4 In vitro Zytotoxizitätstestung

# 4 In vitro Zytotoxizitätstestung

# 4.1 Charakterisierung der für die *in vitro* Zytotoxizitätstestung verwendeten Zelllinien

Man geht derzeit davon aus, dass in Deutschland jährlich etwa 47 500 Frauen neu an Brustkrebs erkranken. Damit ist das Mammakarzinom mit rund 26 % der Krebsneuerkrankungen in Deutschland das häufigste Organmalignom der Frau.<sup>[2, 78]</sup> Aus diesem Grund wurden zur *in vitro* Zytotoxizitätstestung der synthetisierten Eisenkomplexe hauptsächlich zwei Mammakarzinomzelllinien (MCF7 und MDA-MB-231) herangezogen. Als Modellzelllinie des Prostatakarzinoms, welches die häufigste Tumorart beim Mann darstellt, diente die LNCaP/FGC-Zelllinie, an der ausgewählte Eisen(diarylsalen)-Komplexe getestet wurden. Weiterhin wurden ausgesuchte Verbindungen an der HeLa-Zelllinie, einer Zervixkarzinomzellline und zwei verschiedenen Leukämiezelllinien (LAMA84 und K562) auf ihre zytotoxischen Wirkungen untersucht.

## 4.1.1 Generationszeitbestimmung mit Hilfe des Kristallviolett-Assays

Die Ermittlung der Generationszeit diente einerseits als nötige Voruntersuchung für die zeitabhängigen Zytotoxizitätsuntersuchungen, andererseits als Anhaltspunkt, ob die Wachstumsgeschwindigkeit der unterschiedlichen Zelllinien Auswirkungen auf das zytotoxische Potential der verschiedenen Verbindungen hat.

Für die Ermittlung der Generationszeit fand ein kolorimetrisches Verfahren Anwendung, bei dem die Zellbiomasse in Monolayer-Kulturen durch Anfärben mit Kristallviolett bestimmt wird. Dieses Testmodell wurde von Gillies *et al.* 1986 erstmals beschrieben.<sup>[79]</sup> Das gleiche Verfahren fand auch bei den nachfolgenden Zytotoxizitätstestungen Anwendung (vgl. Kapitel 4.2 und 4.3).

Die Vorgehensweise zur Bestimmung der Generationszeit war für alle Zelllinien prinzipiell gleich. Die Zellen wurden in ihrem gewohnten Kulturmedium in einer ihrer Wachstumskinetik angepassten Zelldichte (vgl. Kapitel 11.3.1.6.1) in 96-Loch-Mikrotiterplatten ausgesät und bei 37 °C in wasserdampfgesättigter Atmosphäre bei 5 %  $CO_2$  inkubiert. Nach mindestens sechs verschiedenen Inkubationszeiten (jeweils ca. 24 h Abstand) wurde das Medium von den Platten entfernt und die Zellen durch Zugabe einer 1 %igen Glutardialdehydlösung in PBS fixiert. Die Platten wurden mit PBS überschichtet und bis zum Versuchsende bei 4 °C aufbewahrt.

Um färbebedingte Abweichungen auszuschließen, mussten alle Platten einer Versuchsreihe gemeinsam aufgearbeitet werden. Dabei wurden zunächst die DNAassoziierten Nukleoproteine der Zellen mit Hilfe einer Kristallviolett-Farbstofflösung angefärbt. Um anhaftenden, überschüssigen Farbstoff zu entfernen, wurden nachfolgend alle Platten gründlich gewaschen. Anschließend wurde der Farbstoff mit 70 %-igem Ethanol extrahiert und photometrisch bestimmt. Die dabei gemessene Absorption korrelliert mit der Zellmenge.

Zur Auswertung der Wachstumskinetik wurden die berechneten Mittelwerte einer 96-Lochplatte logarithmisch gegen die Inkubationsdauer aufgetragen. Aus dem linearen Teil des erhaltenen Graphen konnte die Generationszeit mit Hilfe der in Kapitel 11.3.1.5 angegebenen Gleichung 11.2 berechnet werden.

#### 4.1.2 Die humane MCF7-Brustkrebszelllinie

Die humane Mammakarzinomzelllinie MCF7 wurde 1970 aus dem malignen Pleuraerguss einer 69-jährigen Patientin gewonnen, deren metastasiertes, duktales Mammaadenokarzinom zuvor drei Jahre mit Hormon- und Radiotherapie behandelt worden war.<sup>[80]</sup> Die epithelialen MCF7-Zellen besitzen einen hohen Differenzierungsgrad und wachsen als Monolayer mit rosettenförmiger Anordnung. Die zytogenetische Analyse der gut charakterisierten Zelllinie ergab einen fast tetraploiden Chromosomensatz mit durchschnittlich 89 Chromosomen.<sup>[80]</sup> MCF7-Zellen weisen unter anderem Rezeptoren für Estrogene, Androgene und Progesteron auf und gelten aufgrund des hohen Estrogenrezeptorgehalts von 70 bis 90 fmol/mg Protein als hormonabhängig.<sup>[81, 82]</sup> Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Generationszeit von 31.7 h ± 1.3 h ermittelt. In

der Literatur können ebenfalls Verdopplungszeiten von 30 bis 40 Stunden gefunden werden, so dass die beschriebenen Generationszeiten bestätigt werden konnten.<sup>[83-85]</sup>

#### 4.1.3 Die humane MDA-MB-231-Brustkrebszelllinie

Die MDA-MB-231-Zelllinie wurde 1974 aus einem Pleuraerguss einer 51-jährigen Brustkrebspatientin isoliert. Die Patientin wurde zuvor über mehrere Jahre mit 5-Fluorouracil, dann mit einer Kombinationstherapie aus Cyclophosphamid, Adriamycin und Methotrexat behandelt. Die epitheliale, schnell wachsende Zelllinie besitzt einen fast triploiden Chromosomensatz mit einer durchschnittlichen Chromosomenzahl zwischen 65 und 69.<sup>[86]</sup>

Die bei der MDA-MB-231-Zelllinie ermittelte Generationszeit betrug 19.1 h  $\pm$  5.2 h und deckt sich damit ebenfalls mit der in der Literatur bereits beschriebenen Generationszeit.<sup>[84]</sup> Sie liegt deutlich unter der Generationszeit der MCF7-Zelllinie.

## 4.1.4 Die humane HeLa-Zervixkarzinomzelllinie

Bei der HeLa-Zelllinie handelt es sich um eine epitheliale Zervixkarzinomzelllinie, in der Sequenzen des humanen Papillomavirus 18 (HPV-18) nachgewiesen wurden. Charakteristisch für diese adhärent wachsende Zelllinie ist die geringe *p*53-Expression. Die zytogenetische Analyse zeigte durchschnittlich 82 Chromosomen.<sup>[87]</sup>

Für die HeLa-Zelllinie wurde eine Generationszeit von  $13.5 \text{ h} \pm 0.6 \text{ h}$  ermittelt. Ihre durchschnittliche Verdopplungszeit liegt damit deutlich unter den Generationszeiten aller anderen im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Zelllinien.

#### 4.1.5 Die humane LNCaP/FGC-Prostatakarzinomzelllinie

Als Modellzelllinie für das Prostatakarzinom wurde die LNCaP/FGC-Zelllinie (*Lymph Node Carcinoma of Prostate / Fast Growing Colony*) verwendet. Diese Zelllinie wurde 1977 aus einem Lymphknoten eines 50-jährigen Mannes gewonnen, der an metastasierendem Prostatakarzinom erkrankt war. Der Patient wurde zunächst sechs Monate einer oralen Estrogentherapie unterzogen und einen weiteren Monat mit einer Kombinationstherapie aus Methyl-CCNU (1-(2-Chlorethyl)-3-(4-methylcyclohexyl)-1nitrosourea) und Estracyt (Estramustinphosphat) behandelt. Es handelt sich um extrem androgen-sensitive Zellen.<sup>[88, 89]</sup> Die ermittelte durchschnittliche Verdopplungszeit für die LNCaP/FGC-Zelllinie betrug 59.9  $\pm$  4.8 h. Sie liegt damit deutlich unter der in der Literatur beschriebenen Generationszeit von 72 h.<sup>[89]</sup> Die LNCaP/FGC-Zelllinie ist die Zelllinie mit dem größten Verdopplungszeitraum im Vergleich zu den anderen verwendeten Zelllinien.

## 4.2 Zeitabhängige in vitro Zytotoxizitätstestung

Ziel dieser Untersuchungen war die Bestimmung der zytotoxischen Effekte, die die synthetisierten Eisen(diarylsalen)-Komplexe an verschiedenen Tumorzelllinien auszulösen vermögen. Um Struktur-Wirkungs-Beziehungen ableiten zu können, sollten insbesondere der Einfluss des Substitutionsmusters und der Konfiguration der Liganden sowie der Einfluss der Oxidationsstufe des Zentralatoms auf die pharma-kologische Aktivität der Komplexe näher untersucht werden. Dazu wurden alle synthetisierten Verbindungen zunächst an der MCF7-Brustkrebszelllinie getestet. Weiterführend wurden die Aktivitäten von ausgewählten Verbindungen an MDA-MB-231-, an HeLa- und an LNCaP/FGC-Zellen bestimmt.

Mit Hilfe des in Kapitel 4.1.1 und Kapitel 11.3.1.6.4 beschriebenen Kristallviolett-Assays gelang die Detektion der zellproliferationshemmenden Effekte der Eisen(diarylsalen)-Komplexe über die Auswertung der veränderten Zellbiomasse in 96-Loch-Mikrotiterplatten. Die Vorgehensweise entsprach dabei prinzipiell der Bestimmung der Generationszeit. Für die zeitabhängige *in vitro* Zytotoxizitätstestung wurden allerdings fünf Mikrotiterplatten in gleicher Weise mit den entsprechenden substanzhaltigen Medien versetzt und zu fünf unterschiedlichen Zeitpunkten abgestoppt. Die Zeitabstände der Abstopppunkte mussten dabei den Wachstumseigenschaften jeder Zelllinie angepasst werden.

Zur Beurteilung der zellproliferationshemmenden Effekte wurde aus den nach der Kristallviolettfärbung erhaltenen Absorptionswerten ein T/C<sub>corr</sub>-Wert nach folgender Formel ermittelt:

$$T/C_{corr} = \frac{(T^* - C_0)}{(C^* - C_0)} \times 100$$
 (%) Gleichung 4.1

C\*: Absorptionsmittelwert der Kontrollkulturen

T\*: Absorptionsmittelwert der behandelten Kulturen

C<sub>0</sub>: Absorptionsmittelwert der Ausgangszellmenge (t<sub>0</sub>)

Bei der Berechnung der T/C<sub>corr</sub>-Werte werden durch die Subtraktion der Ausgangszellmenge nur die Änderungen der Zellmasse der Kontrollkulturen und der behandelten Kulturen nach der Substanzzugabe aufeinander bezogen. Daher können mit diesem Wert lediglich zytostatische Wirkungen beschrieben werden.

Handelt es sich um zytozide Effekte, nimmt die Zellmenge im Vergleich zum C<sub>0</sub>-Wert ab, so dass der Anteil der abgetöteten Zellen ausgehend von der Ausgangszellmenge bestimmt werden muss. Das Wachstum der Kontrollkulturen muss dabei unberücksichtigt bleiben. Um zytozide Wirkungen beschreiben zu können, wurden  $\tau$ -Werte nach der Gleichung 4.2 berechnet:

$$\tau = \frac{(T^* - C_0)}{C_0} \times 100$$
 (%) Gleichung 4.2

Die berechneten T/C<sub>corr</sub>- bzw.  $\tau$ -Werte können dabei folgendermaßen interpretiert werden:

	T/C <sub>corr</sub>	> 80 %	keine antiproliferative Wirkung
80 % >	T/C <sub>corr</sub>	≥ 20 %	antiproliferative Wirkung
20 % >	T/C <sub>corr</sub>	≥0 %	zytostatische Wirkung
	T/C <sub>corr</sub> b	zw. τ < 0 %	zvtozide Wirkung.

Im Rahmen dieser Arbeit wird unter einer zytotoxischen Wirkung jegliche negative Beeinflussung des Zellwachstums verstanden.

## 4.2.1 Zeitabhängige Zytotoxizitätstestung an der MCF7-Zelllinie

Die Eisen(diarylsalen)-Komplexe wurden an der MCF7-Brustkrebszelllinie im Allgemeinen in den Konzentrationen 1, 5 und 10  $\mu$ M getestet. Als Referenz diente Cisplatin, das als Kontrolle in jedem Test in den Konzentrationen 0.5, 1 und 5  $\mu$ M mitgeführt wurde. Abbildung 4.1 zeigt als Beispiel die erhaltenen zeitabhängigen Zytotoxizitätskurven bei der Testung von Cisplatin und des Eisenkomplexes *d*,*I*[Fe<sup>III</sup>4'F]Cl (122d,I). Die berechneten T/C<sub>corr</sub>- bzw.  $\tau$ -Werte (%) wurden dabei gegen die Inkubationsdauer (h) aufgetragen.

Um die Übersicht zu vereinfachen, werden in den folgenden Tabellen und Abbildungen lediglich die minimalen T/C<sub>corr</sub>- bzw.  $\tau$ -Werte zusammengefasst. Eine Zusammenstellung der ermittelten Zytotoxizitätskurven der zeitabhängigen Testung aller getesteten Verbindungen befindet sich mit statistischer Auswertung im Anhang.



Abbildung 4.1: Beispielkurven der zeitabhängigen Zytotoxizitätstestung an der MCF7-Zelllinie <u>links:</u> Cisplatin, getestet in den Konzentrationen 0.5, 1 und 5 μM <u>rechts:</u> Der Eisen(III)-Komplex *d*,*I*[Fe<sup>III</sup>4'F]Cl (122d,I), getestet in den

Konzentrationen 1, 5 und 10  $\mu M$ 

# 4.2.1.1 Einfluss der Einführung der 1,2-Diarylethan-"Brücke" und Variationen der Substituenten der "Brücken"-Aromaten

Der [Fe<sup>III</sup>salen]CI-Komplex **(85)** zeigte in einer Konzentration von 5 µM deutlich antiproliferative Effekte. Für eine Testkonzentration von 10 µM wurde ein T/C<sub>corr</sub>-Wert um 0 % ermittelt (siehe Tabelle 4.1 und Abbildung 4.2). Mit Verdopplung der Konzentration des Eisenkomplexes resultierten offensichtlich zytostatische, fast zytozide Wirkungen. Ausgehend von diesem Eisen(salen)-Komplex führte der Ersatz der Ethanbrücke durch eine 1,2-Diarylethan-Partialstruktur zu einer deutlichen Wirkungssteigerung. Die Verbindung *m*[Fe<sup>III</sup>DPS]CI **(90m)**, die keine Substituenten an den "Brücken"-Aromaten trägt, zeigte bereits in einer Konzentration von 1 µM mit einem T/C<sub>corr</sub>-Wert von 41 % deutliche antiproliferative Effekte. Eine Erhöhung der Testkonzentration des Eisenkomplexes auf 5 bzw. 10 µM führte zu stark zytoziden Wirkungen an der MCF7-Zelllinie ( $\tau \approx -27$  % bzw. -37 %).

Durch die Einführung von Methoxygruppen in die "Brücken"-Aromaten wurden Verbindungen erhalten, die zwar eine höhere Wirksamkeit als der Eisen(salen)-Komplex [Fe<sup>III</sup>salen]CI (85) besaßen, gleichzeitig aber eine geringere Wirksamkeit aufwiesen als der in den "Brücken"-Aromaten unsubstituierte m[Fe<sup>III</sup>DPS]CI-Komplex (90m).

T/C <sub>corr</sub> (%) bzw. τ (%)					
Nr.	1 µM (h)	5 µM (h)	10 µM (h)	Abkürzung	
CisPt	55.1 (172)	2.2 (172)	-	Cisplatin	
(85)	74.8 (72)	43.4 (118)	0.1 (118)	[Fe <sup>lli</sup> salen]Cl	
(90m)	41.2 (121)	-26.6 (121)	-37.1 (121)	<i>m</i> [Fe <sup>III</sup> DPS]CI	
(93m)	79.5 (72)	49.2 (118)	-17.4 (72)	<i>m</i> [Fe <sup>III</sup> 2'OCH <sub>3</sub> ]Cl	
(96m)	63.4 (72)	3.5 (72)	-11.0 (72)	<i>m</i> [Fe <sup>III</sup> 3'OCH <sub>3</sub> ]Cl	
(104m)	66.1 (68)	33.9 (118)	-5.0 (68)	<i>m</i> [Fe <sup>III</sup> 4'OCH <sub>3</sub> ]Cl	
(111m)	78.8 (117)	55.6 (117)	42.5 (71)	<i>m</i> [Fe <sup>III</sup> 2',4'OCH <sub>3</sub> ]Cl	
(112m)	93.8 (115)	85.6 (71)	82.1 (71)	<i>m</i> [Fe <sup>III</sup> 2'Cl,4'OCH <sub>3</sub> ]Cl	
(114m)	13.6 (74)	-38.0 (169)	-43.0 (74)	<i>m</i> [Fe <sup>III</sup> 2'F]Cl	
(116m)	30.0 (170)	-33.8 (79)	-36.3 (170)	<i>m</i> [Fe <sup>III</sup> 3'F]Cl	
(122m)	50.4 (72)	-5.1 (72)	-18.6 (72)	<i>m</i> [Fe <sup>III</sup> 4'F]Cl	

Tabelle 4.1:

Minimale T/C<sub>corr</sub>-Werte bzw. τ-Werte (Zeit) an der MCF7-Zelllinie: Einfluss der Einführung von "Brücken"-Aromaten und Einfluss der Substituenten an den "Brücken"-Aromaten

Der 4'-methoxysubstituierte Eisen(diarylsalen)-Komplex m[Fe<sup>III</sup>4'OCH<sub>3</sub>]Cl (104m) besaß in einer Konzentration von 5 µM einen minimalen T/C<sub>corr</sub>-Wert von rund 34 % und damit im Vergleich zu dem Komplex m[Fe<sup>III</sup>DPS]Cl (90m) lediglich eine antiproliferative Wirksamkeit. In einer Testkonzentration von 10 µM zeigte der 4'-methoxysubstituierte Komplex mit einem  $\tau$ -Wert von -5.0 % deutlich zytozide Wirkungen. Das "Verschieben" der Methoxysubstituenten von der 4'- in die 3'-Position bewirkte eine weitere Steigerung der zytotoxischen Wirksamkeit. Der Komplex m[Fe<sup>III</sup>3'OCH<sub>3</sub>]Cl (96m) besaß bereits in einer Konzentration von 5 µM mit einem T/C<sub>corr</sub>-Wert von 3.5 % stark zytostatische Wirkungen. In einer Testkonzentration von 10 µM konnten auch für diese Verbindung zytozide Effekte gefunden werden.

Das weitere "Verschieben" der Methoxygruppe von der 3'- in die 2'-Position der "Brücken"-Aromaten hatte dagegen eine Wirkungsabschwächung zur Folge. Der Eisenkomplex *m*[Fe<sup>III</sup>2'OCH<sub>3</sub>]Cl (93m) besaß in einer Konzentration von 5  $\mu$ M mit einem T/C<sub>corr</sub>-Wert von 49 % geringere antiproliferative Effekte als der 4'- bzw. 3'methoxysubstituierte Komplex (104m) bzw. (96m). Für eine Testkonzentration von 10  $\mu$ M konnten für den Komplex (93m) ebenfalls zytozide Eigenschaften gefunden werden, deren Stärke in etwa mit denen der 3'-methoxysubstituierten Verbindung (96m) vergleichbar ist.



Abbildung 4.2: Antiproliferative Wirkungen der Eisen(III)(diarylsalen)-Komplexe mit Methoxy- bzw. Fluorsubstitution der "Brücken"-Aromaten an MCF7-Zellen

Die Kombination zweier Methoxysubstituenten in der 2'- und 4'-Position der "Brücken"-Aromaten" bewirkte im Vergleich zu den mono-methoxysubstituierten Verbindungen (93m) bzw. (104m) eine deutliche Abschwächung der zytotoxischen Wirksamkeit. Der Komplex *m*[Fe<sup>III</sup>2',4'OCH<sub>3</sub>]Cl (111m) besaß in den beiden Testkonzentrationen von 5 bzw. 10 µM lediglich antiproliferative Eigenschaften.

Durch die Einführung eines Chlorsubstituenten in die 2'-Position der "Brücken"-Aromaten der 4'-methoxysubstituierten Verbindung wurde der Eisen(diarylsalen)-Komplex m[Fe<sup>III</sup>2'CI,4'OCH<sub>3</sub>]CI **(122m)** erhalten, der an der MCF7-Zelllinie keine zytotoxische Wirkung aufzeigte.

Eine Wirkungssteigerung im Vergleich zu den methoxysubstituierten Verbindungen wurde durch die Einführung von Fluorsubstituenten erreicht. Dabei ist ebenfalls eine Abhängigkeit der zytotoxischen Wirkung von der Stellung der Fluorsubstituenten in den "Brücken"-Aromaten anzumerken. Durch "Verschieben" der Fluorsubstituenten von der 4'- über die 3'- in die 2'-Position konnte eine signifikante Wirkungssteigerung erreicht werden.

Der 2'-fluorsubstituierte Komplex m[Fe<sup>III</sup>2'F]Cl (**114m**) zeigte z.B. in einer Testkonzentration von 1 µM mit einem T/C<sub>corr</sub>-Wert von ca. 14 % eine deutlich zytostatische Wirkung, während der 4'-fluorsubstituierte Komplex m[Fe<sup>III</sup>4'F]Cl (**122m**) in dieser Konzentration lediglich antiproliferative Eigenschaften aufwies. In Testkonzentrationen von 5 bzw. 10 µM zeigten alle drei fluorsubstituierten Komplexe zytozide Eigenschaften, wobei für den 2'-fluorsubstituierte Komplex m[Fe<sup>III</sup>2'F]Cl (**114m**) im Vergleich zu dem 3'- bzw. 4'-fluorsubstituierten Komplex (**116m**) bzw. (**122m**) der geringste  $\tau$ -Wert und damit die größte zytozide Wirksamkeit ermittelt wurde.

Im Vergleich zu der in den "Brücken"-Aromaten unsubstituierte Diphenylsalen-Verbindung m[Fe<sup>III</sup>DPS]CI (90m) zeigte die 3'-Fluorverbindung m[Fe<sup>III</sup>3'F]CI (116m) an MCF7-Zellen annähernd die gleiche zytotoxische Wirksamkeit. Die in 2'-Position fluorierte Verbindung m[Fe<sup>III</sup>2'F]CI (114m) war etwas stärker wirksam als der unsubstituierte m[Fe<sup>III</sup>DPS]CI-Komplex (90m).

T/C <sub>corr</sub> (%) bzw. τ (%)						
Nr.	0.5 µM (h)	1 µM (h)	5 µM (h)	10 µM (h)	Abkürzung	
(122m)	-	50.4 (72)	-5.1 (72)	-18.6 (72)	<i>m</i> [Fe <sup>lll</sup> 4'F]Cl	
(126m)	11.3 (65)	-16.5 (65)	-25.0 (118)	-30.2 (118)	<i>m</i> [Fe <sup>lll</sup> 2',4'F]Cl	
(127m)	-	18.8 (69)	-25.0 (140)	-16.1 (162)	<i>m</i> [Fe <sup>III</sup> 2',5'F]Cl	
(128m)	-	85.4 (143)	36.2 (70)	39.9 (70)	<i>m</i> [Fe <sup>lll</sup> 2',6'F]Cl	
(129m)	-	8.3 (145)	-17.0 (72)	-49.0 (72)	<i>m</i> [Fe <sup>III</sup> 3',4'F]CI	

 
 Tabelle 4.2:
 Minimale T/C<sub>corr</sub>- bzw. τ-Werte (Zeit) an der MCF7-Zelllinie: Eisen(III)-(diarylsalen)-Komplexe mit Difluorsubstitution der "Brücken"-Aromaten

Im Gegensatz zur Einführung zweier Methoxysubstituenten in die "Brücken"-Aromaten (m[Fe<sup>III</sup>2',4'OCH<sub>3</sub>]Cl **(111m)**) bewirkte die Einführung eines zweiten Fluorsubstituenten (in Abhängigkeit vom Substitutionsmuster) eine weitere Wirkungssteigerung (siehe Tabelle 4.2 und Abbildung 4.3). Der in Position 2' und 4' fluorierte Komplex m[Fe<sup>III</sup>2',4'F]Cl **(126m)** besaß bereits in einer Konzentration von 0.5 µM zytostatische Wirksamkeit. In einer Testkonzentration von 1 µM konnten für diese Verbindung stark zytozide Wirkungen gefunden werden. Damit ist der m[Fe<sup>III</sup>2',4'F]Cl-Komplex **(126m)** einer der wirksamsten Eisen(diarylsalen)-Komplexe, der im Rahmen dieser Arbeit synthetisiert wurde.

Generell zeigten die difluorierten Eisen(diarylsalen)-Komplexe eine sehr hohe zytotoxische Wirksamkeit. Mit Ausnahme des m[Fe<sup>III</sup>2',6'F]CI-Komplexes (**128m**) konnten bereits in einer Konzentration von 5 µM stark zytozide Effekte beobachtet werden. Der in 2'- und 6'-Position fluorierte Eisenkomplex m[Fe<sup>III</sup>2',6'F]CI (**128m**) besaß im Gegensatz zu den anderen synthetisierten difluorierten Komplexen auch in einer Konzentration von 10 µM lediglich antiproliferative Wirkungen. Er war damit wesentlich schwächer wirksam als die monofluorierten Verbindungen.



Abbildung 4.3: Antiproliferative Wirkungen der Eisen(diarylsalen)-Komplexe mit Difluorsubstitution der "Brücken"-Aromaten an MCF7-Zellen

Neben Methoxygruppen und Fluorsubstitutionen wurden noch weitere Substituenten in die "Brücken"-Aromaten eingeführt. Allerdings wurden dabei Eisen(diarylsalen)-Komplexe erhalten, die an der MCF7-Zelllinie im Vergleich zu den methoxy- bzw. fluor-substituierten Verbindungen generell wesentlich geringere zytotoxische Wirkungen besaßen bzw. unwirksam waren (siehe Tabelle 4.3 und Abbildung 4.4).

Durch Einführung von Hydroxygruppen in die 3'- bzw. 4'-Position der "Brücken"-Aromaten entstanden die stark hydrophilen Komplexe m[Fe<sup>III</sup>3'OH]Cl (130m) und m[Fe<sup>III</sup>4'OH]Cl (131m), die im MCF7-Zytotoxizitätstest völlig unwirksam waren. Die Einführung von Acetoxyschutzgruppen in die 3'- bzw. 4'-hydroxysubstituierten Komplexe führte zu den Verbindungen m[Fe<sup>III</sup>3'OCOCH<sub>3</sub>]Cl (132m) und m[Fe<sup>III</sup>4'OCOCH<sub>3</sub>]Cl (133m), wobei lediglich der Komplex (132m) in einer Test-konzentration von 10 µM mit einem minimalen T/C<sub>corr</sub>-Wert von rund 45 % antipro-liferative Effekte zeigte.

Für die 4'-trifluormethylsubstituierte Verbindung m[Fe<sup>III</sup>4'CF<sub>3</sub>]Cl (**134m**) konnte für die höchste Testkonzentration von 10 µM ebenfalls nur ein antiproliferativer Effekt gefunden werden. Die Wirksamkeit dieser Verbindung ist damit wesentlich geringer als die der analoge 4'-methoxy- bzw. 4'-fluorsubstituierten Komplexe (**104m**) bzw. (**122m**).

Für die Verbindungen deren "Brücken"-Aromaten mit Nitrogruppen (m[Fe<sup>III</sup>4'NO<sub>2</sub>] (135m) und m[Fe<sup>III</sup>4'NO<sub>2</sub>]Cl (136m)) oder Dimethylaminogruppen (m[Fe<sup>III</sup>4'N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]Cl (137m)) substituiert sind, konnten ebenfalls lediglich schwach antiproliferative Effekte gefunden werden.

Die Einführung von Chlorsubstituenten in die 2'-Position (m[Fe<sup>III</sup>2'Cl]Cl (138m)) führte ebenso wie Dichlorierung der "Brücken"-Aromaten (m[Fe<sup>III</sup>3',4'Cl]Cl (139)) zu lediglich schwachen zelltoxischen Wirkungen der Komplexe. Mit einem T/C<sub>corr</sub>-Wert von 80 % für die 2'-chlorierte Verbindung (138m) und einem T/C<sub>corr</sub>-Wert von rund 72 % für die dichlorierte Verbindung (139m) waren beide Komplexe nur leicht antiproliferativ wirksam.

T/C <sub>corr</sub> (%) bzw. τ (%)					
Nr.	1 µM (h)	5 µM (h)	10 µM (h)	Abkürzung	
(130m)	104.3 (70)	93.2 (140)	88.8 (117)	<i>m</i> [Fe <sup>III</sup> 3'OH]CI	
(131m)	93.9 (170)	90.2 (222)	98.0 (222)	<i>m</i> [Fe <sup>III</sup> 4'OH]CI	
(132m)	86.3 (71)	72.0 (117)	44.9 (117)	<i>m</i> [Fe <sup>III</sup> 3'OCOCH <sub>3</sub> ]Cl	
(133m)	93.6 (213)	84.4 (144)	84.0 (144)	<i>m</i> [Fe <sup>III</sup> 4'OCOCH <sub>3</sub> ]Cl	
(134m)	87.1 (74)	86.0 (115)	46.2 (115)	<i>m</i> [Fe <sup>III</sup> 4'CF <sub>3</sub> ]Cl	
(135m)	98.7 (72)	71.5 (72)	53.9 (72)	<i>m</i> [Fe <sup>ll</sup> 4'NO <sub>2</sub> ]	
(136m)	98.7 (67)	55.7 (67)	48.1 (67)	<i>m</i> [Fe <sup>III</sup> 4'NO <sub>2</sub> ]Cl	
(137m)	92.5 (222)	87.1 (222)	69.1 (222)	<i>m</i> [Fe <sup>III</sup> 4'N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ]Cl	
(138m)	95.4 (209)	81.2 (167)	80.2 (71)	<i>m</i> [Fe <sup>III</sup> 2'CI]CI	
(139m)	90.1 (165)	68.5 (165)	71.9 (165)	<i>m</i> [Fe <sup>III</sup> 3',4'CI]CI	

Tabelle 4.3:Minimale T/Ccorr<sup>-</sup> bzw. τ-Werte (Zeit) an der MCF7-Zelllinie: Eisen-<br/>(diarylsalen)-Komplexe mit unterschiedliche Substituenten der<br/>"Brücken"-Aromaten



Abbildung 4.4: Antiproliferative Wirkungen der Eisen(diarylsalen)-Komplexe mit unterschiedlichen Substituenten der "Brücken"-Aromaten an MCF7-Zellen

#### 4.2.1.2 Einfluss der Oxidationsstufe des Eisenzentralatoms

Generell erwiesen sich die synthetisierten Eisen(III)(diarylsalen)-Komplexe wirksamer als ihre Eisen(II)-Analoga. In Tabelle 4.4 und Abbildung 4.5 wird dies exemplarisch an [Fe<sup>II/III</sup>salen], *m*[Fe<sup>II/III</sup>DPS] und den fluorsubstituierten Verbindungen gezeigt. Dieser Effekt konnte auch bei den methoxysubstituierten Diarylsalen-Komplexen beobachtet werden (siehe dazu auch Abschnitt 4.2.1.3, Tabelle 4.6 und Abbildung 4.8).

Während die unterschiedliche Wirksamkeit der Eisen(II)- und Eisen(III)-Verbindungen bei den Salen-Derivaten eher geringer ausgeprägt ist, zeigte sich die unterschiedliche Wirksamkeit bei den fluorsubstituierten Komplexen besonders deutlich. Die Eisen(II)-Komplexe m[Fe<sup>II</sup>3'F] (115m) und m[Fe<sup>II</sup>4'F] (117m) wiesen im Gegensatz zu ihren Eisen(III)-Analoga in den beiden höchsten Testkonzentrationen lediglich zytostatische Aktivitäten auf. In der Eisen(II)-Reihe der fluorsubstituierten Komplexe war im Vergleich zu den analogen Eisen(III)-Komplexen keine deutliche Wirkungssteigerung durch "Verschieben" der Fluorsubstituierten von der 4'- über die 3'- in die 2'-Position erkennbar. Der 4'-fluorsubstituierte Eisen(II)-Komplex m[Fe<sup>II</sup>4'F] (117m) zeigte in einer Testkonzentration von 1  $\mu$ M mit einem T/C<sub>corr</sub>-Wert von rund 40 % beispielsweise eine größere antiproliferative Wirkung als der in 3'-Position fluorierte Eisen(II)-Komplex m[Fe<sup>II</sup>3'F] (115m), für den für dieselben Testkonzentration ein minimaler T/C<sub>corr</sub>-Wert von rund 71 % gefunden werden konnte.

Allerdings zeigte der 2'-fluorierte Eisen(II)-Komplex m[Fe<sup>II</sup>2'F] (**113m**) in einer Konzentration von 10 µM mit einem  $\tau$ -Wert von rund -26 % eine stark zytozide Wirkung, während für den m[Fe<sup>II</sup>3'F]-Komplex (**115m**) bzw. für den m[Fe<sup>II</sup>4'F]-Komplex (**117m**) lediglich zytostatische Effekte beobachtet werden konnten.

	T/C <sub>corr</sub> (%) bzw. τ (%)						
Nr.	1 µM (h)	5 µM (h)	10 µM (h)	Abkürzung			
(81)	87.3 (217)	79.6 (74)	3.9 (139)	[Fe <sup>ll</sup> salen]			
(85)	74.8 (72)	43.4 (118)	0.1 (118)	[Fe <sup>llI</sup> salen]Cl			
(89m)	56.0 (97)	6.8 (97)	-4.6 (97)	<i>m</i> [Fe <sup>ll</sup> DPS]			
(90m)	41.2 (121)	-26.6 (121)	-37.1 (121)	<i>m</i> [Fe <sup>III</sup> DPS]CI			
(113m)	67.0 (117)	14.5 (69)	-25.6 (69)	<i>m</i> [Fe <sup>ll</sup> 2'F]			
(114m)	13.6 (74)	-38.0 (169)	-43.0 (74)	<i>m</i> [Fe <sup>III</sup> 2'F]Cl			
(115m)	71.4 (117)	47.9 (117)	14.7 (69)	<i>m</i> [Fe <sup>ll</sup> 3'F]			
(116m)	30.0 (170)	-33.8 (79)	-36.3 (170)	<i>m</i> [Fe <sup>III</sup> 3'F]Cl			
(117m)	39.8 (72)	10.1 (72)	7.1 (72)	<i>m</i> [Fe <sup>ll</sup> 4'F]			
(122m)	50.4 (72)	-5.1 (72)	-18.6 (72)	<i>m</i> [Fe <sup>III</sup> 4'F]Cl			

 Tabelle 4.4:
 Minimale T/C<sub>corr</sub> bzw. τ-Werte (Zeit) an der MCF7-Zelllinie: Einfluss der Oxidationsstufe des Zentralatoms



Abbildung 4.5: Antiproliferative Wirkungen der Eisen(II)- und Eisen(III)(diarylsalen)-Komplexe an MCF7-Zellen

#### 4.2.1.3 Einfluss der Konfiguration der 1,2-Diarylethan-Partialstruktur

Neben den Substituenten der "Brücken"-Aromaten und der Oxidationsstufe des Zentralatoms hatte auch die Konfiguration der 1,2-Diarylethan-Partialstruktur einen entscheidenden Einfluss auf die Wirksamkeit der Eisen(diarylsalen)-Komplexe. Auffallend war der unterschiedliche Kurvenverlauf der zeitabhängigen Zytotoxizitätstestungen für *meso-* und *d,I-*Verbindungen. *Meso-*konfigurierte Komplexe zeigten ihre stärksten zytoziden Effekte zu einem frühen Abstoppzeitpunkt. Trotz starker zytotoxischer Wirkungen erholten sich die Zellen im Verlaufe der Testung wieder. Im Gegensatz dazu wurden die maximale zytozide Effekte der *d,I-*Verbindungen meist zu einem späteren Zeitpunkt der Tests erreicht.

Ein Beispiel dafür ist in Abbildung 4.6 dargestellt. Die linke Seite der Abbildung zeigt die Zytotoxizitätskurven des *meso*-konfigurierten *m*[Fe<sup>II</sup>DPS]-Komplexes **(89m)** im Vergleich zu dem diastereomeren *d*,*I*[Fe<sup>II</sup>DPS]-Komplex **(89d,I)**. Auf der rechten Seite der Abbildung ist der Kurvenverlauf der Testung der *meso*- bzw. *d*,*I*-konfigurierten *m/d*,*I*[Fe<sup>III</sup>3'OCH<sub>3</sub>]CI-Verbindungen **(96m)** und **(96d,I)** dargestellt.



Abbildung 4.6: Kurvenverlauf der Zytotoxizitätstestung von meso- und d,/-konfigurierten Eisen(diarylsalen)-Komplexen an der MCF7-Zelllinie
 <u>links:</u> Vergleich von m[Fe<sup>II</sup>DPS] (89m) und d,/[Fe<sup>II</sup>DPS] (89d,I); 5 μM
 <u>rechts:</u> Vergleich von m[Fe<sup>III</sup>3'OCH<sub>3</sub>]Cl (96m) und d,/[Fe<sup>III</sup>3'OCH<sub>3</sub>]Cl (96d,I); 10 μM

Trotz der deutlichen Unterschiede im Kurvenverlauf der zeitabhängigen Zytotoxizitätstests zwischen *meso*- und *d,l*-konfigurierten Verbindungen konnte keine eindeutige Abhängigkeit der zytotoxischen Wirkung der Eisen(diarylsalen)-Komplexe von der Konfiguration der 1,2-Diarylethan-Partialstruktur erkannt werden. *D,l*-konfigurierte Verbindungen erwiesen sich häufig als wirksamer als ihre *meso*-konfigurierten Analoga, allerdings wurde je nach Substitutionsart, -muster und Ladung des Eisenzentralatoms auch eine geringere oder gleiche Wirksamkeit der *d,l*-Komplexe gefunden. In Tabelle 4.5 und Abbildung 4.7 sind die minimalen T/C<sub>corr</sub>- bzw.  $\tau$ -Werte der *meso*- und *d,l*-konfigurierten Diphenylsalen-Komplexe ohne Substituenten an den "Brücken"-Aromaten dargestellt.

Nr.	1 µM (h)	5 µM (h)	10 µM (h)	Abkürzung
(89m)	56.0 (97)	6.8 (97)	-4.6 (97)	<i>m</i> [Fe <sup>ll</sup> DPS]
(89d,l)	74.9 (72)	-34.7 (218)	-41.8 (218)	<i>d,I</i> [Fe <sup>ll</sup> DPS]
(90m)	41.2 (121)	-26.6 (121)	-37.1 (121)	<i>m</i> [Fe <sup>III</sup> DPS]CI
(90d,l)	91.4 (117)	-55.4 (164)	-63.1 (140)	<i>d,I</i> [Fe <sup>III</sup> DPS]CI

Tabelle 4.5:Minimale T/C<sub>corr</sub>- bzw. τ-Werte (Zeit) an MCF7-Zellen: Einfluss der<br/>Konfiguration der 1,2-Diarylethan-Partialstruktur bei Eisen(diarylsalen)-<br/>Komplexen ohne Substituenten an den "Brücken"-Aromaten



Abbildung 4.7: Einfluss der Konfiguration der 1,2-Diarylethan-Partialstruktur auf die antiproliferativen Wirkungen der Eisen(II)/(III)(diarylsalen)-Komplexe ohne Substituenten an den "Brücken"-Aromaten an MCF7-Zellen

Der *d,I*-konfigurierte Eisen(II)-Komplex *d,I*[Fe<sup>II</sup>DPS] **(89d,I)** zeigte eine wesentlich stärkere zytotoxische Wirksamkeit als der analoge *meso*-konfigurierte Eisen(II)-Komplex *m*[Fe<sup>III</sup>DPS] **(89m)**. Im Gegensatz dazu besaß der *meso*-Eisen(III)-Komplex *m*[Fe<sup>III</sup>DPS]CI **(90m)** in einer Konzentration von 1  $\mu$ M mit einem T/C<sub>corr</sub>-Wert von 41 % eine wesentlich stärkere zytotoxische Wirkung als der analoge *d,I*-konfigurierte *d,I*[Fe<sup>III</sup>DPS]CI-Komplex **(90d,I)**. In Konzentrationen über 1  $\mu$ M waren beide Eisen(III)-Komplex eshr stark zytozide wirksam.

T/C <sub>corr</sub> (%) bzw. τ (%)					
Nr.	1 µM (h)	5 µM (h)	10 µM (h)	Abkürzung	
(91m)	92.8 (145)	30.4 (145)	13.0 (60)	<i>m</i> [Fe <sup>ll</sup> 2'OCH <sub>3</sub> ]	
(91d,l)	76.9 (115)	- 57.2 (139)	-53.6 (139)	<i>d,I</i> [Fe <sup>ll</sup> 2'OCH <sub>3</sub> ]	
(93m)	79.5 (72)	49.2 (118)	-17.4 (72)	<i>m</i> [Fe <sup>III</sup> 2'OCH <sub>3</sub> ]Cl	
(93d,l)	52.6 (72)	-35.0 (166)	-37.1 (166)	<i>d,I</i> [Fe <sup>III</sup> 2'OCH <sub>3</sub> ]CI	
(94m)	29.1 (60)	-18.0 (60)	-12.2 (60)	<i>m</i> [Fe <sup>II</sup> 3'OCH <sub>3</sub> ]	
(94d,l)	85.3 (68)	13.6 (143)	6.9 (157)	<i>d,I</i> [Fe <sup>ll</sup> 3'OCH <sub>3</sub> ]	
(96m)	63.4 (72)	3.5 (72)	-11.0 (72)	<i>m</i> [Fe <sup>Ⅲ</sup> 3'OCH <sub>3</sub> ]Cl	
(96d,I)	59.5 (72)	0.3 (166)	-37.8 (210)	<i>d,I</i> [Fe <sup>III</sup> 3'OCH <sub>3</sub> ]CI	
(97m)	79.1 (71)	63.7 (71)	36.4 (118)	<i>m</i> [Fe <sup>ll</sup> 4'OCH <sub>3</sub> ]	
(97d,l)	97.0 (118)	44.1 (68)	19.9 (143)	<i>d,I</i> [Fe <sup>II</sup> 4'OCH <sub>3</sub> ]	
(104m)	66.1 (68)	33.9 (118)	-5.0 (68)	<i>m</i> [Fe <sup>III</sup> 4'OCH <sub>3</sub> ]Cl	
(104d,l)	93.0 (169)	23.9 (139)	-19.3 (217)	<i>d,I</i> [Fe <sup>III</sup> 4'OCH <sub>3</sub> ]Cl	

Tabelle 4.6:Minimale T/Ccorr-<br/>bzw. τ-Werte (Zeit) an der MCF7-Zelllinie: Einfluss<br/>der Konfiguration der 1,2-Diarylethan-Partialstruktur bei Verbindungen<br/>mit Methoxysubstitution der "Brücken"-Aromaten

In Tabelle 4.6 und Abbildung 4.8 sind die minimalen T/C<sub>corr</sub>- bzw.  $\tau$ -Werte methoxysubstituierter *meso*- und *d*,*l*-konfigurierter Eisen(II)/(III)(diarylsalen)-Komplexe vergleichend zusammengestellt, in Tabelle 4.7 und Abbildung 4.9 die der fluorsubstituierten *meso*- und *d*,*l*-konfigurierten Eisen(II)/(III)(diarylsalen)-Komplexe. Die *d,l*-konfigurierten Komplexe *d,l*[Fe<sup>II</sup>2'OCH<sub>3</sub>] (91d,I) und *d,l*[Fe<sup>III</sup>2'OCH<sub>3</sub>]Cl (93d,I) zeigten eine größere zelltoxischere Wirksamkeit als ihre *meso*-konfigurierten Analoga (91m) bzw. (93m). Im Gegensatz dazu besaß der *meso*-konfigurierte 3'-methoxy-substituierte Komplex *m*[Fe<sup>II</sup>3'OCH<sub>3</sub>] (94m) eine größere antiproliferative Aktivität als der analoge *d,l*-Komplex *d,l*[Fe<sup>III</sup>3'OCH<sub>3</sub>] (94d,I). Die in 4'-Position methoxysubstituierten *meso*- und *d,l*-konfigurierten Komplexe *m*[Fe<sup>III</sup>4'OCH<sub>3</sub>] (97m), *m*[Fe<sup>III</sup>4'OCH<sub>3</sub>]Cl (104m), *d,l*[Fe<sup>III</sup>4'OCH<sub>3</sub>] (97d,I) und *d,l*[Fe<sup>III</sup>4'OCH<sub>3</sub>]Cl (104d,I) zeigten an der MCF7-Zelllinie dagegen annähernd die gleiche Wirksamkeit.

Die zytotoxische Wirksamkeit der *meso-* bzw. *d,l-*konfigurierten fluorsubstituierten Eisen(diarylsalen)-Komplexen zeigte eine deutliche Abhängigkeit von der Ladung des Eisenzentralatoms. *D,l-*konfigurierte Eisen(II)-Komplexe besaßen in der Regel größere zytotoxische Wirkungen als ihre *meso-*konfigurierten Eisen(II)-Analoga. Die *d,l-*konfigurierten Komplexe *d,l*[Fe<sup>II</sup>2'F] (113d,I) und *d,l*[Fe<sup>II</sup>3'F] (115d,I) wiesen in einer Testkonzentration von 5  $\mu$ M stark zytozide Aktivitäten auf, während die analogen *meso-*konfigurierten Komplexe (113m) und (115m) lediglich antiproliferative Wirkungen besaßen.



Abbildung 4.8: Einfluss der Konfiguration der 1,2-Diarylethan-Partialstruktur auf die antiproliferativen Wirkungen der methoxysubstituierten Eisen(II)/(III)-(diarylsalen)-Komplexe

Bei den Eisen(III)-Komplexen der mono-fluorsubstituierten Verbindungen fiel dagegen eine gegenteilige Wirksamkeit auf. In dieser Reihe zeigten *meso*-konfigurierte Komplexe eher größere zytotoxische Effekte als die *d*,*l*-konfigurierten Eisen(III)-Analoga. Beispielsweise waren die beiden Komplexe *m*[Fe<sup>III</sup>2'F]Cl (114m) und *m*[Fe<sup>III</sup>3'F]Cl (116m) in einer Konzentration von 1 µM bereits stark antiproliferativ wirksam, während ihre *d*,*l*-konfigurierten Analoga in dieser Testkonzentration keine zytotoxischen Effekte aufwiesen. Der *m*[Fe<sup>III</sup>4'F]Cl-Komplex (122m) zeigte ebenfalls eine größere zytotoxische Wirkung als der analoge *d*,*l*-konfigurierte Komplex *d*,*l*[Fe<sup>III</sup>4'F]Cl (122d,I).

Die Wirksamkeit der 4'-fluorsubstituierten Eisen(II)-Komplexe m[Fe<sup>II</sup>4'F] (117m) und d,l[Fe<sup>II</sup>4'F] (117d,I) ist dagegen weniger eindeutig zu beurteilen. Der m[Fe<sup>II</sup>4'F]-Komplex (117m) war in einer Testkonzentration von 1 µM mit einem minimalen T/C<sub>corr</sub>-Wert von rund 40 % deutlich stärker antiproliferativ wirksam als der d,l-konfigurierte diastereomere d,l[Fe<sup>II</sup>4'F]-Komplex (117d,I). Dies änderte sich jedoch bei Erhöhung der Testkonzentration auf 10 µM. In dieser Konzentration besaß der d,l-konfigurierte Komplex (117d,I) mit einem  $\tau$ -Wert von -39 % wesentlich stärkere zytozide Effekte als der *meso*-konfigurierte diastereomere Komplex (117m).

T/C <sub>corr</sub> (%) bzw. τ (%)					
Nr.	1 µM (h)	5 µM (h)	10 µM (h)	Abkürzung	
(113m)	67.0 (117)	14.5 (69)	-25.6 (69)	<i>m</i> [Fe <sup>ll</sup> 2'F]	
(113d,l)	62.4 (70)	-69.6 (140)	-55.5 (213)	<i>d,I</i> [Fe <sup>ll</sup> 2'F]	
(114m)	13.6 (74)	-38.0 (169)	-43.0 (74)	<i>m</i> [Fe <sup>III</sup> 2'F]Cl	
(114d,l)	61.2 (71)	-36.9 (71)	-45.1 (118)	<i>d,I</i> [Fe <sup>III</sup> 2'F]CI	
(115m)	71.4 (117)	47.9 (117)	14.7 (69)	<i>m</i> [Fe <sup>ll</sup> 3'F]	
(115d,l)	85.8 (138)	-35.5 (174)	-30.0 (174)	<i>d,I</i> [Fe <sup>ll</sup> 3'F]	
(116m)	30.0 (170)	-33.8 (79)	-36.3 (170)	<i>m</i> [Fe <sup>III</sup> 3'F]Cl	
(116d,l)	85.6 (77)	1.3 (144)	-51.3 (144)	<i>d,I</i> [Fe <sup>III</sup> 3'F]CI	
(117m)	39.8 (72)	10.1 (72)	7.1 (72)	<i>m</i> [Fe <sup>ll</sup> 4'F]	
(117d,l)	85.4 (144)	17.7 (144)	-39.0 (213)	<i>d,I</i> [Fe <sup>ll</sup> 4'F]	
(122m)	50.4 (72)	-5.1 (72)	-18.6 (72)	<i>m</i> [Fe <sup>III</sup> 4'F]Cl	
(122d,l)	87.0 (144)	24.1 (144)	-62.7 (144)	<i>d,I</i> [Fe <sup>III</sup> 4'F]CI	

Tabelle 4.7:Minimale T/Ccorr- bzw. τ-Werte (Zeit) an der MCF7-Zelllinie: Einfluss<br/>der Konfiguration der 1,2-Diarylethan-Partialstruktur bei Verbindungen<br/>mit Fluorsubstitutionen der "Brücken"-Aromaten



Abbildung 4.9: Einfluss der Konfiguration der 1,2-Diarylethan-Partialstruktur auf die antiproliferativen Wirkungen der fluorsubstituierten Eisen(II)/(III)(diaryl-salen)-Komplexe an MCF7-Zellen

Bei den Eisen(diarylsalen)-Komplexen mit Difluorsubstitutionen der "Brücken"-Aromaten ließ sich – wie anhand der ausgewählten Beispiele ersichtlich – nur z.T. eine Steigerung der Wirksamkeit durch die *d*,*l*-Konfiguration der Liganden feststellen (vgl. Tabelle 4.5 und Abbildung 4.10). Die *d*,*l*[Fe<sup>III</sup>2',6'F]CI-Verbindung (**128d**,**I**) war in einer Konzentration von 0.5  $\mu$ M mit einem T/C<sub>corr</sub>-Wert von 6.3 % deutlich zytostatisch wirksam. In einer Konzentration von 1  $\mu$ M konnte mit einem  $\tau$ -Wert von -20.1 % eine stark zytozide Wirkung gefunden werden. Im Gegensatz dazu zeigte die *meso*konfigurierte Verbindung *m*[Fe<sup>III</sup>2',6'F]CI (**128m**) auch in einer Konzentration von 10  $\mu$ M lediglich antiproliferative Effekte. Der *d*,*l*-konfigurierte *d*,*l*[Fe<sup>III</sup>2',6'F]CI-Komplex (**128d**,**I**) zählt mit seinen stark zytoziden Eigenschaften neben dem *meso*-konfigurierten *m*[Fe<sup>III</sup>2',4'F]CI-Komplex (**126m**) zu einer der wirksamsten Verbindungen, die im Rahmen dieser Arbeit synthetisiert wurden.

Allerdings wurde bei den in 2'- und 5'-Position difluorierten Komplexen d,//m[Fe<sup>III</sup>2',5'F]Cl (127m) bzw. (127d,I) durch die Änderung der Konfiguration der 1,2-Diarylethan-Partialstruktur von einer *meso-* zu einer *d*,/-Konfiguration keine Zytotoxizitätssteigerung erzielt. Der *d*,/-konfigurierte Komplex *d*,/[Fe<sup>III</sup>2',5'F]Cl (127d,I) zeigte in einer Konzentration von 1 µM lediglich schwach antiproliferative Effekte, während die analoge *meso*-diastereomere Verbindung in dieser Konzentration deutlich zytostatische Wirkungen besaß. Ähnlich verhielt es sich mit dem in 3'- und 4'-Position difluorierten Komplex m[Fe<sup>III</sup>3',4'F]Cl (**129m**). Dieser wirkte in einer Konzentration von 10 µM beispielsweise mit einem  $\tau$ -Wert von -49 % stark zytozide, während der analoge *d*,*l*-konfigurierte *d*,*l*[Fe<sup>III</sup>3',4'F]Cl-Komplex (**129d**,I) in derselben Konzentration lediglich zytostatische Effekte aufwies.

T/C <sub>corr</sub> (%) bzw. τ (%)							
Nr.	0.5 µM (h)	1 µM (h)	5 µM (h)	10 µM (h)	Abkürzung		
(127m)	-	18.8 (69)	-25.0 (140)	-16.1 (162)	<i>m</i> [Fe <sup>III</sup> 2',5'F]Cl		
(127d,l)	88.6 (68)	71.5 (68)	-30.8 (144)	-	<i>d,I</i> [Fe <sup>III</sup> 2',5' F]CI		
(128m)	-	85.4 (143)	36.2 (70)	39.9 (70)	<i>m</i> [Fe <sup>III</sup> 2',6'F]Cl		
(128d,l)	6.3 (115)	-20.1 (115)	-60.4 (115)	-60.9 (150)	<i>d,I</i> [Fe <sup>III</sup> 2',6'F]Cl		
(129m)	-	8.3 (145)	-17.0 (72)	-49.0 (72)	<i>m</i> [Fe <sup>ll</sup> 3',4'F]		
(129d,l)		87.7 (123)	34.2 (166)	6.6 (145)	<i>d,I</i> [Fe <sup>ll</sup> 3',4'F]		

Tabelle 4.8:Minimale T/Ccorr- bzw. τ-Werte (Zeit) an der MCF7-Zelllinie: Einfluss<br/>der Konfiguration der 1,2-Diarylethan-Partialstruktur bei Eisen(diaryl-<br/>salen)-Komplexen mit Difluorsubstitutionen der "Brücken"-Aromaten



Abbildung 4.10: Einfluss der Konfiguration der 1,2-Diarylethan-Partialstruktur auf die antiproliferativen Wirkungen der difluorsubstituierten Eisen(diarylsalen)-Komplexe an MCF7-Zellen

## 4.2.1.4 Einfluss der Variation der Substituenten der "Basis"-Aromaten

Die Einführung von Hydroxygruppen in die Aromaten der [Fe<sup>II/III</sup>salen]-Komplexe und in die "Basis"-Aromaten des Diarylsalengrundgerüsts führte zu einem deutlichen Verlust der zytotoxischen Wirksamkeit der entstandenen Komplexe.

Die Hydroxysalenkomplexe (82), (83), (84), (86), (87) und (88) waren im getesteten Konzentrationsbereich von 1, 5 und 10  $\mu$ M unwirksam oder besaßen in der höchsten Testkonzentration lediglich sehr schwach antiproliferative Eigenschaften (siehe Tabelle 4.9 und Abbildung 4.11).

Die Eisen(diarylsalen)-Komplexe, in deren "Basis"-Aromaten eine weitere Hydroxygruppe eingeführt wurde ((92m), (95m), (98m), (99m), (100m), (105m), (106m), (107m), (118m)), zeigten in den drei Testkonzentrationen ebenfalls keine oder lediglich sehr schwache antiproliferative Wirkungen (siehe Tabelle 4.9 und Abbildung 4.12).

T/C <sub>corr</sub> (%) bzw. τ (%)					
Nr.	1 µM (h)	5 µM (h)	10 µM (h)	Abkürzung	
(82)	99.7 (169)	94.2 (151)	86.7 (151)	[Fe <sup>ll</sup> (3OH) salen]	
(83)	71.4 (60)	86.1 (60)	65.4 (140)	[Fe <sup>ll</sup> (4OH) salen]	
(84)	92.2 (169)	94.7 (169)	88.8 (74)	[Fe <sup>ll</sup> (5OH) salen]	
(86)	100.6 (151)	85.9 (119)	74.5 (119)	[Fe <sup>III</sup> (3OH) salen]Cl	
(87)	104.6 (118)	87.9 (71)	97.8 (118)	[Fe <sup>III</sup> (4OH) salen]Cl	
(88)	91.5 (209)	90.4 (115)	82.1 (71)	[Fe <sup>III</sup> (5OH) salen]Cl	
(92m)	83.5 (74)	80.7 (169)	81.3 (74)	<i>m</i> [Fe <sup>II</sup> (3OH) 2'OCH <sub>3</sub> ]	
(95m)	92.6 (122)	84.5 (72)	81.4 (72)	<i>m</i> [Fe <sup>ll</sup> (3OH) 3'OCH <sub>3</sub> ]	
(98m)	104.6 (173)	92.0 (97)	68.4 (212)	<i>m</i> [Fe <sup>ll</sup> (3OH) 4'OCH <sub>3</sub> ]	
(99m)	74.5 (97)	67.3 (97)	77.0 (172)	<i>m</i> [Fe <sup>ll</sup> (4OH ) 4'OCH <sub>3</sub> ]	
(100m)	95.5 (97)	81.3 (97)	63.7 (97)	<i>m</i> [Fe <sup>ll</sup> (5OH) 4'OCH <sub>3</sub> ]	
(105m)	85.0 (234)	69.4 (66)	65.3 (119)	<i>m</i> [Fe <sup>III</sup> (3OH) 4'OCH <sub>3</sub> ]Cl	
(106m)	81.2 (97)	76.9 (69)	76.5 (117)	<i>m</i> [Fe <sup>III</sup> (4OH) 4'OCH <sub>3</sub> ]Cl	
(107m)	90.1 (66)	69.0 (234)	56.7 (166)	<i>m</i> [Fe <sup>III</sup> (5OH) 4'OCH <sub>3</sub> ]Cl	
(118m)	83.7 (122)	93.3 (145)	93.1 (219)	<i>m</i> [Fe <sup>ll</sup> (5OH) 4'F]	

Tabelle 4.9:Minimale T/Ccorr-<br/>bzw. τ-Werte (Zeit) an der MCF7-Zelllinie: Eisen-<br/>(salen)-Komplexe bzw. der Eisen(diarylsalen)-Komplexe, in deren<br/>"Basis"-Aromaten weitere Hydroxygruppen eingeführt wurden



Abbildung 4.11: Antiproliferative Effekte der Eisen(II)/(III)(hydroxysalen)-Komplexe an MCF7-Zellen



Abbildung 4.12: Antiproliferative Wirkungen der Eisen(II)/(III)(diarylsalen)-Komplexe, in deren "Basis"-Aromaten weitere Hydroxygruppen eingeführt wurden

Die Einführung von Methoxygruppen in die "Basis"-Aromaten des Diarylsalengrundgerüsts führte ebenfalls zu einer Abschwächung der zytotoxischen Wirksamkeit der Eisenkomplexe. In Abhängigkeit vom Substitutionsmuster der "Brücken"-Aromaten und der Stellung der Methoxygruppe in den "Basis"-Aromaten wurden unwirksame, schwach antiproliferativ wirksame und – nur im Fall des Komplexes **(125m)** – eine zytozid wirksame Verbindung erhalten (siehe Tabelle 4.10 sowie Abbildung 4.13 und 4.14). Dabei lässt sich bei den Eisen(II)-Komplexen mit Methoxysubstitutionen der "Basis"-Aromaten keine Struktur-Wirkungs-Beziehung erkennen. Interessanterweise zeigten dagegen beide Eisen(III)-Komplexe mit Methoxysubstitution der 5-Positionen (m[Fe<sup>III</sup>(5OCH<sub>3</sub>) 4'OCH<sub>3</sub>]Cl **(110m)** und m[Fe<sup>III</sup>(5OCH<sub>3</sub>) 4'F]Cl **(125m)**) die größte Wirksamkeit in der Reihe der in den "Basis"-Aromaten methoxysubstituierten Verbindungen.

Generell konnte aber die Einführung von Methoxysubstituenten in die "Basis"-Aromaten die zytotoxische Wirksamkeit der Eisenkomplexe nicht steigern.

T/C <sub>corr</sub> (%) bzw. τ (%)						
Nr.	1 µM (h)	5 µM (h)	10 µM (h)	Abkürzung		
(101m)	91.4 (74)	82.0 (74)	78.4 (115)	<i>m</i> [Fe <sup>ll</sup> (3OCH <sub>3</sub> ) 4'OCH <sub>3</sub> ]		
(102m)	87.8 (74)	81.8 (115)	75.2 (74)	<i>m</i> [Fe <sup>ll</sup> (4OCH <sub>3</sub> ) 4'OCH <sub>3</sub> ]		
(103m)	85.9 (71)	76.5 (138)	76.1 (174)	<i>m</i> [Fe <sup>II</sup> (5OCH <sub>3</sub> ) 4'OCH <sub>3</sub> ]		
(108m)	96.5 (118)	80.1 (70)	76.6 (70)	<i>m</i> [Fe <sup>III</sup> (3OCH <sub>3</sub> ) 4'OCH <sub>3</sub> ]Cl		
(109m)	87.9 (166)	80.4 (166)	74.8 (166)	<i>m</i> [Fe <sup>III</sup> (4OCH <sub>3</sub> ) 4'OCH <sub>3</sub> ]Cl		
(110m)	58.0 (72)	25.3 (72)	35.3 (145)	<i>m</i> [Fe <sup>III</sup> (5OCH <sub>3</sub> ) 4'OCH <sub>3</sub> ]Cl		
(119m)	92.2 (71)	85.5 (174)	65.0 (65)	<i>m</i> [Fe <sup>ll</sup> (3OCH <sub>3</sub> ) 4'F]		
(120m)	92.6 (71)	49.8 (138)	42.8 (138)	<i>m</i> [Fe <sup>ll</sup> (4OCH <sub>3</sub> ) 4'F]		
(121m)	90.2 (74)	74.7 (169)	48.1 (139)	<i>m</i> [Fe <sup>ll</sup> (5OCH <sub>3</sub> ) 4'F]		
(123m)	100.7 (70)	86.2 (70)	91.5 (143)	<i>m</i> [Fe <sup>III</sup> (3OCH <sub>3</sub> ) 4'F]Cl		
(124m)	86.9 (116)	59.9 (116)	46.6 (162)	<i>m</i> [Fe <sup>III</sup> (4OCH <sub>3</sub> )4'F]Cl		
(125m)	78.5 (162)	13.6 (69)	-19.8 (69)	<i>m</i> [Fe <sup>III</sup> (5OCH <sub>3</sub> ) 4'F]Cl		

Tabelle 4.10:Minimale T/Ccorr<sup>-</sup> bzw. τ-Werte (Zeit) an der MCF7-Zelllinie: Eisen-<br/>(diarylsalen)-Komplexe mit Methoxysubstituenten der "Basis"-<br/>Aromaten



Abbildung 4.13: Antiproliferative Wirkungen der Eisen(II)/(III)(diarylsalen)-Komplexe mit Methoxysubstituenten der "Basis"-Aromaten und 4'-Methoxysubstitution der "Brücken"-Aromaten an MCF7-Zellen



Abbildung 4.14: Antiproliferative Wirkungen der Eisen(II)/(III)(diarylsalen)-Komplexe mit Methoxysubstituenten der "Basis"-Aromaten und 4'-Fluorsubstitution der "Brücken"-Aromaten an MCF7-Zellen

## 4.2.1.5 Einfluss struktureller Abweichungen vom Salen- bzw. Diarylsalengrundgerüst

Als strukturelle Variation des Salengrundgerüsts wurde zunächst die 1,2-Diaminoethan-Partialstruktur durch eine 1,3-Diaminopropan-Teilstruktur ersetzt. Der erhaltene  $[Fe^{II}propyl]$ -Komplex (142) erwies sich jedoch als schwächer wirksam im Vergleich zur  $[Fe^{II}salen]$ -Ausgangsverbindung (81). Der Ersatz der Salicylteilstruktur durch eine Hydroxynaphthylteilstruktur führte zu dem zytoziden  $[Fe^{III}naphthyl]$ Cl-Komplex (144), der mit einem minimalen  $\tau$ -Wert von -9.2 % (bei 10 µM Testkonzentration) eine stärkere zytotoxische Wirksamkeit besaß als die Ausgangsverbindung  $[Fe^{III}salen]$ Cl (85). Die 4'-methoxydiarylsalenanaloge Verbindung  $[Fe^{III}naphthyl 4'OCH_3]$ Cl (146m) zeigte dagegen keine antiproliferativen Effekte und besaß damit eine geringere Wirkung als die  $m[Fe^{III}4'OCH_3]$ Cl-Ausgangsverbindung (104m) (siehe Tabelle 4.11 und Abbildung 4.15). Die salenanaloge Verbindung  $[Fe^{III}CH_3 salen]$  (143), deren Iminproton durch eine Methylgruppe ersetzt wurde, zeigte ebenso wie die diarylsalenanaloge Verbindung  $m[Fe^{III}CH_3 4'OCH_3]$ Cl (145m) im Gegensatz zu den jeweiligen Ausgangsverbindungen keine zytotoxischen Eigenschaften.

Durch die Hydrierung der Imindoppelbindung und die damit erfolgte Aufhebung der Azomethingrundstruktur konnten ebenfalls nur Verbindungen erhalten werden ([Fe<sup>III</sup>hydrosal]Cl **(147)** und *m*[Fe<sup>III</sup>hydro 4'OCH<sub>3</sub>]Cl **(148m)**), die an der MCF7-Zelllinie keine antiproliferativen Effekte besaßen.

T/C <sub>corr</sub> (%) bzw. τ (%)					
Nr.	1 μM (h)	5 µM (h)	10 µM (h)	Abkürzung	
(81)	87.3 (217)	79.6 (74)	3.9 (139)	[Fe <sup>ll</sup> salen]	
(85)	74.8 (72)	43.4 (118)	0.1 (118)	[Fe <sup>lli</sup> salen]Cl	
(142)	103.0 (118)	86.5 (118)	57.3 (71)	[Fe <sup>ll</sup> propyl]	
(143)	93.4 (121)	97.0 (121)	102.0 (213)	[Fe <sup>III</sup> CH₃ salen]Cl	
(144)	97.2 (144)	70.3 (144)	-9.2 (163)	[Fe <sup>III</sup> naphthyl]Cl	
(147)	97.7 (150)	91.4 (150)	94.8 (150)	[Fe <sup>lli</sup> hydrosal]Cl	
(104m)	66.1 (68)	33.9 (118)	-5.0 (68)	<i>m</i> [Fe <sup>III</sup> 4'OCH <sub>3</sub> ]Cl	
(145m)	85.7 (165)	85.2 (144)	89.1 (144)	<i>m</i> [Fe <sup>III</sup> CH <sub>3</sub> 4'OCH <sub>3</sub> ]Cl	
(146m)	95.4 (139)	91.1 (74)	90.2 (139)	<i>m</i> [Fe <sup>III</sup> naphthyl 4'OCH <sub>3</sub> ]Cl	
(148m)	92.6 (70)	74.2 (70)	57.3 (70)	<i>m</i> [Fe <sup>III</sup> hydro 4'OCH <sub>3</sub> ]Cl	

 Tabelle 4.11:
 Minimale T/C<sub>corr</sub> bzw. τ-Werte (Zeit) an der MCF7-Zelllinie: Einfluss

 struktureller Abweichungen vom Salen- bzw. Diarylsalengrundgerüst

Im Gegensatz zu den genannten strukturellen Variationen des Grundgerüsts wurden durch die Überbrückung der Ethanstruktur mit einer Phenylendiamin-Teilstruktur die beiden stark zytozid wirksamen Komplexe [Fe<sup>II</sup>salophen] (140) und [Fe<sup>III</sup>salophen]Cl (141) erhalten, die neben den bereits erwähnten difluorsubstituierten Komplexen (126m) und (128d,I) zu den wirksamsten Verbindungen, die im Rahmen dieser Arbeit synthetisiert wurden, zählen. Der Eisen(II)-Komplex (140) zeigte bereits in einer Konzentration von 0.5  $\mu$ M einen deutlich antiproliferativen Effekt (siehe Tabelle 4.12 und Abbildung 4.16). Mit einer Testkonzentration von 1  $\mu$ M konnten stark zytozide Wirkungen erzielt werden. Damit besaß der [Fe<sup>II</sup>salophen]-Komplex (140) eine 10-fach stärkere Wirksamkeit als [Fe<sup>II</sup>salen] (81), deren zytostatische Wirkung erst in einer Konzentration von 10  $\mu$ M zu beobachten war. Der analoge Eisen(III)-Komplex [Fe<sup>III</sup>salophen]Cl (141) erwies sich noch wirksamer als [Fe<sup>III</sup>salophen]. [Fe<sup>III</sup>salophen]Cl wirkte bereits in einer Konzentration von 0.5  $\mu$ M stark zytozide. Im Vergleich zur [Fe<sup>III</sup>salen]Cl-Ausgangsverbindung (85) wurde damit ein um mehr als 20-fach wirksamerer Eisenkomplex erhalten.



Abbildung 4.15: Antiproliferative Wirkungen der Eisenkomplexe mit struktureller Abweichung vom Salen- bzw. Diarylsalengrundgerüst an MCF7-Zellen

	T/C <sub>corr</sub> (%) bzw. τ (%)							
Nr.	0.05 µM (h)	0.1 µM (h)	0.5 µM (h)	1 µM (h)	Abkürzung			
(140)	96.5 (71)	96.7 (71)	35.7 (71)	-35.9 (138)	[Fe <sup>ll</sup> salophen]			
(141)	92.6 (166)	80.4 (72)	-23.4 (72)	-50.8 (166)	[Fe <sup>III</sup> salophen]Cl			

 Tabelle 4.12:
 Minimale T/C<sub>corr</sub>- bzw. τ-Werte (Zeit) an der MCF7-Zelllinie:

[Fe<sup>ll/III</sup>salophen]-Komplexe



Abbildung 4.16: Antiproliferative Wirkungen von [Fe<sup>II/III</sup>salophen] an MCF7-Zellen

# 4.2.1.6 Zusammenfassung der Ergebnisse der Zytotoxizitätstestungen an der MCF7-Zelllinie

In der zeitabhängigen Zytotoxizitätstestung der Eisen(diarylsalen)-Komplexe an der MCF7-Zelllinie konnte eine starke Abhängigkeit der antiproliferativen Wirkung von der Struktur der Verbindungen gefunden werden. Die ermittelten Struktur-Wirkungs-Beziehungen sollen an dieser Stelle noch einmal kurz zusammengefasst werden:

• Die Einführung der 1,2-Diarylethan-Partialstruktur in das Salengrundgerüst der Liganden der Eisenkomplexe erhöhte deutlich deren zellwachstumshemmende Wirksamkeit.

• Eisen(III)-Komplexe waren generell wirksamer als ihre Eisen(II)-Analoga.

 Durch die Einführung weiterer Substituenten in die "Brücken"-Aromaten des Diarylsalengrundgerüsts konnte die zytotoxische Wirksamkeit der Komplexe im Vergleich zu den unsubstituierten Diphenylsalen-Eisenkomplexen kaum gesteigert werden. Lediglich fluorsubstituierte Verbindungen besaßen (je nach Position des Fluorsubstituenten) eine vergleichbare oder auch größere zytotoxische Wirksamkeit.

• Eisen(diarylsalen)-Komplexe mit Fluorsubstitution der "Brücken"-Aromaten erwiesen sich generell als wirksamer als methoxysubstituierte Verbindungen.

• In der in den "Brücken"-Aromaten methoxysubstituierten und fluorsubstituierten Reihen konnte je nach Substituent (F oder OCH<sub>3</sub>) und Ladung des Eisenzentralatoms z.T. eine Steigerung der zellwachstumshemmenden Wirkung bei "Verschieben" der Position der Substituenten von der 4'-, über die 3'-, in die 2'-Position gesehen werden. Für die *meso*-konfigurierten Liganden der Eisen(III)-Komplexe wurde z.B. folgende Wirkungsreihe gefunden:

• Die Einführung eines zweiten Fluorsubstituenten in die "Brücken"-Aromaten bewirkte mit Ausnahme der *m*[Fe<sup>III</sup>2',6'F]CI-Verbindung **(128m)** eine weitere Wirkungssteigerung im Vergleich zu den monofluorierten Komplexen. Für die *meso*-konfigurierten fluorierten Komplexe wurde folgender Zusammenhang ermittelt:

• Die Konfiguration der 1,2-Diarylethan-Partialstruktur der Liganden hatte einen deutlichen Einfluss auf die zytotoxische Wirkung der Komplexe. Dabei besaßen *d,I*-Komplexe häufig eine höhere Wirksamkeit als ihre *meso*-konfigurierten Diastereomere.

• Die Einführung von Substituenten in die "Basis"-Aromaten führte generell zu einer Wirkungsabschwächung. Dabei wurden durch die Einführung von Hydroxygruppen unwirksame Verbindungen erhalten, durch die Einführung von Methoxygruppen in Abhängigkeit von der Position der Methoxysubstituenten schwächer wirksame bis unwirksame Verbindungen.

• Variationen am Salen- wie auch am Diarylsalengrundgerüst, wie z.B. die Hydrierung der Iminstruktur oder der Austausch des Azomethinprotons durch eine Methylgruppe, führten meist zu unwirksamen Verbindungen. Die Azomethinstruktur der Liganden scheint offensichtlich eine essentielle Bedeutung für die zytotoxische Wirkung zu haben.

• Durch Ersatz der Ethanbrücke des Salens durch eine Phenylendiamin-Teilstruktur wurde die wirksamste Verbindung [Fe<sup>III</sup>salophen]Cl **(141)** erhalten, die bereits in einer Testkonzentration von 0.5 µM zytozide Wirkungen aufzeigte.

# 4.2.2 Zeitabhängige Zytotoxizitätstestung an der MDA-MB-231-Zelllinie

An der MDA-MB-231 Brustkrebszelllinie sind zunächst ausgewählte Verbindungen getestet worden. Diese Zelllinie erwies sich als wesentlich empfindlicher gegenüber den Eisenkomplexen als alle anderen verwendeten Zelllinien. Aus diesem Grund wurden die Verbindungen in der Regel in vier unterschiedlichen Konzentrationen in einem Bereich von 0.05  $\mu$ M bis 1  $\mu$ M getestet. Z.T. konnten an der MDA-MB-231-Zelllinie allerdings schon ab einer Konzentration von 0.01  $\mu$ M stark zytozide Wirkungen gefunden werden (z.B. *d*,*l*[Fe<sup>III</sup>DPS]CI (90d,I) oder *m*[Fe<sup>III</sup>2'OCH<sub>3</sub>]CI (93m)).

Die besonders hohe Empfindlichkeit dieser Zelllinie gegenüber den synthetisierten Eisenkomplexen ist gerade deshalb besonders bemerkenswert, da die etablierten Zytostatika an der MDA-MB-231-Zelllinie in der Regel eine geringere Wirksamkeit im Vergleich zur MCF7-Zelllinie besitzen (siehe Abschnitt 9.3 und Tabelle 9.1). Beispielsweise zeigt auch Cisplatin an MDA-MB-231-Zellen eine etwas geringere Wirksamkeit als an der MCF7-Zelllinie. Der Platinkomplex besitzt z.B. in einer Testkonzentration von 1  $\mu$ M an der MDA-MB-231-Zelllinie mit einem minimalen T/C<sub>corr</sub>-Wert von 69 % lediglich antiproliferative Eigenschaften.

## 4.2.2.1 Eisen(salen), Eisen(salen)-Analoga und Einführung der 1,2-Diarylethan-Partialstruktur

Die [Fe<sup>II/III</sup>salen]-Komplexe **(81)** und **(85)** besaßen an der MDA-MB-231-Zelllinie bereits in einer Konzentration von 1  $\mu$ M zytozide Wirkungen. Wesentlich stärker wirksamen waren die phenylendiaminüberbrückten Komplexe [Fe<sup>II</sup>salophen] **(140)** und [Fe<sup>III</sup>salophen]Cl **(141)**, die schon in einer Konzentration von 0.5  $\mu$ M stark zytotoxische Effekte zeigten. Eine deutlich schwächere Wirksamkeit als die [Fe<sup>II/III</sup>salen]-Ausgangsverbindungen zeigte der hydrierte Komplex [Fe<sup>IIII</sup>hydrosal]Cl **(147)**. Er war in der höchsten Testkonzentration (1  $\mu$ M) lediglich schwach antiproliferativ wirksam (vgl. Tabelle 4.13 und Abbildung 4.17).

	T/C <sub>corr</sub> (%) bzw. τ (%)							
Nr.	0.05 µM (h)	0.1 µM (h)	0.5 µM (h)	1 µM (h)	Abkürzung			
CisPt	-	-	79.7 (72)	69.0 (72)	Cisplatin			
(81)	72.1 (47)	97.1 (117)	14.1 (73)	-11.4 (47)	[Fe <sup>ll</sup> salen]			
(85)	94.9 (49)	92.0 (70)	57.6 (70)	-1.2 (70)	[Fe <sup>llI</sup> salen]Cl			
(90m)	-	64.5 (53)	-10.8 (94)	-14.7 (122)	<i>m</i> [Fe <sup>III</sup> DPS]CI			
(90d,l)	-	-12.3 (91)	-27.4 (68)	-40.5 (68)	<i>d,I</i> [Fe <sup>Ⅲ</sup> DPS]CI			
(140)	90.0 (49)	41.9 (71)	-19.1 (47)	-29.7 (47)	[Fe <sup>ll</sup> salophen]			
(141)	46.0 (53)	66.2 (69)	-27.8 (122)	-40.8 (53)	[Fe <sup>III</sup> salophen]Cl			
(147)	-	85.9 (73)	70.1 (47)	62.3 (47)	[Fe <sup>III</sup> hydrosal]Cl			

Tabelle 4.13:Minimale T/C<sub>corr</sub>- bzw. τ-Werte (Zeit) an der MDA-MB-231-Zelllinie:<br/>[Fe<sup>ll/III</sup>salen], [Fe<sup>ll/III</sup>salen]-Analoga und Einführung der 1,2-Diarylethan-<br/>Partialstruktur



**Abbildung 4.17:** Antiproliferative Effekte der [Fe<sup>II/III</sup>salen]-Komplexe und strukturmodifizierter Eisen(salene) an MDA-MB-231-Zellen

Durch die Einführung einer 1,2-Diarylethan-Partialstruktur in die Liganden konnte analog zur MCF7-Brustkrebszelllinie eine Wirkungssteigerung erzielt werden. Der *meso*-konfigurierte Komplex *m*[Fe<sup>III</sup>DPS]CI **(90m)** zeigte bereits in einer Konzentration von 0.1  $\mu$ M antiproliferative Eigenschaften und in einer Testkonzentration von 0.5  $\mu$ M deutlich zytozide Wirkungen. Der *d*,*l*-konfigurierte Komplex *d*,*l*[Fe<sup>III</sup>DPS]CI **(90d,I)** besaß eine noch stärkere Wirkung als der *meso*-konfigurierte diastereomere Komplex. Er war bereits in einer Testkonzentration von 0.1  $\mu$ M stark zytozid wirksam.

Die Einführung von Methoxy- oder Fluorsubstituenten in die 4'-Position der "Brücken"-Aromaten führte insbesondere bei den *d*,*l*-konfigurierten Komplexen *d*,*l*[Fe<sup>III</sup>4'OCH<sub>3</sub>]Cl (104d,I) und *d*,*l*[Fe<sup>III</sup>4'F]Cl (122d,I) im Vergleich zur unsubstituierten Verbindung (90d,I) zu einer Wirkungsabschwächung. Beide Komplexe besaßen an der MDA-MB-231-Zelllinie in einer Konzentration von 0.1  $\mu$ M keine deutlichen antiproliferativen Eigenschaften. Der unsubstituierte *d*,*l*[Fe<sup>III</sup>DPS]CI-Komplex (90d,I) war dagegen in dieser Konzentration bereits zytozid wirksam.

Im Gegensatz zu den *d,l*-konfigurierten Komplexen konnte bei den diastereomeren *meso*-Komplexen *m*[Fe<sup>III</sup>4'OCH<sub>3</sub>]Cl **(104m)** und *m*[Fe<sup>III</sup>4'F]Cl **(122m)** (besonders bei der fluorsubstituierten Verbindung) eine Erhöhung der Wirksamkeit durch die Einführung von Methoxy- bzw. Fluorsubstituenten in die "Brücken"-Aromaten gefunden werden.

## 4.2.2.2 Eisen(diarylsalen)-Komplexe mit Methoxysubstitution der "Brücken"-Aromaten

Die Veränderung der Position der Methoxysubstituenten von der 4'- über die 3'- in die 2'-Position führte z.T. zu schwächer wirksamen Verbindungen und z.T. zu stärker wirksamen Verbindungen. Auffällig ist die hohe Wirksamkeit des in 2'-Position methoxysubstituierten Komplexes m[Fe<sup>III</sup>2'OCH<sub>3</sub>]Cl (93m), der in einer Testkonzentration von 0.1 µM mit einem minimalen  $\tau$ -Wert von -24.4 % stark zytozide Eigenschaften zeigte und damit eine mit der *d*,*l*-konfigurierten Verbindung *d*,*l*[Fe<sup>III</sup>DPS]Cl (90d,I) vergleichbare Wirkstärke aufwies (siehe Tabelle 4.14 und Abbildung 4.18).

Die Konfiguration der 1,2-Diarylethan-Partialstruktur hatte auch an der MDA-MB-231-Zelllinie einen Einfluss auf die zytotoxische Wirksamkeit der Komplexe. Dabei konnte allerdings bei den *d*,*l*-konfigurierten Komplexen, wie an der MCF7-Zelllinie auch, nur z.T. eine eindeutig größere zelltoxischere Wirkung gefunden werden. Eine deutlich stärkere Wirksamkeit als der *meso*-konfigurierte *m*[Fe<sup>III</sup>DPS]CI-Komplex (90m) besaß z.B. der bereits erwähnte *d*,*l*[Fe<sup>III</sup>DPS]CI-Komplex (90d,I). Eine ebenso stärkere zytozide Wirkung zeigte der in 2'-Position methoxysubstituierte Eisen(II)-Komplex *d*,*l*[Fe<sup>III</sup>2'OCH<sub>3</sub>] (91d,I). Er war mit einem minimalen T/C<sub>corr</sub>-Wert von 15.6 % bereits in einer Konzentration von 0.1 µM stark zytostatisch wirksam, während der diastereomere *meso*-Komplex (91m) in dieser Konzentration keinerlei antiproliferative Effekte auslöste. Im Gegensatz dazu hatte der analoge Eisen(III)-Komplex *m*[Fe<sup>III</sup>2'OCH<sub>3</sub>]CI (93m) in dieser Testkonzentration mit einem minimalen  $\tau$ -Wert von -24.4 % bereits stark zytozide Eigenschaften, während der *d*,*l*-Eisen(III)-Komplex (93d,I) lediglich schwach antiproliferativ wirksam war.

	T/C <sub>corr</sub> (%) bzw. τ (%) (h)							
Nr.	0.05 μM	0.1 µM	0.5 µM	1 µM	Abkürzung			
(91m)	99.0 (164)	99.0 (122)	3.1 (49)	-34.9 (164)	<i>m</i> [Fe <sup>ll</sup> 2'OCH <sub>3</sub> ]			
(91d,l)	83.8 (47)	15.6 (47)	-20.2 (117)	-21.4 (117)	<i>d,I</i> [Fe <sup>ll</sup> 2'OCH <sub>3</sub> ]			
(93m)	38.4 (49)	-24.4 (49)	-18.3 (49)	-21.2 (70)	<i>m</i> [Fe <sup>III</sup> 2'OCH <sub>3</sub> ]Cl			
(93d,l)	77.7 (45)	59.2 (98)	-3.7 (170)	-7.8 (170)	<i>d,I</i> [Fe <sup>III</sup> 2'OCH <sub>3</sub> ]CI			
(94m)	92.0 (71)	96.9 (71)	64.9 (71)	8.5 (102)	<i>m</i> [Fe <sup>ll</sup> 3'OCH <sub>3</sub> ]			
(94d,l)	54.7 (51)	1.6 (51)	-3.8 (51)	-11.8 (93)	<i>d,I</i> [Fe <sup>ll</sup> 3'OCH <sub>3</sub> ]			
(96m)	98.8 (94)	78.8 (70)	-31.4 (49)	-42.4 (49)	<i>m</i> [Fe <sup>III</sup> 3'OCH <sub>3</sub> ]Cl			
(96d,l)	91.5 (98)	55.7 (98)	-18.8 (98)	-3.4 (45)	<i>d,I</i> [Fe <sup>III</sup> 3'OCH <sub>3</sub> ]CI			
(97m)	77.0 (73)	45.3 (117)	-21.2 (144)	-39.9 (144)	<i>m</i> [Fe <sup>ll</sup> 4'OCH <sub>3</sub> ]			
(97d,l)	99.7 (116)	72.8 (116)	-7.1 (51)	-25.1 (165)	<i>d,I</i> [Fe <sup>ll</sup> 4'OCH <sub>3</sub> ]			
(104m)	97.9 (96)	47.6 (74)	-28.6 (74)	-46.2 (74)	<i>m</i> [Fe <sup>III</sup> 4'OCH <sub>3</sub> ]Cl			
(104d,l)	99.8 (168)	93.4 (115)	-12.4 (49)	-39.3 (49)	<i>d,I</i> [Fe <sup>III</sup> 4'OCH <sub>3</sub> ]CI			

Tabelle 4.14:Minimale T/Ccorr<sup>-</sup> bzw. τ-Werte (Zeit) an der MDA-MB-231-Zelllinie:<br/>Eisen(diarylsalen)-Komplexe mit Methoxysubstitution der "Brücken"-<br/>Aromaten



Abbildung 4.18: Antiproliferative Effekte der Eisen(diarylsalen)-Komplexe mit Methoxysubstitution der "Brücken"-Aromaten an MDA-MB-231-Zellen

# 4.2.2.3 Eisen(diarylsalen)-Komplexe mit Fluorsubstitution der "Brücken"-Aromaten

Die zytotoxische Wirksamkeit der fluorsubstituierten Komplexe entsprach an der MDA-MB-231-Zelllinie in etwa der der methoxysubstituierten Verbindungen. In einer Konzentration von 1  $\mu$ M besaßen alle untersuchten Komplexe stark zytozide Wirkungen. Auffallend ist auch in dieser Reihe die starke zytotoxische Wirksamkeit des *meso*-konfigurierten in 2'-Position substituierten Komplexes *m*[Fe<sup>III</sup>2'F]Cl (114m), der ähnlich wie der *m*[Fe<sup>III</sup>2'OCH<sub>3</sub>]Cl-Komplex (93m) und der *d*,*l*[Fe<sup>III</sup>DPS]Cl-Komplex (90d,I) bereits in einer Konzentration von 0.1  $\mu$ M deutlich zytozide Eigenschaften aufwies (vgl. Tabelle 4.15 und Abbildung 4.19).

	T/C <sub>corr</sub> (%) bzw. τ (%)						
Nr.	0.05 µM (h)	0.1 µM (h)	0.5 µM (h)	1 µM (h)	Abkürzung		
(114m)	23.9 (73)	-6.5 (73)	-32.9 (173)	-47.6 (173)	<i>m</i> [Fe <sup>III</sup> 2'F]Cl		
(116m)	84.9 (69)	60.6 (69)	4.8 (122)	-20.4 (54)	<i>m</i> [Fe <sup>III</sup> 3'F]Cl		
(117m)	88.8 (59)	31.0 (73)	-21.0 (73)	-20.5 (73)	<i>m</i> [Fe <sup>ll</sup> 4'F]		
(117d,l)	93.3 (58)	82.1 (58)	-20.3 (73)	-25.1 (73)	<i>d,I</i> [Fe <sup>ll</sup> 4'F]		
(122m)	81.6 (47)	9.0 (47)	-24.2 (74)	-19.8 (74)	<i>m</i> [Fe <sup>III</sup> 4'F]Cl		
(122d,l)	96.7 (58)	82.6 (96)	-13.9 (173)	-28.9 (73)	<i>d,I</i> [Fe <sup>III</sup> 4'F]Cl		

Tabelle 4.15:Minimale T/Ccorr- bzw. τ-Werte (Zeit) an der MDA-MB-231-Zelllinie:Eisen(diarylsalen)-Komplexe mit Fluorsubstitution der "Brücken"-<br/>Aromaten



Abbildung 4.19: Antiproliferative Effekte der Eisen(diarylsalen)-Komplexe mit Fluorsubstitution der "Brücken"-Aromaten an MDA-MB-231-Zellen

Eine weitere Wirkungssteigerung ließ sich wiederum durch die Einführung von zwei Fluorsubstituenten in die "Brücken"-Aromaten erreichen. Die getesteten Komplexe besaßen mit Ausnahme des m[Fe<sup>III</sup>3',4'F]CI-Komplexes **(129m)** bereits in einer Konzentration von 0.1 µM stark zytotoxische Wirkungen (siehe Tabelle 4.16 und Abbildung 4.20).

Besonders auffallend ist die starke Wirksamkeit des d,l[Fe<sup>III</sup>2',6'F]CI-Komplexes (128d,I), dessen zytozide Wirkung mit einem minimalen  $\tau$ -Wert von -23.7 % bereits in einer Konzentration von 0.05  $\mu$ M zu beobachten war.

	T/C <sub>corr</sub> (%) bzw. τ (%)							
Nr.	0.01 µM (h)	0.05 µM (h)	0.1 µM (h)	0.5 µM (h)	1 µM (h)	Abkürzung		
(122m)	-	81.6 (47)	9.0 (47)	-24.2 (74)	-19.8 (74)	<i>m</i> [Fe <sup>III</sup> 4'F]Cl		
(126m)	-	45.3 (49)	7.4 (72)	-3.7 (72)	-14.7 (115)	<i>m</i> [Fe <sup>III</sup> 2',4'F]Cl		
(127d,l)	-	97.1 (49)	-17.0 (49)	-28.6 (91)	-21.9 (91)	<i>d,I</i> [Fe <sup>III</sup> 2',5'F]CI		
(128d,l)	99.0 (49)	-23.4 (71)	-31.2 (102)	-	-	<i>d,I</i> [Fe <sup>III</sup> 2',6'F]CI		
(129m)	-	75.2 (92)	45.2 (92)	12.3 (92)	-8.4 (72)	<i>m</i> [Fe <sup>III</sup> 3',4'F]Cl		

 Tabelle 4.16:
 Minimale T/C<sub>corr</sub>- bzw. τ-Werte (Zeit) an der MDA-MB-231-Zelllinie:

Eisen(diarylsalen)-Komplexe mit Difluorsubstitution der "Brücken"-Aromaten



Abbildung 4.20: Antiproliferative Effekte der Eisen(diarylsalen)-Komplexe mit Difluorsubstitution der "Brücken"-Aromaten an MDA-MB-231-Zellen

## 4.2.2.4 Eisen(diarylsalen)-Komplexe mit Methoxysubstitution der "Basis"-Aromaten

Die zytotoxische Wirksamkeit der Eisen(III)-Komplexe, deren "Basis"-Aromaten Methoxysubstituenten tragen, entsprach in etwa der Wirkung der in den "Basis"-Aromaten unsubstituierten Verbindungen (siehe Tabelle 4.17 und Abbildung 4.21). Insbesondere die Wirkung der 4'-methoxysubstituierten Komplexe (**108m**), (**109m**) und (**110m**) ist mit der Ausgangsverbindung m[Fe<sup>III</sup>4'OCH<sub>3</sub>]Cl (**104m**) vergleichbar. Bei den 4'-fluorsubstituierten Verbindungen (**123m**), (**124m**) und (**125m**) wurde die zytotoxische Wirkung der Komplexe durch die Einführung der Methoxysubstituenten eher abgeschwächt. Während der m[Fe<sup>III</sup>4'F]CI-Komplex (**122m**) bereits in einer Konzentration von 0.1 µM eine zytostatische Wirkung aufwies, zeigten die in den "Basis"-Aromaten methoxysubstituierten Komplexe in dieser Konzentration lediglich antiproliferative Effekte.

	T/C <sub>corr</sub> (%) bzw. τ (%)							
Nr.	0.05 μM	0.1 µM (h)	0.5 µM (h)	1 µM (h)	Abkürzung			
(108m)	86.7 (73)	56.4 (97)	-19.4 (47)	-32.5 (47)	<i>m</i> [Fe <sup>III</sup> (3OCH <sub>3</sub> ) 4'OCH <sub>3</sub> ]Cl			
(109m)	96.6 (122)	72.5 (96)	-27.9 (173)	-28.6 (73)	<i>m</i> [Fe <sup>III</sup> (4OCH <sub>3</sub> ) 4'OCH <sub>3</sub> ]Cl			
(110m)	98.4 (98)	100.4 (170)	7.6 (98)	-23.4 (98)	<i>m</i> [Fe <sup>III</sup> (50CH <sub>3</sub> ) 4'0CH <sub>3</sub> ]Cl			
(123m)	97.4 (71)	90.2 (71)	61.3 (71)	33.9 (49)	<i>m</i> [Fe <sup>III</sup> (3OCH <sub>3</sub> ) 4'F]Cl			
(124m)	82.4 (71)	44.2 (71)	-25.1 (71)	-32.9 (102)	<i>m</i> [Fe <sup>III</sup> (4OCH <sub>3</sub> ) 4'F]Cl			
(125m)	80.4 (49)	78.0 (49)	74.4 (102)	43.5 (102)	<i>m</i> [Fe <sup>III</sup> (5OCH <sub>3</sub> ) 4'F]Cl			

Tabelle 4.17:Minimale T/Ccorr- bzw. τ-Werte (Zeit) an der MDA-MB-231-Zelllinie:Eisen(diarylsalen)-Komplexe mit Methoxysubstitution der "Basis"-<br/>Aromaten



Abbildung 4.21: Antiproliferative Wirkung der Eisen(diarylsalen)-Komplexe mit Methoxysubstitution der "Basis"-Aromaten an MDA-MB-231-Zellen

Der 4'-hydroxysubstituierte Komplex m[Fe<sup>III</sup>4'OH]Cl (**132m**) und der 3',4'-dichlorsubstituierte Komplex m[Fe<sup>III</sup>3',4'Cl]Cl (**139m**) besaßen auch an der MDA-MB-231-Zelllinie eine wesentlich geringere Wirksamkeit als der in den "Brücken"-Aromaten unsubstituierte Diphenylsalen-Komplex m[Fe<sup>III</sup>DPS]Cl (**90m**) bzw. der 4'-methoxysubstituierte Komplex m[Fe<sup>III</sup>4'OCH<sub>3</sub>]Cl (**104m**) (vgl. Tabelle 4.18 und Abbildung 4.22). Beide Komplexe waren in den Testkonzentrationen lediglich antiproliferativ wirksam. Der m[Fe<sup>III</sup>CH<sub>3</sub> 4'OCH<sub>3</sub>]Cl-Komplex (**145m**), dessen Diarylsalengrundstruktur durch den Austausch des Iminprotons durch eine Methylgruppe variiert wurde, zeigte an der MDA-MB-231-Zelllinie in den gewählten Testkonzentrationen eine größer antiproli-

ferative Aktivität als der hydroxy- **(131m)** bzw. der chlorsubstituierte **(139m)** Komplex. Er besaß jedoch in der Konzentration von 1 µM lediglich zytostatische Aktivität.

	T/C <sub>corr</sub> (%) bzw. τ (%)						
Nr.	0.1 µM (h)	0.5 µM (h)	1 µM (h)	Abkürzung			
(90m)	64.5 (53)	-10.8 (94)	-14.7 (122)	<i>m</i> [Fe <sup>III</sup> DPS]CI			
(104m)	47.6 (74)	-28.6 (74)	-46.2 (74)	<i>m</i> [Fe <sup>III</sup> 4'OCH <sub>3</sub> ]CI			
(131m)	91.0 (47)	76.5 (47)	70.8 (47)	<i>m</i> [Fe <sup>III</sup> 4'OH]Cl			
(139m)	90.1 (68)	81.9 (91)	89.8 (49)	<i>m</i> [Fe <sup>III</sup> 3',4'CI]CI			
(145m)	63.7 (49)	36.0 (49)	23.0 (49)	<i>m</i> [Fe <sup>III</sup> CH <sub>3</sub> 4'OCH <sub>3</sub> ]Cl			

 Tabelle 4.18:
 Minimale T/C<sub>corr</sub> bzw. τ-Werte (Zeit) an der MDA-MB-231-Zelllinie:

 Eisen(diarylsalen)-Komplexe mit unterschiedlichen Strukturmodifikationen



Abbildung 4.22: Antiproliferative Wirkung der Eisen(diarylsalen)-Komplexe mit verschiedenen Strukturmodifikationen an MDA-MB-231-Zellen

## 4.2.3 Zeitabhängige Zytotoxizitätstestung an der HeLa-Zelllinie

An der HeLa-Zervixkarzinomzelllinie wurde ebenfalls nur eine Auswahl der synthetisierten Eisen(diarylsalen)-Komplexe auf ihre zytotoxischen Eigenschaften getestet. Die zytotoxische Wirkung der Eisenkomplexe entsprach allgemein in etwa der Wirksamkeit an der MCF7-Zelllinie, so dass an dieser Zelllinie die Komplexe ebenfalls in Konzentrationen von 1, 5 und 10  $\mu$ M getestet wurden.

Der Eisen(salen)-Komplex [Fe<sup>III</sup>salen]Cl **(85)** wies auch in der höchsten Testkonzentration von 10  $\mu$ M lediglich schwach antiproliferative Eigenschaften auf (siehe Tabelle 4.19 und Abbildung 4.23). Die Einführung einer 1,2-Diarylethan-Partialstruktur in die Komplexe bewirkte auch an der HeLa-Zelllinie eine deutliche Steigerung der zytotoxischen Wirkung. Der *meso*-konfigurierte *m*[Fe<sup>III</sup>DPS]CI-Komplex **(90m)** besaß bereits in einer Konzentration von 1  $\mu$ M zytostatische Aktivität und zeigte in den beiden höheren Testkonzentrationen von 5 und 10  $\mu$ M stark zytozide Effekte.

	T/C <sub>corr</sub> (%) bzw. τ (%)							
Nr.	1 µM (h)	5 µM (h)	10 µM (h)	Abkürzung				
CisPt	33.5 (91)	12.4 (114)	-	Cisplatin				
(85)	72.6 (68)	50.9 (46)	58.9 (46)	[Fe <sup>III</sup> salen]Cl				
(90m)	15.4 (48)	-28.6 (120)	-26.0 (120)	<i>m</i> [Fe <sup>III</sup> DPS]CI				
(93m)	61.7 (46)	11.1 (68)	12.9 (46)	<i>m</i> [Fe <sup>III</sup> 2'OCH <sub>3</sub> ]Cl				
(93d,l)	57.0 (51)	-25.7 (114)	-31.0 (114)	<i>d,I</i> [Fe <sup>III</sup> 2'OCH <sub>3</sub> ]CI				
(96m)	78.7 (68)	14.6 (68)	8.7 (46)	<i>m</i> [Fe <sup>III</sup> 3'OCH <sub>3</sub> ]Cl				
(96d,l)	74.3 (51)	-43.2 (114)	-43.9 (72)	<i>d,I</i> [Fe <sup>III</sup> 3'OCH <sub>3</sub> ]CI				
(97m)	76.1 (97)	61.2 (97)	47.4 (97)	<i>m</i> [Fe <sup>II</sup> 4'OCH <sub>3</sub> ]				
(97d,l)	94.1 (97)	10.6 (97)	1.5 (146)	<i>d,I</i> [Fe <sup>ll</sup> 4'OCH <sub>3</sub> ]				
(104m)	64.6 (48)	33.9 (120)	3.7 (120)	<i>m</i> [Fe <sup>III</sup> 4'OCH <sub>3</sub> ]Cl				
(104d,l)	85.3 (95)	37.0 (95)	-16.5 (119)	<i>d,I</i> [Fe <sup>Ⅲ</sup> 4'OCH₃]Cl				

 Tabelle 4.19:
 Minimale T/C<sub>corr</sub> bzw. τ-Werte (Zeit) an der HeLa-Zelllinie: Cisplatin,

 Eisen(salen)- und Eisen(diarylsalen)-Komplexe

Vergleichbar mit der MCF7-Zelllinie kam es durch die Einführung einer Methoxygruppe in die "Brücken"-Aromaten zu einer Wirkungsabschwächung. Die methoxysubstituierten Komplexe m[Fe<sup>III</sup>2'OCH<sub>3</sub>]Cl (93m), m[Fe<sup>III</sup>3'OCH<sub>3</sub>]Cl (96m) und m[Fe<sup>III</sup>4'OCH<sub>3</sub>]Cl (104m) zeigten im Gegensatz zu dem unsubstituierten Komplex (90m) in den drei verwendeten Testkonzentrationen lediglich zytostatische Eigenschaften.

Eine erhöhte Wirksamkeit konnte dagegen durch die Änderung der Konfiguration der 1,2-Diarylethan-Partialstruktur erreicht werden. *D,I*-konfigurierte Eisenkomplexe besaßen an der HeLa-Zelllinie wesentlich höhere zytotoxische Aktivität als ihre *meso*-konfigurierten Diastereomere. Die *d,I*-konfigurierten Komplexe *d,I*[Fe<sup>III</sup>2'OCH<sub>3</sub>]CI (93d,I), *d,I*[Fe<sup>III</sup>3'OCH<sub>3</sub>]CI (96d,I) und *d,I*[Fe<sup>III</sup>4'OCH<sub>3</sub>]CI (104d,I) wiesen in einer Konzentration von 10  $\mu$ M stark zytozide Effekte auf, die beiden Komplexe (93d,I) und (96d,I) sogar schon in einer Testkonzentration von 5  $\mu$ M.

Ebenfalls vergleichbar mit den Zytotoxizitätstestungen an der MCF7-Zelllinie waren Eisen(II)-Komplexe geringer wirksam als ihre Eisen(III)-Analoga. Beispielsweise wies der *d,I*-konfigurierte Eisen(II)-Komplex *d,I*[Fe<sup>II</sup>4'OCH<sub>3</sub>]Cl (97d,I) in einer Konzentration von 10  $\mu$ M lediglich zytostatische Effekte auf, während der analoge Eisen(III)-Komplex *d,I*[Fe<sup>III</sup>4'OCH<sub>3</sub>]Cl (104d,I) in gleicher Konzentration deutlich zytozide Aktivitäten zeigte.



Abbildung 4.23: Antiproliferative Wirkung von Cisplatin, Eisen(salen)- und Eisen(diarylsalen)-Komplexe an HeLa-Zellen

Die durch Einführung von Methoxysubstituenten in die "Basis"-Aromaten der Eisen(diarylsalen)-Komplexe entstandenen Komplexverbindungen m[Fe<sup>III</sup>(3OCH<sub>3</sub>) 4'OCH<sub>3</sub>]Cl (108m) und m[Fe<sup>III</sup>(3OCH<sub>3</sub>) 4'OCH<sub>3</sub>]Cl (110m) waren an der HeLa-Zelllinie ebenfalls schwächer wirksam als die in den "Basis"-Aromaten unsubstituierte Ausgangsverbindung m[Fe<sup>III</sup>4'OCH<sub>3</sub>]Cl (104m) (siehe Tabelle 4.20 und Abbildung 4.24). Beide Eisenkomplexe wiesen auch in der höchsten Testkonzentration lediglich (schwach) antiproliferative Wirkungen auf. Der Eisenkomplex m[Fe<sup>III</sup>(4OCH<sub>3</sub>) 4'OCH<sub>3</sub>]Cl (109m) zeigte dagegen eher eine mit der Ausgangsverbindung (104m) vergleichbaren Wirkstärke.

T/C <sub>corr</sub> (%) bzw. τ (%)					
Nr.	1 µM (h)	5 µM (h)	10 µM (h)	Abkürzung	
(104m)	64.6 (48)	33.9 (120)	3.7 (120)	<i>m</i> [Fe <sup>III</sup> 4'OCH <sub>3</sub> ]Cl	
(108m)	82.9 (97)	83.8 (82)	80.9 (82)	<i>m</i> [Fe <sup>III</sup> (3OCH <sub>3</sub> ) 4'OCH <sub>3</sub> ]Cl	
(109m)	83.1 (51)	36.5 (72)	28.6 (72)	<i>m</i> [Fe <sup>III</sup> (4OCH <sub>3</sub> ) 4'OCH <sub>3</sub> ]Cl	
(110m)	73.6 (97)	68.5 (48)	55.7 (48)	<i>m</i> [Fe <sup>III</sup> (5OCH <sub>3</sub> ) 4'OCH <sub>3</sub> ]Cl	

 
 Tabelle 4.20:
 Minimale T/C<sub>corr</sub> bzw. τ-Werte (Zeit) an der HeLa-Zelllinie: Eisen-(diarylsalen)-Komplexe mit Methoxysubstitutionen der "Basis"-Aromaten



Abbildung 4.24: Antiproliferative Wirkung der Eisen(diarylsalen)-Komplexe mit Methoxysubstitutionen der "Basis"-Aromaten an HeLa-Zellen

Auch an der HeLa-Zelllinie konnte für die fluorsubstituierten Eisen(diarylsalen)-Komplexe eine größere Wirksamkeit als für ihre methoxysubstituierten Analoga gefunden werden. Der fluorsubstituierte *d*,/[Fe<sup>III</sup>4'F]CI-Komplex (**122d**,**I**) besaß z.B. in einer Konzentration von 5  $\mu$ M mit einem minimalen  $\tau$ -Wert von -29.5 % eine stark zytozide Wirkung, während der analoge 4'-methoxysubstituierte Eisen(diarylsalen)-Komplex *d*,/[Fe<sup>III</sup>4'OCH<sub>3</sub>]CI (**104d**,**I**) in dieser Testkonzentration lediglich zytostatische Eigenschaften aufwies (siehe Tabelle 4.21 und Abbildung 4.25). Wie an der MCF7-Zelllinie war auch an der HeLa-Zelllinie die Position der Substituenten für die Wirkung der fluorsubstituierten Eisenkomplexe von entscheidender Bedeutung. Im Gegensatz zu den methoxysubstituierten Verbindungen, bei denen sich der Einfluss der Position des Methoxysubstituenten weniger deutlich auswirkte, wurde bei den fluorsubstituierten Verbindungen durch "Verschieben" des Substituenten von der 4'- über die 3'-Position in die 2'-Position wesentlich wirksamere Komplexe erhalten. Der 2'-Fluorkomplex m[Fe<sup>III</sup>2'F]Cl (**114m**) wies z.B. bereits in einer Konzentration von 1 µM mit einem minimalen  $\tau$ -Wert von -45.2 % stark zytozide Wirkungen auf. Der 4'fluorsubstituierte Komplex m[Fe<sup>III</sup>4'F]Cl (**122m**) besaß dagegen mit einem minimalen T/C<sub>corr</sub>-Wert von rund 68 % in dieser Konzentration lediglich schwach antiproliferative Eigenschaften.

T/C <sub>corr</sub> (%) bzw. τ (%)						
Nr.	1 µM (h)	5 µM (h)	10 µM (h)	Abkürzung		
(114m)	-45.2 (97)	-42.9 (120)	-35.3 (120)	<i>m</i> [Fe <sup>III</sup> 2'F]Cl		
(116m)	44.6 (72)	1.0 (51)	-12.0 (51)	<i>m</i> [Fe <sup>III</sup> 3'F]Cl		
(117m)	90.6 (68)	59.5 (68)	12.7 (68)	<i>m</i> [Fe <sup>ll</sup> 4'F]		
(117d,l)	88.3 (82)	-27.3 (97)	-39.3 (97)	<i>d,I</i> [Fe <sup>ll</sup> 4'F]		
(122m)	67.9 (72)	18.5 (51)	-4.4 (51)	<i>m</i> [Fe <sup>III</sup> 4'F]Cl		
(122d,l)	71.8 (97)	-29.5 (97)	-56.4 (97)	<i>d,I</i> [Fe <sup>III</sup> 4'F]Cl		
(126m)	47.6 (72)	7.9 (51)	15.2 (72)	<i>m</i> [Fe <sup>III</sup> 2',4'F]CI		

Tabelle 4.21:Minimale T/Ccorr<sup>-</sup> bzw. τ-Werte (Zeit) an der HeLa-Zelllinie: Eisen-<br/>(diarylsalen)-Komplexe mit Fluorsubstitution der "Brücken"-Aromaten

Ebenfalls vergleichbar mit der zytotoxischen Wirkung der Eisen(diarylsalen)-Komplexe an der MCF7-Zelllinie zeigten Eisen(III)-Komplexe eine größere Wirksamkeit als ihre Eisen(II)-Analoga. Der Eisen(II)-Komplex m[Fe<sup>II</sup>4'F] **(117m)** wirkte beispielsweise in einer Testkonzentration von 10 µM lediglich zytostatisch, während der analoge Eisen(III)-Komplex m[Fe<sup>III</sup>4'F]Cl **(122m)** in dieser Konzentration zytozide Wirkungen aufzeigte (siehe Tabelle 4.21 und Abbildung 4.25). In der fluorsubstituierten Reihe zeigte sich ebenso die größere Wirksamkeit der *d,l*-konfigurierte Komplexe im Vergleich zu ihren *meso*-konfigurierten Stereoisomeren. Interessanterweise besaß die difluorierte Verbindung *m*[Fe<sup>III</sup>2',4'F]Cl **(126m)** an der HeLa-Zelllinie eine wesentlich schwächere Wirkung als an der MCF7-Zelllinie. In den drei Testkonzentrationen von 1, 5 und 10  $\mu$ M konnten an der HeLa-Zelllinie lediglich antiproliferative bis zytostatische Effekte beobachtet werden, während an der MCF7-Zelllinie bereits in einer Konzentration von 0.5  $\mu$ M zytostatische und in einer Konzentration von 1  $\mu$ M zytozide Wirkungen erhalten wurden.



Abbildung 4.25: Antiproliferative Wirkung der Eisen(diarylsalen)-Komplexe mit Fluorsubstitution der "Brücken"-Aromaten an HeLa-Zellen

Die phenylendiaminüberbrückte Verbindung [Fe<sup>III</sup>salophen]Cl (141) besaß an der HeLa-Zelllinie ebenfalls eine etwas schwächere Wirksamkeit als an der MCF7-Zelllinie. Während eine Testkonzentration von  $0.5 \,\mu$ M an der MCF7-Zelllinie mit einem minimalen  $\tau$ -Wert von -23 % stark zytozide Eigenschaften aufzeigte, war der Eisen(III)-Komplex an der HeLa-Zelllinie in gleicher Konzentration lediglich antiproliferativ wirksam. Die zytoziden Wirkungen wurde erst ab einer Testkonzentration von 1  $\mu$ M erkennbar (siehe Tabelle 4.22).

_	T/C <sub>corr</sub> (%) bzw. τ (%)						
	Nr.	0.1 µM (h)	0.5 µM (h)	1 µM (h)	Abkürzung		
	(141)	36.2 (51)	52.1 (51)	-26.0 (77)	[Fe <sup>III</sup> salophen]Cl		
Гab	elle 4.22:	Minimale [Fe <sup>III</sup> salop	T/C <sub>corr</sub> - bzw. hen]Cl <b>(141)</b>	τ-Werte (Zeit)	an der HeLa-Zelllinie:		

### 4.2.4 Zeitabhängige Zytotoxizitätstestung an der LNCaP/FGC-Zelllinie

Als Modellzelllinie für das Prostatakarzinom wurde die LNCaP/FGC-Zelllinie ausgewählt. Die Zellen dieser Zelllinie wachsen zwar als Monolayerkultur, sie bilden jedoch so genannte Cluster, die einerseits das Anfärben mit Kristallviolett erschweren und sich andererseits leicht vom Boden der Kulturgefäße ablösen. Aus diesem Grund weisen die Zytotoxizitätstests relativ hohe Standardabweichungen auf und das Färben der LNCaP-Tests ist wesentlich aufwendiger als bei den anderen Zelllinien.

Für adhärente Zelllinien sind die Oberflächeneigenschaften der Kulturgefäße von besonderer Bedeutung. Bei einem physiologischen pH-Wert von 7.2 tragen die Zellen an ihrer Oberfläche hauptsächlich negative Ladungen, die unregelmäßig über die ganze Zelle verteilt sind und durch den physiologischen Zustand der Zelle beeinflusst werden können. Um die Haftung der Zellen zu erhöhen, wird in der Literatur daher häufig eine Optimierung der Oberflächeneigenschaften durch Beschichtung der Kulturgefäße beschrieben. Zur Beschichtung können künstliche Substanzen (z.B. Polylysine mit einem Molekulargewicht von mehr als 70 000 oder Polyornithine mit einem Molekulargewicht zwischen 60 000 und 90 000) und auch natürliche Verbindungen (z.B. Fibronectin, Collagen, Gelatine oder FCS) eingesetzt werden. Für LNCaP-Zell-kulturen kommen häufig Beschichtungen mit Polyornithin und/oder Poly-D-Lysin zum Einsatz.<sup>[88, 90, 91]</sup>

Die Beschichtung mit Poly-D-Lysin erwies sich auch aufgrund des höheren Haftungsvermögens der Zellen sowohl für die Zellkulturen als auch für die Zytotoxizitätstestung als vorteilhaft. Das bessere Haftungsvermögen der Zellen am Boden des Kulturgefäßes ließ sich auch mikroskopisch erkennen. Wie aus Abbildung 4.26 ersichtlich, wuchsen die Zellkulturen wesentlich dichter. Allerdings veränderte die Beschichtung und die damit verbundene bessere Haftung das Wachstumsverhalten der Zellen deutlich. Die Generationszeit, deren Bestimmung in Kapitel 4.1.1 beschrieben wurde, betrug bei beschichteten Zellkulturgefäßen lediglich 23.38 h  $\pm$  1.3 h. Die Verdopplungszeit der Zellen hatte sich damit mehr als halbiert, so dass die Testparameter (Testdauer und Abstoppzeitpunkte) an das schnellere Zellwachstum angepasst werden mussten (siehe Kapitel 11.3.1.6.1).

Da die Beschichtung der einzelnen 96-Lochplatten sehr aufwendig ist, wurde nur eine geringe Auswahl der synthetisierten Verbindungen getestet.



Abbildung 4.26: Konfluente LNCaP/FGC-Zellen bei 5-facher Vergrößerung <u>links:</u> unbeschichtete Kultur <u>rechts:</u> mit Poly-D-Lysin beschichtete Kultur

In dem LNCaP-Testsystem zeigten die synthetisierten Eisenverbindungen eine wesentlich größere Wirksamkeit als an MCF7-Zellen. Die Wirkstärke der Komplexe ist eher mit der Wirkung an der MDA-MB-231-Zelllinie vergleichbar. Je nach Ligandenstruktur zeigten die Komplexverbindungen bereits in einer Konzentration von 1  $\mu$ M zytozide Wirkungen.

Die Eisen(salen)-Ausgangsverbindung [Fe<sup>III</sup>salen]Cl **(85)** besaß in der höchsten Testkonzentration von 1  $\mu$ M lediglich sehr schwach antiproliferative Eigenschaften (siehe Tabelle 4.23 und Abbildung 4.27).

Mit der Einführung der 1,2-Diarylethan-Partialstruktur war auch an der LNCaP-Zelllinie eine Steigerung der Wirksamkeit verbunden. Die in den "Brücken"-Aromaten unsubstituierte Verbindung *m*[Fe<sup>III</sup>DPS]CI **(90m)** zeigte bei einer Testkonzentration von 1  $\mu$ M mit einem minimalen  $\tau$ -Wert von -19.3 % stark zytozide Effekte. Durch die Einführung einer Methoxygruppe in die 4'-Position der "Brücken"-Aromaten kam es auch bei dieser Zelllinie zu einer Abschwächung der Wirksamkeit. Der  $m[Fe^{III}4'OCH_3]CI$ -Komplex (**104m**) besaß in einer Konzentration von 1 µM lediglich zytostatische Eigenschaften. Durch "Verschieben" der Methoxysubstituenten von der 4'- in die 3'- bzw. in die 2'-Position stieg die Wirksamkeit der Komplexe, so dass die Wirkstärke des unsubstituierten Eisen(III)(diphenylsalen)-Komplexes (**90m**) fast wieder erreicht wurde. Dabei besaßen die beiden Komplexe  $m[Fe^{III}3'OCH_3]CI$  (**96m**) und  $m[Fe^{III}2'OCH_3]CI$  (**93m**) eine annähernd vergleichbare Wirkstärke.

Auch an dieser Zelllinie waren Eisen(III)-Komplexe häufig wesentlich wirksamer als ihre Eisen(II)-Analoga (siehe Tabelle 4.23 und Tabelle 4.24).

T/C <sub>corr</sub> (%) bzw. τ (%)						
Nr.	0.1 µM	0.5 µM (h)	1 µM (h)	Abkürzung		
(85)	97.3 (140)	88.3 (140)	77.8 (160)	[Fe <sup>III</sup> salen]Cl		
(90m)	79.6 (117)	25.7 (117)	-19.3 (117)	<i>m</i> [Fe <sup>III</sup> DPS]CI		
(93m)	96.1 (123)	46.0 (123)	-7.8 (71)	<i>m</i> [Fe <sup>III</sup> 2'OCH <sub>3</sub> ]Cl		
(96m)	89.9 (71)	53.5 (223)	-19.1 (123)	<i>m</i> [Fe <sup>III</sup> 3'OCH <sub>3</sub> ]Cl		
(97m)	71.6 (102)	57.1 (102)	51.3 (117)	<i>m</i> [Fe <sup>ll</sup> 4'OCH <sub>3</sub> ]		
(104m)	63.0 (69)	36.5 (95)	8.1 (95)	<i>m</i> [Fe <sup>III</sup> 4'OCH <sub>3</sub> ]Cl		
(140)	47.3 (69)	8.9 (95)	-25.6 (160)	[Fe <sup>ll</sup> salophen]		
(141)	34.4 (71)	3.6 (90)	-19.5 (90)	[Fe <sup>llI</sup> salophen]Cl		

Tabelle 4.23:Minimale T/Ccorr- bzw. τ-Werte (Zeit) an der LNCaP/FGC-Zelllinie:<br/>Eisen(diarylsalen)-Komplexen mit unterschiedlichen Strukturmodifika-<br/>tionen

Sehr starke zytotoxische Effekte konnten auch an dieser Zelllinie bei den phenylendiaminüberbrückten Salenkomplexen [Fe<sup>II</sup>salophen] (140) und [Fe<sup>III</sup>salophen]Cl (141) beobachtet werden. Beide Komplexe wirkten bereits ab einer Konzentration von 0.5  $\mu$ M deutlich zytostatisch.

Vergleichbar mit den anderen Zelllinien zeigten die fluorsubstituierten Diarylsalen-Komplexe an der LNCaP-Zelllinie ebenfalls eine größere Wirksamkeit als die analogen methoxysubstituierten Verbindungen. Dabei war wiederum eine Wirkungssteigerung bei "Verschieben" der Fluorsubstituenten von der 4'- in die 3'- bzw. 2'-Position erkennbar. Wie in der methoxysubstituierten Reihe zeigten die beiden Komplexe m[Fe<sup>III</sup>3'F]Cl (116m) und m[Fe<sup>III</sup>2'F]Cl (114m) dabei eine ähnliche Wirkstärke (vgl. Tabelle 4.24 und Abbildung 4.28).



Abbildung 4.27: Antiproliferative Wirkungen der Eisen(diarylsalen)-Komplexe mit unterschiedlichen Strukturmodifikationen an LNCaP/FGC-Zellen

Die größten zytotoxischen Effekte zeigte an der LNCaP/FGC-Zelllinie der difluorierte Komplex *m*[Fe<sup>III</sup>2',4'F]Cl (**126m**). Er war bereits in einer Konzentration von 0.5  $\mu$ M mit einem minimalen  $\tau$ -Wert von -12.7 % stark zytozide wirksam. Seine zytotoxische Aktivität an der Prostatakarzinomzelllinie übertraf die der phenylendiaminüberbrückten Komplexe (**140**) und (**141**) und der Diarylsalen-Komplexe sehr deutlich.

T/C <sub>corr</sub> (%) bzw. τ (%)				
Nr.	0.1 µM (h)	0.5 µM (h)	1 µM (h)	Abkürzung
(114m)	81.5 (75)	4.8 (90)	-49.2 (90)	<i>m</i> [Fe <sup>III</sup> 2'F]CI
(116m)	68.1 (75)	6.3 (90)	-30.9 (75)	<i>m</i> [Fe <sup>III</sup> 3'F]Cl
(117m)	102.9 (117)	51.4 (117)	31.2 (102)	<i>m</i> [Fe <sup>ll</sup> 4'F]
(122m)	85.4 (223)	31.1 (123)	-6.3 (71)	<i>m</i> [Fe <sup>III</sup> 4'F]Cl
(126m)	68.0 (170)	-12.7 (75)	-44.1 (170)	<i>m</i> [Fe <sup>III</sup> 2',4'F]Cl

Tabelle 4.24:Minimale T/Ccorr- bzw. τ-Werte (Zeit) an der LNCaP/FGC-Zelllinie:<br/>Eisen(diarylsalen)-Komplexe mit Fluorsubstitution der "Brücken"-<br/>Aromaten



Abbildung 4.28: Antiproliferative Wirkung der Eisen(diarylsalen)-Komplexe mit Fluorsubstitution der "Brücken"-Aromaten an LNCaP/FGC-Zellen

Im Vergleich zu den etablierten Zytostatika Cisplatin und Carboplatin (vgl. Tabelle 4.25 und Abbildung 4.29) besaßen die Eisen(diarylsalen)-Komplexe in dem verwendeten Testsystem eine wesentlich höhere Wirksamkeit. Beide Platinkomplexe zeigten erst in einer Konzentration von 5  $\mu$ M deutlich zytostatische Aktivitäten. Sie sind damit ca. zehnfach schwächer wirksam als z.B. der *m*[Fe<sup>III</sup>DPS]CI-Komplex (90m), der eine vergleichbare zytostatische Aktivität bereits in einer Testkonzentration von 0.5  $\mu$ M aufwies.

Eine mit den Eisenkomplexen vergleichbare Wirkstärke besaß lediglich Oxaliplatin. Dieser Platinkomplex zeigte in einer Konzentration von  $0.5 \,\mu$ M zytostatische Wirkungen und in einer Konzentration von  $1 \,\mu$ M zytozide Wirkungen.

T/C <sub>corr</sub> (%) bzw. τ (%)			
Verbindung	0.5 µM (h)	1 µM (h)	5 µM (h)
Cisplatin	59.0 (98)	32.7 (124)	6.7 (124)
Carboplatin	69.5 (73)	55.5 (46)	19.6 (73)
Oxaliplatin	12.7 (124)	-0.6 (124)	-31.0 (98)
<i>m</i> -4FPtCl <sub>2</sub> <sup>1</sup>	65.0 (71)	53.0 (71)	5.0 (71)
d,I-4FPtCl2 <sup>2</sup>	18.5 (71)	3.3 (141)	-7.1 (90)

Tabelle 4.25:

Minimale T/C<sub>corr</sub>- bzw. τ-Werte (Zeit) an der LNCaP/FGC-Zelllinie: Platinkomplexen



Abbildung 4.29: Antiproliferative Effekte von Platinkomplexen an LNCaP/FGC-Zellen

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> [meso-1,2-Bis(4-fluorphenyl)ethylendiamin]dichloroplatin(II)

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup> [d,I-1,2-Bis(4-fluorphenyl)ethylendiamin]dichloroplatin(II)

Neben den etablierten Zytostatika wurden zwei Platinkomplexe mit fluorsubstituierten Diaminneutralliganden (m-4FPtCl<sub>2</sub> und d,l-4FPtCl<sub>2</sub>) als Vergleich mitgetestet. Sie erwiesen sich als wesentlich schwächer wirksam als die vergleichbaren fluorsubstituierten Eisen(III)-Komplexe. Der 4'-fluorsubstituierte Eisen(III)(diarylsalen)-Komplex (**122m**) zeigte z.B. in einer Konzentration von 1 µM deutlich zytozide Eigenschaften. Dagegen besaß der m-4FPtCl<sub>2</sub>-Komplex in dieser Konzentration lediglich antiproliferative Effekte.

## 4.2.5 Zusammenfassung der Ergebnisse der Zytotoxizitätstestungen an den vier verschiedenen Zelllinien

Insgesamt gesehen lässt sich feststellen, dass die synthetisierten Eisen(diarylsalen)-Komplexe an der MCF7- und an der HeLa-Zelllinie eine in etwa vergleichbare Wirkstärke zeigten. Die Verbindungen besaßen an den beiden Zelllinien häufig ab einer Konzentration von 5 µM zytostatische oder zytozide Wirkungen (je nach Ligandenstruktur und Ladung des Eisenzentralatoms).

An der MDA-MB-231-Zelllinie wiesen die Eisenkomplexe eine wesentlich stärkere Wirksamkeit als an der MCF7- bzw. HeLa-Zelllinie auf. Hier konnten zytozide Effekte häufig bereits ab eine Testkonzentration von 0.5 µM beobachtet werden.

Die zytotoxische Wirksamkeit der Komplexe an der LNCaP/FGC-Zelllinie ist am ehesten mit der Wirksamkeit an der MDA-MB-231-Zelllinie vergleichbar. Die Eisenkomplexe besaßen auch an der Prostatakarzinomzelllinie häufig bereits in einer Konzentration von 0.5 µM zytostatische bis z.T. zytozide Effekte.

Von der Zytotoxizitätstestung aller synthetisierten Eisen(diarylsalen)-Komplexe an der MCF7-Brustkrebszelllinie konnten Struktur-Wirkungs-Beziehungen abgeleitet werden, die bei der Testung der Verbindungen an den drei anderen Zelllinien wieder gefunden werden konnten. So konnte an allen vier Zelllinien eine Steigerung der Wirksamkeit durch den Ersatz der Ethanbrücke des Salens durch eine 1,2-Diarylethan-Partialstruktur gefunden werden. Ebenso zeigten Eisen(III)-Komplexe an allen vier Zelllinien eine größere Wirksamkeit als ihre Eisen(II)-Analoga. Weiterhin war neben der Abhängigkeit der zytotoxischen Wirkung von der Art der Substituenten der "Brücken"-Aromaten auch eine Abhängigkeit der Wirksamkeit von der Position der Substituenten in der Regel wirksamer als methoxysubstituierte Komplexe und Komplexe mit Substituenten in 4'-Position.

Weiterhin konnte eine Abhängigkeit der zytotoxischen Wirkung von der Konfiguration der 1,2-Diarylethan-"Brücke" gefunden werden. Dabei waren *d*,*l*-konfigurierte Komplexe häufig wirksamer als ihre diastereomeren *meso*-Analoga.

Insgesamt gesehen besaßen an allen vier Zelllinien die *d*,*l*-konfigurierten fluorsubstituierten Komplexe, die difluorierten Komplexe und die phenylendiaminüberbrückten Eisen(salen)-Verbindungen die größte zytotoxische Wirksamkeit.

## 4.3 Bestimmung von IC<sub>50</sub>-Werten

Der IC<sub>50</sub>-Wert (*inhibitory concentration*) entspricht derjenigen Wirkstoffkonzentration, bei der eine Hemmung des Zellwachstums im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollkulturen um 50 % hervorgerufen wird.<sup>[92]</sup> Im Gegensatz zu der zeitabhängigen Zytotoxizitätstestung fand bei der Bestimmung der IC<sub>50</sub>-Werte nur ein einziger Abstoppzeitpunkt Verwendung. Vorteil dieser Methode ist der geringere Zeitaufwand, der sich durch die kürzere Inkubationsdauer ergibt. Nachteilig ist natürlich, dass nur der zu diesem Zeitpunkt vorliegende T/C<sub>corr</sub>-Wert berücksichtigt wird, der, wie die zeitabhängigen Testungen zeigten, stark von der Inkubationsdauer abhängig sein kann.

Die Bestimmung der IC<sub>50</sub>-Werte wurde zum einen durchgeführt, um Aussagen darüber treffen zu können, ob die Komplexierung als Voraussetzung der zytotoxischen Wirkung der synthetisierten Verbindungen anzusehen ist und um gleichzeitig die Zytotoxizität der einzelnen "Komplexbausteine" (Liganden und Fe<sup>2+</sup> bzw. Fe<sup>3+</sup>) einschätzen zu können. Zum anderen war die Bestimmung der IC<sub>50</sub>-Werte insbesondere an der COS7-Zelllinie als Vorversuch zu den Apoptoseuntersuchungen nötig.

# 4.3.1 IC<sub>50</sub>-Werte der Eisen(diarylsalen)-Komplexe und der Synthesevorstufen

Zur Bestimmung des  $IC_{50}$ -Wertes wurden die Zellen mit 0.01 bis 100  $\mu$ M (je nach zu testender Verbindung und Empfindlichkeit der Zelllinie) substanzhaltigem Medium 72 Stunden (MDA-MB-231) bzw. 96 Stunden (MCF7) inkubiert. Die Zellen wurden analog zu Kapitel 4.1.1 mit Kristallviolett gefärbt, und die Zellbiomasse über eine photometrische Messung bestimmt.

Es wurde wiederum ein T/C<sub>corr</sub>-Wert im Verhältnis zum Kontrollwert berechnet. Dieser wurde gegen den Logarithmus der Substanzkonzentration in einem Diagramm aufgetragen, und eine sigmoide Kurve mit Hilfe der Boltzmann-Funktion (Origin 7.0) ermittelt. Die Substanzkonzentration, die einem T/C<sub>corr</sub>-Wert von 50 % entspricht, kann dabei aus der erhaltenen Grafik abgelesen werden.<sup>[31]</sup>

#### 4.3.1.1 IC<sub>50</sub>-Werte an der MCF7- und an der MDA-MB-231-Zelllinie

Abbildung 4.30 zeigt den sigmoiden Kurvenverlauf der Dosis-Wirkungs-Kurve und die  $IC_{50}$ -Wertbestimmung am Beispiel des *d*,*l*[Fe<sup>III</sup>4'F]CI-Komplexes (**122d**,**I**) an der MCF7-Zelllinie.



**Abbildung 4.30:** Dosis-Wirkungs-Kurve zur Bestimmung des IC<sub>50</sub>-Wertes am Beispiel von *d*,*l*[Fe<sup>III</sup>4'F]Cl (122d,I) an der MCF7-Zelllinie; (n = 16)

Die Eisensalze Fe(OAc)<sub>2</sub> und FeCl<sub>3</sub> sind in den getesteten Konzentrationen wirkungslos (siehe Tabelle 4.26). Die Liganden der Eisenkomplexe besaßen eine schwach zytotoxische Wirkung an den beiden Zelllinien, wobei die Wirksamkeit durch Komplexierung an ein Eisenzentralatom deutlich gesteigert werden konnte.

Besonders deutlich wird diese Aktivitätssteigerung an den  $IC_{50}$ -Werten der MDA-MB-231-Zelllinie. Während z.B. der 4'-methoxysubstituierte Diarylsalenligand **(11)** an MDA-MB-231-Zellen einen  $IC_{50}$ -Wert von 28.7 µM besaß, konnte für die beiden Eisenkomplexe *m*[Fe<sup>II</sup>4'OCH<sub>3</sub>] **(97m)** und *m*[Fe<sup>III</sup>4'OCH<sub>3</sub>]Cl **(104m)** ein  $IC_{50}$ -Wert von 0.1 µM ermittelt werden.

Verbindung	MCF7 (µM)	MDA-MB-231 (µM)
Fe(OAc) <sub>2</sub>	> 50	> 50
FeCl₃	> 100	> 100
meso-4'OCH <sub>3</sub> -Ligand (11)	26.0 (± 0.20)	28.7 (± 1.56)
<i>m</i> [Fe <sup>ll</sup> 4'OCH <sub>3</sub> ] <b>(97m)</b>	17.9 (± 2.85)	0.1 (± 0.04)
<i>m</i> [Fe <sup>III</sup> 4'OCH <sub>3</sub> ]Cl <b>(104m)</b>	9.25 (± 1.95)	0.1 (± 0.03)
d,I-4'OCH <sub>3</sub> -Ligand (66)	13.3 (± 0.65)	18.0 (± 0.28)
<i>d,I</i> [Fe <sup>ll</sup> 4'OCH <sub>3</sub> ] <b>(97d,I)</b>	5.5 (± 0.35)	0.3 (± 0.21)
<i>d,I</i> [Fe <sup>III</sup> 4'OCH <sub>3</sub> ]Cl <b>(104d,I)</b>	3.6 (± 0.01)	0.3 (± 0.11)
meso-4'F-Ligand (16)	11.3 (± 0.05)	21.6 (± 5.01)
<i>m</i> [Fe <sup>ll</sup> 4'F] <b>(117m)</b>	9.7 (± 0.28)	0.1 (± 0.02)
<i>m</i> [Fe <sup>III</sup> 4'F]Cl <b>(122m)</b>	8.1 (± 2.30)	0.1 (± 0.01)
<i>d,I-</i> 4'F-Ligand (69)	11.1 (± 1.20)	17.0 (± 2.12)
<i>d,I</i> [Fe <sup>ll</sup> 4'F] <b>(117d,I)</b>	5.6 (± 0.35)	0.1 (± 0.01)
<i>d,I</i> [Fe <sup>III</sup> 4'F]Cl <b>(122d,I)</b>	4.5 (± 0.20)	0.1 (± 0.01)

Tabelle 4.26:Ermittelte  $IC_{50}$ -Werte der Synthesevorstufen (Fe(OAc)<sub>2</sub>, FeCl<sub>3</sub> und<br/>Liganden) sowie der Eisen(II)/(III)(diarylsalen)-Komplexe. Dargestellt<br/>sind die Mittelwerte mindestens zweier unabhängiger Experimente<br/>(n = 16).

An den ermittelten  $IC_{50}$ -Werten wurde ebenfalls die wesentlich stärkere zytotoxische Aktivität der Eisenkomplexe an der MDA-MB-231-Zelllinie im Vergleich zur MCF7-Zelllinie deutlich. Die in den zeitabhängigen Zytotoxizitätstests ermittelten Struktur-Wirkungs-Beziehungen spiegeln sich auch in den  $IC_{50}$ -Werten wider. Während die  $IC_{50}$ -Werte der Eisen(II)- und Eisen(III)-Komplexe an der MDA-MB-231-Zelllinie durchaus identisch sind, wurden für Eisen(III)-Komplexe an der MCF7-Zelllinie geringere Werte ermittelt als für die Eisen(II)-Analoga (vgl. Tabelle 4.26). Die unterschiedlich starke Wirkung der Eisen(II)- und Eisen(III)-Komplexe ist bei der Bestimmung der  $IC_{50}$ -Werte im Vergleich zu den zeitabhängigen Testungen jedoch relativiert. Die  $IC_{50}$ -Werte der Eisen(II)-Verbindungen unterscheiden sich mit Ausnahme der 4'-methoxysubstituierten Verbindungen (**97m**) und (**104m**) lediglich gering voneinander.

Weiterhin konnten die größere Wirksamkeit der 4'-fluorsubstituierten Komplexe im Vergleich zu den 4'-methoxysubstituierten Komplexen ebenfalls anhand der geringeren IC<sub>50</sub>-Werte gefunden werden. Die größere Wirksamkeit *d*,*l*-konfigurierter Komplexe im Vergleich zu deren *meso*-Analoga wurde ebenso bestätigt.

Verbindung	MCF7 (µM)	MDA-MB-231 (µM)
Phenylendiamin-Ligand (73)	5.1 (± 0.70)	23.5 (± 2.40)
[Fe <sup>ll</sup> salophen] <b>(140)</b>	0.4 (± 0.07)	0.1 (± 0.01)
[Fe <sup>lli</sup> salophen]Cl <b>(141)</b>	0.3 (± 0.01)	0.01 (± 0.01)
<i>m</i> [Co <sup>ll</sup> 4'OCH <sub>3</sub> ] <b>(149m)</b>	14.2 (± 0.75)	-
Juglon	5.6 (± 0.35)	1.6 (± 0.30)

 Tabelle 4.27:
 Ermittelte IC<sub>50</sub>-Werte der Eisen(II)- und Eisen(III)-Komplexe, sowie des Co(salen)-Komplexes und Juglon. Dargestellt sind die Mittelwerte mindestens zweier unabhängiger Experimente (n = 16).

Die besonders hohe zytotoxische Wirksamkeit der phenylendiaminüberbrückten Eisen(salen)-Komplexe [Fe<sup>II</sup>salophen] (140) bzw. [Fe<sup>III</sup>salophen]Cl (141) konnte auch in den ermittelten IC<sub>50</sub>-Werten wieder gefunden werden (siehe Tabelle 4.27). Die beiden Komplexe besaßen an der MCF7-Zelllinie einen IC<sub>50</sub>-Wert von 0.4  $\mu$ M (140) bzw. 0.3  $\mu$ M (141) und an der MDA-MB-231-Zelllinie einen IC<sub>50</sub>-Wert von 0.1  $\mu$ M (140) bzw. 0.01  $\mu$ M (141). Allerdings zeigte der Ligand (73) an der MCF7-Zelllinie mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von 5.1  $\mu$ M ebenfalls eine starke zytotoxische Wirksamkeit. Der IC<sub>50</sub>-Wert des Liganden lag dabei deutlich unter den IC<sub>50</sub>-Werten, die z.T. für die Komplex-verbindungen gefunden wurden. Interessanterweise besaß der Phenylendiamin-Ligand (73) an der MDA-MB-231-Zelllinie einen IC<sub>50</sub>-Wert von 23.5  $\mu$ M, der sich in der Größenordung der IC<sub>50</sub>-Werte der anderen getesteten Liganden befindet.

Um die Wirkstärke der synthetisierten Eisen(diarylsalen)-Komplexe besser einschätzen zu können, wurden für mehrere Vergleichssubstanzen mit ähnlicher Struktur oder ähnlichem Wirkungsmechanismus  $IC_{50}$ -Werte ermittelt. Für den strukturell ähnlichen Cobaltkomplex *m*[Co<sup>II</sup>4'OCH<sub>3</sub>] **(149m)** wurde an der MCF7-Zelllinie ein  $IC_{50}$ -Wert von 14.2 µM bestimmt. Die Wirkstärke des Cobalt(II)-Komplexes liegt damit zwischen der des analogen Eisen(II)- und der des Eisen(III)-Komplexes (17.9 µM für **(97m)** und 9.25 µM für **(107m)**).

Als Vergleich wurde weiterhin ein  $IC_{50}$ -Wert für das Naphthochinonderivat Juglon bestimmt. Juglon besitzt zwar strukturell keinerlei Ähnlichkeit mit den Eisen(salen)-Komplexen, entfaltet aber über einen ähnlichen Mechanismus seine zytotoxische Wirkung. Das Naphthochinonderivat kann über Semichinonradikalbildung ROS produzieren, die in Gegenwart von Eisen in einer Fenton-Reaktion Hydroxyl-Radikale bilden können und damit zu einer DNA-Schädigung führen (siehe Kapitel 6 insbesondere Abbildung 6.3 und Kapitel 8). Juglon besaß an der MCF7-Zelllinie einen mit den *d*,*l*-konfigurierten fluorsubstituierten Eisen(diarylsalen)-Komplexen **(117d,I)** und **(122d,I)** vergleichbaren  $IC_{50}$ -Wert. Wie die Eisenkomplexe war Juglon an der MDA-MB-231-Zelllinie wesentlich wirksamer als an der MCF7-Zelllinie. Allerdings konnte Juglon mit einem  $IC_{50}$ -Wert von 1.6  $\mu$ M die Wirksamkeit der Eisen(diarylsalen)-Komplexe an der MDA-MB-231-Zelllinie nicht erreichen.

Verbindung	MCF7 (µM)
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	114.6 (± 4.05)
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + Fe(OAc) <sub>2</sub>	70.0
<i>d,I</i> [Fe <sup>ll</sup> 4'OCH <sub>3</sub> ] <b>(97d,I)</b> + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	< 0.01
<i>d,I</i> [Fe <sup>III</sup> 4'OCH <sub>3</sub> ]CI <b>(122d,I)</b> + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0.02

Tabelle 4.28:

Ermittelte IC<sub>50</sub>-Werte von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und den Eisen(II)- bzw. Eisen(III)-Komplexen bei Zusatz äquimolarer Mengen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Als weiteren Vergleichswert wurde der  $IC_{50}$ -Wert von  $H_2O_2$  bestimmt. Dabei wurde für  $H_2O_2$  ein recht hoher  $IC_{50}$ -Wert von 114.6  $\mu$ M ermittelt. Der Zusatz äquimolarer Mengen Fe(OAc)<sub>2</sub> zu dem  $H_2O_2$ -haltigen Medium konnte, wie erwartet, dessen  $IC_{50}$ -Wert reduzieren, wobei der bestimmte  $IC_{50}$ -Wert für das  $H_2O_2/Fe(OAc)_2$ -System von 70  $\mu$ M im Vergleich zu den Eisen(diarylsalen)-Komplexen noch immer als sehr hoch einzuschätzen ist.

Der Zusatz von äquimolaren Mengen  $H_2O_2$  zu den beiden Eisenkomplexen (97d,I) und (122d,I) führte erwartungsgemäß zu einer sehr deutlichen Verringerung der IC<sub>50</sub>-Werte beider Verbindungen.

#### 4.3.1.2 IC<sub>50</sub>-Werte an der COS7-Zelllinie

Die  $IC_{50}$ -Werte an der COS7-Zelllinie wurden in Hinblick auf die Apoptoseuntersuchungen mittels DAPI-Färbung bestimmt. Sie lieferten wichtige Informationen für den zu verwendenden Konzentrationsbereich.

In der Untersuchung auf apoptoseinduzierende Eigenschaften fand bisher nur der wirksamste Eisen(III)-Komplex [Fe<sup>III</sup>salophen]Cl (141) Verwendung, so dass an der COS7-Zelllinie lediglich die IC<sub>50</sub>-Werte des Komplexes (141), seines Liganden (73) und des Positivvergleichs Juglon ermittelt wurden (siehe Tabelle 4.29).

Verbindung	COS7 (µM)
Cisplatin	5.1 (± 0.21)
Phenylendiamin-Ligand (73)	31.8 (± 12.94)
[Fe <sup>lli</sup> salophen]Cl <b>(141)</b>	0.3 (± 0.24)
Juglon	0.8 (± 0.17)

**Tabelle 4.29:**Ermittelte IC50-Werte an der COS7-Zelllinie. Dargestellt sind die Mittelwerte mindestens zweier unabhängiger Experimente (n = 16).

Durch die Koordinierung des Liganden an das Eisenzentralatom konnte auch an der COS7-Zelllinie eine Steigerung der zytotoxischen Aktivität erreicht werden. Der Ligand **(73)** besaß an COS7-Zellen einen  $IC_{50}$ -Wert von rund 32 µM, während für die komplexierte [Fe<sup>III</sup>salophen]CI-Verbindung **(141)** ein  $IC_{50}$ -Wert von 0.3 µM gefunden wurde. Der  $IC_{50}$ -Wert des Positivvergleichs Juglon lag etwa in einer ähnlichen Größenordnung wie der Wert, der für die Eisenkomplexverbindung ermittelt wurde. Für die Naphthochinonverbindung und den Eisenkomplex wurde jeweils ein ca. 10-fach geringerer  $IC_{50}$ -Wert ermittelt als für das etablierte Zytostatikum Cisplatin.

## 4.4 Zytotoxizitätstestungen an Leukämiezelllinien

Die Untersuchungen der Eisen(diarylsalen)-Komplexe auf ihre zytotoxischen Eigenschaften an den Leukämiezelllinien LAMA84 und K562 wurden von Frau Univ. Doz. Dr. B. Kircher im Labor für Tumor- und Immunbiologie in der Klinischen Abteilung für Hämatologie und Onkologie an der Universitätsklinik für Innere Medizin der Stadt Innsbruck durchgeführt.

#### 4.4.1 Charakterisierung der Zelllinien LAMA84 und K562

#### 4.4.1.1 Die LAMA84-Leukämiezelllinie

Die humane Leukämiezelllinie LAMA84 wurde aus dem peripheren Blut einer 29jährigen Patientin mit chronisch myeloischer Leukämie (CML) in der akuten Phase der Erkrankung gewonnen, die zuvor 5 Jahre mit Busulfan behandelt wurde.

Die Zellen wachsen als Suspensionskultur und besitzen einen drei- bis vierfachen Chromosomensatz. Das Philadelphiachromosom, das durch Translokation der langen Arme des Chromosoms Nr. 22 auf ein anderes Chromosom entsteht (in der Regel auf Chromosom Nr. 9) und bei 90 % der Patienten gefunden wird, konnte in vier- bis fünffacher Kopie nachgewiesen werden.

Die Zelllinie ist schwer zu klassifizieren, weist aber hauptsächlich morphologische Eigenschaften undifferenzierter Vorläuferzellen auf. Die myeloischen Zellen besitzen erythroides, megakaryocytäres und monocytäres Entwicklungspotential und können sich entlang eines megakaryocytären oder eines erythrocytären Weges entwickeln. Einerseits weisen sie granulozytäre Antigene auf, andererseits können sie unter geeigneten Bedingungen Hämoglobin synthetisieren. Die Zelllinie besitzt keine Lymphozytenmarker und wird hauptsächlich als erythromegakaryocytäre Zelllinie angesehen, die aber auch hämatopoetische Merkmale anderer Linien besitzt.<sup>[93-97]</sup>

#### 4.4.1.2 Die K562-Leukämiezelllinie

Die K562-Zelllinie wurde 1970 von Lozzio *et al.* aus dem Pleuraerguss einer 53 Jahre alten Patientin mit CML in der terminalen Blastenkrise isoliert. Die hauptsächlich erythroide Zelllinie besitzt in geringem Ausmaß auch granulozytäre Antigene und megakaryozytäre Differenzierungsmarker. Die Biosynthese bestimmter Zellmembranglykoproteine, z.B. Glykophorin, die Zellmorphologie mit basophilem Zytoplasma und die mögliche Induktion der Hämoglobinsynthese sprechen für die erythroide Herkunft der Zelllinie.<sup>[98, 99]</sup> Die Zellen besitzen einen fast triploiden Chromosomensatz mit durchschnittlich 70 Chromosomen. Das Philadelphiachromosom als zelluläres Merkmal der Krankheit konnte ebenfalls nachgewiesen werden.<sup>[96, 98-104]</sup>

#### 4.4.2 Der EZ4U-Assay

Die Ermittlung der zytotoxischen Eigenschaften der Eisen(diarylsalen)-Komplexe an den beiden Leukämiezelllinien erfolgte mit Hilfe des EZ4U-Assays der Firma Biomedica. Die Zellen wurden dazu als Suspensionskultur in 96-Lochplatten ausgesät und fünf Tage mit den entsprechenden Verbindungen inkubiert.

Nach Ablauf der Inkubationsdauer wurden die Zellen 2 bis 5 Stunden mit einer Lösung eines zart gelb gefärbten Tetrazoliumsalzes versetzt, das in die Zellen aufgenommen und in den Mitochondrien zum ziegelroten Formazanderivat reduziert wird (siehe Abbildung 4.31). Die Absorption der Farbstofflösung kann dann bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen werden. Da die Reduktion an die Funktionsfähigkeit intakter Mitochondrien gebunden ist, bietet der EZ4U-Assay gleichzeitig eine gute Unterscheidungsmöglichkeit zwischen lebenden und toten Zellen.



Abbildung 4.31: Reduktion des Tetrazoliumsalzes zum Formazanderivat

Aus Background- und Standardmessungen wird die prozentualen Proliferationen berechnet, welche in der Abbildung 4.32 für die LAMA84-Zelllinie und in der Abbildung 4.33 für die K562-Zelllinie dargestellt sind.

# 4.4.3 Ergebnisse der Zytotoxizitätstestungen an den Leukämiezelllinien

An den beiden Leukämiezelllinien wurden ausgewählte Eisenkomplexe in den Konzentrationen 1, 5 und 10 µM getestet. Als Vergleichssubstanz wurde wiederum Cisplatin verwendet, das in den gleichen Konzentrationen wie die synthetisierten Eisenkomplexe eingesetzt wurde.

Die proliferationshemmenden Eigenschaften der Eisenkomplexe sind an beiden Zelllinien vergleichbar, wobei die Verbindungen an beiden Zelllinien in einer Konzentration von 1  $\mu$ M z.T. nur schwach antiproliferativ wirksam waren. Auffällig war in dieser Konzentration bereits die starke zytotoxische Wirksamkeit *d*,*l*-konfigurierter Komplexe. *D*,*l*-konfigurierte Eisen(diarylsalen)-Komplexe zeigten an den beiden Leukämiezelllinien z.B. eine größere Wirksamkeit als Cisplatin.

Im Unterschied zu den adhärenten Zelllinien besaß die 2',4'-difluorierte Verbindung m[Fe<sup>III</sup>2',4'F]Cl (**126m**) an den beiden Leukämiezelllinien keine größere Wirksamkeit als die monofluorierte Verbindung m[Fe<sup>III</sup>4'F]Cl (**122m**) bzw. als Cisplatin.



Abbildung 4.32: Einfluss ausgewählter Eisen(diarylsalen)-Komplexe auf die Proliferation von LAMA84-Leukämiezellen, (n = 3)

Bei der Testung der Eisenkomplexe an der K562-Zelllinie war die hohe Wirksamkeit des *d,l*-konfigurierten Komplexes *d,l*[Fe<sup>III</sup>4'OCH<sub>3</sub>]Cl (**104d,I**) besonders auffallend. Die Eisenverbindung besaß in einer Konzentration von 5  $\mu$ M mit einer relativen Proliferation von 32 % eine wesentlich höhere Aktivität als Cisplatin (Proliferation bei 5  $\mu$ M 55 %).

An den beiden Leukämiezelllinien ließen sich auch die bereits beschriebenen Struktur-Wirkungs-Beziehungen erkennen. Auch in diesem Testsystem waren, vergleichbar mit den Brustkrebszelllinien, Eisen(III)-Komplexe wirksamer als ihre Eisen(II)-Analoga, d,Ikonfigurierte Komplexe wirksamer als ihre meso-konfigurierten Analoga und fluorierte Komplexe wirksamer als Verbindungen mit Methoxysubstitution der "Brücken"-Aromaten.



Abbildung 4.33: Einfluss ausgewählter Eisen(diarylsalen)-Komplexe auf die Proliferation von K562-Leukämiezellen, (n = 3)