenden Arbeit sowohl die SAL-Tiere, als auch die SAL/CGP-Gruppe, wenngleich keine statistische Signifikanz im Vergleich der beiden Gruppen erreicht werden konnte. Hierzu passt die zeitgleiche Verminderung der „print area“ (=Hinterpfotenabdruck) der SAL- sowie geringer ausgeprägt der SAL/CGP-Tiere, was o.g. trippelnde, dem menschlichen Zehengang ähnelnde Bewegungscharakteristik unterstreicht.

Huehnchen et al. etablierten die Catwalk-Testung im Bereich der experimentellen CIPN-Diagnostik anhand eines Paclitaxel-Mausmodells. Ihre Befunde unter Langzeittherapie mit Paclitaxel bieten mit unseren Daten vergleichbare, distal-betonte subtile Gangbildveränderungen. [87] Unsere Daten suggerieren, dass die Versuchstiere eine Tendenz zur Vermeidung von langem Bodenkontakt und voller Gewichtsbelastung der betroffenen Pfoten ausbilden, was sich, vergleichbar mit o.g. Paclitaxel-Daten, einem sensibel-neuropathischen Phänotyp zuordnen lässt. Hervorzuheben ist, dass sich unter additiver CGP-Therapie eine signifikant geringere Dynamik der Veränderung des „print area“-Werts im Vergleich zur SAL-Monotherapie ausprägte, was eine partiell-neuroprotektive Wirkung durch CGP erkennen lässt.

Ferner verdeutlichen die Catwalk-Daten die CIPN-typische Längenabhängigkeit des neuropathischen Schädigungsmusters. Das distal betonte, symmetrische Verteilungsmuster in den hinteren Extremitäten der Versuchstiere entspricht der charakteristischen Erstmanifestation der neuropathischen Schäden an den Enden der längsten Axonausläufer.

In Anbetracht der Fallberichte allerdings wäre eine deutlichere motorische Komponente des neuropathischen Phänotyps von SAL zu erwarten gewesen. Der entsprechende RotaRod-Test verblieb allerdings durchweg unauffällig, sodass unter der gewählten Dosierung von 5 mg/kg KG in dem hier etablierten Tiermodell von einer rein sensiblen Neuropathie mit kritischen Beeinträchtigungen der Kältesensibilität und der Mechanozeption auszugehen ist.

Die Substanz ordnet sich damit phänotypisch den klassischen Zytostatika wie Paclitaxel und Cisplatin zu. Inwiefern unter abweichenden Dosierungen, zeitlichen Applikationsschemata, einem längeren Beobachtungszeitraum oder einer SAL-Kumulativedosis mit motorischen Defiziten zu rechnen ist, bleibt offen. Zudem wäre, insbesondere vor dem Hintergrund der bekannten stark-monoaminergen Wirkkomponente, auch eine gezielte Evaluation autonomer Symptome anhand weiterführender Studien wichtig.

O.g. Befunde verdeutlichen, dass die isolierte Interpretation verhaltensanalytischer Daten zur Charakterisierung einer Neuropathie im Kontext der auffälligen Heterogenität der CIPN-

Datenlage Limitationen besitzt. Ein zentrales Problem ist neben der Auswahl der geeigneten Testmethoden auch, dass für gewöhnlich isolierte Verhaltenstestungen durchgeführt werden. Nur wenige Studienansätze kombinieren Verhaltenstestungen unterschiedlicher Modalitäten oder integrieren ENG-Messungen. Darüber hinaus mangelt es an einheitlichen Festlegungen hinsichtlich der follow up-Untersuchungszeitpunkte nach Bestimmung der Baseline-Werte, sowie an standardisierten Vorgehensweisen in der histopathologischen Aufarbeitung.[30], [31]

Analog zu dem Vorgehen in der Humanmedizin liefert die Hinzunahme der Elektrophysiologischen Untersuchung (ENG) hierergänzende objektive Daten zur Funktion peripherer Nerven als auch spezifischer neuropathischer Schädigungsmuster und erscheint vor dem Hintergrund einer substanziellen Translatierbarkeit der tierexperimentellen Daten essenziell. Der Schwanznerv bietet hierzu in murinen Tiermodellen einen gut zugänglichen, vergleichsweise frühen Manifestationsort neuropathischer Läsionen.[128],[129] Die ENG besitzt grundsätzlich eine gute Sensitivität und Spezifität, wenn ein vorwiegende axonale Beteiligung oder Degeneration dick myelinisierter Axone vorliegt. Limitationen besitzt die Methodik in frühen Phasen der CIPN oder der vorwiegenden Schädigung dünner, unmyelinisierter Axone. Zudem unterliegen die Messergebnisse einem gewissen Einfluss der Temperatur, der in der vorliegenden Untersuchung jedoch durch Hinzunahme einer Rotlicht-Wärmelampe ausgeglichen wurde. Diese Angabe fehlt in anderen Studien allerdings häufig, was sich mitunter limitierend auf eine Vergleichbarkeit auswirken kann.[130]

Unter Salinomycin-Langzeittherapie mit 5 mg/kg KG ergab sich in der Interventionsstudie in erster Linie eine signifikante Reduktion der Amplitude des sensiblen Nervenaktionspotenzials (SNAP), was mit einem vorwiegend axonalen Schädigungsmuster korreliert. Die geringfügige Reduktion der Nervenleitgeschwindigkeit in der SAL/VEH-Gruppe zum späten Messzeitpunkt könnte eine begleitende demyelinisierende Komponente suggerieren, ist hier jedoch durch die führende Degeneration dick myelinisierter Axone zu erklären, wie sich in einer weiterführenden Nervenmorphometrie darstellte (nicht Teil dieser Arbeit, vergl. anteilige Publikation [95]). Die elektrophysiologischen Veränderungen manifestieren sich zudem, relativ zu den phänotypischen Veränderungen sowie in Anbetracht von ENG-Daten aus anderen CIPN-Tiermodellen, exemplarisch für Suramin [131] und Bortezomib [132], vergleichsweise früh. Bereits zum mittleren Messzeitpunkt ließen sich in unserer Studie Signifikanzen ableiten, was zu dem führenden Untergang dick myelinisierter Axone mit entsprechend frühen ENG-Veränderungen passen würde. Elektrophysiologisch weist Salinomycin somit, analog zu seinem phänotypischen Muster, typische CIPN-Charakteristika auf und bietet hinsichtlich seines Manifestationsverhaltens zeitliche und qualitative Analogien zu dem der klassischen Zytostatika. [117] Entgegen der für die

humanen Äquivalenzdosierung von Paclitaxel, Cisplatin, Vincristin und Bortezomib in der C57BL6/J-Maus gezeigten zusätzlichen Verlangsamung der NLG, bietet sich für SAL in der hier untersuchten Dosis nur eine marginale, a.e. sekundär durch den Verlust dick myelinisierter Axone bedingte Reduktion der Nervenleitgeschwindigkeit. [117],[132],[133]

Hervorzuheben ist zudem, dass sich in den Tieren, die eine Mitbehandlung mit CGP erfuhren, zum abschließenden Messzeitpunkt eine geringere Reduktion des SNAP erkennen lässt, was mit der phänotypisch beschriebenen, partiellen Protektion der SAL-induzierten Neuropathie durch CGP korreliert.

Nicht zu vernachlässigen ist jedoch, dass in der Erstbeschreibung der SAL-Neuropathie durch Van Der Linde-Sipman et al. an SAL-intoxikierten Katzen anhand von (histo-)morphologischen Kriterien das Bild einer sensomotorischen, axonalen und teils demyelinisierenden Neuropathie beschrieben wird. [69] In Anbetracht des hier abzuleitenden, vorwiegend axonalen Schädigungsmechanismus bleibt offen, ob sich im weiteren zeitlichen Verlauf oder unter abweichenden SAL-Dosierungen Veränderungen der Nervenleitgeschwindigkeit als Korrelat einer demyelinisierenden Komponente manifestieren. Pathophysiologisch erscheint dies vor dem Hintergrund der eingangs beschriebenen Wirkmechanismen von SAL auf DRG und Schwann'sche Zellen zumindest nicht unwahrscheinlich. [80] Demgegenüber zeigen Pakozdy et al. in Ihrer ENG-basierten Studie der SAL-Neuropathie (ebenfalls an intoxikierten Katzen) zudem ein markantes motorisches Läsionsmuster ohne Veränderungen des SNAP, das sich klinisch als Parese bzw. Paraplegie der Tiere darstellte.[73] Diese Konstellation unterstreicht die Beobachtungen der veterinärmedizinischen Fallstudien hinsichtlich eines weitreichenden neuro- und myopathischen Nebenwirkungsspektrums von Salinomycin in höheren Dosierungen, das sich in der hier gewählten therapeutischen Dosierung jedoch nicht manifestiert. In Anbetracht dieser Daten sowie vor dem Hintergrund der bekannten gravierenden Myotoxizität der Ionophoren-Antibiotika, erscheinen ergänzende Studien zur Detektion subtiler Veränderungen der motorischen Nervenfunktion und Muskulatur von Interesse.

Neben den bekannten Outcome-Unterschieden in Abhängigkeit von externen Faktoren wie Dosierung, Applikationsschema und der Auswahl der geeigneten Untersuchungsmethoden ergeben sich aus den Daten von Pakozdy et al. und Van der Linde-Sipman et al. zudem erneut Hinweise auf die tierartspezifische, unterschiedliche Ausprägung des CIPN-Nebenwirkungsprofils. Dies stellt ein zentrales Problem der präklinischen, tiermodellbasierten Neuropathieforschung dar. Jüngere Daten von Leandri et al. vertiefen diese Problematik anhand eines Paclitaxel-Tiermodells. So stellten sie im direkten Vergleich einer äquivalenten Paclitaxel-Dosierung in zwei verschiedenen Mausstämmen (C57BL/6J- und DBA2J-Stamm) signifikante

Unterschiede in der motorischen Leistung zwischen den beiden Zuchtlinien fest. Während die C57BL/6J-Maus unter der gewählten Paclitaxel-Dosierung keinen relevanten neuropathischen Phänotyp entwickelte, bot die DBA2J-Maus eine markante motorische Neuropathie. Zudem ergaben sich korrelierende Befunde in den neurophysiologischen Untersuchungen der Studie, was divergierende Manifestationsmuster in Abhängigkeit von dem genetischen Hintergrund der Versuchstiere suggeriert.[129] In der Literatur finden sich stützende Daten von Smith et al., ebenfalls aus einer vergleichenden Untersuchung eines Paclitaxel-Tiermodells an 10 verschiedenen Mausstämmen, in der sich teils deutlich unterschiedliche Ausprägungen einer mechanischen Allodynie je nach murinem Genotyp boten.[134] Der C57BL/6J-Stamm erwies sich dabei als „low allodynic strain“, also als vergleichsweise wenig empfindlich der Entwicklung einer mechanischen Allodynie gegenüber, während andere Zuchtlinien (z.B. DBA/2J) niedrige nozizeptive Schwellenwerte aufwiesen. Weitere Arbeiten zu Nozizeption und variablen CIPN-Phänotypen anhand muriner Tiermodelle unterstreichen die nicht zu unterschätzende Abhängigkeit der Nozizeption von dem genetischen Hintergrund und zeigen ebenfalls nozizeptive Differenzen bei Alter und Geschlecht der Versuchstiere auf.[135]-[137]

Im Bezug auf den Phänotyp der SAL-Neuropathie wurde bereits gezeigt, dass die in der vorliegenden Arbeit gewählte i.p.-Dosierung von 5 mg/kg KG in der BALB/c-Maus neben einer signifikant höheren Mortalität auch ein vorwiegend motorisches Schädigungsmuster induziert, was hinsichtlich weiterführender tierexperimenteller Studien zu SAL zu berücksichtigen ist.[4] Aus den o.g. Daten lässt sich schlussfolgern, dass, soweit verfügbar, in der Generierung und Interpretation tierexperimenteller Daten stets Vergleiche mit Genotyp-äquivalenten Tiermodellen angestrebt werden sollten. Inwiefern sich hieraus ein Einflussfaktor auf die Translation tiermodell-basierter Studienergebnisse in die Humanmedizin ergibt, bleibt zu beleuchten.

Zusammenfassend zeigt sich in unserem murinen Tiermodell in der C57BL/6J-Maus unter Langzeittherapie mit Salinomycin das Bild einer subakut-chronischen, distal-betonten, axonalen, sensiblen Neuropathie. Als klinisch führend erwies sich eine ausgeprägte mechanische und Kälte-Allodynie sowie subtile Alterationen des Gangbilds. Die pharmakologische Prävention der SAL-induzierten Neuropathie durch selektive Inhibition des mitochondrialen NCX mit CGP-37157 ermöglicht sowohl auf phänotypischer als auch elektrophysiologischer Ebene eine partielle Neuroprotektion.

In dieser Arbeit wurden zudem zentrale Problempunkte hinsichtlich der Interpretation tierexperimenteller Arbeiten mit dem isolierten Endpunkt ‚Verhalten‘ identifiziert. Zur umfassenden Charakterisierung neuropathischer Phänomene sollte ein Untersuchungsansatz mit vorab festgelegten Endpunkten und selektierten Verhaltenstestungen erfolgen. Neben rein

verhaltensbasierten Interpretationen sollten zudem die Endpunkte Histologie und Elektrophysiologie hinzugezogen werden. Hinsichtlich der aktuell limitierten Vergleichbarkeit tiermodellbasierter Studien ist zudem die außergewöhnliche Abhängigkeit des neuropathischen Phänotyps von Dosierung und Applikationsschema sowie dem Alter, Geschlecht und Genotyp der Tiere zu beachten. Hier schließt sich die dringende Notwendigkeit zur Festlegung einheitlicher methodischer und diagnostischer Standards und zur Definition konsensueller Interpretationsleitlinien an.

4.4 Zusammenfassung und Ausblick

Die vorliegende Arbeit liefert grundlegende pharmakologische Daten zu Salinomycin und eine tiermodellbasierte, phänotypische und elektrophysiologische Charakterisierung der Salinomycin-induzierten Neuropathie. Laborchemische und histologische Daten ergänzen das systemische Nebenwirkungsprofil der Substanz unter Langzeittherapie. Ausgehend von vorangegangenen *in vitro*-Ergebnissen dieser Arbeitsgruppe, die die kritische Stellung der intrazellulären Calciumhomöostase in der Genese der SAL-induzierten Neuropathie identifizieren konnten, gelang in dieser Arbeit ein translationaler Ansatz einer wirksamen und sicheren neuroprotektiven Behandlungsoption durch die gezielte mitochondriale NCX-Blockade mit CGP-37157. Zudem konnte mittels Hochdruck-Flüssigkeitschromatografie und Tandem-Massenspektrometrie eine verlässliche Methode zum pharmakologischen Monitoring von SAL-Plasmaspiegeln *in vivo* demonstriert werden. Die in dieser Arbeit erhobenen pharmakokinetischen Daten liefern einen orientierenden Überblick und stellen die Basis für weiterführende *in vivo*- und *in vitro*-Studien zu Salinomycin. Dabei sollte beachtet werden, dass der zytotoxische Effekt von Salinomycin bereits in niedrig-mikromolaren Konzentrationen in Erscheinung tritt, die Substanz einer engen therapeutischen Breite sowie einer raschen systemischen Elimination durch eine vorwiegend hepatische Metabolisierung unterliegt. Eine Langzeittherapie mit SAL in einer Dosierung von 5 mg/kg KG ist in der C57Bl6/J-Maus systemisch nebenwirkungsarm, sie induziert jedoch eine subakut-chronische, vorwiegend axonale, sensible Polyneuropathie. Eine Dosis von 10 mg/kg KG sollte im Mausmodell aufgrund einer nicht kalkulierbaren systemischen Toxizität vermieden werden.

Salinomycin wurde seit seiner Entdeckung Ende der Siebziger Jahre für mehr als drei Jahrzehnte als antimikrobiell-wirksamer Futtermittelzusatzstoff und Mastverstärker in Nutztieren angewandt. Vor dem Hintergrund einer nicht zu unterschätzenden Toxizität der Substanz in Säugetieren und Geflügel, erschien ein therapeutischer Einsatz des Wirkstoffs in der Humanmedizin zunächst nicht von Interesse. Im Jahr 2009 zeigte eine Studie der Arbeitsgruppe um P. Gupta vom Broad Institute des MIT (Massachusetts Institute of Technology) und der Harvard University, dass Salinomycin in Lage ist, im Mausmodell selektiv Tumorstammzellen, sowie Chemotherapie-resistente Mammakarzinomzellen zu eliminieren.[1] Eine sich daran anschließende Untersuchung konnte aufzeigen, dass Salinomycin in Tumorzellen mit breiter, multimodaler Chemoresistenz eine fulminante Apoptose induziert und effektive Resistenzmechanismen der Zellen überwindet.[44] 2010 wurde dann im Kontext einer klinischen „first in man“-Pilotstudie eine erstmalige therapeutische Verwendung von Salinomycin in der Humanmedizin initiiert. Dabei wurden selektierte, als „austherapiert“ geltende Patientinnen mit metastasiertem, Hormonrezeptor-

negativem, invasiv-duktalem Mammakarzinom oder Plattenepithelkarzinom der Vulva mit Salinomycin behandelt. Die Patientinnen erhielten eine intravenöse Dosis von 200-250 µg/kg Körpergewicht jeden zweiten Tag zu insgesamt 12 Zyklen (24 Tage), was etwa der Hälfte der menschlichen Äquivalenzdosis der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Dosierung entspricht. In allen publizierten Fallstudien konnte unter Salinomycin allein oder in Kombination mit gängigen Chemotherapeutika, eine signifikante Regression der Tumormasse als auch der Serum-Tumormarker erreicht werden. Dabei wurde lediglich ein mildes Nebenwirkungsspektrum mit Tachykardie und einem Tremor der Hände beobachtet. Gravierende Nebenwirkungen, wie sie unter Therapie mit gängig eingesetzten Zytostatika häufig beobachtet werden, konnten in diesen Einzelfällen nicht festgestellt werden.[138]

Zurzeit sind die zytostatischen Mechanismen von Salinomycin noch nicht eingehend verstanden. Insbesondere die Wirksamkeit der Substanz auf Tumorstammzellen steht im Fokus weltweiter wissenschaftlicher Bemühungen. Die Beeinflussung der zellulären Wnt-Signalkaskaden sowie die Induktion von epithelialen Differenzierungsprozessen in Tumorzellen und Tumorstammzellen konnten einige Arbeiten bis dato als zentrale Elemente der SAL-induzierten zellulären Signalkaskaden charakterisieren. Salinomycin lässt somit nicht nur auf eine multimodale, d.h. alle Zellsubtypen eliminierende Tumorthapie und den Schluss der „Stammzell-Lücke“ konventioneller Zytostatika hoffen; die additive Gabe von Salinomycin könnte zudem eine signifikante Dosisreduktion gängiger Substanzen ermöglichen. Hierunter ließe sich ggfs. auch auf eine Minderung der markanten systemischen und neurologischen Nebenwirkungen zytostatischer Therapien hoffen. Inwieweit sich eine erfolgreiche „bench to bedside“-Entwicklung der Substanz nachvollziehen lässt, bleibt zu erwarten.

VII. Literaturverzeichnis

- [1] P. B. Gupta, T. T. Onder, G. Jiang, K. Tao, C. Kuperwasser, R. A. Weinberg, and E. S. Lander, 'Identification of selective inhibitors of cancer stem cells by high-throughput screening.', *Cell*, vol. 138, no. 4, pp. 645–59, Aug. 2009.
- [2] M. Mitani, T. Yamanishi, Y. Miyazaki, and N. Otake, 'Salinomycin effects on mitochondrial ion translocation and respiration.', *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 9, pp. 655–660, 1976.
- [3] P. Story and A. Doube, 'A case of human poisoning by salinomycin, an agricultural antibiotic.', *N. Z. Med. J.*, vol. 117, no. 1190, p. U799, Mar. 2004.
- [4] O. O. Ojo, S. Bhadauria, and S. K. Rath, 'Dose-dependent adverse effects of salinomycin on male reproductive organs and fertility in mice.', *PLoS One*, vol. 8, no. 7, p. e69086, Jan. 2013.
- [5] V. T. DeVita and E. Chu, 'A history of cancer chemotherapy.', *Cancer Res.*, vol. 68, no. 21, pp. 8643–53, Nov. 2008.
- [6] D. Hanahan and R. A. Weinberg, 'The Hallmarks of Cancer', *Cell*, vol. 100, no. 1, pp. 57–70, Jan. 2000.
- [7] A. H. Bild, G. Yao, J. T. Chang, Q. Wang, A. Potti, D. Chasse, M.-B. Joshi, D. Harpole, J. M. Lancaster, A. Berchuck, J. A. Olson, J. R. Marks, H. K. Dressman, M. West, and J. R. Nevins, 'Oncogenic pathway signatures in human cancers as a guide to targeted therapies.', *Nature*, vol. 439, no. 7074, pp. 353–7, Jan. 2006.
- [8] B. J. Druker, F. Guilhot, S. G. O'Brien, I. Gathmann, H. Kantarjian, N. Gattermann, M. W. N. Deininger, R. T. Silver, J. M. Goldman, R. M. Stone, F. Cervantes, A. Hochhaus, B. L. Powell, J. L. Gabilove, P. Rousselot, J. Reiffers, J. J. Cornelissen, T. Hughes, H. Agis, T. Fischer, G. Verhoef, J. Shepherd, G. Saglio, A. Gratwohl, J. L. Nielsen, J. P. Radich, B. Simonsson, K. Taylor, M. Baccarani, C. So, L. Letvak, and R. A. Larson, 'Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia.', *N. Engl. J. Med.*, vol. 355, no. 23, pp. 2408–17, Dec. 2006.
- [9] L. A. Emens and N. E. Davidson, 'Trastuzumab in breast cancer.', *Oncology (Williston Park)*, vol. 18, no. 9, pp. 1117–28–2, 1137–8, Aug. 2004.
- [10] F. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray, 'GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide', *IARC CancerBase No. 11*, vol. 11, 2013.
- [11] F. J. Bray F, Ren JS, Masuyer E, 'Estimates of global cancer prevalence for 27 sites in the adult population in 2008', *Int J Cancer*, vol. Mar 1, no. 132, pp. 1133–45, 2013.
- [12] B. W. Stewart and C. Wild, 'World cancer report 2014', *Geneva WHO*, 2014.
- [13] Gesundheitsberichterstattung des Bundes, *Krebs in Deutschland 2011/2012 10*. 2015.
- [14] J.-P. Gillet and M. M. Gottesman, 'Mechanisms of multidrug resistance in cancer.', *Methods Mol. Biol.*, vol. 596, pp. 47–76, 2010.
- [15] T. G. Karrison, D. J. Ferguson, and P. Meier, 'Dormancy of Mammary Carcinoma After Mastectomy', *JNCI J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 91, no. 1, pp. 80–85, Jan. 1999.
- [16] D. Weckermann, P. Müller, F. Wawroschek, R. Harzmann, G. Riethmüller, and G. Schlimok, 'Disseminated cytokeratin positive tumor cells in the bone marrow of patients with prostate cancer: detection and prognostic value.', *J. Urol.*, vol. 166, no. 2, pp. 699–703, Aug. 2001.
- [17] J. C. Y. Wang and J. E. Dick, 'Cancer stem cells: lessons from leukemia', *Trends Cell Biol.*, vol. 15, no. 9, pp. 494–501, Sep. 2005.
- [18] M. F. Clarke, J. E. Dick, P. B. Dirks, C. J. Eaves, C. H. M. Jamieson, D. L. Jones, J. Visvader, I. L. Weissman, and G. M. Wahl, 'Cancer stem cells--perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells.', *Cancer Res.*, vol. 66, no. 19, pp. 9339–44, Oct. 2006.
- [19] J. M. Gerber, B. D. Smith, B. Ngwang, H. Zhang, M. S. Vala, L. Morsberger, S. Galkin,

- M. I. Collector, B. Perkins, M. J. Levis, C. A. Griffin, S. J. Sharkis, M. J. Borowitz, J. E. Karp, and R. J. Jones, 'A clinically relevant population of leukemic CD34(+)CD38(-) cells in acute myeloid leukemia.', *Blood*, vol. 119, no. 15, pp. 3571–7, Apr. 2012.
- [20] C. J. Creighton, X. Li, M. Landis, J. M. Dixon, V. M. Neumeister, A. Sjolund, D. L. Rimm, H. Wong, A. Rodriguez, J. I. Herschkowitz, C. Fan, X. Zhang, X. He, A. Pavlick, M. C. Gutierrez, L. Renshaw, A. A. Larionov, D. Faratian, S. G. Hilsenbeck, C. M. Perou, M. T. Lewis, J. M. Rosen, and J. C. Chang, 'Residual breast cancers after conventional therapy display mesenchymal as well as tumor-initiating features.', *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 106, no. 33, pp. 13820–5, Aug. 2009.
- [21] J. A. Aguirre-Ghiso, 'Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy', *Nat. Rev. Cancer*, vol. 7, no. 11, pp. 834–846, Nov. 2007.
- [22] J. M. Jacobs, 'Vascular permeability and neurotoxicity.', *Environ. Health Perspect.*, vol. 26, pp. 107–16, Oct. 1978.
- [23] A. J. Windebank and W. Grisold, 'Chemotherapy-induced neuropathy.', *J. Peripher. Nerv. Syst.*, vol. 13, no. 1, pp. 27–46, Mar. 2008.
- [24] O. Caspani, S. Zurborg, D. Labuz, and P. A. Heppenstall, 'The contribution of TRPM8 and TRPA1 channels to cold allodynia and neuropathic pain.', *PLoS One*, vol. 4, no. 10, p. e7383, Jan. 2009.
- [25] A. S. Jaggi and N. Singh, 'Mechanisms in cancer-chemotherapeutic drugs-induced peripheral neuropathy.', *Toxicology*, vol. 291, no. 1–3, pp. 1–9, Jan. 2012.
- [26] W. Grisold, G. Cavaletti, and A. J. Windebank, 'Peripheral neuropathies from chemotherapeutics and targeted agents: diagnosis, treatment, and prevention.', *Neuro. Oncol.*, vol. 14 Suppl 4, p. iv45-54, Sep. 2012.
- [27] A. A. Argyriou, V. Zolota, O. Kyriakopoulou, and H. P. Kalofonos, 'Toxic peripheral neuropathy associated with commonly used chemotherapeutic agents.', *J. BUON.*, vol. 15, no. 3, pp. 435–46, Jul-Sep. 2010 .
- [28] M. Seretny, G. L. Currie, E. S. Sena, S. Ramnarine, R. Grant, M. R. MacLeod, L. A. Colvin, and M. Fallon, 'Incidence, prevalence, and predictors of chemotherapy-induced peripheral neuropathy: A systematic review and meta-analysis.', *Pain*, vol. 155, no. 12, pp. 2461–70, Dec. 2014.
- [29] M. I. Bennett, C. Rayment, M. Hjermstad, N. Aass, A. Caraceni, and S. Kaasa, 'Prevalence and aetiology of neuropathic pain in cancer patients: a systematic review.', *Pain*, vol. 153, no. 2, pp. 359–65, Feb. 2012.
- [30] A. Hoke and M. Ray, 'Rodent Models of Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy', *ILAR J.*, vol. 54, no. 3, pp. 273–281, Mar. 2014.
- [31] N. Authier, D. Balayssac, F. Marchand, B. Ling, A. Zangarelli, J. Descoeur, F. Coudore, E. Bourinet, and A. Eschalier, 'Animal models of chemotherapy-evoked painful peripheral neuropathies.', *Neurotherapeutics*, vol. 6, no. 4, pp. 620–9, Oct. 2009.
- [32] V. A. Carozzi, A. Canta, N. Oggioni, B. Sala, A. Chiorazzi, C. Meregalli, M. Bossi, P. Marmiroli, and G. Cavaletti, 'Neurophysiological and neuropathological characterization of new murine models of chemotherapy-induced chronic peripheral neuropathies.', *Exp. Neurol.*, vol. 226, no. 2, pp. 301–9, Dec. 2010.
- [33] A. A. Argyriou, E. Chroni, A. Koutras, J. Ellul, S. Papapetropoulos, G. Katsoulas, G. Iconomou, and H. P. Kalofonos, 'Vitamin E for prophylaxis against chemotherapy-induced neuropathy: a randomized controlled trial.', *Neurology*, vol. 64, no. 1, pp. 26–31, Jan. 2005.
- [34] G. J. Prud'homme, 'Cancer stem cells and novel targets for antitumor strategies', *Curr. Pharm. Des.*, vol. 18, pp. 2838–2849, 2012.
- [35] Y. Miyazaki, M. Shibuya, H. Sugawara, O. Kawaguchi, and C. Hirsoe, 'Salinomycin, a new polyether antibiotic.', *J. Antibiot. (Tokyo).*, vol. 27, pp. 814–821, 1974.
- [36] H. Kinashi, N. Ōtake, H. Yonehara, S. Sato, and Y. Saito, 'The structure of salinomycin, a new member of the polyether antibiotics', *Tetrahedron Lett.*, vol. 14, no. 49, pp. 4955–

- 4958, Jan. 1973.
- [37] P. J. Kocieński, R. C. D. Brown, A. Pommier, M. Procter, and B. Schmidt, 'Synthesis of salinomycin', *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, no. 1, pp. 9–40, Jan. 1998.
- [38] A. Huczyński, M. Antoszczak, J. Janczak, B. Brzezinski, and J. Stefańska, 'Synthesis and antimicrobial activity of amide derivatives of polyether antibiotic—salinomycin', *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, vol. 22, pp. 4697–4702, 2012.
- [39] H. Mehlhorn, H. J. Ganster, and W. Raether, 'Effect of salinomycin-Na on malaria parasites (*Plasmodium falciparum* and *P. berghei*).', *Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg. A.*, vol. 256, pp. 305–313, 1984.
- [40] T. R. Callaway, T. S. Edrington, J. L. Rychlik, K. J. Genovese, T. L. Poole, Y. S. Jung, K. M. Bischoff, R. C. Anderson, and D. J. Nisbet, 'Ionophores: their use as ruminant growth promotants and impact on food safety.', *Curr. Issues Intest. Microbiol.*, vol. 4, no. 2, pp. 43–51, Sep. 2003.
- [41] P. Butaye, L. A. Devriese, and F. Haesebrouck, 'Antimicrobial growth promoters used in animal feed: effects of less well known antibiotics on gram-positive bacteria.', *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 16, no. 2, pp. 175–88, Apr. 2003.
- [42] M. Mitani, T. Yamanishi, and Y. Miyazaki, 'Salinomycin: a new monovalent cation ionophore.', *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 66, no. 4, pp. 1231–6, Oct. 1975.
- [43] B. C. Pressman, 'Properties of ionophores with broad range cation selectivity.', *Fed. Proc.*, vol. 32, no. 6, pp. 1698–703, Jun. 1973.
- [44] D. Fuchs, A. Heinold, G. Opelz, V. Daniel, and C. Naujokat, 'Salinomycin induces apoptosis and overcomes apoptosis resistance in human cancer cells.', *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 390, pp. 743–749, 2009.
- [45] B. Zhang, X. Wang, F. Cai, W. Chen, U. Loesch, and X. Y. Zhong, 'Antitumor properties of salinomycin on cisplatin-resistant human ovarian cancer cells in vitro and in vivo: involvement of p38 MAPK activation.', *Oncol. Rep.*, vol. 29, pp. 1371–8, 2013.
- [46] D. Fuchs, V. Daniel, M. Sadeghi, G. Opelz, and C. Naujokat, 'Salinomycin overcomes ABC transporter-mediated multidrug and apoptosis resistance in human leukemia stem cell-like KG-1a cells.', *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 394, no. 4, pp. 1098–104, Apr. 2010.
- [47] J.-H. Kim, J. Ro, S. Yoon, H. S. Kang, S. Kim, K. Yoon, and W. K. Kim, 'Salinomycin, a p-glycoprotein inhibitor, sensitizes radiation-treated cancer cells by increasing DNA damage and inducing G2 arrest', *Investigational New Drugs*, vol. 30, pp. 1311–1318, 2012.
- [48] J.-H. Kim, M. Chae, W. K. Kim, Y.-J. Kim, H. S. Kang, H. S. Kim, and S. Yoon, 'Salinomycin sensitizes cancer cells to the effects of doxorubicin and etoposide treatment by increasing DNA damage and reducing p21 protein.', *Br. J. Pharmacol.*, vol. 162, no. 3, pp. 773–84, Feb. 2011.
- [49] Y. Zhang, X.-Q. Wang, J.-C. Wang, X. Zhang, and Q. Zhang, 'A comparison study of the cytotoxicity of salinomycin and salinomycin sodium toward human breast cancer stem cells as well as breast cancer cells.', *J. Chinese Pharm. Sci.*, vol. 20, pp. 368–375, 2011.
- [50] P. S. Oak, F. Kopp, C. Thakur, J. W. Ellwart, U. R. Rapp, A. Ullrich, E. Wagner, P. Knyazev, and A. Roidl, 'Combinatorial treatment of mammospheres with trastuzumab and salinomycin efficiently targets HER2-positive cancer cells and cancer stem cells.', *Int. J. Cancer*, vol. 131, no. 12, pp. 2808–19, Dec. 2012.
- [51] F. Kopp, A. Hermawan, P. Oak, A. Herrmann, E. Wagner, and A. Roidl, 'Salinomycin treatment reduces metastatic tumor burden by hampering cancer cell migration', *Mol. Cancer*, vol. 13, no. 1, p. 16, Jan. 2014.
- [52] W. K. Kim, J.-H. Kim, K. Yoon, S. Kim, J. Ro, H. S. Kang, and S. Yoon, 'Salinomycin, a p-glycoprotein inhibitor, sensitizes radiation-treated cancer cells by increasing DNA damage and inducing G2 arrest.', *Invest. New Drugs*, vol. 30, no. 4, pp. 1311–8, Aug. 2012.

- [53] X. Zhang, X. Wang, J. Wang, Y. Zhang, H. Zhang, and Q. Zhang, 'The eradication of breast cancer and cancer stem cells using octreotide modified paclitaxel active targeting micelles and salinomycin passive targeting micelles', *Biomaterials*, vol. 33. pp. 679–691, 2012.
- [54] C. Gong, H. Yao, Q. Liu, J. Chen, J. Shi, F. Su, and E. Song, 'Markers of tumor-initiating cells predict chemoresistance in breast cancer.', *PLoS One*, vol. 5, no. 12, p. e15630, Jan. 2010.
- [55] G. N. Zhang, Y. Liang, L. J. Zhou, S. P. Chen, G. Chen, T. P. Zhang, T. Kang, and Y. P. Zhao, 'Combination of salinomycin and gemcitabine eliminates pancreatic cancer cells', *Cancer Lett.*, vol. 313, pp. 137–144, 2011.
- [56] A. Calzolari, E. Saulle, M. L. De Angelis, L. Pasquini, A. Boe, F. Pelacchi, L. Ricci-Vitiani, M. Baiocchi, and U. Testa, 'Salinomycin Potentiates the Cytotoxic Effects of TRAIL on Glioblastoma Cell Lines.', *PLoS One*, vol. 9, no. 4, p. e94438, Jan. 2014.
- [57] F. Wang, W. Dai, Y. Wang, M. Shen, K. Chen, P. Cheng, Y. Zhang, C. Wang, J. Li, Y. Zheng, J. Lu, J. Yang, R. Zhu, H. Zhang, Y. Zhou, L. Xu, and C. Guo, 'The synergistic in vitro and in vivo antitumor effect of combination therapy with salinomycin and 5-fluorouracil against hepatocellular carcinoma.', *PLoS One*, vol. 9, no. 5, p. e97414, Jan. 2014.
- [58] B. Parajuli, H.-G. Lee, S.-H. Kwon, S.-D. Cha, S.-J. Shin, G.-H. Lee, I. Bae, and C.-H. Cho, 'Salinomycin inhibits Akt/NF- κ B and induces apoptosis in cisplatin resistant ovarian cancer cells.', *Cancer Epidemiol.*, vol. 37, pp. 512–7, 2013.
- [59] J.-H. Kim, A.-R. Choi, Y. K. Kim, H. S. Kim, and S. Yoon, 'Low amount of salinomycin greatly increases Akt activation, but reduces activated p70S6K levels.', *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 14, no. 9, pp. 17304–18, Jan. 2013.
- [60] A.-R. Choi, J.-H. Kim, and S. Yoon, 'Sensitization of cancer cells through reduction of total Akt and downregulation of salinomycin-induced pAkt, pGsk3 β , pTSC2, and p4EBP1 by cotreatment with MK-2206.', *Biomed Res. Int.*, vol. 2014, p. 295760, Jan. 2014.
- [61] W. Lu and Y. Li, 'Salinomycin suppresses LRP6 expression and inhibits both Wnt/ β -catenin and mTORC1 signaling in breast and prostate cancer cells.', *J. Cell. Biochem.*, Jun. 2014.
- [62] Y. Zhou, C. Liang, F. Xue, W. Chen, X. Zhi, X. Feng, X. Bai, and T. Liang, 'Salinomycin decreases doxorubicin resistance in hepatocellular carcinoma cells by inhibiting the β -catenin/TCF complex association via FOXO3a activation.', *Oncotarget*, vol. 6, no. 12, pp. 10350–65, Apr. 2015.
- [63] J. A. McCubrey, S. L. Abrams, K. Stadelman, W. H. Chappell, M. Lahair, R. A. Ferland, and L. S. Steelman, 'Targeting signal transduction pathways to eliminate chemotherapeutic drug resistance and cancer stem cells.', *Adv. Enzyme Regul.*, vol. 50, no. 1, pp. 285–307, Jan. 2010.
- [64] A. Ring, Y.-M. Kim, and M. Kahn, 'Wnt/catenin signaling in adult stem cell physiology and disease.', *Stem Cell Rev.*, vol. 10, no. 4, pp. 512–25, Aug. 2014.
- [65] S. Ma, T. K. Lee, B.-J. Zheng, K. W. Chan, and X.-Y. Guan, 'CD133+ HCC cancer stem cells confer chemoresistance by preferential expression of the Akt/PKB survival pathway.', *Oncogene*, vol. 27, no. 12, pp. 1749–58, Mar. 2008.
- [66] N. Takebe, L. Miele, P. J. Harris, W. Jeong, H. Bando, M. Kahn, S. X. Yang, and S. P. Ivy, 'Targeting Notch, Hedgehog, and Wnt pathways in cancer stem cells: clinical update', *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, vol. 12, no. 8, pp. 445–464, Apr. 2015.
- [67] T. D. King, M. J. Suto, and Y. Li, 'The Wnt/ β -catenin signaling pathway: a potential therapeutic target in the treatment of triple negative breast cancer.', *J. Cell. Biochem.*, vol. 113, pp. 13–8, 2012.
- [68] S. S. Bastianello, H. L. McGregor, M. L. Penrith, and N. Fourie, 'A chronic cardiomyopathy in feedlot cattle attributed to toxic levels of salinomycin in the feed.', *J S*

- Afr Vet Assoc*, vol. 67. 1996, pp. 38–41, Mar 1996.
- [69] J. S. van der Linde-Sipman, T. S. van den Ingh, J. J. van nes, H. Verhagen, J. G. Kersten, A. C. Beynen, and R. Plekkringa, ‘Salinomycin-induced polyneuropathy in cats: morphologic and epidemiologic data.’, *Vet. Pathol.*, vol. 36, pp. 152–156, 1999.
- [70] K. H. Plumlee, B. Johnson, and F. D. Galey, ‘Acute salinomycin toxicosis of pigs.’, *J. Vet. Diagn. Invest.*, vol. 7, no. 3, pp. 419–20, Jul. 1995.
- [71] E. J. Van Assen, ‘A case of salinomycin intoxication in turkeys.’, *Can. Vet. J.*, vol. 47, no. 3, pp. 256–8, Mar. 2006.
- [72] A. Omid, M. R. Aslani, A. R. Movassaghi, M. Mohri, and M. Dadfar, ‘Accidental salinomycin intoxication in calves.’, *Can. Vet. J.*, vol. 51, no. 10, pp. 1143–5, Oct. 2010.
- [73] A. Pakozdy, I. Challande-Kathman, M. Doherr, S. Cizinauskas, S. J. Wheeler, A. Oevermann, and A. Jaggy, ‘Retrospective study of salinomycin toxicosis in 66 cats.’, *Vet. Med. Int.*, vol. 2010, p. 147142, 2010.
- [74] G. L. Griffiths, P. Hillier, and R. J. Sutherland, ‘Salinomycin poisoning in point-of-lay turkeys.’, *Aust. Vet. J.*, vol. 66, no. 10, pp. 326–9, Oct. 1989.
- [75] A. Khodakaram Tafti, S. Nazifi, H. Rajaian, M. Sepehrimanesh, S. L. Poorbaghi, and S. Mohtarami, ‘Pathological changes associated with experimental salinomycin toxicosis in sheep’, *Comp. Clin. Path.*, vol. 17, no. 4, pp. 255–258, 2008.
- [76] J. Ashrafihelan, H. Eisapour, A. M. Erfani, A. A. Kalantary, J. S. Amoli, and M. Mozafari, ‘High mortality due to accidental salinomycin intoxication in sheep.’, *Interdiscip. Toxicol.*, vol. 7, no. 3, pp. 173–6, Sep. 2014.
- [77] N. T. Kavanagh and D. S. Sparrow, ‘Salinomycin toxicity in pigs.’, *Vet. Rec.*, vol. 127, no. 20, p. 507, Nov. 1990.
- [78] M. W. Huyben, J. Sol, G. H. Counotte, M. P. Roumen, and G. H. Borst, ‘Salinomycin poisoning in veal calves.’, *Vet. Rec.*, vol. 149, no. 6, pp. 183–4, Aug. 2001.
- [79] P. V. Peixoto, V. A. Nogueira, A. P. González, C. H. Tokarnia, and T. N. França, ‘Accidental and experimental salinomycin poisoning in rabbits’, *Pesqui. Veterinária Bras.*, vol. 29, no. 9, pp. 695–699, Sep. 2009.
- [80] W. Boehmerle and M. Endres, ‘Salinomycin induces calpain and cytochrome c-mediated neuronal cell death.’, *Cell Death Dis.*, vol. 2, p. e168, Jan. 2011.
- [81] D. A. Cox, L. Conforti, N. Sperelakis, and M. A. Matlib, ‘Selectivity of inhibition of Na(+)-Ca²⁺ exchange of heart mitochondria by benzothiazepine CGP-37157.’, *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, vol. 21, no. 4, pp. 595–9, Apr. 1993.
- [83] S. E. Lazic and L. Essieux, ‘Improving basic and translational science by accounting for litter-to-litter variation in animal models.’, *BMC Neurosci.*, vol. 14, no. 1, p. 37, Jan. 2013.
- [84] C. Kilkenny, W. J. Browne, I. C. Cuthill, M. Emerson, and D. G. Altman, ‘Improving bioscience research reporting: The ARRIVE guidelines for reporting animal research.’, *J. Pharmacol. Pharmacother.*, vol. 1, no. 2, pp. 94–9, Jul. 2010.
- [85] E. Chéneau, J. Henri, Y. Pirotais, J.-P. Abjean, B. Roudaut, P. Sanders, and M. Laurentie, ‘Liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometric method for quantification of monensin in plasma and edible tissues of chicken used in pharmacokinetic studies: applying a total error approach.’, *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, vol. 850, no. 1–2, pp. 15–23, May 2007.
- [86] N. W. Dunham and T. S. Miya, ‘A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice’, *J. Am. Pharm. Assoc.*, vol. 46, no. 3, pp. 208–209, Sep. 2006.
- [87] Huehnchen, W. Boehmerle, and M. Endres, ‘Assessment of paclitaxel induced sensory polyneuropathy with “Catwalk” automated gait analysis in mice.’, *PLoS One*, vol. 8, no. 10, p. e76772, Jan. 2013.
- [88] T. M. Cunha, W. A. Verri Jr., G. G. Vivancos, I. F. Moreira, S. Reis, C. A. Parada, F. Q. Cunha, and S. H. Ferreira, ‘An electronic pressure-meter nociception paw test for mice’, *Brazilian J. Med. Biol. Res.*, vol. 37, no. 3, pp. 401–407, Mar. 2004.

- [89] Y.-J. Chen, F.-C. Cheng, M.-L. Sheu, H.-L. Su, C.-J. Chen, J. Sheehan, and H.-C. Pan, 'Detection of subtle neurological alterations by the Catwalk XT gait analysis system.', *J. Neuroeng. Rehabil.*, vol. 11, p. 62, Jan. 2014.
- [90] A. J. Allchorne, D. C. Broom, and C. J. Woolf, 'Detection of cold pain, cold allodynia and cold hyperalgesia in freely behaving rats.', *Mol. Pain*, vol. 1, no. 1, p. 36, Jan. 2005.
- [91] A. W. Bannon and A. B. Malmberg, 'Models of nociception: hot-plate, tail-flick, and formalin tests in rodents.', *Curr. Protoc. Neurosci.*, vol. Chapter 8, p. Unit 8.9, Oct. 2007.
- [92] M. S. Wang, A. A. Davis, D. G. Culver, and J. D. Glass, 'WldS mice are resistant to paclitaxel (taxol) neuropathy.', *Ann. Neurol.*, vol. 52, no. 4, pp. 442–7, Oct. 2002.
- [93] C. L. C. Scudamore, *A Practical Guide to the Histology of the Mouse*. 2013.
- [94] A. Faul, F., Erdfelder, E., Lang, A.-G., & Buchner, 'G*Power 3: A flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences.', *Behav. Res. Methods*, vol. 3, pp. 175–191, 2007.
- [95] W. Boehmerle, H. Muenzfeld, A. Springer, P. Huehnchen, and M. Endres, 'Specific targeting of neurotoxic side effects and pharmacological profile of the novel cancer stem cell drug salinomycin in mice.', *J. Mol. Med. (Berl.)*, vol. 92, no. 8, pp. 889–900, Aug. 2014.
- [96] X.-S. Miao, R. E. March, and C. D. Metcalfe, 'Fragmentation study of salinomycin and monensin A antibiotics using electrospray quadrupole time-of-flight mass spectrometry.', *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, vol. 17, no. 2, pp. 149–54, Jan. 2003.
- [97] S. R. Chaplan, F. W. Bach, J. W. Pogrel, J. M. Chung, and T. L. Yaksh, 'Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw.', *J. Neurosci. Methods*, vol. 53, no. 1, pp. 55–63, Jul. 1994
- [98] LL 44 2012, 'Diagnostik bei Polyneuropathien', *Dtsch. Gesellschaft für Neurol.*, pp. 1–17, 2012.
- [99] I. J. Murawski, R. W. Maina, and I. R. Gupta, 'The relationship between nephron number, kidney size and body weight in two inbred mouse strains.', *Organogenesis*, vol. 6, no. 3, pp. 189–94, Jan. 2016.
- [100] M. S. Gaide, J. T. Lehr, S. S. Wong, F. A. Lattanzio, and A. L. Bassett, 'Comparative study of the effects of salinomycin and monensin on electrophysiologic and contractile properties of canine myocardium.', *Eur. J. Pharmacol.*, vol. 100, no. 3–4, pp. 321–7, May 1984.
- [101] M. Fahim, G. del Valle, and B. C. Pressman, 'Comparison of the effects of the ionophore salinomycin and adrenaline on the haemodynamics and work efficiency of the dog heart.', *Cardiovasc. Res.*, vol. 20, no. 2, pp. 145–52, Feb. 1986.
- [102] A. Lattanzio and B. C. Pressman, 'Alterations in intracellular calcium activity and contractility of isolated perfused rabbit hearts by ionophores and adrenergic agents.', *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 139, no. 2, pp. 816–21, Sep. 1986. P. S.
- [103] Bourdois, J.-L. Dancla, J. M. Faccini, J. Nachbaur, and A. M. Monro, 'The sub-acute toxicology of digoxin in dogs; clinical chemistry and histopathology of heart and kidneys', *Arch. Toxicol.*, vol. 51, no. 4, pp. 273–283, 1982.
- [104] N. Rietbrock, J. Kuhlmann, and H. F. Vöhringer, '[Pharmacokinetics of cardiac glycosides and clinical consequences].', *Fortschr. Med.*, vol. 95, no. 14, pp. 909–15, 951–4, Apr. 1977.
- [105] M. Aleman, K. G. Magdesian, T. S. Peterson, and F. D. Galey, 'Salinomycin toxicosis in horses.' *Journal of the American Veterinary Medical Association*, vol. 230. 2007, pp. 1822–1826. 2007
- [106] M. N. Novilla, 'The veterinary importance of the toxic syndrome induced by ionophores.', *Vet. Hum. Toxicol.*, vol. 34, no. 1, pp. 66–70, Mar. 1992.
- [107] A. Scherzed, S. Hackenberg, K. Froelich, K. Rak, A. Technau, A. Radeloff, U. Nöth, C. Koehler, R. Hagen, and N. Kleinsasser, 'Effects of salinomycin on human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in vitro.', *Toxicol. Lett.*, vol. 218, no. 3, pp. 207–14, Apr.

- 2013.
- [108] C. H. Frith, R. L. Suber, and R. Umholtz, 'Hematologic and clinical chemistry findings in control BALB/c and C57BL/6 mice.', *Lab. Anim. Sci.*, vol. 30, no. 5, pp. 835–40, Oct. 1980.
- [109] M. O. Spinelli, M. C. Motta, R. J. Cruz, and C. M. S. C. Godoy, 'Reference intervals for hematological parameters of animals bred and kept at the vivarium of the Faculty of Medicine of the State University of São Paulo', *Acta Sci. Heal. Sci.*, vol. 36, no. 1, pp. 1–4, 2014.
- [110] H. L. Forster, J. D. Small, and J. G. Fox, *The Mouse in Biomedical Research: Normative Biology, Husbandry, and Models*, vol. 7. Academic Press, 2006.
- [111] M. Atef, A. Ramadan, S. A. Youssef, and K. Abo el-Sooud, 'Kinetic disposition, systemic bioavailability and tissue distribution of salinomycin in chickens.', *Res. Vet. Sci.*, vol. 54, pp. 179–183, 1993.
- [112] J. Henri, R. Maurice, G. Postollec, E. Dubreil-Cheneau, B. Roudaut, M. Laurentie, and P. Sanders, 'Comparison of the oral bioavailability and tissue disposition of monensin and salinomycin in chickens and turkeys', *J. Vet. Pharmacol. Ther.*, vol. 35, pp. 73–81, 2011.
- [113] K. Resham, P. N. Patel, D. Thummuri, L. Guntuku, V. Shah, R. B. Bambal, and V. G. M. Naidu, 'Preclinical drug metabolism and pharmacokinetics of salinomycin, a potential candidate for targeting human cancer stem cells', *Chem. Biol. Interact.*, vol. 240, pp. 146–152, Oct. 2015.
- [114] Europäische Kommission, 'Berichte des wissenschaftlichen Futtermittelausschusses der EU Kommission – Achte Folge', 1992.
- [115] S. Oie and T. N. Tozer, 'Effect of altered plasma protein binding on apparent volume of distribution.', *J. Pharm. Sci.*, vol. 68, no. 9, pp. 1203–5, Sep. 1979.
- [116] P. Gauchan, T. Andoh, K. Ikeda, M. Fujita, A. Sasaki, A. Kato, and Y. Kuraishi, 'Mechanical allodynia induced by paclitaxel, oxaliplatin and vincristine: different effectiveness of gabapentin and different expression of voltage-dependent calcium channel alpha(2)delta-1 subunit.', *Biol. Pharm. Bull.*, vol. 32, no. 4, pp. 732–4, Apr. 2009.
- [117] W. Boehmerle, P. Huehnchen, S. Peruzzaro, M. Balkaya, and M. Endres, 'Electrophysiological, behavioral and histological characterization of paclitaxel, cisplatin, vincristine and bortezomib-induced neuropathy in C57Bl/6 mice', *Sci. Rep.*, vol. 4, p. 6370, Sep. 2014.
- [118] L. E. Ta, P. A. Low, and A. J. Windebank, 'Mice with cisplatin and oxaliplatin-induced painful neuropathy develop distinct early responses to thermal stimuli.', *Mol. Pain*, vol. 5, p. 9, Jan. 2009.
- [119] R. Nassini, M. Gees, S. Harrison, G. De Siena, S. Materazzi, N. Moretto, P. Failli, D. Preti, N. Marchetti, A. Cavazzini, F. Mancini, P. Pedretti, B. Nilius, R. Patacchini, and P. Geppetti, 'Oxaliplatin elicits mechanical and cold allodynia in rodents via TRPA1 receptor stimulation', *Pain*, vol. 152, no. 7, pp. 1621–1631, 2011
- [120] B. Ling, N. Authier, D. Balayssac, A. Eschalier, and F. Coudore, 'Behavioral and pharmacological description of oxaliplatin-induced painful neuropathy in rat.', *Pain*, vol. 128, no. 3, pp. 225–34, Apr. 2007.
- [121] R. Coriat, J. Alexandre, C. Nicco, L. Quinquis, E. Benoit, C. Chéreau, H. Lemaréchal, O. Mir, D. Borderie, J.-M. Tréluyer, B. Weill, J. Coste, F. Goldwasser, and F. Batteux, 'Treatment of oxaliplatin-induced peripheral neuropathy by intravenous mangafodipir.', *J. Clin. Invest.*, vol. 124, no. 1, pp. 262–72, Jan. 2014.
- [122] R. H. Wilson, T. Lehky, R. R. Thomas, M. G. Quinn, M. K. Floeter, and J. L. Grem, 'Acute oxaliplatin-induced peripheral nerve hyperexcitability.', *J. Clin. Oncol.*, vol. 20, no. 7, pp. 1767–74, Apr. 2002.
- [123] A. A. Argyriou, G. Cavaletti, C. Briani, R. Velasco, J. Bruna, M. Campagnolo, P. Alberti, F. Bergamo, D. Cortinovis, M. Cazzaniga, C. Santos, K. Papadimitriou, and H. P. Kalofonos, 'Clinical pattern and associations of oxaliplatin acute neurotoxicity: a

- prospective study in 170 patients with colorectal cancer.’, *Cancer*, vol. 119, no. 2, pp. 438–44, Jan. 2013.
- [124] M. Zhao, K. Isami, S. Nakamura, H. Shirakawa, T. Nakagawa, and S. Kaneko, ‘Acute Cold Hypersensitivity Characteristically Induced by Oxaliplatin is Caused by the Enhanced Responsiveness of TRPA1 in Mice’, *Mol. Pain*, vol. 8, pp. 1744-8069-8–55, Sep. 2012.
- [125] D. H. Vrinten and F. F. T. Hamers, ‘“CatWalk” automated quantitative gait analysis as a novel method to assess mechanical allodynia in the rat; a comparison with von Frey testing.’, *Pain*, vol. 102, no. 1–2, pp. 203–9, Mar. 2003.
- [126] A. Bozkurt, R. Deumens, J. Scheffel, D. M. O’Dey, J. Weis, E. A. Joosten, T. Führmann, G. A. Brook, and N. Pallua, ‘CatWalk gait analysis in assessment of functional recovery after sciatic nerve injury.’, *J. Neurosci. Methods*, vol. 173, no. 1, pp. 91–8, Aug. 2008.
- [127] A. F. Gabriel, M. A. E. Marcus, W. M. M. Honig, G. H. I. M. Walenkamp, and E. A. J. Joosten, ‘The CatWalk method: a detailed analysis of behavioral changes after acute inflammatory pain in the rat.’, *J. Neurosci. Methods*, vol. 163, no. 1, pp. 9–16, Jun. 2007.
- [128] H. H. Schaumburg, E. Zotova, C. S. Raine, M. Tar, and J. Arezzo, ‘The rat caudal nerves: a model for experimental neuropathies.’, *J. Peripher. Nerv. Syst.*, vol. 15, no. 2, pp. 128–39, Jun. 2010.
- [129] M. Leandri, M. Ghignotti, L. Emionite, S. Leandri, and M. Cilli, ‘Electrophysiological features of the mouse tail nerves and their changes in chemotherapy induced peripheral neuropathy (CIPN)’ , *J. Neurosci. Methods*, vol. 209, no. 2, pp. 403–409, Aug. 2012.M.
- [130] Leandri, S. Leandri, and G. Lunardi, ‘Effect of temperature on sensory and motor conduction of the rat tail nerves.’, *Neurophysiol. Clin.*, vol. 38, no. 5, pp. 297–304, Oct. 2008.
- [131] J. W. Russell, J. S. Gill, E. J. Sorenson, D. A. Schultz, and A. J. Windebank, ‘Suramin-induced neuropathy in an animal model.’, *J. Neurol. Sci.*, vol. 192, no. 1–2, pp. 71–80, Nov. 2001.
- [132] G. Cavaletti, A. Gilardini, A. Canta, L. Rigamonti, V. Rodriguez-Menendez, C. Ceresa, P. Marmiroli, M. Bossi, N. Oggioni, M. D’Incalci, and R. De Coster, ‘Bortezomib-induced peripheral neurotoxicity: a neurophysiological and pathological study in the rat.’, *Exp. Neurol.*, vol. 204, no. 1, pp. 317–25, Mar. 2007.
- [133] C. Meregalli, A. Canta, V. A. Carozzi, A. Chiorazzi, N. Oggioni, A. Gilardini, C. Ceresa, F. Avezza, L. Crippa, P. Marmiroli, and G. Cavaletti, ‘Bortezomib-induced painful neuropathy in rats: a behavioral, neurophysiological and pathological study in rats.’, *Eur. J. Pain*, vol. 14, no. 4, pp. 343–50, Apr. 2010.
- [134] S. B. Smith, S. E. Crager, and J. S. Mogil, ‘Paclitaxel-induced neuropathic hypersensitivity in mice: responses in 10 inbred mouse strains.’, *Life Sci.*, vol. 74, no. 21, pp. 2593–604, Apr. 2004.
- [135] J. S. Mogil, S. G. Wilson, K. Bon, S. E. Lee, K. Chung, P. Raber, J. O. Pieper, H. S. Hain, J. K. Belknap, L. Hubert, G. I. Elmer, J. M. Chung, and M. Devor, ‘Heritability of nociception I: responses of 11 inbred mouse strains on 12 measures of nociception.’, *Pain*, vol. 80, no. 1–2, pp. 67–82, Mar. 1999.
- [136] H. Naji-Esfahani, G. Vaseghi, L. Safaeian, A.-A. Pilehvarian, A. Abed, and M. Rafieian-Kopaei, ‘Gender differences in a mouse model of chemotherapy-induced neuropathic pain’ , *Lab. Anim.*, vol. 50, no. 1, pp. 15–20, 2016.
- [137] M. S. Wang, A. A. Davis, D. G. Culver, and J. D. Glass, ‘Wlds mice are resistant to paclitaxel (taxol) neuropathy’ , *Ann. Neurol.*, vol. 52, no. 4, pp. 442–447, Oct. 2002.
- [138] C. Naujokat and R. Steinhart, ‘Salinomycin as a drug for targeting human cancer stem cells.’, *J. Biomed. Biotechnol.*, vol. 2012, p. 950658, Jan. 2012.

VIII. Anhang

1. Experimental Procedures: Quantification of SAL in mouse serum, Fragmentation of SAL in negative ESI

In an initial step the fragmentation pattern of SAL was determined. CID in the collision cell of the Synapt G2-S typically led to the MS/MS spectrum depicted in Figure S2. Table S1 lists the fragmentation pattern with peak assignment and mass errors for the spectrum shown in Figure S2. To improve mass accuracy, an internal calibrant was used utilizing the lock mass sprayer option. To facilitate this, all spectra analyzed were centroided and recalibrated using the lock mass calibrant peak derived from deprotonated Leucine Enkephaline, CAS 58822-25-6, m/z 554.2620. Generally, mass accuracy was better than 3 ppm. We chose to use negative ESI for detection of SAL. Unlike positive ESI, where different cation adducts (mainly singly and doubly sodiated SAL, but also ammonium and/or potassium adducts accompanied by the protonated species) are detected depending on the sample preparation and sample composition, negative ion mode results in formation of deprotonated species only. This is simplifying generation of linear lines of best-fit and thus quantification.

2. Parameter optimization for quantification

1) Mass spectrometer

All transfer settings of the instrument were optimized for a maximum abundance of the deprotonated acid, $m/z_{calc} = 749.4845$. Capillary voltage was adjusted to 2.0 kV, sampling cone voltage to 40 V, source offset to 80 V. Source temperature was adjusted to 100°C, desolvation temperature to 250°C. While no cone gas was used, desolvation gas flow was adjusted to 650 L/h and nebulizer gas was adjusted to 6.0 bar. A mass range of m/z 50 to 1000 was used throughout the experiments. MS overview spectra and the MS/MS trace were recorded alternately (0.3 s/scan), while three scans of the lock mass compound were recorded every 30 s. MS/MS experiments were performed with an optimized collision energy (CE) of 30, resulting in the fragments listed above. To improve sensitivity, the most intense fragment was chosen. Summarizing, the 749.4845 \rightarrow 241.1445 transition was used to perform the quantification. As extraction window 241.1445 \pm 5 ppm was used to reduce chemical background.

2) UHPLC condition optimization

For the UHPLC separation preceding the MS/MS detection an Acquity UPLC (Waters Corp., Milford, MA, USA) equipped with an Acquity UPLC C18 1.7 μ m 2.1x50 mm column, was used. As solvent (A) water/0.1% formic acid and solvent (B) methanol/0.1% formic acid was used. Starting with 50/50 (A)/(B), a linear gradient was applied resulting in a mixture of 10/90 (A)/(B) after 10 min. After washing the column for 10 min with 10/90 (A)/(B) the column was re-

equilibrated for 2 min with 50/50 (A)/(B) until the next injection was performed. The samples were stored at -20°C until measured and at 4°C while the sequence was running. The column was operated at 30°C. Using these conditions, SAL elution was detected at 6.99 min. For quantification, an elution window of 6.99 min ± 0.2 min was set.

3) Standard and sample preparation

To minimize extraction effects, all standards were prepared in mouse serum. All further treatment was analogous to the treatment of the samples: 3 parts acetonitrile were added to 1 part SAL-doped serum, incubated at room temperature for 10 minutes on a mechanical shaker at 100 rpm, centrifuged at 36000 g for 10 min at 4°C and filtered through a 0.2 µm PTFE syringe filter before analysis.

4) Quantification:

With the optimized protocol described above we measured a calibration curve using external calibration (Figure S3). With these preconditions, the concentration of SAL in experimental samples was determined.

References:

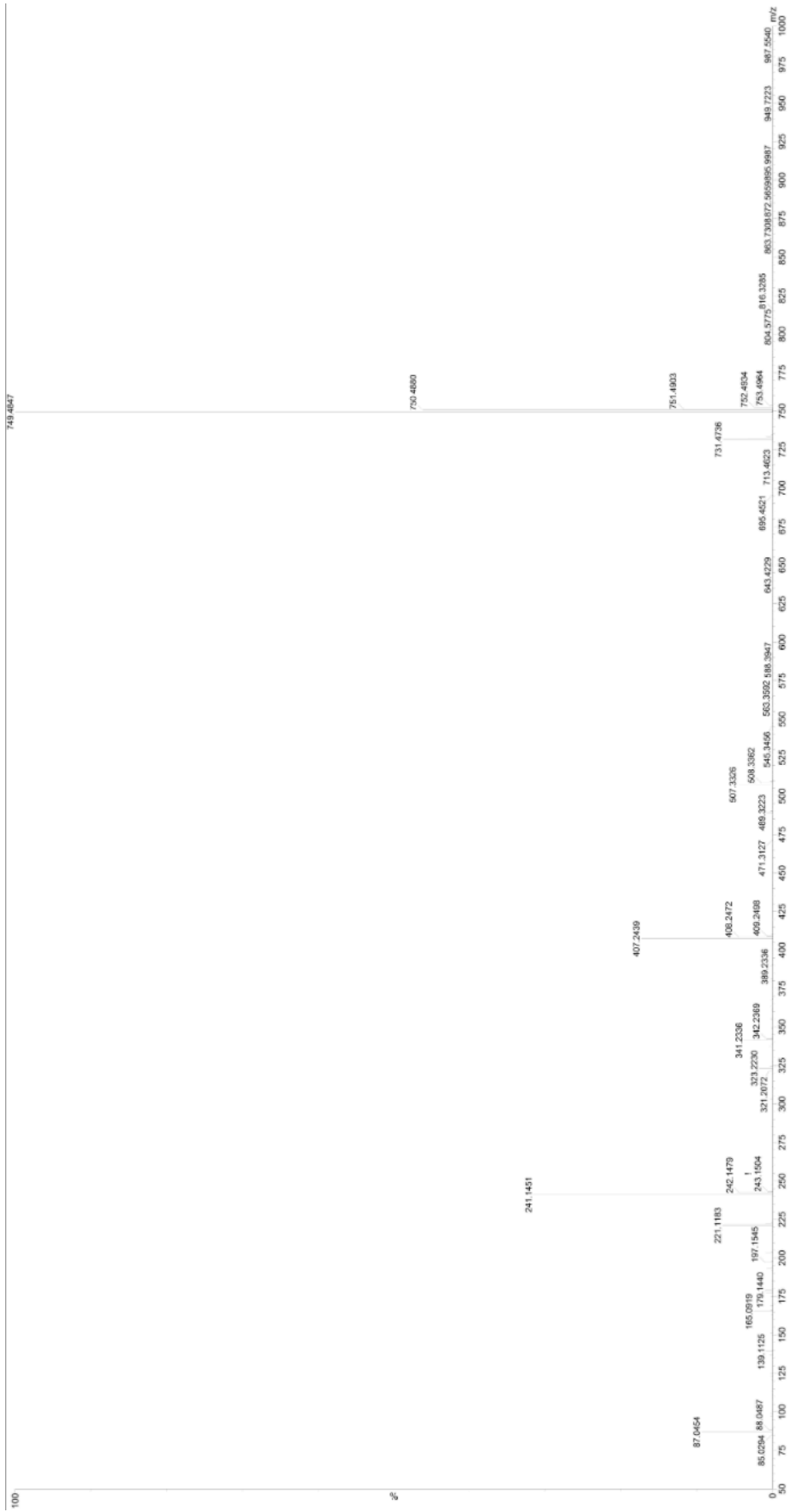
- [96] Miao XS, March RE, & Metcalfe CD (2003) Fragmentation study of SAL and monensin A antibiotics using electrospray quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Rapid communications in mass spectrometry* : RCM 17(2):149-154.

Supplemental Table 1: Fragmentation pattern with peak assignment and mass errors for the spectrum depicted in Figure S2.

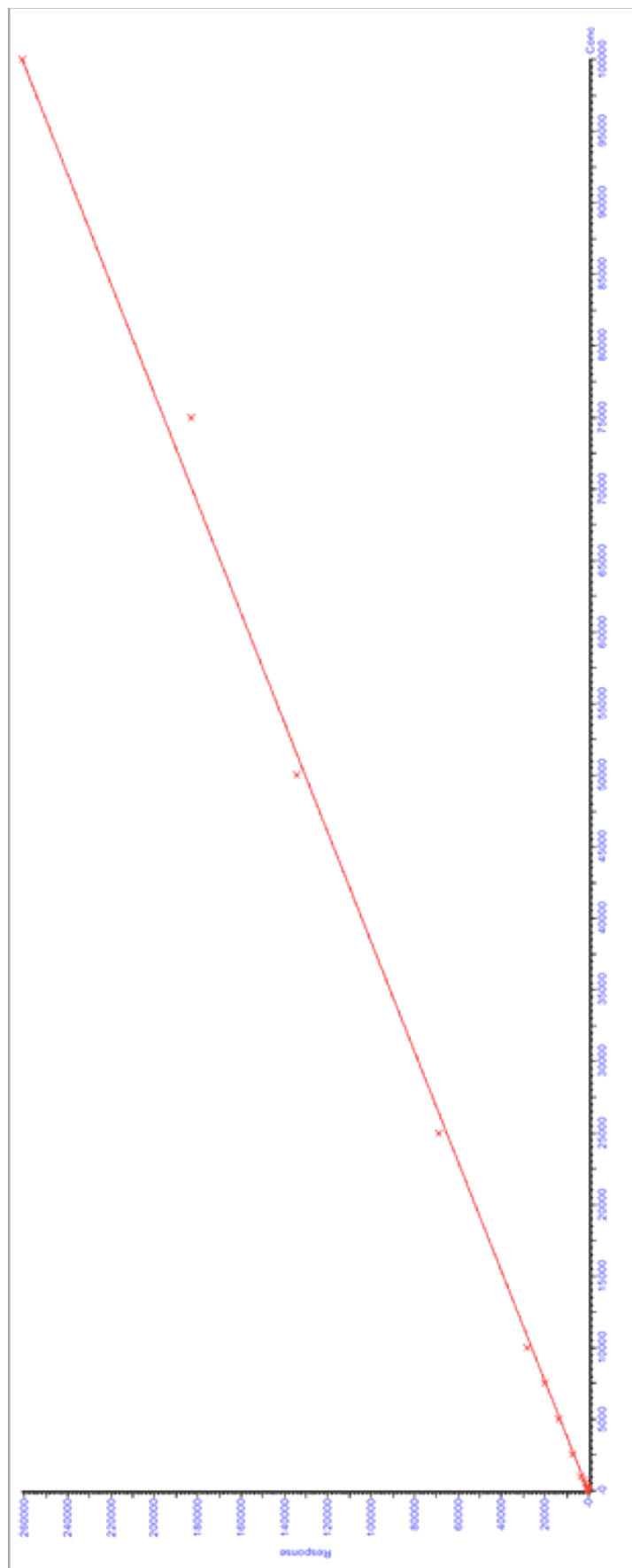
elemental composition	m/z_{exp}	m/z_{calc}	$\Delta m/z$	
C ₄₂ H ₆₉ O ₁₁ ⁻	749.2847	749.4845	0.3 ppm	precursor, [M-H] ⁻
C ₄₂ H ₆₇ O ₁₀ ⁻	731.4736	731.474	0.5 ppm	[M - H ₂ O - H] ⁻
C ₂₉ H ₄₇ O ₇ ⁻	507.3326	507.3327	0.2 ppm	
C ₂₉ H ₄₅ O ₆ ⁻	489.3223	489.3222	0.2 ppm	[C ₂₉ H ₄₇ O ₇ - H ₂ O] ⁻
C ₂₃ H ₃₅ O ₇ ⁻	407.2439	407.2439	0.0 ppm	
C ₂₃ H ₃₃ O ₆ ⁻	389.2336	389.2333	0.8 ppm	[C ₂₃ H ₃₅ O ₇ - H ₂ O] ⁻
C ₁₉ H ₃₃ O ₅ ⁻	341.2336	341.2333	0.9 ppm	
C ₁₉ H ₃₃ O ₅ ⁻	323.223	323.2228	0.6 ppm	[C ₁₉ H ₃₃ O ₅ - H ₂ O] ⁻
C ₁₃ H ₂₁ O ₄ ⁻	241.1451	241.1445	2.5 ppm	
C ₄ H ₇ O ₂ ⁻	87.0454	87.0452	2.3 ppm	

Supplemental Figure 2: MS/MS spectrum of deprotonated salinomycin.

The fragment ions observed can be deduced from the fragmentation pattern suggested for sodiated Salinomycin.



Supplemental Figure 3: SAL calibration standards with linear regression. Concentration values are in nM. $r = 9.998847$, $r^2 = 0.997695$.



IX. Lebenslauf

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

X. Publikation und Anteilserklärung

1. Boehmerle Wolfgang, Münzfeld Hanna, Springer Andreas, Huehnchen Petra, Endres Matthias, **Specific targeting of neurotoxic side effects and pharmacological profile of the novel cancer stem cell drug salinomycin in mice**. Journal of Molecular Medicine (Berl). 2014 Apr 27

Beitrag im Einzelnen:

Die zu Grunde liegende Idee zu der vorliegenden Studie stammt von Wolfgang Böhmerle und Matthias Endres. Hanna Münzfeld, Wolfgang Böhmerle und Matthias Endres haben gemeinsam das Studiendesign entworfen, sowie die notwendigen tierexperimentellen Versuchsanträge erstellt.

Hanna Münzfeld hat im Verlauf der Studienzeit folgende Tätigkeiten durchgeführt:

- Subkutane Implantation der osmotischen Pumpen bei den Versuchstieren in Zusammenarbeit mit Petra Loge und Wolfgang Böhmerle
- Tägliche Aufbereitung und intraperitoneale Applikation des Pharmakons
- Tägliche Begutachtung der Versuchstiere und Aufbereitung der Haltung
- Durchführung der Trainingseinheiten sowie der Verhaltenstestungen (Catwalk, RotaRod, VonFrey Hair Test, Hot-Cold-Plate)
- Analgosedierung der Versuchstiere und Durchführung der elektrophysiologischen Messungen
- Auswertung der Daten der Verhaltenstestung und elektrophysiologischen Messungen zusammen mit Wolfgang Böhmerle.
- Entnahme der Blutproben zur laborchemischen Untersuchung zusammen mit Petra Loge.
- Entnahme und Aufbereitung der Blutproben zur Messung mittels UPLC/MS-MS zusammen mit Wolfgang Böhmerle.
- Euthanasie der Versuchstiere und Organpräparation in Zusammenarbeit mit Wolfgang Böhmerle, Petra Hühnchen und Petra Loge
- Histologische Aufarbeitung entnommener Gewebeproben (Leber, Niere, Herz, Skelettmuskulatur) mittels Paraffineinbettung, Erstellen der Gewebeschnitte, histochemische Anfärbung zusammen mit Petra Loge.
- Auswertung der Leber-, Nieren-, Herz- und Skelettmuskel-Histologie mittels Lichtmikroskopie und Weißlichttisch, sowie Mikrographien des Materials
- Erstellung von publikationsrelevanten Grafiken mittels GraphPad Prism Software, Adobe Photoshop, Microsoft Office Excel
- Mitarbeit an der Erstellung der Publikationsschrift in Zusammenarbeit mit Wolfgang

Böhmerle und Matthias Endres.

- Hanna Münzfeld und Wolfgang Böhmerle teilen sich die Erstautorenschaft.

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers

Unterschrift der Doktorandin

XI. Eidesstattliche Versicherung

Ich, Hanna Münzfeld, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Neurotoxizität und Pharmakokinetik des experimentellen Tumorthapeutikums Salinomycin im Mausmodell“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.

Datum

Unterschrift

XII. Danksagung

Mein tiefster Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Matthias Endres für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und Überlassung des interessanten Promotionsthemas.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Priv.-Doz. Dr. med. Wolfgang Böhmerle für seine hervorragende fachliche Betreuung, die richtungsweisenden inhaltlichen Denkanstöße und die stets tatkräftige Unterstützung während meiner Promotionsarbeit. Vielen Dank!

Ein großes Dankeschön gilt auch den Mitgliedern der AG Endres während der Zeit meiner Experimente; insbesondere Dr. Petra Hühnchen, Simon Gonzalez-Hirschfeld und Ruben Marquina danke ich für ihre wertvollen Tipps und Hilfestellungen.

Im Besonderen danken möchte ich auch Frau Petra Loge für ihren außerordentlichen laborexperimentellen Sachverstand und ihre unermüdliche Hilfsbereitschaft an und um die Laborwerkbank.

Ein herzliches Dankeschön gilt auch Dr. Andreas Springer für die unkomplizierte interdisziplinäre Zusammenarbeit im HPLC-Teilprojekt.

Ich danke zudem allen Kolleginnen und Kollegen im Labor der Abteilung für Experimentelle Neurologie am Campus Mitte für die wertvollen Hilfestellungen und eine stets produktive und kollegiale Arbeitsatmosphäre.

Vielen Dank auch an Anna Kufner für die Korrektur des englischen Anteils und an meine liebe Mutter, Regina Münzfeld, für das abschließende Lektorat dieser Arbeit.

Schlussendlich danke ich meiner gesamten Familie sowie meinem Freund Alexander Kalik für die liebevolle Unterstützung während der vergangenen Jahre.

In Liebe und dankbarer Erinnerung an meinen Vater Lutz Münzfeld.

Ich widme diese Arbeit meinen lieben Großeltern Heinrich und Doris Leven.