

5 Ergebnisse

5.1 Ergebnisse der Western-Blot-Analysen

LLC-MDR1-Zellen werden von zahlreichen Arbeitsgruppen zur Untersuchung von P-gp abhängigen Transportvorgängen eingesetzt. Da die Transfektion mit der DNA für humanes P-Glykoprotein schon 1995 erfolgte [Schinkel et al. 1995], wurde der Status der

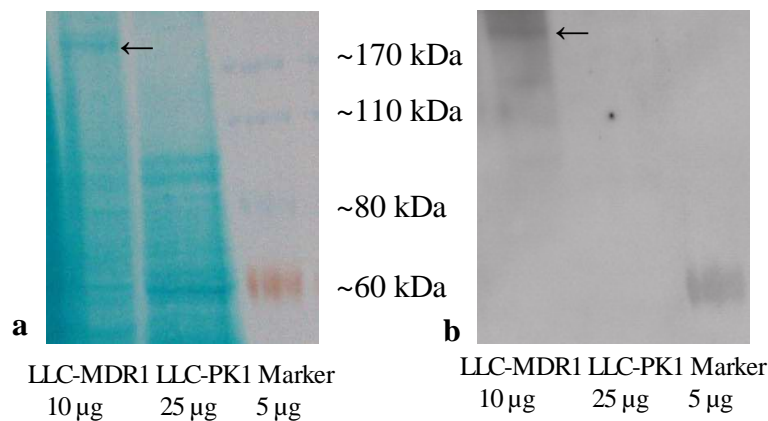


Abbildung 14: *Western Blot Nachweis von P-Glykoprotein*
a: Färbung mit Fast Green
b: Inkubation mit Antikörper C494 und Detektion mit ECL

Proteinexpression im Laufe der Experimente immer wieder kontrolliert. Dazu wurde ein aus den Zellen gewonnenes Proteingemisch mit Hilfe der SDS-PAGE getrennt, mittels Western-Blot auf eine Membran transferiert und mit spezifischen Antikörpern detektiert. Dabei konnte im Zeitraum der Experimente immer P-gp nachgewiesen werden. Zusätzlich wurde das Zellkulturmedium mit Vincristin in einer Endkonzentration von 0,64 µM supplementiert um den Selektionsdruck für P-gp aufrechtzuerhalten.

Abbildung 14 zeigt exemplarisch einen Western-Blot Nachweis für P-gp. Gut zu erkennen sind mehrere mit Fast Green eingefärbte Proteinbanden mit unterschiedlichem Molekulargewicht. Diese sind sowohl bei LLC-PK1 als auch bei LLC-MDR1 Zellen zu sehen. Nach der Inkubation mit einem spezifischen Antikörper und der Detektion ist nur noch eine Bande bei den transfizierten Zellen bei circa 170 kDa zu sehen. Das entspricht dem Molekulargewicht des P-Glykoproteins.

5.2 Voruntersuchungen

5.2.1 Zellzahl

Da sich die Versuche jeweils über 72 Stunden erstreckten und der Einfluss der untersuchten Substanzen auf das Zellwachstum untersucht werden sollte, war es wichtig, die Zahl der ausgesäten Zellen so zu wählen, dass diese erst zum Ende eines Experiments Konfluenz erreichten. Dazu wurden Zellen in unterschiedlicher Anzahl in 96-Well-Platten ausgesät und nach drei Tagen wurde ihre Konfluenz bestimmt. Das geschah mit Hilfe eines Mikroskops und durch die Bestimmung der Zellzahl. Aus den so ermittelten Werten konnte der für die durchzuführenden Experimente ideale Wert mit 8000 - 10000 Zellen pro Well bestimmt werden.

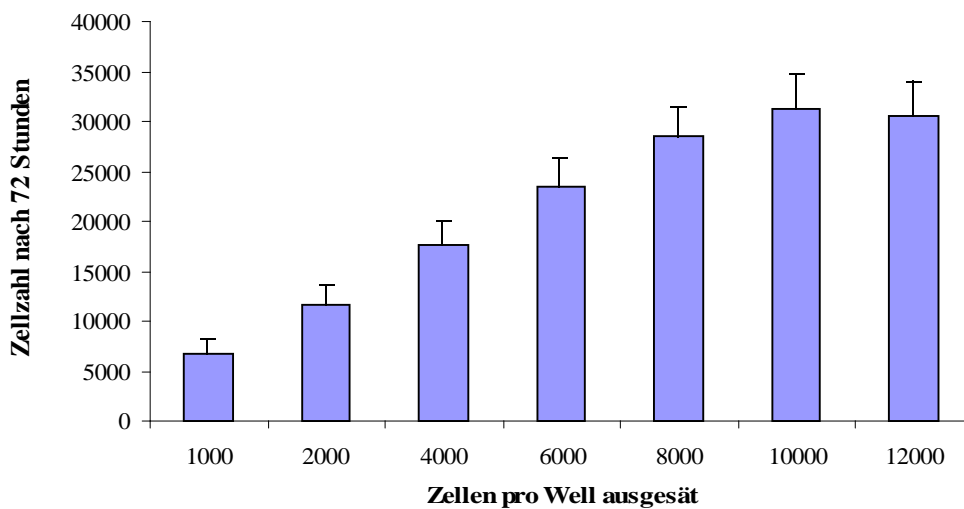


Abbildung 15: Bestimmung der optimalen Zellzahl für die Zytotoxizitätstests

LLC-MDR1 Zellen wurden in unterschiedlicher Anzahl ausgesät und wuchsen 72 Stunden. Danach erfolgte die Auswertung durch Bestimmung der Zellzahl und am Mikroskop. Die Daten sind Mittelwerte \pm SD aus $n = 3$ Einzelexperimenten

5.2.2 Lösungsmittelkonzentration

Um den Einfluss des Lösungsmittels auf die Zellen so gering wie möglich zu halten, wurde die Toxizität verschiedener DMSO-Konzentrationen bestimmt. Eine maximale Endkonzentration von 0,5 % DMSO wurde aufgrund dieser Untersuchungen für alle Experimente gewählt.

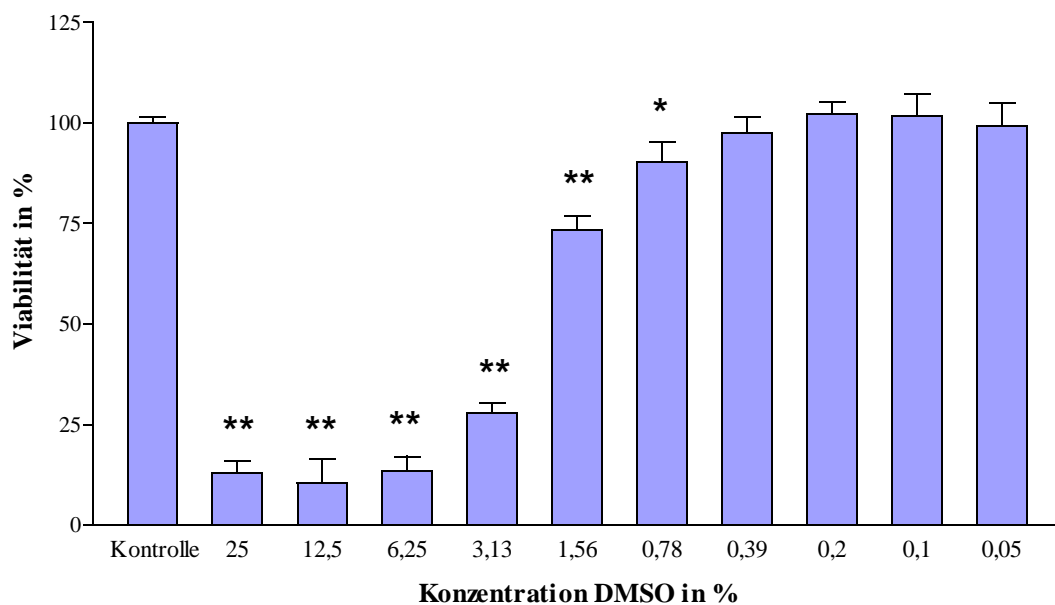


Abbildung 16: Überlebensfähigkeit von LLC-MDR1 Zellen bei unterschiedlichen DMSO-Konzentrationen, bestimmt mit dem Kristallviolett-Test.

LLC-MDR1 Zellen wurden ausgesät und nach vier Stunden mit verschiedenen Konzentrationen DMSO inkubiert. Nach 72 Stunden erfolgte die Auswertung.

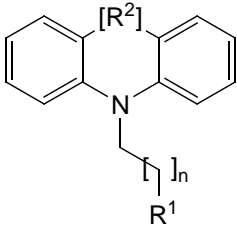
*) $p < 0,05$; **) $p < 0,001$: Inkubation vs. Kontrolle; einseitiger ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm SD aus $n = 3$ Einzelexperimenten

5.3 Ergebnisse der Zytotoxizitätstests

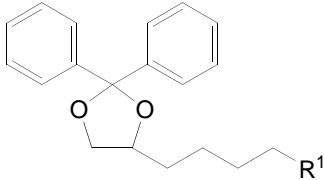
5.3.1 Vergleich von Kristallviolett-Test und MTT-Test

Im Vorfeld dieser Arbeit wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Langner bereits eine Anzahl der hier untersuchten Verbindungen getestet. Dazu gehörten unter anderem die von Ungvari synthetisierten und beschriebenen 1,3-Dioxolane und 1,3-Dioxane sowie Hydantoin-, Dibenzazepin- und Carbazol-Derivate [Ungvari 2005]. Die Testung erfolgte mit dem MTT-Test an CaCo2-Zellen. Die Ergebnisse sind in *Tabelle 5* dargestellt.

Tabelle 5: Übersicht über getestete Verbindungen und deren ermittelte Wirkwerte (MTT-Test) nach Ungvari [Ungvari 2005]

Verbindung n	R ¹	R ²	IC ₅₀ _{MOD} [μM ± SD]	pIC ₅₀ _{MOD}	IC ₅₀ _{TOX} [μM ± SD]	pIC ₅₀ _{TOX}	MQ	
								
51	3 MP	-	5,97 ± 3,25	5,22	21,74 ± 3,51	4,66	3,64	
53	3 DPh5P	-	10,07 ± 3,66	5,00	26,06 ± 3,61	4,58	2,59	
54	3 DPh5P	CH=CH	11,94 ± 3,06	4,92	21,31 ± 3,51	4,67	1,78	

MP = 4-Methylpiperazin; DPh5P = 4-(Diphenylpentyl)-piperazin

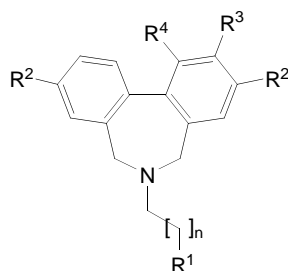
Verbindung	R ¹	IC ₅₀ _{MOD} [μM ± SD]	pIC ₅₀ _{MOD}	IC ₅₀ _{TOX} [μM ± SD]	pIC ₅₀ _{TOX}	MQ
						
55	MP	18,79 ± 4,74	4,73	42,84 ± 3,64	4,37	2,28
56	PIP	35,79 ± 3,92	4,45	81,69 ± 4,99	4,09	2,28
57	DPh5P	5,73 ± 3,57	5,24	17,32 ± 3,21	4,76	3,02

MP = 4-Methylpiperazin; PIP = Piperidin; DPh5P = 4-(Diphenylpentyl)-piperazin

Verbindung	n	R ¹	R ²	R ³	IC ₅₀ _{MOD} [μM ± SD]	pIC ₅₀ _{MOD}	IC ₅₀ _{TOX} [μM ± SD]	pIC ₅₀ _{TOX}	MQ
58 cis	2	MP	H	H	14,38 ± 3,90	4,84	86,23 ± 5,13	4,06	6,00
58 trans	2	MP	H	H	13,51 ± 3,64	4,87	78,56 ± 4,80	4,10	5,81
58 RR	2	MP	H	H	9,39 ± 3,14	5,03	83,45 ± 4,80	4,08	8,89
58 SS	2	MP	H	H	7,03 ± 3,42	5,15	80,79 ± 5,23	4,09	11,49
60 cis	2	DPh5P	H	H	9,21 ± 3,14	5,04	66,51 ± 3,64	4,18	7,22
60 trans	2	DPh5P	H	H	12,52 ± 3,51	4,90	65,32 ± 3,80	4,18	5,22
60 RR	2	DPh5P	H	H	18,51 ± 3,62	4,73	66,12 ± 3,56	4,18	3,57
60 SS	2	DPh5P	H	H	17,06 ± 3,72	4,77	65,84 ± 3,84	4,18	3,86
61	2	PIP	H	H	13,76 ± 4,78	4,86	66,39 ± 4,57	4,18	4,82
62	2	HEP	H	H	207,81 ± 6,12	3,68	289,31 ± 7,12	3,54	1,39
63	2	DPh1P	H	H	64,32 ± 5,12	4,19	73,67 ± 4,63	4,13	1,15
64	2	DPh2P	H	H	9,12 ± 5,02	5,04	18,32 ± 3,94	4,74	2,01
65	2	DPh3P	H	H	69,62 ± 4,99	4,16	79,38 ± 4,21	4,10	1,14
66	2	DPh4P	H	H	34,27 ± 4,17	4,47	43,73 ± 3,41	4,36	1,28
68	2	DFPh1P	H	H	50,64 ± 4,66	4,30	98,56 ± 5,21	4,01	1,95
69	1	MP	H	H	8,66 ± 3,23	5,06	33,22 ± 3,50	4,48	3,84
70	3	MP	H	H	25,41 ± 5,82	4,59	55,21 ± 5,19	4,26	2,17
71	1	DPh5P	H	H	19,91 ± 4,29	4,70	58,55 ± 3,98	4,23	2,94
72	3	DPh5P	H	H	27,36 ± 3,99	4,56	64,23 ± 3,97	4,19	2,35

MP = 4-Methylpiperazin; PIP = Piperidin; HEP = 4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin; DPh1P = 4-(Diphenylmethyl)-piperazin; DPh2P = 4-(Diphenylethyl)-piperazin; DPh3P = 4-(Diphenylpropyl)-piperazin; DPh4P = 4-(Diphenylbutyl)-piperazin; DPh5P = 4-(Diphenylpentyl)-piperazin; DFPh1P = 4-(Bis-(4-fluorphenyl)-methyl)-piperazin

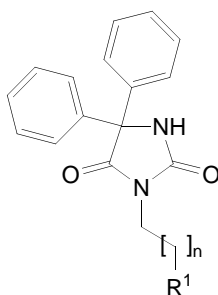
Verbindung	n	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	IC ₅₀ _{MOD} [μM ± SD]	pIC ₅₀ _{MOD}	IC ₅₀ _{TOX} [μM ± SD]	pIC ₅₀ _{TOX}	MQ
------------	---	----------------	----------------	----------------	----------------	--	----------------------------------	--	----------------------------------	----



77 3 DPh5P H H H 14,26 ± 3,54 4,85 20,24 ± 3,26 4,69 1,42

DPh5P = 4-(Diphenylpentyl)-piperazin

Verbindung	n	R ¹	IC ₅₀ _{MOD} [μM ± SD]	pIC ₅₀ _{MOD}	IC ₅₀ _{TOX} [μM ± SD]	pIC ₅₀ _{TOX}	MQ
------------	---	----------------	--	----------------------------------	--	----------------------------------	----

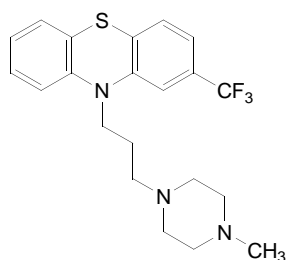


78 3 MP 20,04 ± 3,54 4,70 118,72 ± 7,23 3,93 5,92

79 3 DPh5P 3,42 ± 2,98 5,47 15,09 ± 3,19 4,82 4,41

MP = 4-Methylpiperazin; DPh5P = 4-(Diphenylpentyl)-piperazin

Verbindung	IC ₅₀ _{MOD} [μM ± SD]	pIC ₅₀ _{MOD}	IC ₅₀ _{TOX} [μM ± SD]	pIC ₅₀ _{TOX}	MQ
------------	--	----------------------------------	--	----------------------------------	----



TFP 16,05 ± 3,52 4,79 43,28 ± 3,31 4,36 2,70

TFP = Trifluperazin

Da die Erfahrungen mit dem MTT-Test in der Arbeitsgruppe überwiegend positiv waren, sollten sich damit weitere Untersuchungen der Verbindungen an LLC-MDR1-Zellen anschließen. Das galt auch für die Phenothiazin-Derivate. Allerdings kam es im Verlauf erster Experimente zu teilweise abweichenden Ergebnissen, für die zunächst keine plausible Erklärung gefunden werden konnte. Wurden zum Beispiel LLC-MDR1-Zellen mit Zytostatika wie Vinblastin, Vincristin oder Doxorubicin inkubiert, entsprach die am Plattenphotometer gemessene Absorption nicht der unter dem Mikroskop zu beobachtenden, tatsächlichen Dichte des Zellrasens (vgl. *Abbildung 17*). Die Ergebnisse des MTT-Tests ließen den Schluss auf eine höhere Viabilität und damit eine größere Anzahl Zellen als tatsächlich im Untersuchungsgefäß vorhanden waren zu. Die verstärkte Reduktion des Formazanfarbstoffs unter wachstumshemmenden Bedingungen wurde bereits von anderen Arbeitsgruppen beobachtet [Bernhard et al. 2003]; [Pagliacci et al. 1993]. Aufgrund dieses Phänomens wurden weitere Zytotoxizitätstests als mögliche Alternative zum MTT-Test durchgeführt und verglichen. Der Kristallviolett-Test zeigte dabei eine gute Übereinstimmung zwischen tatsächlicher Zellzahl und gemessener Absorption.

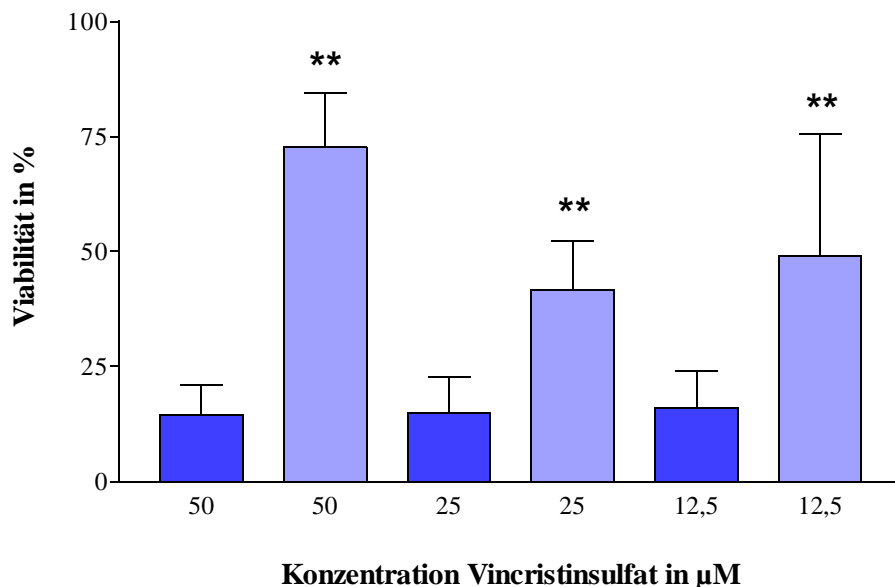


Abbildung 17: Überlebensfähigkeit von LLC-MDR1-Zellen nach Inkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen Vincristinsulfat. Kristallviolett-Test (dunkelblau), MTT-Test (hellblau)

LLC-MDR1 Zellen wurden ausgesät und nach vier Stunden mit Vincristinsulfat inkubiert.

Nach insgesamt 72 Stunden erfolgte die Auswertung.

** $p < 0,001$: gleiche Konz. Vincristinsulfat, Kristallviolett vs. MTT; einseitiger ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest. Die gezeigten Werte sind Mittelwerte \pm SD aus $n = 3$ Einzelexperimenten.

Die Arbeit mit dem Kristallviolett-Test erwies sich auch im Folgenden für die Aufgabenstellung dieser Arbeit als reproduzierbarer, unkomplizierter und unabhängiger von äußeren Einflüssen, wie Umgebungstemperatur oder Dauer der Inkubation mit der Reagenzlösung.

Deshalb wurde, obwohl es sich beim MTT-Test um einen etablierten und in der Laborpraxis bewährten Zellkulturtest handelt, dem Kristallviolett-Test in diesem Fall der Vorzug gegeben. Dieser ist für die Fragestellung nach der Quantifizierung des Zellwachstums als einfach, schnell und preiswert durchzuführender Test ausreichend, gerade wenn eine größere Anzahl von Experimenten durchzuführen ist.

Der Grund für die teilweise abweichenden Ergebnisse des MTT-Tests könnte in einer erhöhten mitochondrialen Aktivität der mit Zytostatika behandelten Zellen gesehen werden. Diese könnten in der selben Zeit mehr Formazan umsetzen als unbehandelte Zellen. Eine weitere Erklärung wäre nach *Vellonen et al.* die Möglichkeit, dass MTT als Substrat für P-gp mit anderen Substraten, wie den verwendeten Zytostatika, in Konkurrenz um den Transporter tritt [Vellonen et al. 2004]. In Folge des verminderten Effluxes, würden die mit Zytostatikum inkubierten Zellen in der selben Zeit mehr MTT umsetzen als die gleiche Anzahl unbehandelter Kontrollzellen.

5.3.2 Vergleich der Vitalfärbungstests

Neben dem Kristallviolett-Test wurden für einige Substanzen auch weitere Tests wie der Neutralrot-Test und der Sulforhodamin B-Test durchgeführt. Zwischen den ermittelten IC_{50} Werten ließen sich keine signifikanten Unterschiede erkennen. Exemplarisch sind in *Abbildung 18* die Ergebnisse für Verapamil dargestellt. Aus arbeitsorganisatorischen Gründen wurden im Folgenden alle anderen Experimente mit dem Kristallviolett-Test ausgewertet.

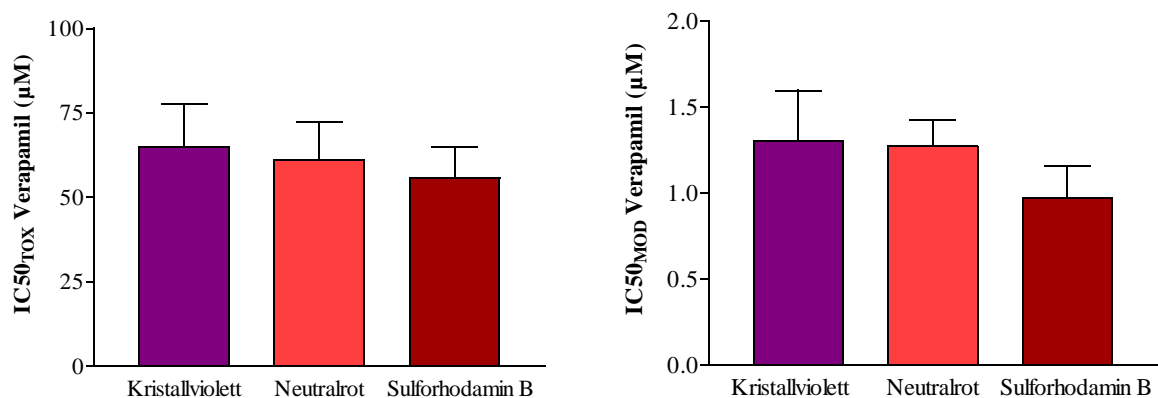


Abbildung 18: Ermittlung von $IC_{50_{TOX}}$ und $IC_{50_{MOD}}$ von Verapamil mit dem Kristallviolett-, Neutralrot- bzw. dem Sulforhodamin B-Test.

LLC-MDR1 Zellen wurden ausgesät und nach vier Stunden mit Verapamil bzw. Verapamil/Vincristinsulfat inkubiert. Nach insgesamt 72 Stunden erfolgte die Auswertung.

Kristallviolett vs. Neutralrot vs. Sulforhodamin B; einseitiger ANOVA und Bonferroni's multipler Vergleichstest.

Die gezeigten Werte sind Mittelwerte \pm SD aus $n = 3$ Einzelexperimenten. Es konnten keine signifikanten Unterschiede beobachtet werden ($p \leq 0,05$).

5.3.3 Darstellung der Ergebnisse

Für die Auswertung der Messergebnisse aus den Zytotoxizitätstests wurden die benötigten Werte mit Hilfe von *GraphPadPrism 3* ermittelt. Dabei konnte mit dem $IC_{50_{TOX}}$ -Wert zunächst eine Aussage über die Toxizität sowohl der jeweils untersuchten Verbindung als auch der Zytostatika gemacht werden. Ebenfalls wurden IC_{50} -Werte der Verbindungen in Gegenwart einer fixen Zytostatikakonzentration ($IC_{50_{MOD}}$), sowie IC_{50} -Werte für das Zytostatikum Vincristin in Gegenwart einer fixen Konzentration des jeweils untersuchten Modulators ($IC_{50_{VCR+}}$) bestimmt. Mit diesen Werten erfolgte die Bestimmung des modulatorischen Quotienten und der Fold Reversal. Eine Übersicht über die getesteten Verbindungen und die dazugehörigen Messwerte gibt *Tabelle 6*.

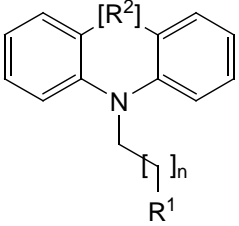
Die Messungen am FACS wurden mit WinMDI Version 2.8 ausgewertet. Die FAR-Werte sind in *Tabelle 7* aufgeführt.

Tabelle 6: Übersicht über die ermittelten Wirkwerte der getesteten Verbindungen und Referenzsubstanzen (Kristallviolett)

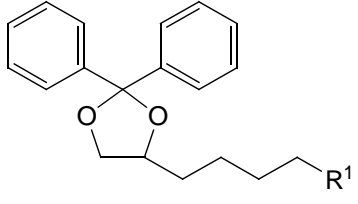
Verbindung	n	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	$IC_{50_{MOD}}$ [$\mu M \pm SD$]	$pIC_{50_{MOD}}$	$IC_{50_{TOX}}$ [$\mu M \pm SD$]	$pIC_{50_{TOX}}$	MQ
1	2	MP	H	H	H	H	2,26±0,42	5,65	16,55±2,53	4,78	7,33
2	2	MP	H	Me	H	H	1,73±0,19	5,76	14,87±0,26	4,83	8,60
3	2	MP	H	Ac	H	H	1,50±0,06	5,82	25,41±5,94	4,60	16,97
4	2	MP	H	Prop(ac)	H	H	0,49±0,08	6,31	13,18±2,06	4,88	26,89
5	2	MP	H	Bu(ac)	H	H	0,72±0,02	6,14	15,77±1,30	4,80	21,88
6	2	MP	H	Bzl	H	H	0,22±0,04	6,66	6,31±0,39	5,20	28,79
7	2	MP	H	[a]Bn	H	H	0,40±0,14	6,40	7,91±1,08	5,10	19,93
8	2	MP	H	H	[c]Bn	H	0,41±0,13	6,39	8,33±1,85	5,08	20,31
9	2	MP	H	H	OMe	H	0,91±0,22	6,04	14,25±0,62	4,85	15,71
10	2	MP	H	H	OEt	H	0,46±0,18	6,34	7,64±0,39	5,12	16,53
11	2	MP	H	H	tBu	tBu	1,24±0,39	5,91	6,13±1,05	5,21	4,95
12	3	MP	H	H	H	H	6,25±1,10	5,20	15,21±3,26	4,82	2,43

Verbindung	n	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	IC ₅₀ _{MOD} [μM ± SD]	pIC ₅₀ _{MOD}	IC ₅₀ _{TOX} [μM ± SD]	pIC ₅₀ _{TOX}	MQ
13	3	MP	H	Ac	H	H	1,88±0,26	5,73	22,47±5,58	4,65	11,92
14	3	MP	H	Prop(ac)	H	H	0,76±0,11	6,12	11,53±3,40	4,94	15,16
15	3	MP	H	Bu(ac)	H	H	0,36±0,01	6,44	7,32±0,18	5,14	20,19
16	3	MP	H	Bzl	H	H	0,20±0,01	6,70	7,66±0,58	5,12	38,37
17	3	MP	H	SMe	H	H	3,07±0,35	5,51	15,73±0,75	4,80	5,12
18	3	MP	H	[a]Bn	H	H	1,17±0,17	5,93	10,32±2,33	4,99	8,85
19	3	MP	H	H	[c]Bn	H	1,89±0,39	5,72	10,24±2,05	4,99	5,40
20	3	MP	H	H	Me	H	9,82±1,42	5,01	47,43±3,05	4,32	4,83
21	3	MP	H	H	Ph	H	3,06±0,36	5,51	13,32±1,21	4,88	4,35
22	3	MP	H	H	OBu	H	4,61±0,10	5,34	21,97±0,61	4,66	4,77
23	3	MP	H	H	Bu	H	5,17±0,97	5,29	14,66±0,66	4,83	2,84
24	3	MP	H	H	iBu	H	5,99±0,55	5,22	21,78±2,98	4,66	3,63
25	3	MP	H	H	tBu	H	5,42±1,55	5,27	21,44±3,16	4,67	3,96
26	3	MP	H	H	tBu	tBu	1,97±0,40	5,71	5,42±0,58	5,27	2,75
27	7	MP	H	H	H	H	4,87±1,27	5,31	12,00±3,81	4,92	2,46
28	7	MP	H	Prop(ac)	H	H	0,62±0,14	6,21	8,01±0,74	5,10	12,86
29	7	MP	H	Bu(ac)	H	H	2,29±0,46	5,64	27,74±1,55	4,56	12,10
30	7	MP	H	Bzl	H	H	1,22±0,13	5,91	8,43±0,62	5,07	6,92
31	1	O2MP	H	H	H	H	3,15±0,67	5,50	17,72±0,71	4,75	5,62
32	2	MP	H	H	H	H	2,26±0,42	5,65	16,55±2,53	4,78	7,33
33	2	MP	=O	H	H	H	7,64±0,67	5,12	119,67±8,21	3,92	15,67
34	4	MP	H	H	H	H	1,27±0,25	5,90	7,83±0,49	5,11	6,18
35	5	MP	H	H	H	H	4,32±1,06	5,37	17,58±1,88	4,76	4,07
36	6	MP	H	H	H	H	1,96±0,47	5,71	8,91±1,24	5,05	4,54
37	9	MP	H	H	H	H	1,09±0,19	5,96	4,44±1,03	5,35	4,09
38	11	MP	H	H	H	H	2,52±0,21	5,60	7,57±0,91	5,12	3,01

MP = 4-Methylpiperazin; O2MP = 2-(4-Methylpiperazin)-ethoxyl

Verbindung	n	R ¹	R ²	IC ₅₀ _{MOD} [μM ± SD]	pIC ₅₀ _{MOD}	IC ₅₀ _{TOX} [μM ± SD]	pIC ₅₀ _{TOX}	MQ
								
39	2	DPh2P	S	1,75 ± 0,18	5,76	29,66 ± 1,98	4,53	16,98
40	2	DPh3P	S	0,91 ± 0,07	6,04	22,70 ± 0,61	4,64	24,84
41	3	DPh1P	S	1,99 ± 0,14	5,70	24,09 ± 2,04	4,62	12,14
42	3	DPh2P	S	1,68 ± 0,17	5,78	24,04 ± 1,68	4,62	14,28
43	3	DPh3P	S	1,72 ± 0,20	5,76	22,82 ± 2,44	4,64	13,26
44	3	DPh4P	S	0,58 ± 0,07	6,24	9,17 ± 1,06	5,04	15,79
45	3	DPh5P	S	0,70 ± 0,08	6,16	10,55 ± 0,88	4,98	15,16
46	3	DFPh1P	S	4,77 ± 0,31	5,32	57,07 ± 2,91	4,24	11,96
47	3	ClPhPh1P	S	5,25 ± 0,65	5,28	43,33 ± 1,44	4,36	8,26
48	3	DPhOH1Pip	S	28,22 ± 3,71	4,55	62,41 ± 2,95	4,21	2,21
49	3	DPh1A	S	35,27 ± 5,37	4,45	308 ± 18,21	3,51	8,73
50	3	DPh2A	S	2,62 ± 0,26	5,58	19,28 ± 2,72	4,72	7,36
51	3	MP	-	4,53 ± 0,44	5,34	14,81 ± 0,44	4,83	3,27
52	3	MP	CH=CH	1,12 ± 0,23	5,95	15,65 ± 1,29	4,81	13,95
53	3	DPh5P	-	0,63 ± 0,06	6,20	13,64 ± 0,47	4,87	21,70
54	3	DPh5P	CH=CH	5,96 ± 1,08	5,23	53,83 ± 8,49	4,27	9,03

MP = 4-Methylpiperazin; DPh1P = 4-(Diphenylmethyl)-piperazin; DPh2P = 4-(Diphenylethyl)-piperazin; DPh3P = 4-(Diphenylpropyl)-piperazin; DPh4P = 4-(Diphenylbutyl)-piperazin; DPh5P = 4-(Diphenylpentyl)-piperazin; DFPh1P = 4-(Bis-(4-fluorphenyl)-methyl)-piperazin; ClPhPh1P = 4-(4-chlorphenyl-phenylmethyl)-piperazin; DPhOH1Pip = 4-(Diphenylhydroxymethyl)-piperidin; DPh1A = Diphenylmethylamin; DPh2A = Diphenylethylamin

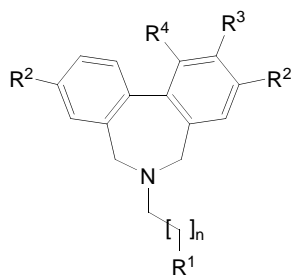
Verbindung	R ¹	IC ₅₀ _{MOD} [μM ± SD]	pIC ₅₀ _{MOD}	IC ₅₀ _{TOX} [μM ± SD]	pIC ₅₀ _{TOX}	MQ
						
55	MP	9,65 ± 0,10	5,02	28,48 ± 2,76	4,55	2,95
56	PIP	6,43 ± 1,31	5,19	32,76 ± 2,72	4,49	5,10
57	DPh5P	1,72 ± 0,02	5,76	8,58 ± 0,34	5,07	5,00

MP = 4-Methylpiperazin; PIP = Piperidin; DPh5P = 4-(Diphenylpentyl)-piperazin

Verbindung	n	R ¹	R ²	R ³	IC ₅₀ _{MOD} [μM ± SD]	pIC ₅₀ _{MOD}	IC ₅₀ _{TOX} [μM ± SD]	pIC ₅₀ _{TOX}	MQ
58 cis	2	MP	H	H	5,70 ± 0,65	5,24	14,18 ± 2,46	4,85	2,49
58 trans	2	MP	H	H	4,55 ± 0,05	5,34	9,67 ± 1,40	5,02	2,13
58 RR	2	MP	H	H	4,95 ± 0,16	5,31	15,33 ± 0,37	4,81	3,09
58 SS	2	MP	H	H	4,33 ± 1,21	5,36	16,60 ± 4,85	4,78	3,83
59	2	MP	Cl	H	1,35 ± 0,06	5,87	4,13 ± 0,02	5,38	3,07
60 cis	2	DPh5P	H	H	2,04 ± 0,22	5,69	10,70 ± 1,04	4,97	5,24
60 trans	2	DPh5P	H	H	2,53 ± 0,57	5,60	11,96 ± 0,22	4,92	4,72
60 RR	2	DPh5P	H	H	2,29 ± 0,60	5,64	17,52 ± 4,56	4,76	7,67
60 SS	2	DPh5P	H	H	2,04 ± 0,24	5,69	14,79 ± 1,33	4,83	7,26
61	2	PIP	H	H	4,16 ± 0,57	5,38	19,29 ± 1,73	4,72	4,64
62	2	HEP	H	H	14,30 ± 3,82	4,85	28,90 ± 3,50	4,54	2,02
63	2	DPh1P	H	H	58,70 ± 8,19	4,23	91,13 ± 19,48	4,04	1,55
64	2	DPh2P	H	H	3,40 ± 0,50	5,47	3,62 ± 0,43	5,44	1,07
65	2	DPh3P	H	H	2,05 ± 0,74	5,69	10,01 ± 1,99	5,00	4,88
66	2	DPh4P	H	H	4,44 ± 0,11	5,35	13,10 ± 0,63	4,88	2,95
67	2	DPh5P	H	H	4,55 ± 0,73	5,34	17,17 ± 3,09	4,77	3,78
68	2	DFPh1P	H	H	2,52 ± 0,22	5,60	9,26 ± 0,05	5,03	3,68
69	1	MP	H	H	9,62 ± 1,90	5,02	17,84 ± 1,19	4,75	1,85
70	3	MP	H	H	4,31 ± 0,25	5,37	9,12 ± 0,61	5,04	2,12
71	1	DPh5P	H	H	3,68 ± 0,73	5,43	18,80 ± 0,76	4,73	5,11
72	3	DPh5P	H	H	17,60 ± 5,72	4,75	48,37 ± 9,91	4,32	2,75
73	2	PP	H	H	15,42 ± 4,31	4,81			
74	2	MPhP	H	H	48,75 ± 6,37	4,31			
75	2	CNPh	H	H	n.b.				
76	2	BzlP	H	H	46,29 ± 5,98	4,33			

MP = 4-Methylpiperazin; PIP = Piperidin; HEP = 4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin; DPh1P = 4-(Diphenylmethyl)-piperazin; DPh2P = 4-(Diphenylethyl)-piperazin; DPh3P = 4-(Diphenylpropyl)-piperazin; DPh4P = 4-(Diphenylbutyl)-piperazin; DPh5P = 4-(Diphenylpentyl)-piperazin; DFPh1P = 4-(Bis-(4-fluorphenyl)-methyl)-piperazin; PP = 4-(2-Pyrimidyl)-piperazin; MPhP = 4-(2-Methylphenyl)-piperazin; CNPh = 4-(2-Cyanophenyl)-piperazin; BzlP = 4-Benzoylpiperazin; n.b. = nicht bestimmbar

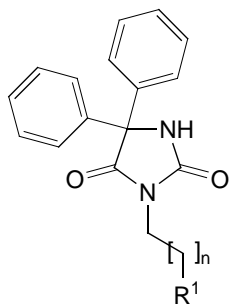
Verbindung	n	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	IC ₅₀ _{MOD} [μM ± SD]	pIC ₅₀ _{MOD}	IC ₅₀ _{TOX} [μM ± SD]	pIC ₅₀ _{TOX}	MQ
------------	---	----------------	----------------	----------------	----------------	--	----------------------------------	--	----------------------------------	----



77 3 DPh5P H H H 2,85 ± 0,35 5,55 8,38 ± 0,28 5,08 2,95

DPh5P = 4-(Diphenylpentyl)-piperazin

Verbindung	n	R ¹	IC ₅₀ _{MOD} [μM ± SD]	pIC ₅₀ _{MOD}	IC ₅₀ _{TOX} [μM ± SD]	pIC ₅₀ _{TOX}	MQ
------------	---	----------------	--	----------------------------------	--	----------------------------------	----



78 3 MP 45,48 ± 2,80 4,34 130,93 ± 2,29 3,88 2,88

79 3 DPh5P 1,99 ± 0,16 5,70 6,61 ± 0,51 5,18 3,32

MP = 4-Methylpiperazin; DPh5P = 4-(Diphenylpentyl)-piperazin

Verbindung	IC50 _{MOD} [$\mu\text{M} \pm \text{SD}$]	pIC50 _{MOD}	IC50 _{TOX} [$\mu\text{M} \pm \text{SD}$]	pIC50 _{TOX}	MQ
FPX	0,45 \pm 0,12	6,35	9,67 \pm 0,56	5,02	21,71
FPH	1,22 \pm 0,13	5,91	10,58 \pm 1,11	4,98	8,68
NCD	0,68 \pm 0,06	6,17	20,96 \pm 0,42	4,68	30,83
PF	1,30 \pm 0,27	5,89	25,10 \pm 2,4	4,60	19,28
RES	0,35 \pm 0,03	6,46	8,186 \pm 1,28	5,09	23,56
TFP	1,20 \pm 0,48	5,92	9,41 \pm 1,23	5,03	7,84
VER	1,30 \pm 0,24	5,89	65,03 \pm 10,33	4,19	50,00
VCR	--- ---	---	2,49 \pm 0,64	5,60	---

TFP = Trifluperazin; FPX = *cis*-Flupentixol; FPH = Fluphenazin; NCD = Nicardipin; VER = Verapamil; PF = Propafenon; RES = Reserpin; VCR = Vincristin

Verbindung	IC50 _{VCR+} [$\mu\text{M} \pm \text{SD}$]	Fold Reversal	Verbindung	IC50 _{VCR+} [$\mu\text{M} \pm \text{SD}$]	Fold Reversal	Verbindung	IC50 _{VCR+} [$\mu\text{M} \pm \text{SD}$]	Fold Reversal
				*[nM \pm SD]			*[nM \pm SD]	
18	0,34 \pm 0,06	7,31	37	2,59 \pm 0,09	0,96	60 cis	1,58 \pm 0,04	1,58
19	0,74 \pm 0,11	3,37	41	*260 \pm 17	9,51	73	*42 \pm 4	58,84
21	0,55 \pm 0,01	4,56	42	*35 \pm 3	71,02	74	*49 \pm 5	50,19
22	0,77 \pm 0,04	3,24	43	*33 \pm 2	74,60	77	1,83 \pm 0,11	1,36
23	0,62 \pm 0,05	4,00	44	*61 \pm 5	40,62	79	1,14 \pm 0,92	2,18
24	0,98 \pm 0,11	2,54	45	*58 \pm 3	42,59	FPX	*72 \pm 8	34,23
26	1,62 \pm 0,03	1,54	46	*273 \pm 14	9,12	FPH	*366 \pm 18	6,79
31	0,68 \pm 0,09	3,66	50	*430 \pm 135	5,74	NCD	*24 \pm 1	104,05
32	0,85 \pm 0,18	2,94	54	*131 \pm 20	18,99	PF	*236 \pm 17	10,52
34	1,23 \pm 0,30	2,03	55	0,31 \pm 0,02	8,12	RES	*20 \pm 1	122,24
35	1,01 \pm 0,12	2,46	58 cis	1,99 \pm 0,20	1,25	TFP	*685 \pm 64	3,63
36	1,03 \pm 0,12	2,42	59	1,01 \pm 0,28	2,46			

Tabelle 7: Übersicht über die FAR-Werte der am Durchflusszytometer vermessenen Substanzen

Verbindung	FAR ± SD	Verbindung	FAR	Verbindung	FAR
7	37,04 ± 12,28	2	4,13	31	0,97
8	34,56 ± 17,95	3	8,91	32	1,33
18	14,58 ± 9,01	4	21,51	33	0,91
19	9,26 ± 6,23	5	19,36	34	6,66
27	24,42 ± 8,40	6	29,83	39	4,57
36	15,52 ± 8,59	9	4,89	40	7,22
37	29,91 ± 19,00	10	13,61	41	2,02
53	26,71 ± 10,10	11	3,40	42	8,86
59	29,26 ± 6,18	13	3,08	43	14,02
60 cis	10,5 ± 5,51	14	19,78	44	23,39
60 trans	2,98 ± 0,84	15	9,85	45	9,94
60 RR	3,96 ± 0,99	16	88,19	46	0,93
60 SS	4,11 ± 1,01	20	0,91	50	9,23
77	22,27 ± 11,43	21	2,69	51	1,69
79	55,98 ± 13,81	25	1,02	52	4,21
VER	33,91 ± 16,55	26	13,84	CSP	105,53
TFP	15,46 ± 8,46	28	5,86		
FPX	23,22 ± 2,86	29	1,25		
NCD	24,8 ± 13,96	30	13,54		

VER = Verapamil; TFP = Trifluoperazin, FPX = *cis*-Flupentixol; NCD = Nicardipin; CSP = Cyclosporin

Substanzen, für deren FAR-Werte eine Standardabweichung angegeben ist, wurden dreimal an verschiedenen Tagen vermessen. Die übrigen Substanzen wurden lediglich einmal im Rahmen eines Screenings vermessen.

Bedeutung der Abkürzungen der Tabellen:

IC50_{MOD}: Konzentration an Modulator, bei der in Gegenwart einer bestimmten Zytostatikakonzentration 50 % aller behandelten Zellen nicht überlebten.

IC50_{TOX}: Konzentration an Modulator bei der 50 % aller Zellen nicht überlebten

IC50_{VCR+}: Konzentration an Vincristin, bei der in Gegenwart einer bestimmten Modulatorkonzentration (IC10) 50 % aller Zellen nicht überlebten

IC10: Konzentration des Modulators, bei der 10 % der Zellen nicht überlebten

MQ: modulatorischer Quotient

FR: Fold Reversal

FAR: Fluorescence Activity Ratio

SD: Standardabweichung

5.3.4 Struktur-Wirkungs-Beziehungen

Anhand der Ergebnisse der Zellversuche können durch systematische Variation und Kombination von Moleküldomänen (lipophiles Grundgerüst, Linker, basischer Rest) neben allgemeinen Struktur-Wirkungs-Beziehungen auch gezielt Rückschlüsse auf die Wirksamkeit einzelner Teilbereiche der Verbindungen gezogen werden. Zur Veranschaulichung werden in den folgenden Diagrammen die ermittelten Wirkwerte ausgewählter Endverbindungen mit jeweils zwei identischen und einer variablen Moleküldomäne dargestellt. Es werden die jeweils wirksamsten Verbindungen betrachtet. Die Zahl auf der Abszisse kennzeichnet die jeweilige Substanz, die Ordinate gibt den ermittelten modulatorischen Quotienten an.

5.3.4.1 Lipophiles Grundgerüst

Phenothiazine

Die *Abbildung 19* zeigt die modulatorischen Quotienten von Verbindungen mit PhenothiazinGrundkörpern. Dabei wurde ausgehend von Trifluperazin bei konstanter Linkerlänge (C_3) und einheitlichem 4-Methylpiperazin-Rest am Linker zuerst die Substitution am PhenothiazinGrundgerüst variiert. Es zeigte sich, dass in 2-Stellung die Acylreste Benzoyl (**6**), Propionyl (**4**), Butyryl (**5**) und Acetyl (**3**) am besten wirksam sind. Ebenfalls gut wirksam erwiesen sich neben Verbindungen mit ankondensiertem Benzolring in [a] (**8**) und in [c] Stellung (**7**) auch Ethoxy- (**10**) bzw. Methoxygruppen (**9**) in 3-Stellung. Weniger gut wirksam war Verbindung **11** die mit voluminösen Tertiärbutyl-Resten in 3 und 7 Position substituiert wurde. Da neben der MDR-modulatorischen Komponente der Phenothiazine deren eigentliche neuroleptische Hauptwirkung durch Blockade von Dopaminrezeptoren und weitere pharmakologische Wirkungen unter Blockade von Muscarin- oder Histaminrezeptoren den Einsatz als MDR-Modulatoren limitiert, wurde versucht, über Modifizierung der Länge des Linkers die neuroleptische Wirksamkeit abzuschwächen. Der erste Schritt war eine Verlängerung des Linkers auf vier Kohlenstoffatome (**12-26**), zumal aus der vorangegangenen Arbeit von *Ungvari* bekannt war, dass ein vierzähliger Linker eine dem dreizähligen vergleichbare Wirksamkeit besitzt [Ungvari 2005]. Auch bei diesen Verbindungen ist eine gute Wirksamkeit der in 2-Stellung acylierten Substanzen zu beobachten. Substanz

16 (Benzoyl-Rest) weist den höchsten modulatorischen Quotient aller synthetisierten Verbindungen auf. Allerdings ändert sich im Vergleich zu den Verbindungen mit dreizähligen Linker die Reihenfolge der Wirkstärke für die übrigen Reste (Butyryl (**15**) > Propionyl (**14**) > Acetyl (**13**)). Auch die Verbindungen **18** und **19**, mit den ankondensierten Ringen folgen in ihrer Wirkstärke. Anzumerken ist, dass die modulatorischen Quotienten für die Verbindungen mit C₄-Linker mit einer Ausnahme niedriger sind als bei den entsprechenden Verbindungen mit C₃-Linker. Die Alkylierung in 3-Stellung bringt nur eine geringe Wirkverstärkung im Vergleich zu Trifluperazin.

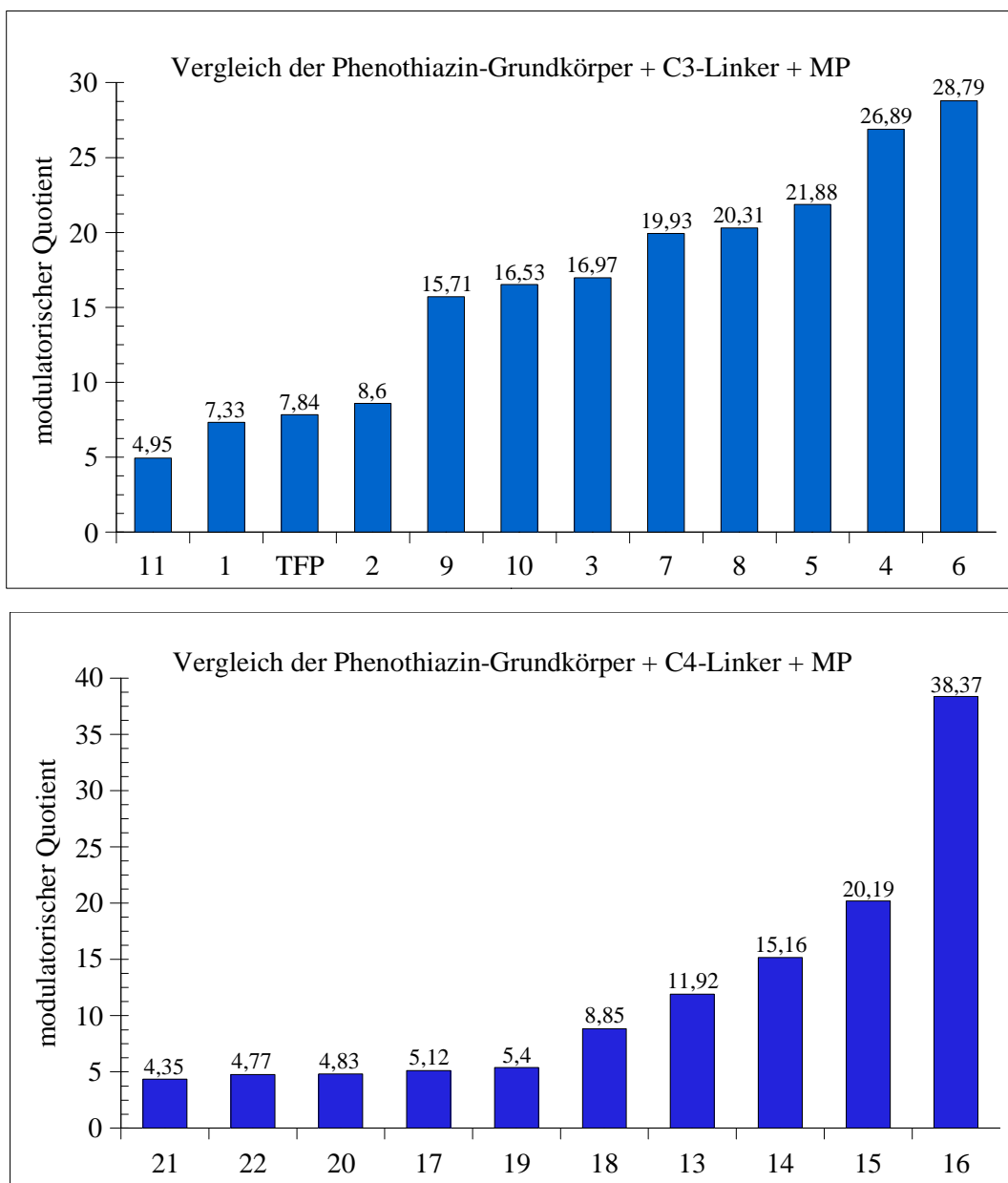


Abbildung 19: Einfluss des Phenothiazingrundkörpers auf die Wirksamkeit der 4-Methylpiperazin-Derivate (Formeln s. Seiten 56 und 57)

Übrige Grundkörper

Bereits vor der Synthese der Phenothiazinverbindungen wurde eine Reihe weiterer Substanzen synthetisiert und untersucht [Ungvari 2005]. Der Wirkungsvergleich dieser übrigen lipophilen Grundstrukturen erfolgt durch Substanzen mit jeweils einheitlicher Linkerlänge und 4-Methylpiperazin-Rest, da dieser als basischer Standardrest bei allen verwendeten Grundstrukturen substituiert wurde.

Wie in *Abbildung 20* zu erkennen, ist die Wirkstärke der übrigen Substanzen allgemein geringer als bei den Phenothiazin-Derivaten. Die beste Wirksamkeit zeigt Substanz **52** mit einer trizyklischen Iminostilben-Grundstruktur. Eine Korrelation zwischen modulatorischem Effekt und der Struktur zeigen die 4,5-Diphenyl-1,3-dioxolane, bei denen es sich um bis dahin als MDR-Modulatoren unbekannte Verbindungen handelt [Ungvari 2005]. Die zwischen den einzelnen Strukturisomeren feststellbaren Unterschiede lassen eine bessere Wirksamkeit der optisch aktiven Formen gegenüber den *meso*-Formen erkennen (**54/SS** > **54/RR** > **54/cis** > **54/trans**).

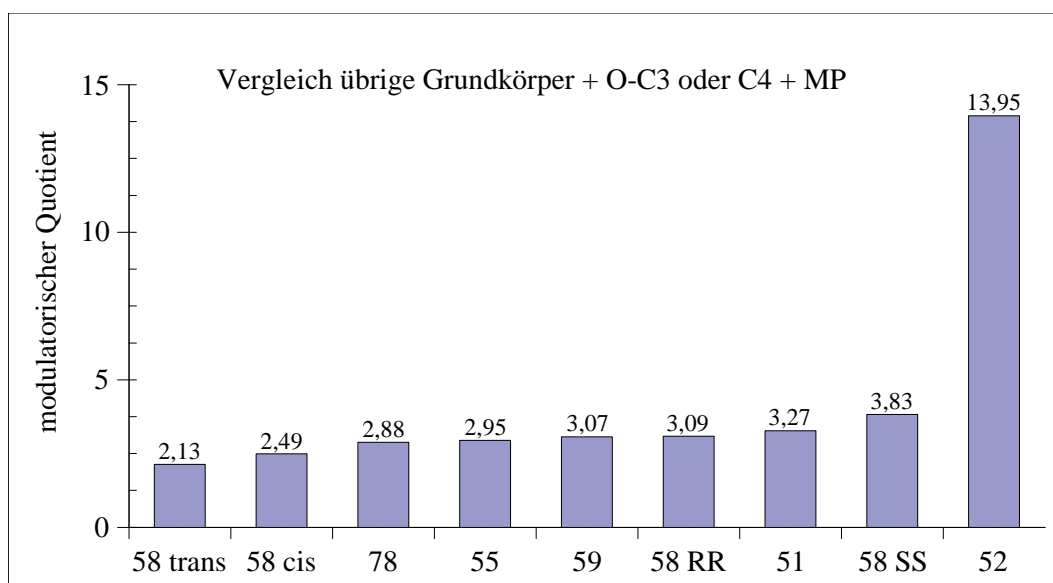


Abbildung 20: Einfluss der übrigen Grundstrukturen auf die Wirksamkeit der 4-Methylpiperazin-Derivate (Formeln s. Seite 58 und 59)

Dieses Ergebnis bleibt auch bestehen wenn, wie in *Abbildung 21* dargestellt, der 4-Methylpiperazin-Rest gegen 4-(Diphenylpentyl)-piperazin ausgetauscht wird. Lediglich das SS-Isomer **60 SS** tauscht mit dem RR-Isomer **60 RR** bei ähnlicher Wirkstärke die Position. Obwohl die Iminostilben-Verbindung **54** nach wie vor gute Wirksamkeit besitzt, zeigt nun das Carbazol-Derivat (**53**) den größten modulatorischen Effekt. Auch die Reihenfolge von 2,2-Diphenyl-1,3-dioxolan (**57**) und Hydantoin-Grundkörper (**79**) bleibt erhalten. Auf die Tatsache, dass der modulatorische Quotient größer ist als bei den Verbindungen mit 4-Methylpiperazin-Rest, wird an späterer Stelle eingegangen.

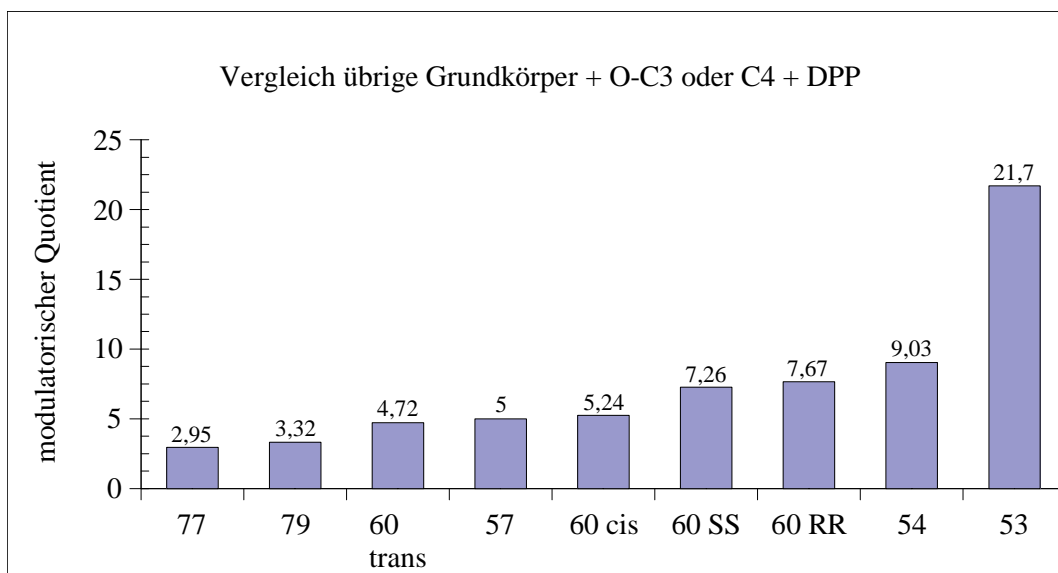


Abbildung 21: Einfluss der übrigen Grundstrukturen auf die Wirksamkeit der 4-(Diphenylpentyl)-piperazin-Derivate (Formeln s. Seiten 58, 59 und 60)

5.3.4.2 Linker

Phenothiazine

Abbildung 22 zeigt den Einfluss von unterschiedlichen Kettenlängen des Linkers auf die Wirksamkeit der Phenothiazine bei gleichem Grundkörper und 4-Methylpiperazin-Rest. Hier zeigt der Linker mit Carbonylfunktion in α -Stellung (**33**) eine höhere Wirkstärke als die Alkyl-Linker. Bei diesen ist zu beobachten, dass Verbindungen deren Linker aus einer ungeraden Anzahl Atome besteht, wirksamer sind als solche bei denen der Linker aus einer geraden Anzahl besteht. Innerhalb der Gruppe mit ungerader Anzahl nimmt die Wirkstärke mit steigender Kettenlänge ab (**32** > **34** > **31** > **36**). Bei den Verbindungen mit gerader Anzahl Kohlenstoffatome ist dieser Trend nicht zu beobachten. Das unsubstituierte Phenothiazin **12** mit vierzähligen Linker erweist sich im Vergleich zu den übrigen Strukturen als relativ schwach.

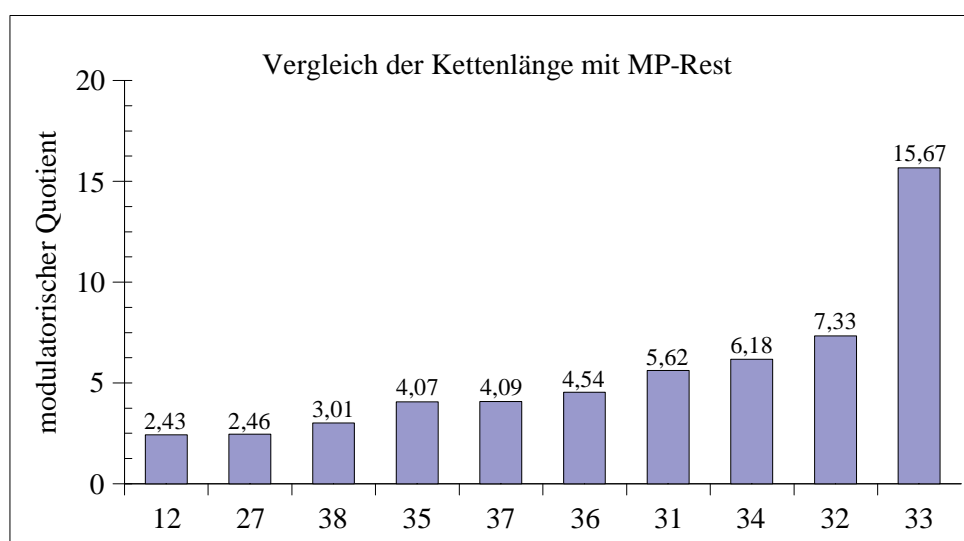


Abbildung 22: Einfluss des Linkers auf die Wirksamkeit der Phenothiazine mit 4-Methylpiperazin-Rest (Formeln s. Seiten 56 und 57)

In Abbildung 23 ist der Einfluss der Kettenlänge auf die Wirksamkeit von verschiedenen Phenothiazin-Derivaten dargestellt. Es handelt sich um die jeweils wirksamsten Verbindungen, die alle in 2-Stellung acyliert sind. Wiederum ist mit der Ausnahme des Benzoyl-Substituenten der dreizählige Linker dem vier- bzw. achtzähligen überlegen.

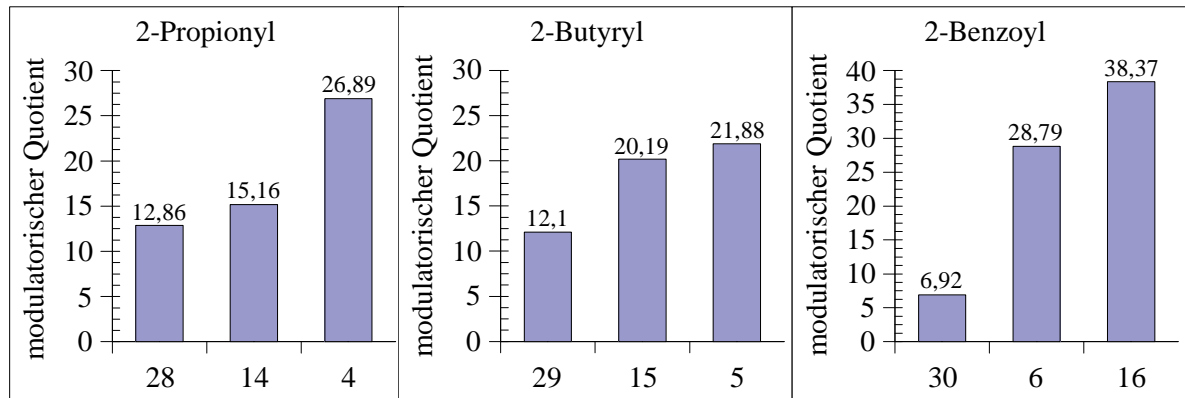


Abbildung 23: Einfluss der Linkerlänge bei verschiedenen PhenothiazinGrundkörpern mit MP-Rest (Formeln s. Seiten 56 und 57)

Übrige Grundkörper

Da es sich bei den im Vorfeld der Synthese und Testung der Phenothiazin-Derivate untersuchten 4,5-Diphenyl-1,3-dioxolanen um neuartige Strukturen handelt, existierten zunächst keine Erkenntnisse über die optimale Länge des Linkers. Dieser besteht aus den C-Atomen der Alkylkette und dem Ethersauerstoff des bei der Synthese eingesetzten 4-Hydroxybenzaldehyds.

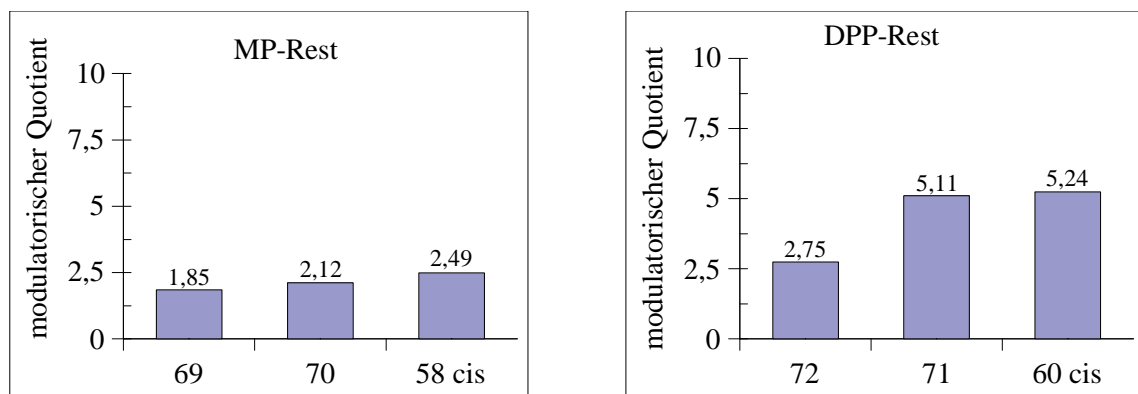


Abbildung 24: Einfluss der Linkerlänge auf die Wirksamkeit der 4,5-Diphenyl-1,3-dioxolane mit 4-Methylpiperazin- bzw. 4-(Diphenylpentyl)-piperazinrest (Formeln s. Seite 59)

Abbildung 24 zeigt den Einfluss der Linker-Länge auf die Wirksamkeit der 4,5-Diphenyl-1,3-dioxolane. Dargestellt ist der modulatorische Quotient der Verbindungen mit den beiden wirksamsten basischen Resten (MP, DPP) mit dreizähligen (OC_2), vierzähligen (OC_3) und fünfzähligen Linker (OC_4). Es zeigte sich, dass für beide basischen Reste der vierzählige Linker eine geringfügig bessere

Wirksamkeit aufweist. Damit stellt dieser eine für diese Substanzklasse günstige Entfernung zwischen dem lipophilen Molekülteil und dem basischen Rest dar. Basierend auf diesen Erkenntnissen wurden für die Phenothiazine, wie bereits erwähnt, als erster Schritt zur Modifikation der Kettenlänge Substanzen mit vierzähliger Linker synthetisiert. Bei diesen wurde davon ausgegangen, dass sie die übrigen pharmakologischen Wirkungen der Verbindungen mit dreizähliger Linker nicht in dem bekannten Maße aufweisen.

5.3.4.3 Basische Reste

Phenothiazine

Die in *Abbildung 25* dargestellten modulatorischen Quotienten geben den Einfluss von verschiedenen basischen Resten auf die Wirksamkeit der Phenothiazine wieder. Der Grundkörper aller Verbindungen ist das unsubstituierte Phenothiazin mit vierzähligem Linker. Allgemein kann festgestellt werden, dass die 4-(Diphenylalkyl)-piperazin-Reste (**41-50**) besser wirksam sind als der 4-Methylpiperazin-Rest (**12**). Auffällig ist, dass Verbindungen mit nur einer Aminogruppe im Linker (**48-50**) einen geringeren modulatorischen Quotienten aufweisen als die Piperazin-Derivate. Verbindung **48** ist bedingt durch die erhöhte Hydrophilie aufgrund der Hydroxylgruppe in unmittelbarer Nähe der Phenyl-Reste die schwächste der hier aufgeführten Substanzen.

Bei den übrigen Resten scheint ein Abstand von vier (**44**) oder fünf (**45**) Kohlenstoffatomen zwischen Piperazin und den Phenylringen günstig für die Wirksamkeit zu sein. Dieser Abstand entspricht etwa dem Abstand zwischen Piperazin und Grundkörper. Innerhalb dieser Gruppe kann ein allgemeiner Zusammenhang zwischen Basizität und Wirkstärke festgestellt werden. Die Basizitäten von **44** und **45** sind aufgrund der Kettenlänge ungefähr gleich. Gleichzeitig sind es die höchsten der hier verwendeten Substituenten, was sich in der guten Wirksamkeit der Verbindungen widerspiegelt. Kürzere Kettenlängen (**41-43**) führen zu geringerer Wirksamkeit und die Einführung elektronenziehender Substituenten in die Phenylringe (**46, 47**) verringert die Wirkung zusätzlich.

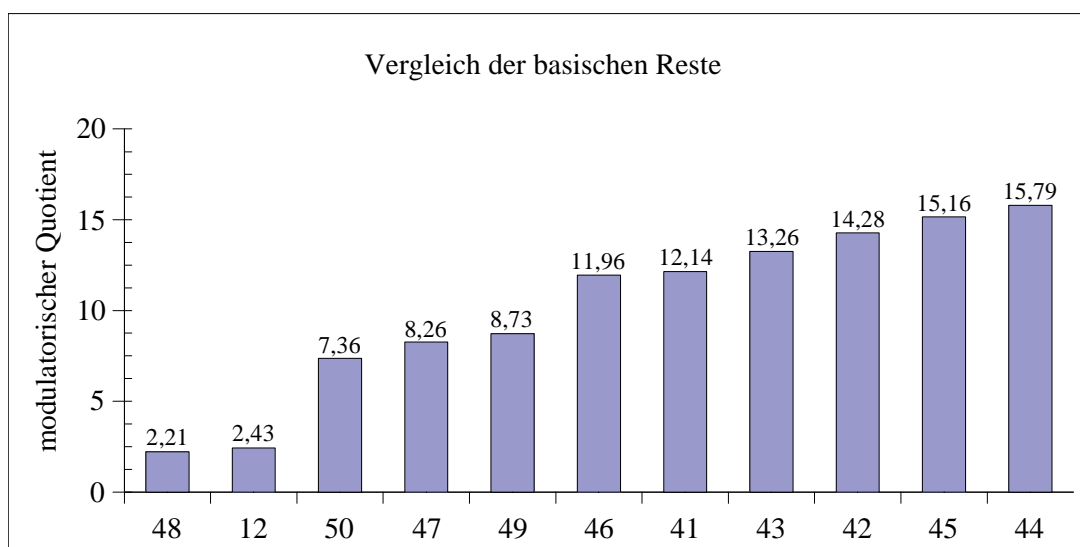


Abbildung 25: Einfluss des basischen Restes auf die Wirksamkeit des Phenothiazin-Grundkörpers (Formeln s. Seite 56 und 58)

Übrige Grundkörper

Abbildung 26 zeigt den modulatorischen Quotienten von Verbindungen mit unterschiedlichen basischen Resten. Die hier verglichenen Substanzen besitzen als einheitlichen Grundkörper alle einen 4,5-Diphenyl-1,3-dioxolanring (*cis*-Isomer) mit vierzähliger Linker (O-C₃).

Allgemein ist zu erkennen, dass die 4,5-Diphenyl-1,3-dioxolane im Vergleich zu den Phenothiazin-Derivaten eine geringere Wirksamkeit aufweisen. Im Vergleich zum Phenothiazin-Grundkörper bewirken die unsubstituierten 4-(Diphenylalkyl)-piperazin-Reste gegenüber der 4-Methylpiperazin-Verbindung **58** hierbei erst eine Wirkungsverstärkung, wenn die Länge der Alkylkette mindestens drei Kohlenstoffatome beträgt (**60 cis**, **65**, **66**). Weiterhin fällt auf, dass so der Austausch des 4-Methylpiperazins gegen Piperidin (**61**) zur Wirkungsverstärkung führt, obwohl damit das zweite basische Zentrum wegfällt. Die *para*-Fluorsubstitution der Phenylringe (**68**) bewirkt ebenfalls eine Erhöhung des modulatorischen Quotienten im Vergleich zur unsubstituierten Verbindung **63**. Die beiden letzten genannten Ergebnisse stehen überraschenderweise im Gegensatz zu den Beobachtungen bei den Phenothiazin-Verbindungen. Der 4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-Substituent (**62**) erhöht die Hydrophilie des Moleküls und senkt erwartungsgemäß die Wirksamkeit der Verbindung.

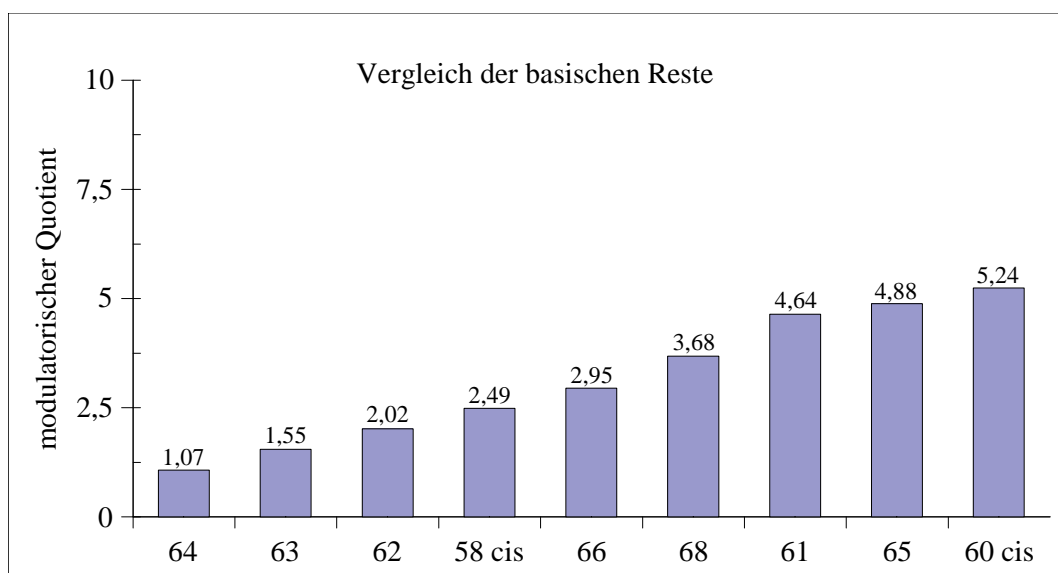


Abbildung 26: Einfluss des basischen Restes auf die Wirksamkeit des 4,5-Diphenyl-1,3-dioxolan-Grundkörpers

Der 4-(Diphenylpentyl)-piperazin-Rest zeigt bei allen untersuchten Verbindungen eine bessere Wirksamkeit als der 4-Methylpiperazin-Rest; einzige Ausnahme stellt der Iminostilben-Grundkörper (**52**, **54**) dar.

Abbildung 27 zeigt den Vergleich zwischen jeweils gleichen Grundkörpern mit vierzähligem Linker, bei denen einmal 4-Methylpiperazin und einmal 4-(Diphenylpentyl)-piperazin als basischer Rest substituiert wurde.

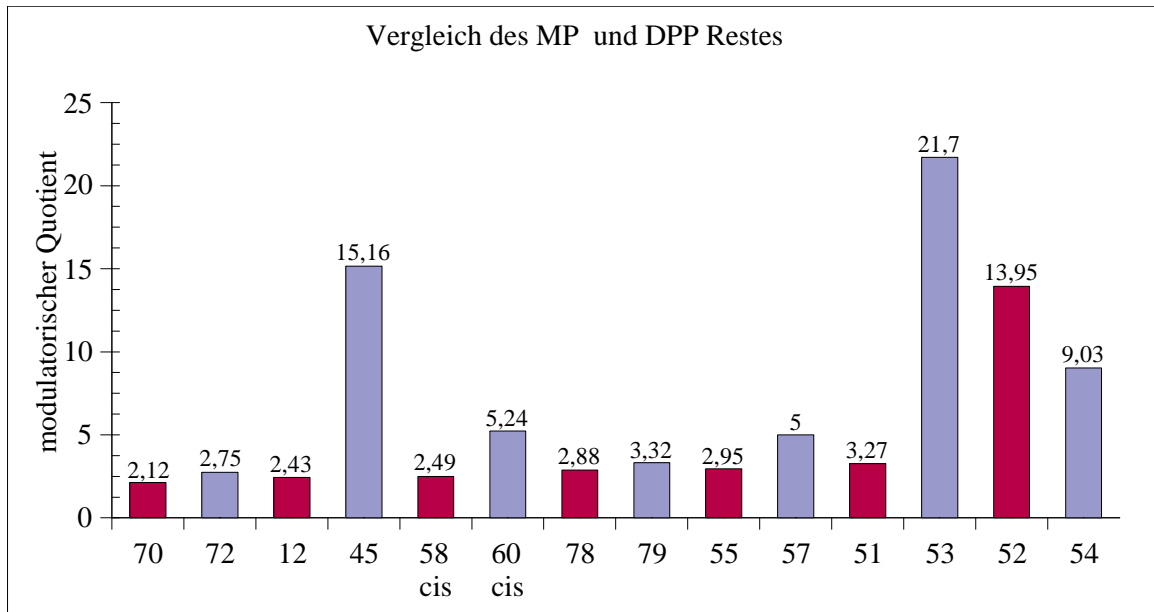


Abbildung 27: Vergleich der Wirkung des 4-Methylpiperazin-Rests (rot) und des 4-(Diphenylpentyl)-piperazin-Rests (blau) auf verschiedene Grundkörper

5.3.4.4 Vergleichssubstanzen

Abbildung 28 zeigt die modulatorischen Quotienten der verwendeten Vergleichssubstanzen. Es handelt sich dabei um Arzneistoffe mit bekannter modulatorischer Wirkung am P-Glykoprotein. Am besten wirksam zeigten sich hier die Calciumantagonisten Verapamil (**VER**) und Nicardipin (**NCD**). Der potenteste Vertreter bei den Phenothiazinen ist cis-Flupentixol (**FPX**). Trifluperazin (**TFP**) und Fluphenazin (**FPH**) entsprechen sich in etwa in ihrer Wirkstärke.

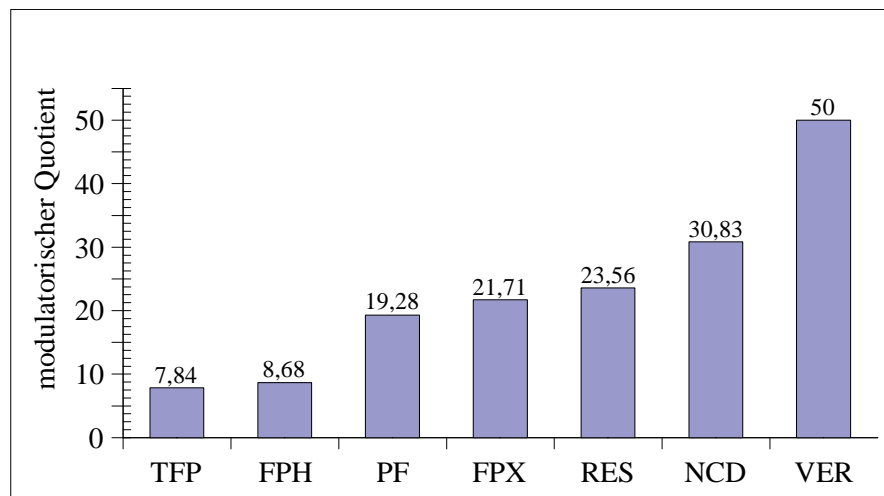


Abbildung 28: Vergleichssubstanzen

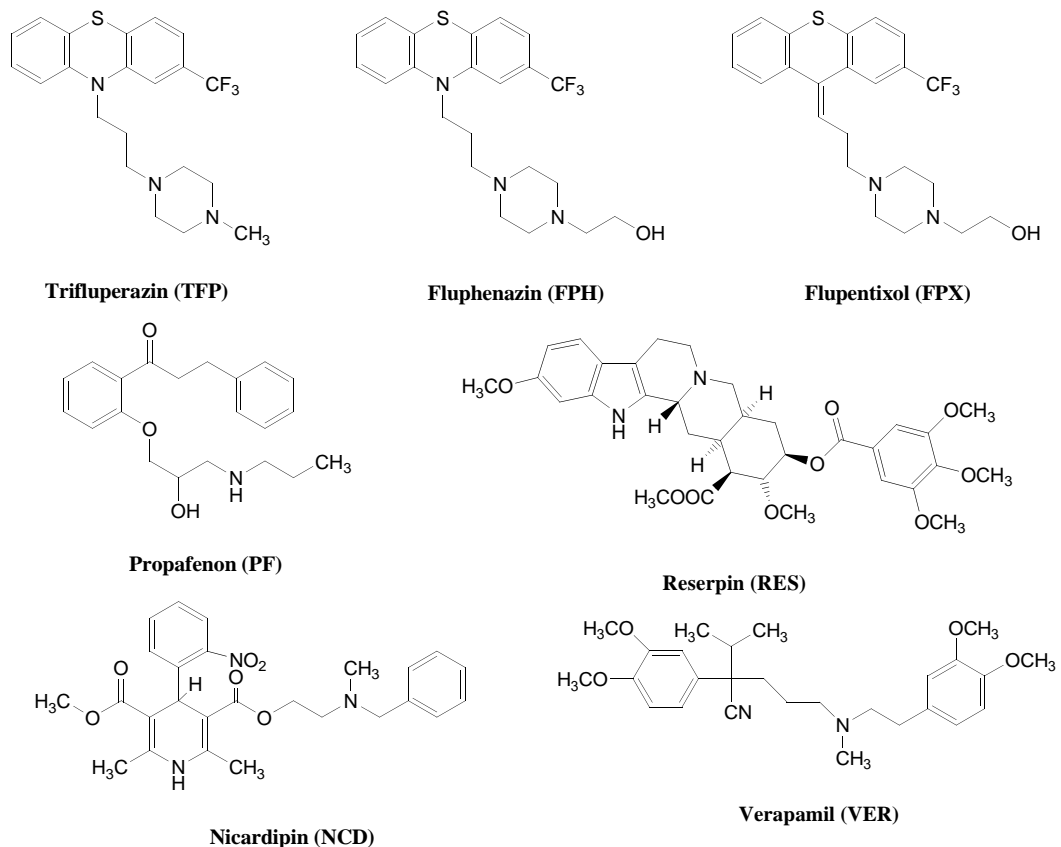


Abbildung 29: Strukturformeln der verwendeten Vergleichssubstanzen

5.4 Modulatorischer Quotient und Fold Reversal

Zur Bestimmung der modulatorischen Potenz einer Substanz mit Hilfe von Zytotoxizitätstests können unterschiedliche Werte herangezogen werden. Diese Einzelwerte sind idelaer Weise nicht isoliert, sondern im Zusammenhang zu betrachten. Betrachtet man alleine die $IC_{50_{MOD}}$, die Konzentration des Modulators, bei der in Gegenwart einer definierten, untoxischen Konzentration des verwendeten Zytostatikums nur 50 % der Zellen im Vergleich zur Kontrolle überleben, kann man noch keine Aussage zur Toxizität der untersuchten Verbindung machen. Die Bestimmung der $IC_{50_{TOX}}$, die Konzentration des Modulators bei der 50 % der Zellen im Vergleich zur Kontrolle überleben, wiederum sagt nichts zur Wirksamkeit einer Substanz aus. Eine gute Möglichkeit beide in ein Verhältnis zu setzen ist die Ermittlung des modulatorischen Quotienten (s. 4.1.4.5.1). Ein Nachteil dieser Bestimmung ist, dass geringe Toxizitäten und geringe Schwankungen bei kleinen $IC_{50_{MOD}}$ -Werten zu starken Schwankungen des Quotienten führen können.

Eine weitere Möglichkeit besteht in der Berechnung der Fold Reversal (s. 4.1.4.5.2). Sie ist definiert als Quotient aus der IC_{50} des eingesetzten Zytostatikums in Abwesenheit bzw. Gegenwart einer relativ untoxischen Konzentration des Modulators.

Dieser Wert variiert in der Praxis allerdings, da einige Arbeitsgruppen äquimolare, andere dagegen äquitoxische Konzentrationen, üblicherweise die IC_{10} , verwenden. Untersuchungen zu Struktur-Wirkungs-Beziehungen werden bevorzugt mit Daten gleicher molarer Konzentrationen der verglichenen Modulatoren durchgeführt [Wiese, Pajeva 2001]. Das hat den Nachteil, dass Substanzen, die bei höheren Konzentrationen immer noch untoxisch sind, „übersehen“ werden können

Zusätzlich ist anzumerken, dass bei dieser Methode die Konzentration des Zytostatikums variiert, während die Therapieschemata in der klinischen Praxis vorwiegend fixe Konzentrationen vorgeben. Hinzu kommt, dass es für die praktische Anwendung und effiziente Durchführung der Experimente günstiger ist, bei konstanter Konzentration des Zytostatikums die Konzentration des Modulators zu verändern. Deshalb lag bei dieser Arbeit der Schwerpunkt auf der Bestimmung des modulatorischen Quotienten.

Für eine Reihe von ausgewählten Verbindungen wurden trotzdem Werte für Fold Reversal bestimmt (vgl. *Tabelle 6, S.61*). Es zeigte sich, dass Substanzen mit einem geringen modulatorischen Quotienten auch geringe Fold Reversal Werte aufwiesen. Dementsprechend wurden für Verbindungen mit hohem modulatorischen Quotienten

hohe Fold Reversal Werte ermittelt. So zeigte zum Beispiel die Substanz mit dem höchsten modulatorischen Quotienten (**16**) den höchsten Wert für Fold Reversal von allen synthetisierten Substanzen .

Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang die gute Wirksamkeit der Phenothiazine mit DiphenylpiperazinResten mit unterschiedlichen Kettenlängen (**42–45**). Wobei überrascht, dass die Verbindungen **42** und **43** mit kürzeren Abständen zwischen Piperazin und Diphenylrest besser wirksam sind als die Verbindungen die dort Kettenlängen von vier bzw. fünf Kohlenstoffatomen aufweisen (**44, 45**). Aufgrund deren Basizität, wäre das Ergebnis in umgekehrter Reihenfolge zu erwarten gewesen.

5.5 FACS-Analysen

Ergänzende Experimente am Durchflusszytometer bestätigten die gewonnenen Erkenntnisse. Auch hier zeigte sich, dass die Substanzen mit hohen Werten für modulatorischen Quotient und Fold Reversal in der Lage sind, das P-Glykoprotein wirksam zu hemmen. Die durchflusszytometrische Bestimmung unterscheidet sich von den vorangegangenen Versuchen dadurch, dass kürzere Zeiträume betrachtet werden, in denen die Aktivität der zu untersuchenden Transporter anhand des Effluxes von Fluoreszenzfarbstoffen aus den Zellen beurteilt wird. Demgegenüber steht die Auswertung des Wachstums von Zellen nach 72 Stunden, bei der die Wirkung des Modulators indirekt über die Zunahme der Toxizität des gleichzeitig vorhandenen Zytostatikums im Vergleich zu un- bzw. monobehandelten Kontrollen gemessen wird.

Von den am FACS vermessenen Substanzen zeigten sich wiederum jene mit 4-(Diphenylalkyl)-piperazin-Rest als wirksam (**43, 44, 53, 77, 79**). Des Weiteren fällt auf, dass von den Phenothiazinen die Verbindungen mit dreizähligen Linker hohe FAR-Werte aufweisen (**4, 5, 6, 7, 8**), was deren gute Wirksamkeit bestätigt (vgl. *Tabelle 7*). Für die Phenothiazine mit vierzähligen Linker bestätigt sich die in den Zytotoxizitätstests ermittelte Wirksamkeit ebenfalls. Die in 2-Stellung benzylierte Verbindung **16** scheint auch hier ein hohes MDR-modulatorisches Potential zu besitzen.