

**Aus der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie der Universität
Würzburg Direktor: Professor Dr. med. Patrick Meybohm**

Titel:

**Chemische, biologische und physikalische Eigenschaften von
Propofol/Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin (Propofol/HP β CD) und
Na-Propofolat/Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin (Na-Propofolat/HP β CD)**

**Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius–Maximilians–Universität Würzburg**

**vorgelegt von
Benedikt Paul Maria Wilhelms
aus Aachen**

Würzburg, Juli 2022



Referent : Prof. Dr. med. Jens Broscheit
Korreferent : Prof. Dr. rer. nat. Christoph Otto
Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 19.01.2024

Der Promovend ist Arzt

Widmung: Meiner Familie

Er dachte einige Zeit nach. Dann sprach er weiter: "Man darf nie an die ganze Straße auf einmal denken, verstehst du? Man muß nur an den nächsten Schritt denken, an den nächsten Atemzug, an den nächsten Besenstrich. Und immer wieder nur an den nächsten." Wieder hielt er inne und überlegte, ehe er hinzufügte: "Dann macht es Freude; das ist wichtig, dann macht man seine Sache gut. Und so soll es sein."

Und abermals nach einer langen Pause fuhr er fort: "Auf einmal merkt man, daß man Schritt für Schritt die ganze Straße gemacht hat. Man hat gar nicht gemerkt wie, und man ist nicht außer Puste." Er nickte vor sich hin und sagte abschließend: "Das ist wichtig."

Michael Ende

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1 Propofol.....	1
1.1.1 Pharmakodynamik.....	2
1.1.2 Pharmakokinetik.....	3
1.1.3 Nebenwirkungen.....	5
1.1.4 Alternative Formulierungen.....	6
1.2 Cyclodextrine.....	7
1.2.1 Chemische Grundlagen.....	7
1.3 Potentielle Komplexe zwischen HP β CD und Propofol.....	11
1.4 Zielsetzung.....	13
2. Material und Methoden.....	16
2.1 1H-NMR-Spektroskopie.....	16
2.1.1 Grundlagen der 1H-NMR-Spektroskopie.....	16
2.1.2 Auswertungen der 1H-NMR-Spektren.....	19
2.1.3 Messungen der 1H-NMR-Spektren.....	20
2.2 Molekulare Modellierungen.....	21
2.2.1 Molekulares Docking mit <i>Autodock v.4.2.5.1</i>	21
2.2.2 Molekulardynamik-Simulationen.....	22
2.3 Differential Scanning Calorimetry (DSC).....	23
2.3.1 Grundlagen der DSC.....	23
2.3.2 DSC-Messungen der Testsubstanzen.....	24
2.4 Zytotoxizitätstests.....	25
2.4.1 MTT-Test.....	28
2.4.2 Laktatdehydrogenase-Assay (LDH-Assay).....	31
2.4.3 XTT-Tetrazoliumreduktionstest (EZ4U-Test).....	33
2.5 Comet-Assay.....	35
2.5.1 Funktionsprinzip des Comet-Assays.....	35
2.5.2 Comet-Assay: Humane Leukämie-HL-60-Zellen.....	37
2.5.3 Comet-Assay: Vorversuche mit H ₂ O ₂	37
2.5.4 Comet-Assay: Versuche mit den Testsubstanzen.....	38
2.6 Statistische Angaben zu den Zytotoxizitätstests und dem Comet-Assay.....	40
3. Ergebnisse.....	41
3.1 1H-NMR-Spektroskopie.....	41
3.1.1 Propofol.....	41
3.1.2 β -Cyclodextrin.....	44
3.1.3 HP β CD.....	46
3.1.4 Propofol/HP β CD.....	50
3.1.5 Na-Propofolat/HP β CD.....	52
3.1.6 Übersicht über die gemessenen 1H-NMR-Spektren.....	53
3.2 Molekulare Modellierungen der Substanzen.....	56
3.2.1 Molekulares Docking mit <i>AutoDock v.4.2.5.1</i>	56
3.2.2 Molekulardynamik-Simulationen.....	58
3.3 Differential Scanning Calorimetry (DSC).....	59
3.4 Zytotoxizitätstests.....	63
3.4.1 Auswertung des MTT-Tests.....	63

3.4.2 Auswertung des Laktatdehydrogenase-Assays (LDH-Assays).....	65
3.4.3 Auswertung des XTT-Tetrazoliumreduktionstests (EZ4U-Tests).....	67
3.5 Auswertung des Comet-Assays.....	69
3.5.1 Comet-Assay: Auswertung der Vorversuche.....	69
3.5.2 Comet-Assay: Auswertung der Testsubstanzen.....	70
3.6 Graphische Darstellung der Zytotoxizitätstests und des Comet-Assays.	73
4. Diskussion.....	74
4.1 ¹ H-NMR-Spektroskopie.....	74
4.2 Molekulare Modellierungen.....	77
4.3 Differential Scanning Calorimetry (DSC).....	78
4.4 Zytotoxizitätstests.....	82
4.4.1 Zytotoxizität des Propofols an der Blut-Hirn-Schranke.....	84
4.4.2 Zytotoxizität des β -Cyclodextrins und des HP β CD an der Blut-Hirn-Schranke.....	84
4.4.3 Propofol/HP β CD und Na-Propofolat/HP β CD an der Blut-Hirn-Schranke.....	86
4.5 Comet-Assay.....	87
4.6 Alternative Formulierungen von Propofol.....	88
5. Zusammenfassung.....	91
6. Literaturverzeichnis.....	93
7. Geräte und Materialien.....	113
7.1 Medien und Lösungen für die Zellkulturen.....	115
7.2 Chemikalien.....	116
7.3 Lösungen.....	118
I. Abkürzungsverzeichnis.....	120
II. Abbildungsverzeichnis.....	122
III. Tabellenverzeichnis.....	123
IV. Anhang.....	124
V. Danksagung.....	129
VI. Lebenslauf.....	130

1. Einleitung

1.1 Propofol

Propofol (2,6-Diisopropylphenol) (siehe Abbildung 1) findet seinen Hauptanwendungsbereich in der Einleitung und Aufrechterhaltung von Anästhesien bei Operationen und Endoskopien sowie bei längerfristiger Sedierung auf der Intensivstation. Der rasche Wirkungseintritt, die geringe Kumulation des intravenös applizierten Medikamentes und die relativ seltenen Nebenwirkungen haben es zu einem der am häufigsten eingesetzten Narkotika weltweit gemacht. So wurde Propofol 2016 in die Liste der unentbehrlichen Arzneimittel der WHO aufgenommen.¹ Vorrangig wirkt das Medikament hypnotisch und zeigt dosisabhängig sedative, anxiolytische und amnestische Effekte bereits in subhypnotischer Anwendung.² Aufgrund der fehlenden analgetischen Wirkung wird Propofol in der Regel zusammen mit einem kurzwirksamen Analgetikum wie Remifentanyl im Rahmen einer total intravenösen Anästhesie (TIVA) appliziert.³ Chemisch betrachtet gehört das Narkotikum zu der Gruppe der Alkylphenole.⁴ Aufgrund seiner lipophilen Eigenschaften wird das unter dem Handelsnamen Disoprivan® geführte Medikament in einer einprozentigen oder zweiprozentigen Emulsionsform aus Sojaöl und Ei-Lecithin vermarktet.⁵ Eine Beschreibung der Wirkweise setzt eine genaue Kenntnis der Pharmakokinetik und Pharmakodynamik voraus.

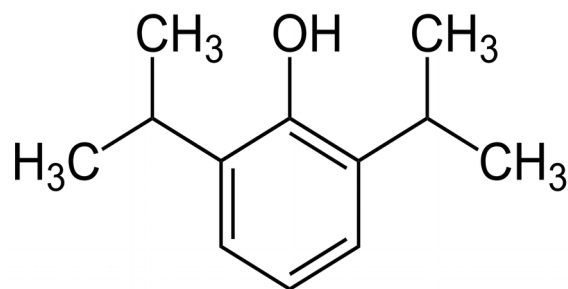


Abb. 1: Strukturformel von Propofol mit der Summenformel⁶: $C_{12}H_{18}O$ (Die Erlaubnis des Verlags zur Nutzung der Abbildung liegt vor)

1.1.1 Pharmakodynamik

Die hypnotische Wirkung der Narkotika wird abhängig von der Dosierung und der Interaktion mit Rezeptoren entfaltet. Dem Wirkmechanismus von Propofol liegt die Verstärkung des inhibitorischen Effektes des Neurotransmitters Gamma-Aminobuttersäure (GABA) durch die GABA_A-Rezeptoren zugrunde.⁷

Die GABA_A-Rezeptoren greifen durch ihr breites Vorkommen im zentralem Nervensystem (ZNS) als ligandengesteuerte Chloridionenkanäle unter anderem in die Steuerung von Vigilanz, motorischer Kontrolle und Angst ein.⁸ Die hypnotische Wirkung des Propofols vollzieht sich bei intravenöser therapeutischer Dosis in der Regel innerhalb von 40 Sekunden aufgrund der raschen Überwindung der Blut-Hirn-Schranke (BHS) und hält für eine Wirkdauer von etwa 5-8 Minuten an.⁹ Der in der Literatur ausführlich beschriebene amnestische Effekt scheint vornehmlich das explizite Gedächtnis zu betreffen und sich in dosisabhängiger Wirkung zu entfalten.^{10,11} In subhypnotischer Dosierung sind zudem anxiolytische und analgetische Effekte beschrieben worden.^{12,13} Für die anxiolytische Wirkung scheint die Inhibition der 5-HT-Rezeptoren im Hippocampus eine Rolle zu spielen, allerdings ist der komplette Wirkmechanismus nicht vollständig bekannt.¹⁴ Der analgetischen Wirkung in subhypnotischer Dosierung scheint eine Modulation der GABA_A-Rezeptoren auf spinaler Ebene zugrunde zu liegen.¹⁵ Einen weiteren Vorteil des Propofols stellt der antiemetische Effekt des Narkotikums dar.¹⁶

Für die Verwendung von Propofol ist die klinische Wirkung und die Überwachung von gewünschten und nichtgewünschten Effekten entscheidend. Die folgenden Anwendungsdosierungen können nur als Empfehlungen betrachtet werden und sind in Tabelle 1 dargestellt. Die standardmäßige Dosierung entspricht einer Initialgabe von 2,5 mg/kg des Körpergewichtes bei Erwachsenen, die bei geriatrischen Patienten auf 1,5 mg/kg des Körpergewichtes reduziert werden sollte.¹⁷ Die Anwendung kann in Bolusgaben von 40 mg in 10 Sekundenabständen erfolgen. Im Rahmen einer TIVA wird eine fortlaufende Propofolinfusion von 6-8 mg/h/kg des Körpergewichtes zur

Aufrechterhaltung der Narkose verwendet.¹⁷ Für Kinder liegen die Standarddosierungen bei einer initialen Bolusgabe von 3- 6 mg/kg, und die Empfehlung zur intraoperativen Infusion beträgt bei Kindern 4- 8 mg/h/kg.¹⁸

Tab. 1: Übersicht über die Standarddosierungen für Propofol bei unterschiedlichen Patientengruppen für Initialgaben und zur Aufrechterhaltung der Narkose^{17,18}

Standarddosierung	Erwachsene	Kinder	Geriatrische Patienten
Initialdosierung	2,5 mg/kg	3-6 mg/kg	1,5 mg/kg
Aufrechterhaltungsdosierung	6-8 mg/h/kg	4-8 mg/h/kg	*

*Aufgrund interindividueller Varianz ist bei geriatrischen Patienten keine Standarddosierung angegeben¹⁹

1.1.2 Pharmakokinetik

Aufgrund der niedrigen oralen Bioverfügbarkeit bei einem hohen First-Pass-Effekt (>90%) eignet sich für Propofol aktuell nur die intravenöse Anwendung.²⁰ Bei der intravenösen Applikation können die Prozesse der Distributions-, Metabolisierungs- und Exkretionsprozesse gezielt betrachtet werden.²¹ Die Distribution erfolgt mit einer vorrangigen Bindung an Erythrozyten und Plasmaproteine. Bei einem Hämatokritwert von 0,45 % und einer Propofolkonzentration von 1 µg/ml liegt das Narkotikum zu 51 % gebunden an Erythrozyten, zu 48 % an Plasmaprotein und zu 1,4 % ungebunden vor.²²

Die Distribution kann anhand des Verteilungsvolumens rechnerisch bestimmt werden (Formel 1). Das Verteilungsvolumen **V** steht mit der molaren Masse **M** und der Konzentration des Pharmakons **C** im folgenden Verhältnis:²³

Formel 1:

$$V = M / C$$

Für viele Medikamente genügt die Orientierung an dem Verteilungsvolumen und der Clearance in einem Ein-Kompartiment-Modell. Für Narkotika ist das

nicht ausreichend, so dass verschiedene Modelle für Propofol beschrieben wurden.²⁴ Anhand des gängigen Drei-Kompartiment-Modells von Cockshott kann die pharmakokinetische Wirkung von Propofol illustriert werden.²⁵ Dieses Modell basiert auf drei unterschiedlichen Verteilungsmustern des Medikaments. Nach der Verteilung im Plasma als dem zentralen Kompartiment erfolgt die Diffusion in die peripheren Kompartimente. Diese werden entsprechend der Perfusion in ein gut durchblutetes (Herz, Gehirn und Leber) und ein mäßig durchblutetes Kompartiment (Fettgewebe und Skelettmuskulatur) unterteilt.²⁵ Da die Rückdiffusion in das zentrale Kompartiment rasch erfolgt, entsteht eine schnelle An- und Abflutungszeit des Narkotikums. Die gute ZNS-Gängigkeit wird entscheidend durch die hohe Lipophilie des Propofols bedingt.²⁶

Vorwiegend erfolgt die Metabolisierung des Propofols hepatisch (60 %). Hierbei erfolgen ca. 70 % des Abbaues durch die Reaktion von Propofol zu Glucuroniden über die UDP-Glucuronosyltransferase.²⁴ Die entstehenden Metabolite entfalten keine eigene anästhetische Wirkung.²⁷ Von der nicht-hepatischen Metabolisierung erfolgt der Großteil renal mit einem Anteil von ca. 30 % an der gesamten Metabolisierung des Propofols.²⁸

Die durchschnittliche Clearance des Propofols beträgt 2.2 l/min und die Exkretion erfolgt zu 88 % in den 5 Tagen nach der Applikation über die renale Ausscheidung.²⁶

1.1.3 Nebenwirkungen

Aus den pharmakodynamischen und pharmakokinetischen Eigenschaften lässt sich bereits die vielfältige Verwendung des Narkotikums erklären. Unter dem in Deutschland 1989 erstmalig zugelassenen Medikament treten bei korrekter klinischer Anwendung verhältnismäßig wenige Nebenwirkungen auf. Das initial höhere Risiko für eine anaphylaktische Reaktion konnte durch den Austausch von dem zuvor verwendeten Kolliphor EL durch Sojabohnenöl reduziert werden, besteht aber weiterhin.²⁹ Trotz dieser Änderung der Emulsion verbleibt weiterhin der Injektionsschmerz als häufige Nebenwirkung und variiert in der Häufigkeit des Auftretens je nach Studie zwischen 28 % und 90 %.³⁰ Außerdem können sowohl Blutdruckabfall³¹, Bradykardie³² und Hyperlipidämie³³ auftreten. Zudem konnte für Lipidemulsionen ein vermehrtes Wachstum von Bakterien³⁴ und an Patienten ein erhöhtes Risiko für postoperative Sepsis nachgewiesen werden.³⁵ Als zwar seltene, aber besonders schwerwiegende Nebenwirkung ist das Propofol-Infusionssyndrom (PRIS) beschrieben worden. Das PRIS ist definiert als ein Symptomkomplex nach einer Propofolinfusion, der sich unter anderem aus einer HerzKreislaufstörung (Bradykardie bis hin zur Asytolie), einer metabolischen Azidose, einer Rhabdomyolyse und einer Lipämie zusammensetzt.³⁶ Obwohl eine Assoziation mit der Dosierung angenommen wird, wird das PRIS auch bei einer Propofolapplikation unter 4 mg/h/kg des Körpergewichtes beschrieben.³⁷ Zudem kann das PRIS auch ohne die typischen Anzeichen einer Azidose, einer Rhabdomyolyse, einer Hyperkaliämie oder einem Nierenversagen auftreten, was eine frühzeitige Diagnostik erschwert.³⁷ Eine weitere Herausforderung bei der Propofol-Anwendung über einen längeren Zeitraum in einem intensivmedizinischen Umfeld stellt zudem die Hyperlipidämie dar, welche als separater Risikofaktor für das PRIS beschrieben wird.^{33,38}

1.1.4 Alternative Formulierungen

Aufgrund der häufigen Verwendung des Propofols und der aufgeführten Nebenwirkungen hat sich ein zunehmendes Bestreben entwickelt, alternative Möglichkeiten zur einprozentigen und zweiprozentigen Propofol-Lipidemulsion zu untersuchen.³⁹ Bereits durch die Variation des Lipidanteiles konnten Veränderungen der Nebenwirkungen registriert werden.⁴⁰ Es konnte gezeigt werden, dass durch die Verwendung einer 0,5 %-Propofollösung an Stelle einer einprozentigen Lipidemulsion eine signifikante Reduktion des Injektionsschmerz bei Kindern erzielt werden konnte.⁴¹ Neben weiteren lipidbasierten Emulsionen, bei denen in der Regel ein geringerer Lipidgehalt verwendet wurde, wurden zudem auch nichtlipide Formulierungen untersucht.⁴⁰ Die Ansätze für eine alternative Formulierung von Propofol reichen von Nanopartikel-Trägern, Prodrugs bis zu Cyclodextrinen.³⁹ Die zentrale Herausforderung für nichtlipide Formulierungen stellt für die intravenöse Applikation die mit 0,150 mg/l begrenzte Wasserlöslichkeit des Propofols dar, da bedingt durch den Benzolring und die Isopropylgruppen eine hohe Lipophilie des Propofols resultiert ($\log P = 4.16$).⁴² Im Gegensatz zu anderen Narkotika, die ohne weitere Probleme wässrige Lösungen formen können, bildet die Hydroxylgruppe des Propofols mit einem pK_s -Wert von 11 keine Salze in Lösungen.⁴³ Für ein Lösungsmittel des Propofols und eine mögliche klinische Verwendung ist entscheidend, dass diese Trägersubstanzen selbst keine eigenen anästhetischen Wirkungen oder toxischen Eigenschaften besitzen.⁴³ Da viele der typischen Lösungsmittel wie Propylenglykol und Benzylalkohole über toxische Eigenschaften verfügen, würden wässrige Lösung eine potentiell zu bevorzugende Alternative darstellen.⁴⁴ Um eine wässrige Lösung zu erzielen, wurden bereits ab 1996 Cyclodextrine als potentielle Lösungssubstanzen untersucht.⁴⁵ Cyclodextrine bieten den Vorteil, mittels Einschlusskomplexen lipophile Substanzen in wässrigen Lösungen zu binden.⁴⁴ Grundlegend für eine Beschreibung dieser Einschlusskomplexe sind die chemischen Eigenschaften der Cyclodextrine selbst.

1.2 Cyclodextrine

1.2.1 Chemische Grundlagen

Cyclodextrine sind cyclische Oligosaccharide, die aus α -(1,4)-glykosidisch verknüpften α -D-Glucopyranosemonomeren aufgebaut sind (Abbildung 3a).⁴⁶ Sie werden durch den Abbau von Stärke gewonnen. Hierfür werden aus Amylose einzelne Glukosemoleküle durch Cyclodextrin-Glycosyltransferase herausgeschnitten, die anschließend zu Oligosacchariden in einer ringförmigen Anordnung zusammengesetzt werden.⁴⁷ Die Ringstruktur entsteht aus der Bindung an dem C1- und dem C4-Atom der einzelnen Glukosemoleküle (Abbildung 2).⁴⁴

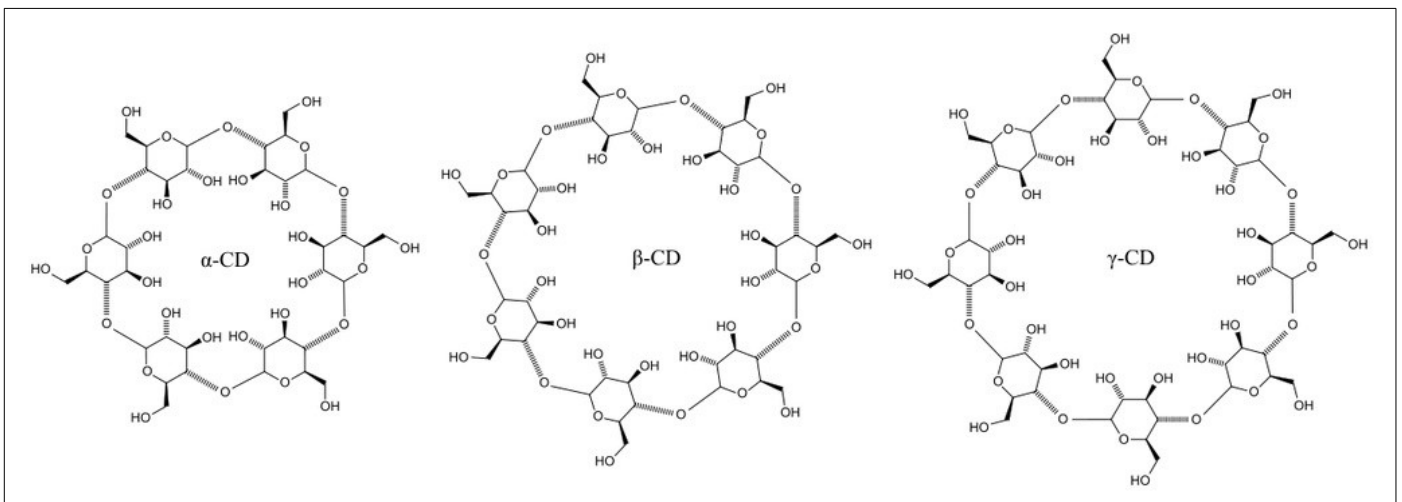


Abb. 2: Darstellung von α -, β -, und γ -Cyclodextrin⁴⁸ (Die Erlaubnis des Verlags zur Nutzung der Abbildung liegt vor)

Die Präfixe α , β , und γ repräsentieren in dieser Reihenfolge je sechs, sieben und acht Glukosemoleküle, die die Ringstruktur bilden. Das β -Cyclodextrin enthält somit sieben Glukoseeinheiten (siehe Abbildung 2). Während unterhalb von sechs Glukoseeinheiten keine Cyclodextrine gebildet werden, erschwert der Prozess der Aufreinigung die Synthese von neun oder mehr Glukoseeinheiten.^{47,49} Neben den drei Cyclodextrinformen α , β , und γ können mittels Methylierung, Hydroxypropylierung bzw. Sulfobutylierung Modifikationen

vorgenommen werden.⁴⁷ Nach der Erstbeschreibung der Cyclodextrine am Ende des 19. Jahrhunderts durch Villiers wurde Mitte des 20. Jahrhunderts deren Möglichkeit beschrieben, Einschlusskomplexe mit anderen Molekülen zu bilden.⁵⁰ Diese Eigenschaft liegt der Verwendung der Cyclodextrine als Carrier für Substanzen wie beispielsweise Medikamente zugrunde. Über das chemische Gleichgewicht wird mittels des Carriers die Konzentration zwischen gebundener und freier Substanz über längere Zeit gleichmäßig geregelt. Diese Konzentration an freier Substanz wird durch das Massenwirkungsgesetz beschrieben (Formel 2).

Formel 2:⁵¹

$$K_{1:1} = \frac{[\text{Drug}]_{\text{Complex}}}{[\text{Drug}]_{\text{frei}} * [\text{Cyclodextrin}]_{\text{frei}}}$$

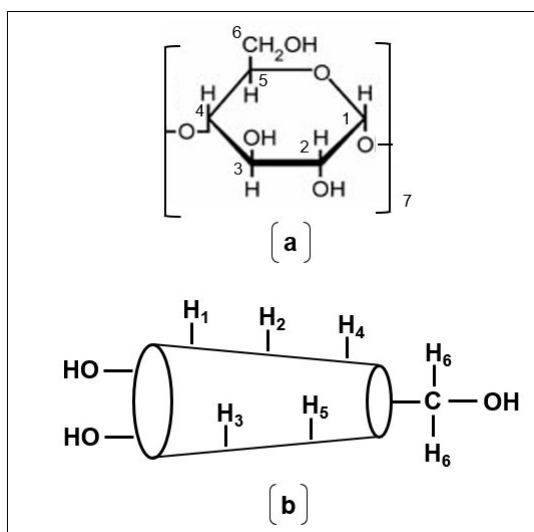


Abb. 3 : (a) Stereochemische Konfiguration des β -Cyclodextrins
 (b) Hohlraumstruktur des β -Cyclodextrins mit inneren und äußeren Protonen⁵² (Die Erlaubnis des Verlags zur Nutzung der Abbildung liegt vor)

Die Form der Cyclodextrine ähnelt in ihrer strukturellen Anordnung einem stumpfen Kegel mit einem Hohlraum im Zentrum (Abbildung 3b und Abbildung 4). In der Abbildung 3a stellt die Hydroxylgruppe am C-6-Atom eine primäre Hydroxylgruppe dar, da sie an ein primäres Kohlenstoffatom gebunden ist. Die Hydroxylgruppe am C-2- und am C-3-Atom werden aufgrund der Bindung an ein sekundäres Kohlenstoffatom als sekundäre Hydroxylgruppen bezeichnet (Abbildung 3a).⁵³ Am C-6-Atom besteht eine freie Rotation der primären Hydroxylgruppe, was die kegelartige Struktur der Kavität ermöglicht (Abbildung 3b).⁴⁷ Für die unterschiedlichen Cyclodextrine liegt eine Varianz des Innendurchmessers von 570 pm bei α , 780 pm bei β , 950 pm bei γ und des Außendurchmessers von 1370 pm bei α , 1540 pm bei β , 1690 pm bei γ vor, während die Höhe mit 750 pm - 800 pm in etwa konstant bleibt.⁵³⁻⁵⁵

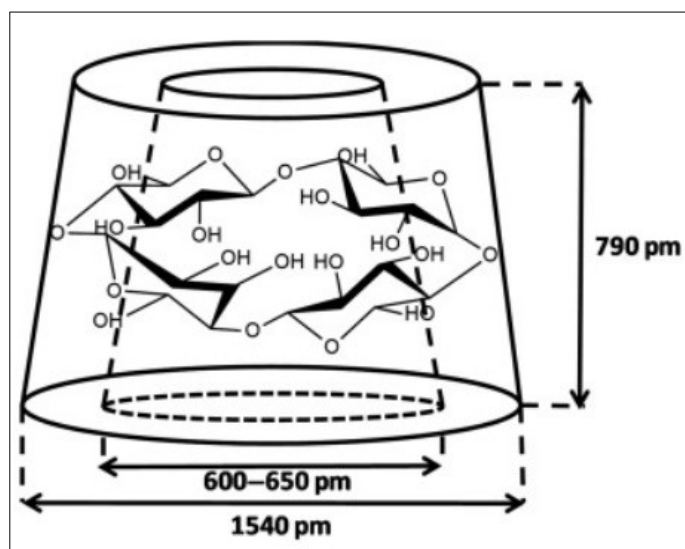


Abb. 4: Hohlraumstruktur des β -Cyclodextrins⁵⁴ (Die Erlaubnis des Verlags zur Nutzung der Abbildung liegt vor)

Die Hydroxylgruppen sind tendenziell nach außen gerichtet und die Wasserstoffatome in Richtung des Hohlraumes. Insbesondere zeigen hierbei das H-3- und das H-5-Atom nach innen und bilden einen hydrophoben Hohlraum.⁵⁶ Die durch die Anordnung resultierende unpolare Innenseite erlaubt den Einschluss von lipophilen kleineren Molekülen. Die nach außen gerichteten

polaren OH-Gruppen bewirken die hydrophilen und damit wasserlöslichen Eigenschaften. Durch Wasserstoffbrückenbindungen sowie Dipol-Dipol-Wechselwirkungen (Van-der-Waals-Kräfte) wird ein Komplex aus dem Cyclodextrin und dem Gastmolekül gebildet.⁴³ Auf diese Weise kann eine erhöhte Löslichkeit eines Medikamentes erzielt werden.⁴³ Diese bedingt die Verwendung der Cyclodextrine als Carrier an biologischen Schranken. Insbesondere konnte an biologischen Schranken der Durchtritt von Komplexen aus Cyclodextrinen und Medikamenten ohne Schäden der Lipidschichten gezeigt werden.^{43,57} Neben Anwendungsbereichen an biologischen Schranken wie beispielsweise der Haut oder des Kolons, werden vermehrt Untersuchungen zu Cyclodextrin-Medikamenten-Komplexen an der Blut-Hirn-Schranke durchgeführt.^{43,57}

1.3 Potentielle Komplexe zwischen HP β CD und Propofol

Für alternative, nichtlipide Formulierungen des Propofol bilden die eingeschränkte Wasserlöslichkeit und die Toxizität die zentralen Herausforderungen für die intravenöse Applikation.⁴² Reines β -Cyclodextrin ist aufgrund der für Mäuse nachgewiesenen Nephrotoxizität und der hämolytischen Wirkung nicht für die intravenöse Anwendung geeignet.⁵⁸ Die Ursache der Toxizität ist zurzeit nicht abschließend geklärt. Die Extraktion des Cholesterins und der Phospholipide aus der Zellmembran durch die Cyclodextrine scheint aber eine Rolle zu spielen.⁵¹ Für die Derivate des β -CD konnte eine Veränderung der physiochemischen Eigenschaften durch die jeweilige Modifikation gezeigt werden.⁵⁷ Für die beiden Cyclodextrinderivate HP β CD (Hydroxypropyl-beta-Cyclodextrin) und Sulfobutylether- β -Cyclodextrin (SBE β CD) konnte eine intravenöse Applikation erfolgreich demonstriert werden.⁵⁸ Beide Cyclodextrine zeigen im Vergleich zu dem β -Cyclodextrin eine erhöhte Wasserlöslichkeit und eine fast 15-fache Reduktion der Toxizität.⁵³ So hat HP β CD auch bei hohen Dosen nur reversible renale toxische Effekte.⁵⁷ Die geringere toxische Wirkung ist auf die erhöhte Löslichkeit des Cyclodextrinderivates zurückgeführt worden.⁵⁷ Allerdings konnte gezeigt werden, dass die Komplexbildung des HP β CD mit dem Wirt im Vergleich zu dem reinen β -Cyclodextrin verringert ist.⁵⁹ Es konnte eine Assoziation zwischen einer erhöhten Substitution der Hydroxypropylgruppe und einer verringerten Komplexbildung nachgewiesen werden.⁶⁰ Nach der Applikation wird HP β CD unverändert über den Harntrakt ausgeschieden. Bei einer normalen Nierenfunktion erfolgte 90 % der Ausscheidung innerhalb von 6 Stunden und 99 % innerhalb von 12 Stunden.⁶¹ Weitere chemische Charakteristika der verwendeten Cyclodextrine und die chemischen Eigenschaften des Propofols sind in der Tabelle 2 zusammengefasst.⁶¹

Tab. 2 : Übersicht über physikalische und chemische Eigenschaften der Substanzen Propofol^{62,63}, β -CD^{57,64} und HP β CD⁶⁵

Substanzen	Molekulargewicht	Schmelzpunkt	Siedepunkt	pK _s -Wert
Propofol	178,14 g/mol	13 °C	256 °C	11,1
β -Cyclodextrin	1134,99 g/mol	290 °C	-	-
HP β CD	1541,55 g/mol	278 °C	-	-

Die Wirt-Gast-Komplexe zwischen Cyclodextrinderivaten und Medikamenten sind bereits in einigen Studien untersucht worden.⁶⁶⁻⁶⁸ Verbindungen zwischen unterschiedlichen Cyclodextrinderivaten und Propofol wurde ebenfalls schon in mehreren Arbeiten beschrieben.⁶⁹⁻⁷¹ Die mit Propofol gebildeten Komplexe benötigen keine speziellen chemischen Formulationen und sind als klare Lösungen ohne Ölzusatz erhältlich.

Neben Propofol/HP β CD konnte durch die Verwendung des Propofolats eine venös injizierbare, stabile und gut lagerbare Formulierung etabliert werden. Das somit in den Komplex eingebundene Anion des Propofols (Phenolat) wurde inklusive der Zubereitung 2011 patentiert.⁷² Ermöglicht wird dies durch die Umsetzung von Propofol im alkalischen Milieu (pH-Wert 9-10) zum Natriumsalz. Die Anwendung des Propofolats kann in einer wässrigen Lösung erfolgen. Als zu favorisierender pH-Wert ist für diese wässrige Lösung der Bereich 9-10 angegeben, den diese nach Auflösung des Feststoffes einnimmt. Das Molverhältnis von Propofolats und HP β CD wird in dem Komplex zwischen 1:2 und 1:4 angegeben.⁷²

1.4 Zielsetzung

Im Rahmen dieser Arbeit soll die Komplexbildung zwischen Propofol mit dem Cyclodextrinderivat HP β CD analysiert werden. Dies ist von Bedeutung, da sich bei Cyclodextrinkomplexen veränderte biologische, chemische und physikalische Eigenschaften im Vergleich sowohl zu dem jeweiligen Cyclodextrinderivat als auch zu dem Medikament ohne Bindung an ein Cyclodextrinderivat zeigen können.⁴³ Das Cyclodextrinderivat HP β CD zeigt im Vergleich mit β -Cyclodextrin eine kaum vorhandene Toxizität und wurde aufgrund der guten Löslichkeit ausgewählt.⁵³ Für Propofol/HP β CD konnte dabei eine für die Komplexbildung ausreichende Stabilität gezeigt werden.⁶⁶ Allerdings wurde auch eine mit der Substitution der Hydroxypropylgruppe assoziierte Reduktion der Komplexbildung im Vergleich zu β -Cyclodextrin nachgewiesen.⁶⁰ In der vorliegenden Arbeit soll die Komplexbildung von Propofol/HP β CD u.a. mittels ¹H-NMR-Spektroskopie untersucht werden. Durch die ¹H-NMR-Spektroskopie kann eine nähere Bestimmung der Koordination des Narkotikums und des Rings des Cyclodextrinderivates erfolgen. Dieses Verfahren bietet im Gegensatz zu anderen Methoden wie der Fluoreszenzmessung und der UV/Vis-Spektroskopie die Möglichkeit, nicht nur energetische Zustände zu ermitteln, sondern lässt auch Rückschlüsse über die Strukturen der gebildeten Komplexe zu.⁷³ Insbesondere kann durch die Untersuchung der Protonen im Bezug auf ihre chemische Verschiebung Aussagen zu der räumlichen Anordnung von Gastmolekül und Cyclodextrinderivat getroffen werden.⁷³ Mittels ¹H-NMR-Spektroskopie werden die Substanzen Propofol, β -CD, HP β CD, Propofol/HP β CD und Na-Propofolat/HP β CD gemessen (siehe 2.1 & 3.1).

Um eine weitere Strukturanalyse vornehmen zu können, werden zudem molekulare Modellierungen von Propofol/HP β CD und Na-Propofolat/HP β CD vorgenommen (siehe 2.2 & 3.2). Diesbezüglich werden die Interaktion zwischen

Wirt-Gast-Komplexe sowohl mit statischen Berechnungen als auch mit dynamischen Molekulardynamik-Simulationen untersucht.

Zur weiteren Analyse der Komplexbildung wird die Differential Scanning Calorimetry (DSC) zur Bestimmung thermodynamischer Parameter durchgeführt. Über die gewonnenen Parameter sollen weitere Rückschlüsse auf die Wechselwirkung zwischen Gastmolekül und Wirtsmolekül gezogen werden.^{74,75} DSC-Messungen werden für die Substanzen HP β CD, Propofol/HP β CD und Na-Propofolat/HP β CD durchgeführt (siehe 2.3 & 3.3).

Neben der näheren Analyse der Struktur ist es Ziel der vorliegenden Arbeit, eine Untersuchung der Auswirkung von Propofol/HP β CD auf die Zytotoxizität vorzunehmen. Die Zytotoxizität stellt ein entscheidendes Kriterium für eine potentielle weitere Verwendung der Substanzen in der Medizin dar.⁷⁶ In den Untersuchungen von *Shityakov et al.* konnte bereits für Propofol und modifizierte β -Cyclodextrin-Komplexe eine vorhandene Permeabilität an der für Narkotika entscheidenden Blut-Hirn-Schranke (BHS) gezeigt werden.⁷⁰ In den vorliegenden Versuchen wurden daher für die Substanzen Propofol, HP β CD, Propofol/HP β CD und Na-Propofolat/HP β CD die Zytotoxizitätstests MTT-Test, LDH-Assay und EZ4U-Test an den bereits mehrfach zur Analyse der Prozesse an der Blut-Hirn-Schranke verwendeten CerebEND-Zellen durchgeführt (siehe 2.4 & 3.4).⁷⁷⁻⁷⁹

Neben der Zytotoxizität konzentrieren sich wissenschaftliche Bemühungen zunehmend auf weitere Aspekte der medikamenteninduzierten Wirkung wie Genotoxizität, Cancerogenität und Mutagenität.⁸⁰ Genotoxizität beschreibt das durch ein Medikament vermittelte Spektrum an akuten sowie chronischen Schäden des genetischen Materials.⁸¹⁻⁸³ Der Comet-Assay bietet die Möglichkeit, sowohl Doppelstrang- als auch Einzelstrangbrüche als DNA-Schäden zu detektieren und stellt ein standardisiertes Verfahren zur Bestimmung der Genotoxizität dar.^{84,85} Ziel der Arbeit ist es, eine Analyse der Genotoxizität von Propofol, HP β CD, Propofol/HP β CD und Na-Propofolat/HP β CD mittels dem Comet-Assay vorzunehmen (siehe 2.5 & 3.5). Für den Comet-Assay wird die bereits etablierte Zelllinie HL-60 verwendet.⁸⁶

Zusätzlich zu Propofol/HP β CD wird in den Versuchen Na-Propofolat/HP β CD untersucht. Da sich für Propofol die Form eines Natriumsalzes als günstig für die Anwendung darstellt, wird in den vorliegenden Versuchen das noch wenig beschriebene Na-Propofolat/HP β CD Teil der Versuchsreihen.⁷² Ziel der Arbeit ist es somit neben Propofol/HP β CD, das bereits bei anderen, früheren Versuchsreihen verwendet wurde, alle Versuche ebenso für Na-Propofolat/HP β CD durchzuführen. Es ist Ziel der Arbeit, diese bisher nicht verwendete Formulierung des Propofolats mit dem Propofol/HP β CD zu vergleichen.

2. Material und Methoden

2.1 ¹H-NMR-Spektroskopie

2.1.1 Grundlagen der ¹H-NMR-Spektroskopie

Der Anwendungsbereich dieser ¹H-NMR-Spektroskopie reicht über diverse chemische und medizinische Felder bis hin zu den Materialwissenschaften und zur Geologie.⁴⁶ Aus der Wechselwirkung zwischen dem Eigendrehimpuls eines Atomkerns, einem äußeren Magnetfeld B_0 und den intramolekularen Feldern können Rückschlüsse auf die genaue Struktur eines Moleküls geschlossen werden. Im Einklang mit anderen atomaren Größen wird der Kernspin als Vielfaches einer (quantifizierten) Einheit angegeben.^{87,88} Im Falle der Kernspinresonanz kann der Kernspin den Wert 0 oder ein Vielfaches von $\frac{1}{2} \hbar$ einnehmen. Für alle Atomkerne, die eine gerade Zahl an Protonen und eine gerade Zahl an Neutronen aufweisen, beträgt die Kernspinquantenzahl 0. In diesem Fall besitzt der Kerndrehimpuls I kein magnetisches Moment und es verbleiben die Atome mit einer ungleichen und ungeraden Anzahl an Neutronen und Protonen wie beispielsweise ¹H und ¹³C zur Messung.⁴⁶ Die Richtungen der magnetischen Dipole der Kerne sind zufällig angeordnet und werden erst durch ein magnetisches Feld B_0 nach den Gesetzmäßigkeiten der Quantenmechanik verändert. Die magnetischen Quantenzahlen werden mit m angegeben und können die Werte $m = I, I-1, I-2, \dots, -I$ einnehmen.⁸⁷ Da nur bestimmte Energiezustände realisiert werden können, ist auch die Richtung des Kernspins gequantelt. Bei magnetischen Dipolen mit Werten von $\frac{1}{2} \hbar$ kann m somit nur $\frac{1}{2}$ oder $-\frac{1}{2}$ betragen. Diese energetisch aufgespalteten Energiezustände werden als *Kern-Zeeman-Niveaus* bezeichnet. In Bezug auf die Anordnung der Dipole zu einem äußeren Magnetfeld kann somit von paralleler (α ; energetisch günstiger) und antiparalleler Anordnung (β ; energetisch ungünstiger) gesprochen werden.

Die magnetischen Dipole präzedieren um die äußere Magnetfeldrichtung B_0 . Die *Lamor-Frequenz* bezeichnet die Frequenz dieser Präzession.⁸⁷ Durch die

Einstrahlung von einem zusätzlichen Magnetfeld B_1 kann der Übergang zwischen den Energieniveaus bewirkt werden. Sofern die Frequenz der eingestrahlten elektromagnetischen Welle ν_1 dem *Kern-Zeeman-Niveau* entspricht, kann ein Resonanzsignal detektiert werden. In einem Koordinatensystem beschreibt die z-Achse die Magnetfeldrichtung B_0 , während die x-Achse und die y-Achse in Richtung der Sende- und Empfängerspule liegen.⁸⁷ Bei der Verwendung eines Fourier-Transformation-NMR-Spektrometers (FT-NMR) wird ein Hochfrequenzimpuls angewendet, der eine gleichzeitige Erregung aller Atomkerne hervorruft. Dieser Impuls wird im μs -Bereich appliziert.⁸⁷ Nach dem Abklingen des Hochfrequenzimpulses wird die Abnahme der Magnetisierung in Form eines sogenannten *free induction decay* (FID) detektiert. Durch den FID wird das NMR-Signal erzeugt.

Grundlage für den FID sind nach Ende der Einstrahlung zwei verschiedene Relaxationsprozesse. Zum einen entsteht durch die Relaxation in Richtung des äußeren Magnetfelds eine *longitudinale Relaxation* oder *Spin-Gitter-Relaxation* T_1 , zum anderen ergibt sich eine *transversale Relaxation* oder *Spin-Spin-Relaxation* T_2 senkrecht zum äußeren Feld. Während die *Spin-Gitter-Relaxation* T_1 durch Wechselwirkung mit elektrischen Feldgradienten und umliegenden magnetischen Feldern entsteht, wird die *Spin-Spin-Relaxation* T_2 durch den Austausch von Energie zwischen gleichartigen Spins und der entstehenden Homogenisierung des Spinsystems bedingt.⁸⁹ Insbesondere durch T_2 wird die Geschwindigkeit beeinflusst, mit der das FID-Signal sinkt. Neben analytischen Verfahren bilden diese beiden Relaxationsprozesse im MRT die Grundlage der Bildgebung.

Im Fall von Molekülen muss neben dem äußeren Feld die innerhalb des Moleküls liegende Umgebung des betrachteten Atoms beachtet werden, durch welche das lokale Feld verändert wird. Zu berücksichtigen sind die Effekte der benachbarten Elektronen und deren magnetisches Feld, welches dem äußeren Feld B_0 überlagert ist. Durch die von den jeweiligen Elektronen verursachten Magnetfelder entstehen die Phänomene der chemischen Verschiebung: der *Abschirmung* und der *Entschirmung* des äußeren Feldes. Ersteres beschreibt

die durch kreisförmige Bewegungen der Elektronen induzierten zusätzlichen Magnetfelder, die sich entgegengesetzt zu dem äußeren Feld verhalten. Die *Entschirmung* wirkt der *Abschirmung* entgegen und beruht auf der Elektronegativität der Gruppen in direkter Nachbarschaft zu dem betrachteten Atomkern. Durch diese Phänomene reduzieren sich die Resonanzfrequenzen der Atome. Um eine vom äußeren Magnetfeld unabhängige Größe zu etablieren, wird die chemische Verschiebung als Größe eingeführt, die in der Einheit ppm angegeben wird.⁹⁰ Als Ganzes bildet die chemische Verschiebung die Grundlage für die Strukturanalyse, da der Resonanzübergang für die einzelnen Atomkerne abhängig von der intramolekularen Umgebung ist und da auf diese Weise Aussagen über die Struktur der jeweiligen Moleküle getroffen werden können.⁹¹ In diesem Zusammenhang wird zwischen chemisch äquivalenten - mit gleichen Resonanzfrequenzen - und chemisch nicht-äquivalenten Kernen unterschieden. Erstere geben nur ein Signal, während die nicht-äquivalenten Kerne getrennte Signale erzeugen.

Für die äquivalenten Kerne gilt die Aufspaltungsregel ($N+1$) (Multiplizität), d.h. dass für N benachbarte Wasserstoffkerne eines H-Kerns im ^1H -NMR-Spektrum, $N+1$ (nahe beinanderliegende) Resonanzpeaks resultieren. Wenn beispielsweise ein äquivalenter Kern eines H-Atoms mit einem benachbartem H-Atom gemessen wird, zeigt sich in der ^1H -NMR-Spektroskopie ein Duplett. Für einen äquivalenten Kern mit zwei benachbarten H-Atomen resultiert ein Triplett.⁹² Gleiche Substituenten an äquivalenten C-Atomen haben die gleiche chemische Verschiebung und treten daher im NMR-Spektrum mit entsprechend höherer Intensität auf.⁹³

Auch die Größe der Kopplung zwischen den verschiedenen Protonen beeinflusst die Signalhöhe im NMR-Spektrum. Insbesondere haben unterschiedliche Kopplungsdistanzen verschiedene Kopplungskonstanten zur Folge. Die unterschiedlichen Kopplungsdistanzen werden an folgenden Beispielen ersichtlich (Abbildung 5):

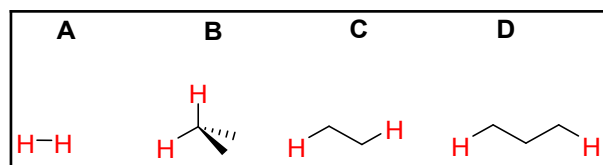


Abb. 5: Schematische Darstellung der verschiedenen Kopplungsdistanzen für 1J (direkte Kopplung, **A**), 2J (geminale Kopplung, **B**), 3J (vicinale Kopplung, **C**) und 4J (long-range Kopplung, **D**) (Eigene Darstellung)

2.1.2 Auswertungen der 1H -NMR-Spektren

Die Multiplizität der Signale wird als Singlett, Duplett, Triplet etc. bezeichnet. Grundlage der Auswertung eines 1H -NMR-Spektrums ist neben der chemischen Verschiebung und der Multiplizität die Berechnung des Integrals der Fläche eines NMR-Signals. Mit Hilfe der Integration kann die Protonenzahl bestimmt werden.

Die Aufspaltung der einzelnen Signale wird zunächst außer Acht gelassen und nur der Schwerpunkt der Signale betrachtet. Den genauen Wert der chemischen Verschiebung dieser Signale kann mittels der Software mit Hilfe des Peak Picking bestimmen werden. Über die Lage der Signale können Aussagen über mögliche Molekülgruppen getroffen werden. So liegt beispielsweise das Signal der Methylprotonen in der Regel zwischen 1 ppm und 4 ppm und das der aromatischen Gruppen zwischen 5 ppm und 8 ppm.⁸⁷

Dann kann durch die Auswertungssoftware die Integration durchgeführt werden, was durch eine Treppenkurve über dem Signal dargestellt wird. Anhand dieses Integrals kann nicht zwangsweise auf die genaue Anzahl der Protonen geschlossen werden, wohl aber auf das Verhältnis der Protonen zwischen den verschiedenen Signalen. Mit Hilfe der Aufspaltungsregeln können weitere Rückschlüsse über die Signale der Protonengruppen getroffen werden. Zuletzt können die Einzelinformationen zu einer Gesamtaussage über die Strukturformel des Moleküls verknüpft werden. Wenn die Atomkerne mit zwei unterschiedlichen Nachbarn koppeln, gilt Formel 3⁹³:

Formel 3⁹³:

$$M = (N_1+1)(N_2+1)$$

N_1 bzw. N_2 repräsentieren die Anzahl der äquivalenten Nachbarprotonen,

M repräsentiert die Multiplizität.

2.1.3 Messungen der ¹H-NMR-Spektren

Die Messungen wurden an einem Fourier 300 (¹H; 300 MHz) (*Bruker Biospin*, Rheinstetten, Deutschland) bei 298 K durchgeführt. Die Messungen der ¹H-NMR-Spektroskopie wurden in Zusammenarbeit mit Dr. rer. nat. Michael Lübtow an dem Lehrstuhl für Chemische Technologie der Materialsynthese an der Universität Würzburg durchgeführt. Um die Substanzen im hochauflösenden NMR zu messen, bedarf es eines Lösungsmittels, in dem jeweils die Testsubstanzen (1 mg) gelöst wurden. Hierfür wurde ein deuteriertes Lösungsmittel verwendet, bei dem alle Wasserstoffatome durch Deuteriumatome (²H) ausgetauscht wurden. Deuterium verfügt als Spin-1-Kern ebenfalls über ein Magnetfeld, das allerdings aufgrund seiner Resonanzfrequenz sehr weit von den Signalen der Protonen entfernt ist und somit nicht mit diesen interferiert.⁹⁴ Zudem würde es bei der Verwendung von protonenhaltigen Lösungsmitteln zu Überlagerungen der Signale kommen. Allerdings beträgt bei den verwendeten Lösungsmitteln die Substitution der Wasserstoffatome nicht ganz 100 %, so dass ein Signal des Lösungsmittels TMS als Referenzwert genutzt wurde. Bei den beschriebenen Messungen wurde deuteriertes DMSO-*d*₆ als Lösungsmittel eingesetzt, bei dem das Referenzsignal bei 2,5 ppm liegt. Die Auswertung der Spektren hinsichtlich der chemischen Verschiebung und der Peak-Integrale erfolgte über das NMR-Programm *MestreNova* 12.0.4 (*Mestrelab Research*).

Mittels der ¹H-NMR-Spektroskopie wurden die Substanzen Propofol, β-CD, HPβCD, Propofol/HPβCD und Na-Propofolat/HPβCD gemessen. β-CD ist nicht Teil der weiteren Untersuchungen der Arbeit und wurde ausschließlich in der ¹H-NMR-Spektroskopie als Referenz untersucht, um die Zuordnung der Signale für das Cyclodextrinderivat HPβCD zu erleichtern.

2.2 Molekulare Modellierungen

2.2.1 Molekulares Docking mit *Autodock v.4.2.5.1*

Um die gegenseitige Orientierung von Gast- und Wirtsmolekül besser zu verstehen, wurden 3D-Modellierungen vorgenommen. Auf diese Weise sollen weitere Rückschlüsse auf die Struktur der Substanzen gezogen werden. Insbesondere die Protein-Ligand-Wechselwirkungen spielen eine entscheidende Rolle für die pharmazeutische Anwendung und werden zunehmend Teil von Untersuchungen.⁹⁵ Molekulares Docking bildet dabei die Möglichkeit, eine Orientierung für die Interaktion zwischen Makromolekülen und Proteinen zu geben. Dabei wird mittels unterschiedlicher Algorithmen versucht, eine energetisch und geometrisch passende Verbindung zu simulieren.⁹⁵ Die dazu verwendeten Funktionen sollen dabei die Bindungsenthalpiewerte (ΔG_{bind}) der Protein-Ligand-Wechselwirkungen vorhersagen.⁹⁵

An Na-Propofolat/HP β CD und an Propofol/HP β CD wurden diese Modellierungen durchgeführt. Dafür wurde das Propofol-Molekül aus der chemischen Datenbasis *PubChem* verwendet. Zur Beurteilung der Form der Kavität des β -Cyclodextrinrings wurde das Programm *PyMol v.1.2* benutzt. Die nahezu kreisförmige Struktur ist in Abbildung 6 gezeigt.

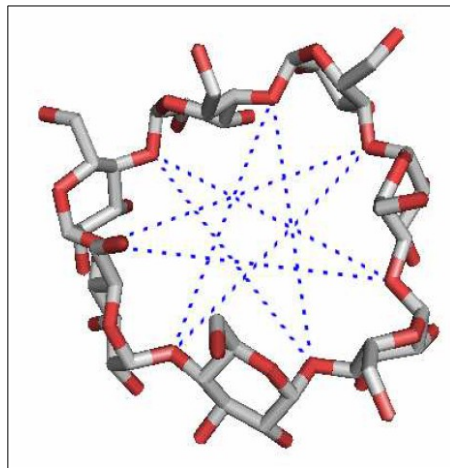


Abb. 6: Mit *PyMol* berechnete Struktur des β -Cyclodextrins⁹⁶ (Die Erlaubnis des Verlags zur Nutzung der Abbildung liegt vor)

Die Struktur für das HP β CD wurde ebenfalls mit Hilfe der Software *PyMol v.1.2* erstellt. Wie auch in früheren Arbeiten anderer Autoren wurden die simulierten Strukturen mit der Software *GTKDynamo v.1.8.1* in einheitlicher Größenskala für einen räumlichen Vergleich dargestellt.^{97,98} Für die zentralen Modellierungen wurde die Software *AutoDock v.4.2.5.1* verwendet, in welche die Software *PyMol v.1.2* integriert wurde.^{98,99} Auf diese Weise wurden die Bindungsenthalpiewerte (ΔG_{bind}) berechnet.⁹⁸ Die molekularen Modellierungen wurden mit freundlicher Unterstützung von Herrn Dr. Shityakov durchgeführt.

2.2.2 Molekulardynamik-Simulationen

Im Unterschied zu den statischen Berechnungen mit der Software *Autodock* wurden zur weiteren Strukturanalyse der dynamischen Aspekte der Substanzen Molekulardynamik-Simulationen verwendet. Dieses Verfahren wurde ausgewählt, um die Dynamik von größeren molekularen Systemen abbilden zu können.¹⁰⁰ Mittels den Molekulardynamik-Simulationen sollen die Bewegungen eines Molekülkomplexes in einem Koordinatensystem dargestellt werden. Durch die Zufuhr von Energie wird die Beweglichkeit der Moleküle erhöht. Insbesondere werden schwächere Bindungen gelockert und das Molekül kann in energetisch stabilere Konfigurationen wechseln.

Die Molekulardynamik-Simulationen wurden für die Substanzen Propofol/HP β CD und Na-Propofolat/HP β CD durchgeführt. Dazu wurde das *Amber Molecular Dynamics Package 12* sowie *GAFF (General Amber Force Field)* und *GLYCAM_06j-1* verwendet.¹⁰¹ Zur graphischen Darstellung wurde *ROSETTA v.5.98* verwendet, um die Verbindungen zwischen Propofol und dem Cyclodextrinderivat abzubilden.^{101,102} Wie auch in vorherigen Studien anderer Autoren wurde die Länge der kovalenten Bindungen mittels dem *SHAKE Algorithmus* bestimmt.^{70,102} Die Simulationen erfolgten in 2,0 fs Intervallen. Für die Molekulardynamik-Simulationen wurde der übliche Zeitraum von insgesamt 50 ns erfasst.¹⁰¹ Die Molekulardynamik-Simulationen wurden mit freundlicher Unterstützung von Herrn Dr. Shityakov durchgeführt.

2.3 Differential Scanning Calorimetry (DSC)

2.3.1 Grundlagen der DSC

Als Methode der thermischen Analytik dient die DSC unter anderem zur Bestimmung von Phasenübergängen erster und zweiter Ordnung. Zudem können Wärmekapazitäten und Schmelz- oder Verdampfungspunkt bestimmt werden. Es können aber auch chemische Prozesse untersucht werden. Gegebenenfalls können Aussagen über die Reinheit der Proben getroffen werden, da die gemessenen Werte Rückschlüsse über die Menge ggf. vorhandener Verunreinigungen zulassen.¹⁰³

Bei einer DSC-Messung wird eine Referenz und die zu untersuchende Substanz bei linearem Temperaturanstieg erwärmt. Mit Hilfe von Widerstandsthermometern werden die Temperatur der Referenz und die Proben temperatur kontinuierlich abgeglichen.¹⁰⁴ Messgröße ist die Differenz der Heizspannung, die erforderlich ist, um die Referenz und die zu untersuchende Probe beim Erwärmen auf jeweils gleicher Temperatur zu halten. Die Wärmekapazität ergibt sich aus der Probeneinwaage und der Steigung der Messkurve.

Entscheidend ist, dass die Probe und die Vergleichssubstanz stets die gleiche Temperatur haben. Bei einem entstehenden Temperaturunterschied wird die kältere Seite stärker beheizt, bis die Temperaturdifferenz ausgeglichen ist. Dies wird über getrennte elektrische Heizelemente für die Probe und die Vergleichssubstanz ermöglicht.¹⁰⁴ Phasenübergänge erster Ordnung in der Probe führen zu einer veränderten Wärmezufuhr, die als Ausschlag (Peak) in der DSC-Kurve dargestellt ist. Phasenübergänge zweiter Ordnung führen zu einer Stufe in der Kurve. Als Vergleichssubstanz wird eine Inertsubstanz verwendet, die keine Phasenübergänge in dem untersuchten Temperaturbereich zeigt.¹⁰⁴ Zur Validierung der Messergebnisse wurden zwei identische Messzyklen durchgeführt.

2.3.2 DSC-Messungen der Testsubstanzen

DSC-Messungen wurden bereits wiederholt für die Analyse von Cyclodextrin-Einschlusskomplexen verwendet.^{105–107} Entsprechend früherer Untersuchungen von Cyclodextrinderivaten erfolgte ein Temperaturanstieg von 10 °C/min.¹⁰⁸ Aufgrund von DSC-Messungen wurde bereits für HPβCD die Bildung von Einschlusskomplexen mit anderen Substanzen vermutet.¹⁰⁹ Um eine potentielle Bildung von Einschlusskomplexen zwischen Propofol und den Cyclodextrinderivaten nachzuweisen, wurden auch in dieser Arbeit DSC-Messungen verwendet. Durchgeführt wurden die Versuche an einem DSC 204 F1 Phoenix, der Firma *NETZSCH* (Selb, Deutschland) mit einem CC200 F1 Controller (*NETZSCH*). Die DSC-Messungen wurden in Zusammenarbeit mit Dr. rer. nat. Michael Lübtow an dem Lehrstuhl für Chemische Technologie der Materialsynthese an der Universität Würzburg durchgeführt. Die Proben wurden in einem Aluminiumtiegel erhitzt. Als Referenz diente ein leerer Aluminiumtiegel. Die Messungen wurden in Stickstoffatmosphäre bei einem Volumenfluss von 20 mL/min N₂ und einer Aufheizrate von 10 °C/min im Bereich 0 °C bis 280 °C vorgenommen. Die DSC-Messungen wurden für die Substanzen HPβCD, Propofol/HPβCD und Na-Propofolat/HPβCD durchgeführt.

2.4 Zytotoxizitätstests

Durch die Interaktion mit den zu testenden Substanzen ergibt sich eine vielfältige Beeinflussung der Zellen, die bis hin zur Apoptose bzw. zur Nekrose reicht.^{110,111} Die Tests stellen daher eine wichtige Möglichkeit zur Evaluation der Zytotoxizität in Zusammenhang mit der medikamentösen Applikation dar. Propofol wurde bereits als Auslöser der Apoptose bei HL-60-Zellen durch eine dosisabhängige Inhibition beschrieben.¹¹⁰ Zudem konnte eine nekrotische Wirkung durch Propofol für diese Zelllinie nachgewiesen werden.¹¹¹ Durch *McKune et al.* wurde bereits die Toxizität des Propofols mit einem LD₅₀-Wert von 53 mg/kg für Mäuse und 42 mg/kg für Ratten nach der intravenösen Injektion und einem LD₅₀-Wert von 1230 mg/kg für Mäuse und 600 mg/kg für Ratten nach der oralen Applikation des Narkotikums in Form einer Sojaöllösung beschrieben.¹¹² Über welche Mechanismen Propofol die apoptotische Wirkung entfaltet, ist weiterhin Gegenstand der Forschung. Beispielsweise konnte nachgewiesen werden, dass die Glykogensynthase-Kinase 3 (GSK-3) eine Rolle spielt.¹¹³ Als neuere Entwicklung konnte aufgrund des apoptotischen Effektes des Propofols eine Reduktion der Tumorzellen für verschiedene Tumorentitäten nachgewiesen werden. So konnten beispielsweise für gastrointestinale Karzinome,¹¹⁴ Bronchialkarzinome¹¹⁵ und Prostatakarzinome¹¹⁶ entsprechende Effekte gezeigt werden. Dies kann zu weiterem Nutzen des antikarzinogenen Effektes und zu verstärktem Einsatz des Narkotikums in den Operationen der betreffenden Fachbereiche führen, wie es bereits vorgeschlagen wurde.^{114,115}

Es wurden in dieser Arbeit mit dem MTT-Test, LDH-Assay und dem EZ4U-Test drei verschiedene Verfahren zur Analyse der Zytotoxizität angewendet.

Für die drei Testverfahren wurden CerebEND-Zellen verwendet. CerebEND-Zellen werden als immortalisierte, endotheliale Zelllinie gewonnen und entstammen dem Kleinhirn neonataler Mäuse.⁷⁸ Durch die Monoschichten der länglichen Zellen wird eine dem Kleinhirn morphologisch ähnliche Barriere

gebildet, die zum Teil aus Zell-Zell-Verbindungen mit Claudin-5-, Occludin- und VE-Cadherin-Proteinen besteht.⁷⁸ CerebEND-Zellen eignen sich somit besonders für die Untersuchung von Prozessen an der Blut-Hirn-Schranke. Für Propofol/HP β CD und Na-Propofolat/HP β CD stellen die BHS-Interaktionen ein wichtiges Kriterium dar, da die narkotisierende Wirkung des Propofols erst nach Übertritt über diese natürliche Zellbarriere entfaltet werden kann. Die Zytotoxizität der Substanzen für diese endotheliale Zelllinie ist somit von entscheidender Bedeutung.

Zur Durchführung der drei Testverfahren musste zunächst das Verteilungsvolumen des Propofols kalkuliert werden. Die Dosis des Propofols wurde aus der Literatur übernommen und betrug 26 mg/kg (26 μ l/g).⁷⁰ Für das Gewicht der Maus wurde der Literatur entsprechend von einem Wert von 25 g ausgegangen.¹¹⁷ Auf diese Weise konnte die gesamte Dosis des Propofols pro Maus aus dem Produkt des Gewichtes sowie der Propofol-Dosis mit 650 μ g/Maus bestimmt werden. Als *lean body mass water content* der Mäuse wurde basierend auf der Arbeit von *Widdowson and Dickerson et al.* ein Wert von 78 % verwendet.¹¹⁸ Diese hatten für ausgewachsene Säuger einen Wassergehalt der Körpermasse von 72,0-78,0 % errechnet.¹¹⁸ Auf dieser Grundlage wurde ein H₂O-Volumen der Mäuse von 19,5 ml als 78 % des 25 g Gesamtgewichts ermittelt. Daher wurde von einer Propofol-Konzentration von 33.3 μ g/ml der Mäuse ausgegangen. Dieser Wert ergibt sich aus dem Quotienten der Propofol-Dosis (650 μ g/Maus) und des H₂O-Volumens (19,5 ml/Maus). Als *Active Pharmacological Ingredient* (API) Gehalt wurde von Cyclolab ein Wert von 6,6 % w/w für den Gehalt des Propofols innerhalb des Na-Propofolat/HP β CD übernommen.⁷⁰

So ergibt sich aus dem Verhältnis von Propofol (6,6 %) zu dem gesamten Na-Propofolat/HP β CD (100 %) ein gerundeter Wert von 15,15 ($100/6,6 \approx 15,15$). Dieser Wert wurde mit der oben berechneten Menge von 650 μ g/Maus an Propofol multipliziert, um die erforderliche Masse an Komplex für jede Messung zu bestimmen. Aus der Menge von 650 μ g/Maus an Propofol und dem H₂O-Volumen der Mäuse (19,5 ml) resultiert die Konzentration pro Milliliter

Flüssigkeit von 33,3 µg/ml. Aus dem Produkt von 33,3 µg/ml und 15,15 ergibt sich ein Wert von 504,5 µg/ml für die Komplexe Na-Propofolat/HPβCD und Propofol/HPβCD, der in den folgenden Zytotoxizitätstests verwendet wurde. Der Wert der HPβCD-Konzentration (471,2 µg/ml) ergibt sich aus der Subtraktion der Konzentration des Propofols (33,3 µg/ml) von der Konzentration des Na-Propofolat/HPβCD (504,5 µg/ml). Eine Übersicht über die Kalkulationen gibt Tabelle 3.

Tab. 3: *Kalkulationen für die Zytotoxizitätstests und den Comet-Assay*

Propofol-Dosis	26 mg/kg = 26 µg/g
Gewicht der Maus	25 g
Dosis Propofol/Maus	25g * 26 µg/g = 650 µg/Maus
H ₂ O-Volumen der Mäuse	25g * 78 % = 19,5 ml
Konzentration Propofol	650 µg/Maus / 19,5 ml = 33,3 µg/ml
Konzentration Na-Propofolat/HPβCD	33,3 µg/ml * 15,15 = 504,5 µg/ml
Konzentration Propofol/HPβCD	33,3 µg/ml * 15,15 = 504,5 µg/ml
Konzentration HPβCD	504,5 µg/ml - 33,3 µg/ml = 471,2 µg/ml

2.4.1 MTT-Test

Eine probate Methode zur Messung der Zellproliferation und Vitalität ist der erstmalig 1983 von Mosmann beschriebene MTT-Test.¹¹⁹ Diese Methode basiert auf der Reduktion des gelben, wasserlöslichen Farbstoffs 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) zum blau-violetten wasserunlöslichen Formazan (siehe Abbildung 7).¹¹⁹ Diese Reduktionsreaktion erfolgt durch das Enzym Dehydrogenase mit den Co-Faktoren NADP⁺/NADPH (siehe Abbildung 7).¹²⁰ Durch die mitochondrialen Dehydrogenasen wird der Tetrazoliumring des in die Zelle eingedrungenen MTTs aufgebrochen.¹²¹ Unter der Zugabe von Isopropanol und Chlorwasserstoff (HCl) kann Formazan aus den Zellen gelöst werden.¹²² Gemessen wird die Farbintensität der Lösung aufgrund der vorhandenen Formazankristalle mittels eines ELISA-Photometers.¹²¹ Die Konzentration der blauen Formazankristalle lässt Rückschlüsse auf den Anteil der lebenden Zellen sowie auf ihr Wachstumsverhalten zu.¹²² Der MTT-Test beruht auf einer Korrelation zwischen der Zahl der lebenden Zellen und der ermittelten Extinktion, da ein direkt proportionales Verhältnis zwischen der Zellzahl der vitalen Zellen und dem gebildeten Formazan besteht (siehe Formel 4).^{119,121}

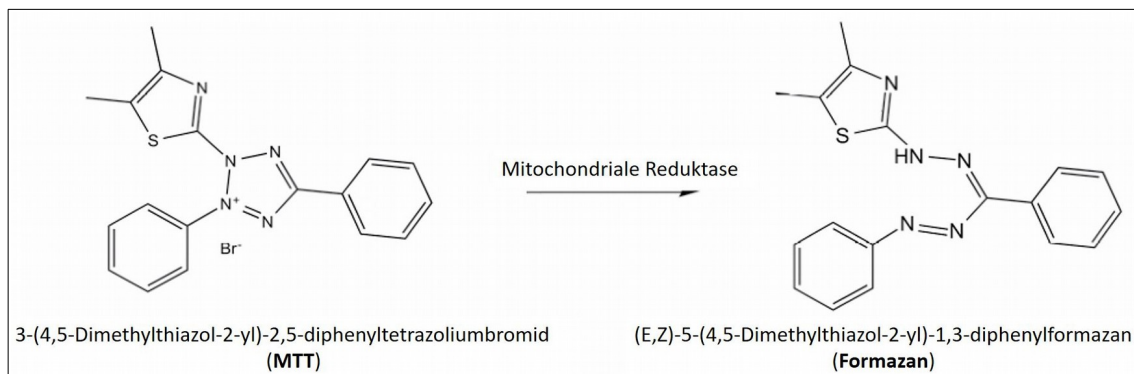


Abb. 7: Darstellung der Reduktionsreaktion des MTT-Tests¹²³

Formel 4a¹²⁴:

$$\text{Zellvitalität (\%)} = (100 - \text{Zytotoxizität (\%)})$$

wobei:

$$\text{Zytotoxizität(\%)} = \frac{\text{opt. Dichte Kontrollzellen} - \text{opt. Dichte der mit Testsubstanz behandelten Zellen}}{\text{optische Dichte der Kontrollzellen}} * 100$$

Die Zellkulturen für den MTT-Test wurden mit 3×10^3 Zellen pro Well mit je 100 μl Zellkulturmedium auf einer 96-Mikrotiterplatte angesetzt. Als Positivkontrolle (PK) wurden Zellen verwendet, zu denen ausschließlich Zellkulturmedium hinzugegeben wurde. Auf die PK wurden die Messergebnisse referenziert. Als weitere Positivkontrolle wurde die Zellen mit einer Mischung aus Zellkulturmedium (90 %) mit hitzeinaktiven fetalem Kälberserum (FCS) (10 %) ausgesät. FCS dient den Zellen zum optimierten Wachstum durch die Versorgung mit Proteinen und Spurenelementen, wobei die genaue Rolle des FCS nicht endgültig geklärt ist.¹²⁵ Als Negativkontrolle wurde eine Wellreihe der Mikrotiterplatte ohne Zellen (NK) sowie eine Lösung aus Zellkulturmedium (90 %) und Dimethylsulfoxid (DMSO) (10 %) gewählt. Als Substanzen wurden entsprechend der unter 2.3. dargestellten Kalkulation Propofol, Propofol/HP β CD und Na-Propofolat/HP β CD getestet.

Nach dem zweimaligen Waschen mit Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) (pH: 7,2) wurden die angefertigten Lösungen aus Substanzen und Zellkulturmedium sowie die Kontrollsubstanzen zu den jeweiligen Proben in die Wells der Mikrotiterplatte hinzugegeben und für 24 Stunden bei 37 °C in den Inkubator platziert. Anschließend wurden 100 μl der vorher zubereiteten, lichtempfindlichen MTT-Arbeitslösung, die zu 90 μl aus Zellkulturmedium und zu 10 μl aus MTT-Stammlösung (5 mg/ml) angefertigt wurde, zu je einem Well der Mikrotiterplatte hinzugeben und für vier Stunden inkubiert. Im Anschluss wurden die Überstände abgesaugt und je 100 μL einer Lösung aus 14,4 ml Isopropanol und 600 μl Chlorwasserstoffsäure (HCl) (0,1 mol/l) zu je einem Well der Mikrotiterplatte hinzugefügt. Nach lichtgeschütztem und kreisförmigem Schütteln für zehn Minuten erfolgte die Auswertung mit Hilfe des *Magellan*

Tecan Programmes. Der Literatur entsprechend erfolgten die Messungen photometrisch bei einer Wellenlänge von 570 nm, da bei dieser Wellenlänge das Absorptionsmaximum für MTT-Formazan liegt, und einer Referenzwellenlänge von 620 nm.¹²⁶

Der MTT-Test wurde in jeweils drei verschiedenen Versuchen und an drei unterschiedlichen Tagen an CerebEND-Zellen für die Substanzen HP β CD, Propofol, Propofol/HP β CD, Na-Propofolat/HP β CD, einer Positivkontrolle mit Zellen mit Zellkulturmedium (PK) sowie mit einer Lösung aus Zellkulturmedium mit FCS, einer Negativkontrolle ohne Zellen (NK) und einer Negativkontrolle mit einer Lösung aus Zellkulturmedium und DMSO durchgeführt.

2.4.2 Laktatdehydrogenase-Assay (LDH-Assay)

Das Prinzip des LDH-Assays basiert auf der Bestimmung der Enzymaktivität der Laktatdehydrogenase im Extrazellularraum.¹²⁷ Das in allen menschlichen Zellen vorkommende LDH ist ein stabiles, zytoplasmatisches Enzym, das die Reaktion von L-Lactat und NAD^+ zu Pyruvat und NADH/H^+ katalysiert.¹²⁸ Bei einer Zellmembranschädigung gelangt LDH zügig in das Zellkulturmedium, wo es mit Hilfe des aus zwei Schritten bestehenden enzymatischen LDH-Assays quantifiziert werden kann.¹²⁷ Die vorgefertigten Reagenzien des LDH-Assays ermöglichen es, NAD^+ zu NADH/H^+ im ersten Schritt durch LDH zu reduzieren, während Laktat zu Pyruvat oxidiert wird.¹²⁸ Durch das Enzym Diaphorase findet im zweiten Schritt die Reduktion des schwach gelb gefärbten Tetrazolium-Salzes INT (2-[4-Iodophenyl]-3-[4-nitrophenyl]-5-phenyltetrazoliumchlorid) zu dem charakteristisch rötlichen Formazansalz bei gleichzeitiger Oxidation von NADH/H^+ zu NAD^+ statt (siehe Abbildung 8).¹²⁹

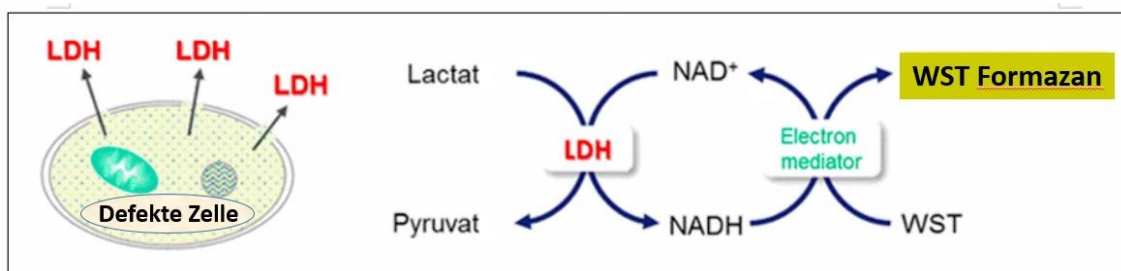


Abb. 8: Darstellung der beiden Reaktionsschritte des LDH-Assays (WST: wasserlösliches Tetrazoliumsalz)¹³⁰

Der Anteil der zerstörten Zellen ist proportional zu der extrazellulären LDH-Menge. Diese wiederum korreliert mit der Menge des entstandenen rötlichen Formazansalzes und korrespondiert somit mit einer Zunahme der Zellschädigung. Die Zytotoxizität des LDH-Assays resultiert insbesondere aus der Membrantoxizität.¹²⁸ Wie beim MTT-Test wurden die Zellkulturen mit 3×10^3 Zellen pro Well mit je $100 \mu\text{l}$ Zellkulturmedium pro Well auf einer 96-Mikrotiterplatte angesetzt. Wie beim MTT-Test wurden als Positivkontrollen Zellen mit und ohne Zusätzen (10 % FCS) ausgesät. Auf die PK wurden die

Messergebnisse referenziert. Als Negativkontrollen wurden eine Lösung aus Zellkulturmedium (90 %) und DMSO (10 %) sowie eine Wellreihe ohne Zellen (NK) verwendet. Nach dem zweimaligen Waschen mit Mg^{2+} - und Ca^{2+} -haltiger Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS-Ca-Mg-Puffer, pH 7,2) wurden entsprechend Tabelle 3 die angefertigten Testsubstanzen und die Kontrollproben zu den jeweiligen Proben auf der Mikrotiterplatte hinzugegeben und für 24 Stunden bei 37 °C in den Inkubator platziert. Nach dem zweimaligem Waschen mit Mg^{2+} - und Ca^{2+} -haltiger PBS wurden 5 μ L des Lyse-Puffers des *Cytotoxicity Detection Kits* des LDH-Assays und 100 μ L des Mediums zu der Mikrotiterplatte hinzupipettiert und für 15 Minuten bei 37 °C in den Inkubator gestellt. Danach wurde ein Reaktionsmix aus dem Katalysator des *Cytotoxicity Detection Kits* des LDH-Assays und der Farbstofflösung des *Cytotoxicity Detection Kits* des LDH-Assays im Verhältnis 1 : 45 erstellt, von dem 100 μ L zu allen Wells der Mikrotiterplatte pipettiert und 10 Minuten unter Lichtabschluss bei Raumtemperatur gelagert wurde. Zum Abschluss wurden 50 μ L der Stocklösung des *Cytotoxicity Detection Kits* des LDH-Assays hinzugefügt und zum Durchmischen auf den Laborschüttler gestellt. Im Anschluss wurde die Messung mit Hilfe des Auswertungsprogrammes *Magellan Tecan* der Literatur entsprechend bei 492 nm ausgewertet.¹³¹ Der LDH-Assay wurde unabhängig voneinander an CerebEND-Zellen für die Substanzen HP β CD, Propofol, Propofol/HP β CD, Na-Propofolat/HP β CD, einer Positivkontrolle mit Zellen mit Zellkulturmedium (PK) sowie mit einer Lösung aus Zellkulturmedium mit FCS, einer Negativkontrolle ohne Zellen (NK) und einer Negativkontrolle mit einer Lösung aus Zellkulturmedium und DMSO an drei verschiedenen Tagen wiederholt.

2.4.3 XTT-Tetrazoliumreduktionstest (EZ4U-Test)

Der EZ4U-Test ist ein weiterer Test zur Messung der Zellproliferation und Zelltoxizität und beruht im Wesentlichen auf dem Verfahren des MTT-Tests.¹³² Ähnlich dem MTT-Test basiert der EZ4U-Test auf der Reduktion von leicht gefärbten Tetrazoliumsalzen zu rötlich gefärbten Formazanfarbstoffen mit der Hilfe von mitochondrialen Dehydrogenasen.^{133,134} Die Durchführung des EZ4U-Tests erfolgte zusätzlich zu dem MTT-Test aufgrund der in der Literatur beschriebenen hohen Spezifität des EZ4U-Tests gegenüber weiteren Zytotoxizitätstests.¹³⁵ Entsprechend anderer Studien zielt die Ergänzung der Zytotoxizitätstests durch den EZ4U-Test darauf ab, die Evidenz hinsichtlich einer potentiellen Zytotoxizität zu erhöhen.¹³⁶ Zudem konnte für den EZ4U-Test neben der einfachen Anwendung auch eine hohe Stabilität der eingesetzten Reagenzien bei unterschiedlichen Lagerbedingungen mit verlässlichen Resultaten nachgewiesen werden.¹³⁷

Wie bei dem MTT-Test besteht eine direkte Korrelation zwischen der Anzahl der lebenden Zellen und der Menge der rötlichen Formazanderivate, ohne dass die Proliferation der Zellen aufgrund der fehlenden Toxizität der Tetrazoliumsalze beeinflusst wird.¹³⁵ Im Gegensatz zum MTT-Test mit einem unlöslichen Formazan als Resultat der Reduktion wird das Tetrazoliumsalz des EZ4U-Tests in ein lösliches Formazan umgewandelt.¹³⁷ Auf diese Weise entfällt der Lösungsschritt bei dem EZ4U-Test. Weitere Vorteile des EZ4U-Tests sind die vergleichsweise einfache Durchführung durch weniger zeitaufwendiges Pipettieren sowie der Wegfall der toxischen Lösungsmittel bei vergleichbarer Sensitivität der beiden Tests.¹³⁸

Wie beim MTT-Test und dem LDH-Assay wurden die Zellkulturen mit 3×10^3 Zellen pro Well mit je 100 μl Zellkulturmedium pro Well auf einer 96-Mikrotiterplatte angesetzt. Als Positivkontrollen wurden wie beim MTT-Test Zellen ausschließlich mit Zellkulturmedium (PK) sowie mit einer Mischung aus Zellkulturmedium (90 %) und hitzeinaktivem fetalem Kälberserum (FCS) (10 %)

angesetzt. Als Negativkontrollen wurden eine Lösung aus Zellkulturmedium (90 %) und DMSO (10 %) sowie eine Wellreihe ohne Zellen (NK) verwendet. Nach dem zweimaligen Waschen mit Mg^{2+} - und Ca^{2+} -haltiger Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS-Ca-Mg-Puffer, pH 7,2) wurden die vorher nach den Berechnungen der Tabelle 3 angefertigten Testsubstanzen und die Kontrollsubstanzen zu den jeweiligen Wells der Mikrotiterplatte hinzugegeben und für 24 Stunden bei 37 °C in den Inkubator platziert. Nach erneutem Waschen der einzelnen Wells der Mikrotiterplatte mit PBS wurde eine Lösung aus 200 μ L Dimethylether (DME) mit je 20 μ L EZ4U-Reagenz zu den einzelnen Wells der Mikrotiterplatte hinzugefügt und für mindestens 60 bis maximal 120 Minuten in den Inkubator gestellt. Im Anschluss diente das *Magellan Tecan* Programm zur Auswertung der spektrophotometrischen Messung, die der Literatur entsprechend bei einer Wellenlänge von 450 nm mit einer Referenzwellenlänge von 590 nm erfolgte.¹³⁹ Die Versuche wurden drei Mal unabhängig voneinander an drei verschiedenen Tagen an CerebEND-Zellen für die Substanzen HP β CD, Propofol, Propofol/HP β CD, Na-Propofolat/HP β CD, einer Positivkontrolle mit Zellen mit Zellkulturmedium (PK) sowie mit einer Lösung aus Zellkulturmedium mit FCS, einer Negativkontrolle ohne Zellen (NK) und einer Negativkontrolle mit einer Lösung aus Zellkulturmedium und DMSO durchgeführt.

2.5 Comet-Assay

2.5.1 Funktionsprinzip des Comet-Assays

Neben Zytotoxizität rücken zunehmend auch weitere Charakteristika der Medikamente wie Mutagenität oder Cancerogenität in den Fokus wissenschaftlicher Untersuchungen.⁷⁹ Im Hinblick auf die Genotoxizität, die die Änderungen des genetischen Materiales einer Zelle beschreibt, kann der Comet-Assay wertvolle Erkenntnisse liefern. Genotoxizität bezieht sich auf die Gesamtheit der Schädigung des genetischen Materials. Diese kann akute und chronische Folgen beinhalten. Basierend auf den Experimenten von *Rydberg und Johanson* beschrieben *Ostling et al.* DNA-Schäden an einzelnen Zellen, die mit Hilfe von *single-cell gel electrophoresis* (Einzelzell-Gelelektrophorese) durchgeführt wurden.¹⁴⁰ Durch das Einführen einer alkalischen Variante des Tests durch *Singh et al.* wurde es möglich, neben den Doppelstrangbrüchen auch Einzelstrangbrüche zu detektieren.⁸⁴ Diese Strangbrüche können als Folge von ionisierenden Strahlen oder durch Einwirkung von Radikalen auftreten.¹³⁰ Eine Vielzahl von genotoxischen Substanzen verursacht über basenlabile Stellen der DNA eine indirekte Einwirkung auf das Erbmateriale.¹⁴² Ab einem pH-Wert > 13 resultieren Bruchstellen in der DNA.¹⁴²

Die Lyse und die Elektrophorese sind im Comet-Assay die zentralen Schritte für die Untersuchung der in Agarose eingebetteten Zellen. Als erstes erfolgt durch die Lyse bei einem pH-Wert zwischen 10-12 die Freilegung der DNA sowie die Denaturierung durch die alkalische Umgebung. Die Denaturierung bewirkt das Trennen der Wasserstoffbrückenbindungen.¹⁴¹ Es resultiert eine Spaltung der Doppelstränge in einzelne Stränge der DNA. Im Anschluss werden die fragmentierten Bruchstränge mit Hilfe der Elektrophorese bei einem pH-Wert von über 13 ihrer Größe entsprechend im Agarosegel separiert.⁸¹

Ausgehend von den Enden der DNA erfolgt die Entwindung der DNA-Doppelhelix.¹⁴³ Dabei variiert die Länge des DNA-Schweifs je nach Umfang und Art der Schädigung des Erbmateriale. Im Gegensatz dazu zeigt sich bei den

nicht geschädigten Zellen eine geringere Veränderung des Zellkerns bei der Auswertung, die mit einem Fluoreszenzmikroskop durchgeführt wird. Als entscheidenden Unterschied zur herkömmlichen DNA-Gelelektrophorese bietet der Comet-Assay die Möglichkeit, die sogenannte DNA-Migration der einzelnen Zelle gezielt mikroskopisch zu evaluieren.¹⁴¹ In Abbildung 9 ist eine Übersicht über das Funktionsprinzip des Comet-Assays dargestellt.^{141,144}

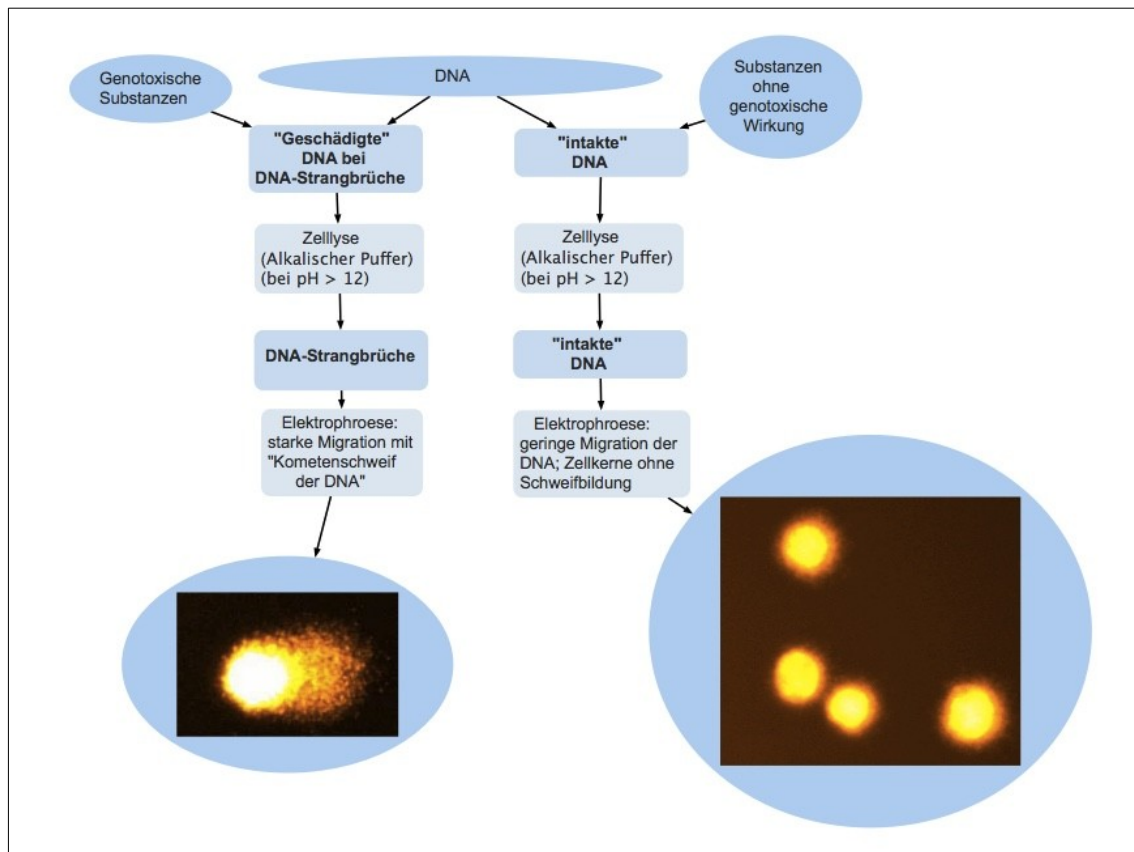


Abb. 9: Darstellung des Funktionsprinzips des Comet-Assays für genotoxische und nicht-genotoxische Substanzen (Eigene Darstellung)

2.5.2 Comet-Assay: Humane Leukämie-HL-60-Zellen

Für den Comet-Assay wurde die Zelllinie humane Leukämie-HL-60-Zellen verwendet. Etabliert wurde diese Zelllinie 1977 aus dem peripheren Blut einer 36-jährigen Nordamerikanerin mit der Diagnose einer akuten myeloischen Leukämie.¹⁴⁵ In verschiedenen Arbeiten wurde für die HL-60-Zellen beschrieben, dass diese Zelllinie auf der Stufe der Promyelozyten verharret.^{146,147} Diese Zelllinie bietet aufgrund der beschriebenen Charakterisierung die Möglichkeit einer genauen Analyse der Signalwege. Daher werden HL-60-Zellen vermehrt zur Testung auf Zytotoxizität verwendet und es konnten bereits für Propofol apoptotische Effekte anhand dieser Zelllinie nachgewiesen werden.¹¹¹ HL-60-Zellen wurden bereits in einigen Fällen zur Durchführung des Comet-Assays eingesetzt.⁸⁵

2.5.3 Comet-Assay: Vorversuche mit H₂O₂

Zum Erlernen der Methodik wurde der Comet-Assay dreimalig mit H₂O₂ als genotoxischer Substanz in unterschiedlichen Konzentrationen und mit bereits bekannten Resultaten durchgeführt, um eine Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten. H₂O₂ neigt zur Bildung von Radikalen, die DNA-Strangbrüche bedingen, und soll als PK in den unter 2.5.3 dargestellten Versuchen der Testsubstanzen verwendet werden.¹⁴² Entsprechend Versuchen anderer Autoren wurde Methylmethansulfonat (MMS) (99 %) als PK verwendet.¹⁴⁸ Als NK wurde H₂O appliziert. Die Objektträger wurden verblindet mikroskopisch untersucht.

Es wurde eine Verdünnung von 1:10 der 30-prozentigen H₂O₂-Lösung mit destilliertem Wasser vorgenommen und die folgenden Mengen der verdünnten Lösung zu den Proben gegeben (siehe Tabelle 4). Die Versuche wurden drei Mal unabhängig voneinander durchgeführt.

Tab. 4: Übersicht über die Mengenangaben der Vorversuche des Comet-Assays

Substanz	Hinzugefügtes Volumen [μl]	Hinzugefügte molare Konzentration [μmol]	Gesamtvolumen pro Well [μl]	Endkonzentration [$\mu\text{mol}/\mu\text{l}$]
1. Negativkontrolle: H_2O	30 μl	1,66 μmol	230 μl	0,01 $\mu\text{mol}/\mu\text{l}$
2. Positivkontrolle: MMS	16,7 μl	150 μmol	216,7 μl	0,69 $\mu\text{mol}/\mu\text{l}$
3. H_2O_2	14,2 μl	12,5 μmol	214,2 μl	0,06 $\mu\text{mol}/\mu\text{l}$
4. H_2O_2	28,3 μl	25 μmol	228,3 μl	0,11 $\mu\text{mol}/\mu\text{l}$
5. H_2O_2	56,7 μl	50 μmol	256,7 μl	0,19 $\mu\text{mol}/\mu\text{l}$
6. H_2O_2	113,4 μl	100 μmol	313,4 μl	0,32 $\mu\text{mol}/\mu\text{l}$

2.5.4 Comet-Assay: Versuche mit den Testsubstanzen

Zur Vorbereitung wurden die HL-60-Zellen mit Hilfe einer Zellkammer mit einem Mikroskop analysiert und ausgezählt. Es wurden $3,5 \times 10^3/\mu\text{l}$ Zellen auf eine 6-Mikrotiterplatte ausgesät. Die Mikrotiterplatte wurde für 30 Minuten in den Inkubator platziert. Entsprechend der zuvor durchgeführten Kalkulationen aus Tabelle 3 wurden die zu testenden Substanzen zu den Proben auf der Mikrotiterplatte gegeben. Als NK wurde entsprechend den Vorversuchen 30 μl H_2O und als PK 50 μmol H_2O_2 gewählt. Diese Dosierung der PK wurde auf Basis der Vorversuche verwendet, da bei dieser Konzentration die Änderungen des DNA-Schweifes in einem gut auswertbaren Bereich liegen. Vorbereitend für die Elektrophorese wurden die 6 Reaktionsgefäße mit je 180 μL der 0,5 % *Low Melting Point*-Agaroselösung (LMP-Agaroselösung) befüllt. Zuvor wurde die 0,5 % LMP-Agaroselösung in einem Wasserbad bei 37 °C temperiert. Nach der 30-minütigen Inkubation wurden von den HL-60-Zellen, die in Reagenzgläsern bei 4 °C gelagert wurden, 20 μL zu den Reaktionsgefäßen hinzupipettiert. Mit wiederum 45 μL der Zell-Agarosemischung wurden die zwei mit 1,5 % *High Melting Point*-Agaroselösung (HMP-Agarose) beschichteten Objektträger bestrichen, um direkt anschließend mit Deckgläsern bedeckt zu werden. Hierbei

wurde die Bildung von Luftblasen vermieden. Die so präparierten Deckgläser konnten, nachdem die Deckgläser nach fünf Minuten entfernt wurden, in der vorgekühlten Küvette mit der vorher angefertigten Lyse-Lösung für mindestens eine Stunde und maximal 24 Stunden bei 4 °C inkubiert werden. In der unter Lichtabschluss in einer Stryoporbox mit Eis gekühlten Elektrophoresekammer wurden die mit destilliertem Wasser abgespülten Objektträger vorsichtig horizontal platziert und vollständig mit dem vorgekühlten Elektrophoresepuffer bedeckt und für 20 Minuten inkubiert. Im Anschluss wurde die Elektrophorese bei einem konstanten alkalischen pH-Wert (>13), einer Spannung von 25 V sowie einer Anfangsstromstärke von 300 mA gestartet. Mit Hilfe der Elektrophorese erfolgte die Aufteilung der DNA-Strangbrüche, wobei die negativ geladenen DNA-Bruchstücke zur Anode wandern. Den DNA-Brüchen entsprechend bilden sich hinter den Zellen aus den Bruchstücken unterschiedlich große und helle „Schweife“, deren Länge bei der Auswertung mit Hilfe der Auswertungssoftware bestimmt wurde (siehe unten).¹⁴³

In den Versuchen wurde die Elektrophoresekammer mit neun Proben und 18 Objektträgern jeweils komplett ausgefüllt. Zur Vermeidung weiterer Brüche der DNA erfolgten die genannten Arbeitsschritte unter möglichst lichtarmen Bedingungen. Im Anschluss an die Elektrophorese wurden die Objektträger mit Neutralisationspuffer (0,4 M Trisaminomethan (Tris) bei einem pH 7,5) dreimal neutralisiert, um das Zurückwinden der DNA zu beschleunigen. Zwischen den Neutralisationsvorgängen wurden die Objektträger bei 4 °C in den Kühlschrank platziert. Anschließend wurde überschüssiger Neutralisationspuffer vorsichtig von den Objektträgern entfernt. Danach wurden die Objektträger mit bei -20 °C vorgekühltem Methanol fixiert und über 24 Stunden bei Raumtemperatur getrocknet. Durch das Fixieren wird sichergestellt, dass die Verteilung der DNA-Bruchstrühe nicht verändert wird und somit für mehrere Tage mikroskopisch untersucht werden kann. Nach dem Auftragen einer Lösung auf die Objektträger (20 ml), die sich im Verhältnis 1:3 aus der Fluoreszenzfarbstoff *Ge/Red* und DABCO zusammensetzt, konnte die Auswertung vorgenommen werden. Pro Testsubstanz wurden 100 nach dem Zufallsprinzip ausgewählte

Zellen (jeweils 50 Zellen pro zwei Objektträgern) ausgewertet. Die Auswertung wurde mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskopes (*Labophot 2*; Nikon GmbH, Düsseldorf, Deutschland) bei 200-facher Vergrößerung vorgenommen. Die Ergebnisse werden in Durchschnitt \pm Standardabweichung angegeben. Als entscheidender Parameter für die Strangbrüche der DNA dient das Schweif-Moment (*Tail moment*). Das Schweif-Moment wird mit Hilfe der Auswertungssoftware Komet 5 (*BFi OPTiLAS*, Gröbenzell, Deutschland) über die Formel 5 berechnet. Die einzelnen Parameter der Formel 5 sind in Abbildung 10 erläutert. Insgesamt wurde der Comet-Assay für die Testsubstanzen drei Mal unabhängig voneinander durchgeführt.

Formel 5¹⁴¹: **Schweif-Moment [μm] = Schweiflänge [μm] * (Schweif-DNA/100)**

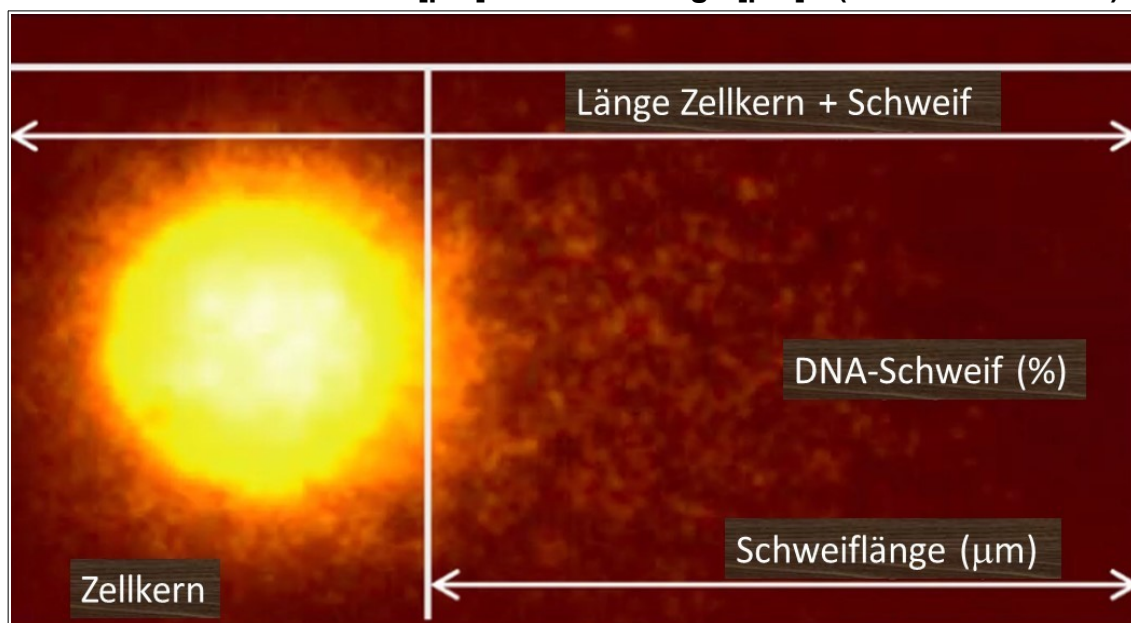


Abb.10: Mikroskopische Auswertung eines Kometenschweifes entsprechend Formel 5; (Fluoreszenzmikroskop *Labophot 2*; Nikon GmbH, Düsseldorf, Deutschland, Auswertungssoftware *Komet 5*; *BFi OPTiLAS*, Gröbenzell, Deutschland)¹⁴⁹ (Eigene Darstellung)

2.6 Statistische Angaben zu den Zytotoxizitätstests und dem Comet-Assay

Mittels der Einstrichproben-t-Tests wurde mit zweiseitiger Hypothese getestet, ob das arithmetische Mittel signifikant von der Positivkontrollen (1.0) der Zytotoxizitätstests und des Comet-Assay verschieden ist. Die Verteilung wurde graphisch verifiziert. Das Signifikanzniveau wurde auf $\text{Alpha}=0,05$ festgesetzt. Wenn angebracht, wurden p-Werte mittels Bonferroni-Methode adjustiert.

3. Ergebnisse

3.1 ¹H-NMR-Spektroskopie

Zur Analyse der Komplexbildung von Propofol/HP β CD und Na-Propofolat/HP β CD wurden ¹H-NMR-Spektren für die Substanzen Propofol, β -CD, HP β CD, Propofol/HP β CD und Na-Propofolat/HP β CD gemessen.

3.1.1 Propofol

Die Abbildung 11 zeigt die Auswertung des ¹H-NMR-Spektrums für Propofol sowie die Zuordnung der Signale entsprechend der chemischen Verschiebungen.

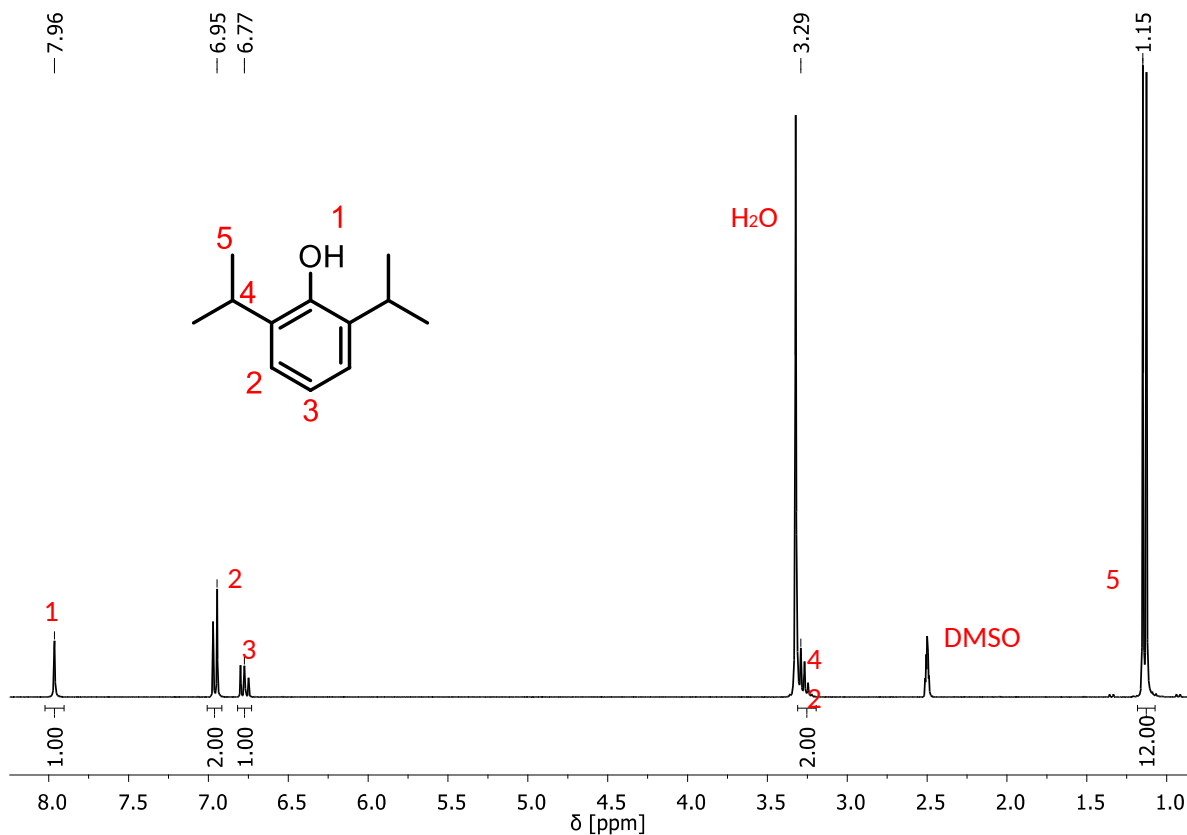


Abb. 11: Struktur und ¹H-NMR-Spektrum für Propofol (DMSO-d₆; 300 MHz; 298 K) (Eigene Darstellung)

Die Integralwerte wurden auf das Proton an Position 1 referenziert, welches auf den Wert 1 festgelegt wurde. Da DMSO-d₆ sehr gut mischbar mit Wasser ist, neigt es dazu, Wasser aus der Luft zu binden. Dadurch entsteht ein charakteristischer Wasserpeak bei 3,29 ppm im ¹H-NMR-Spektrum.^{150,151} Bei 2,5 ppm liegt das Referenzsignal des deuterierten DMSO-d₆.¹⁵⁰

Die Integralflächen unter den Signalen der Wasserstoffatome stimmen mit der bekannten Molekülstruktur überein, die in der Strukturformel nach ihrer Position mit 1-5 markiert sind. So treten sowohl Position 1 (-OH) als auch Position 3 (-CH) im Verhältnis 1 : 2 zu den Positionen 2 (-CH) und 4 (-CH) auf. Aufgrund der

angrenzenden Überlagerung mit dem Wasserpeak bei 3,29 ppm ist Position 4 allerdings schwer abgrenzbar darstellbar. Die Integralfläche der Position 5 korrespondiert mit der Molekülstruktur, da die CH₃-Gruppe entsprechend der Molekülstruktur vierfach repräsentiert ist. Die Hydroxylgruppe hat mit 7,96 ppm eine vergleichsweise hohe Resonanzfrequenz aufgrund der starken Elektronegativität des Sauerstoffes und des Einflusses des aromatischen Rings. Dies führt zu einer geringeren Abschirmung der Atomkerne.⁸⁹

3.1.2 β -Cyclodextrin

Die Abbildung 12 zeigt die Auswertung des $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums für β -Cyclodextrin (β -CD) sowie die Zuordnung der Signale entsprechend der chemischen Verschiebungen. Analog zu Abbildung 12 finden sich bei 2,5 ppm das $\text{DMSO-}d_6$ Signal und bei 3,3 ppm das Wassersignal.

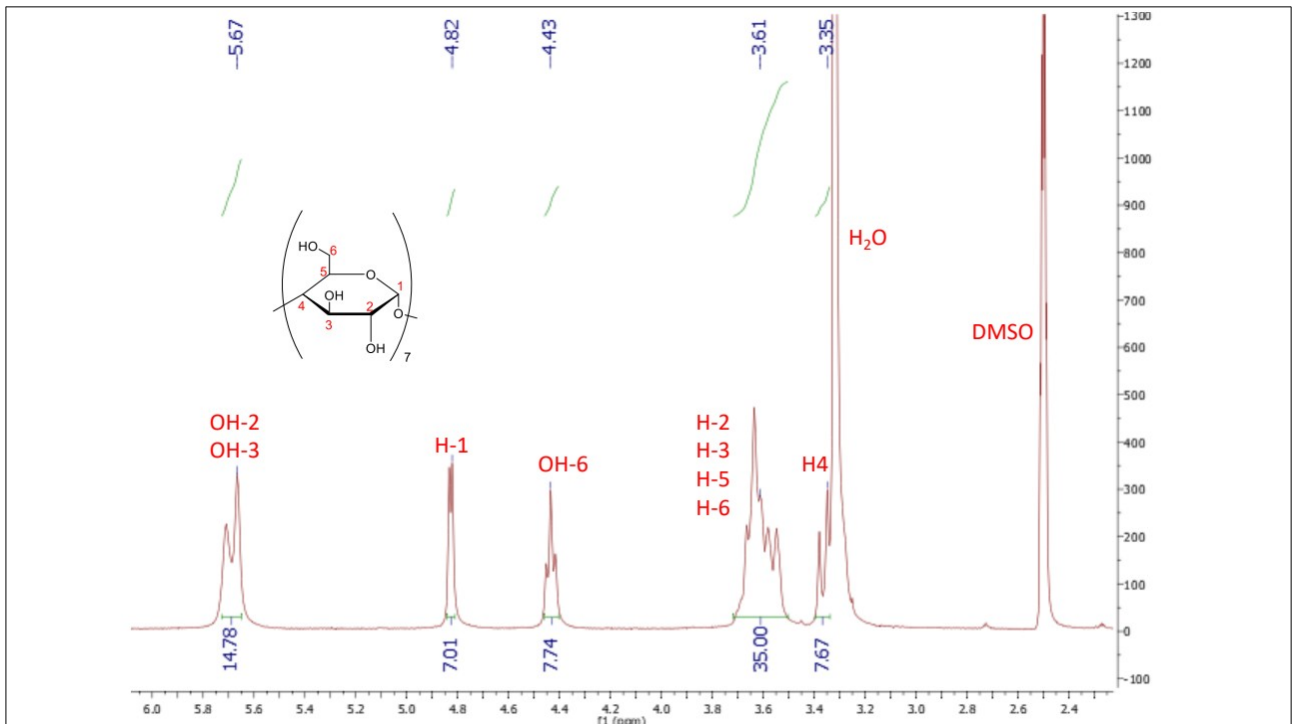


Abb. 12: Struktur und $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum für β -Cyclodextrin (β -CD) ($\text{DMSO-}d_6$; 300 MHz; 298 K) (Eigene Darstellung)

Das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum wurde auf das Proton an Position 1 referenziert, dessen Integralwert auf den Wert 7 festgelegt wurde, um den sieben Glucoseeinheiten des β -CD zu entsprechen. Die Protonen der Positionen 2, 3, 5 und 6 tauchen alle bei einer chemischen Verschiebung von 3,61 ppm auf und entsprechen der fünffachen Integralfäche der Position 1. Dies korreliert mit der Molekülstruktur, da an der Position 6 zwei Protonen und an den Positionen 2, 3 und 5 jeweils ein Proton lokalisiert sind. Das Signal der Position 4 ist wegen der Überlagerung durch das H_2O -Signal nur schwer zu integrieren. Dass im Vergleich zu Position

4 für die Positionen 2, 3, 5 und 6 höhere chemische Verschiebung gemessen wurden, folgt aus der Molekülstruktur. Aufgrund ihrer räumlichen Nähe zu den OH-Gruppen ist eine höhere chemische Verschiebung als für die Position 4 zu erwarten. Die Position 4 zeigt dem Spektrum entsprechend einen niedrigeren Wert in der chemischen Verschiebung. Das Ergebnis steht in Übereinstimmung mit der Literatur.¹⁵²

3.1.3 HP β CD

Die Abbildung 13 zeigt die Auswertung des ^1H -NMR-Spektrums für HP β CD sowie die Zuordnung der Signale entsprechend der chemischen Verschiebungen.

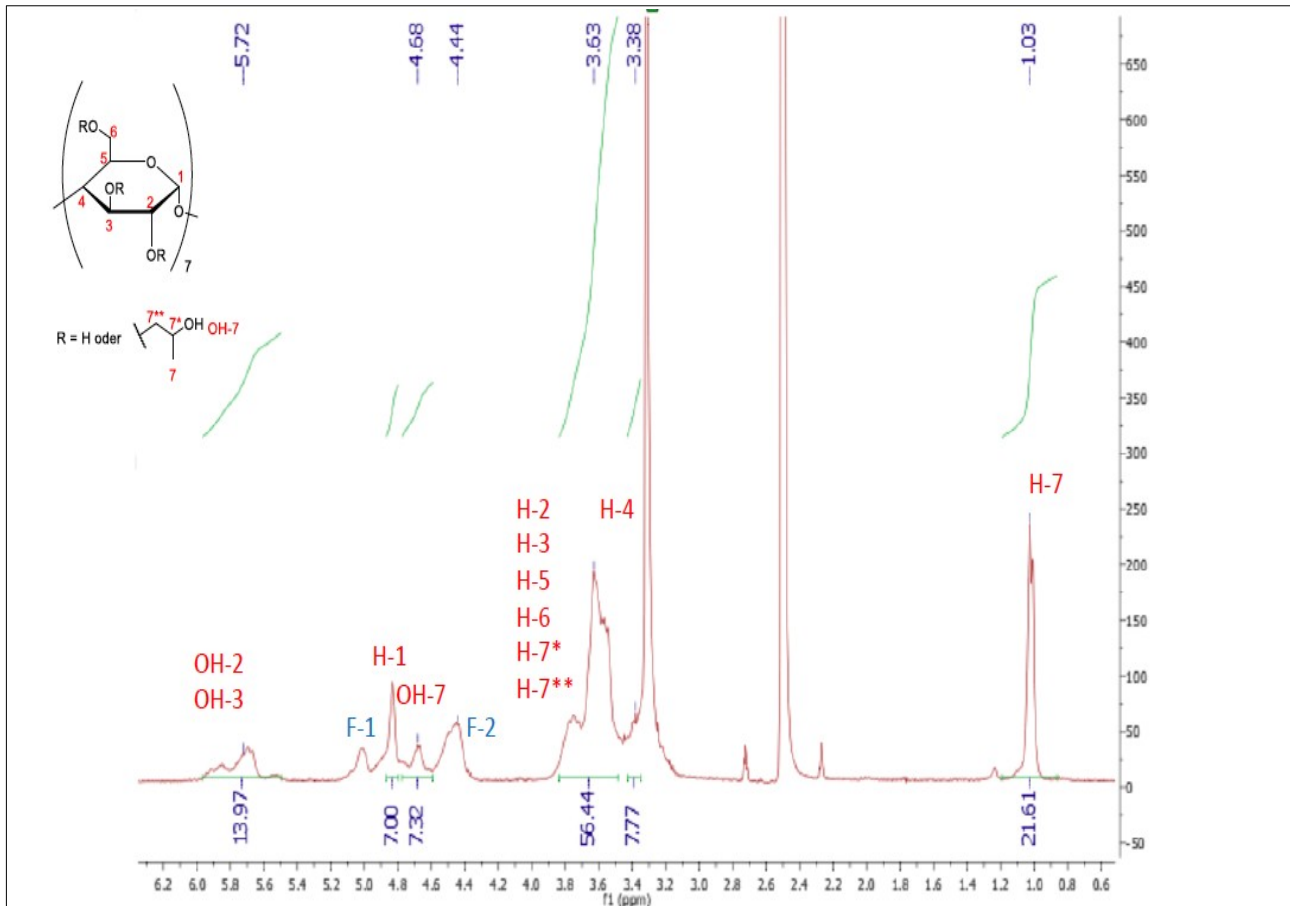


Abb. 13: Struktur und ^1H -NMR-Spektrum für Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin (HP β CD) (DMSO- d_6 ; 300 MHz; 298 K) (Eigene Darstellung)

Dieses ^1H -NMR-Spektrum wurde analog zum Spektrum des β -CD in Abbildung 12 auf H-1 referenziert, dessen Integralwert auf den Wert 7 festgelegt wurde, um den sieben Glucoseeinheiten des β -CD zu entsprechen. In beiden Strukturen (β -CD und HP β CD) liegt H-1 bei der gleichen chemischen

Verschiebung. Die Modifikation des β -CD mit der Hydroxypropyl-Gruppe ($-\text{OCH}_2\text{CHOHCH}_3$) ist in der Abbildung 13 als R gekennzeichnet. Die Gruppe entspricht dem Signal an Position 7. Dementsprechend zeigen sich im Unterschied zum β -Cyclodextrin einige veränderte Signale. Im Unterschied zur Abbildung 12 des β -Cyclodextrins ergeben sich das mit H-7 gekennzeichnete Resonanzsignal bei 1,03 ppm, das mit OH-7 gekennzeichnete Signal bei 4,83 ppm und die Signale des H-7* und des H-7** bei 3,63 ppm. Diese Signale korrespondieren mit der gezeigten Struktur bezüglich der Hydroxypropyl-Gruppe. Durch die Hydroxylgruppe resultiert ein hohes Signal für OH-7, das in einem Verhältnis von 1:1 zu dem H-1 steht und nahelegt, dass OH-7 in der gleichen Häufigkeit wie H-1 in dem Komplex vorhanden ist. Für das Signal H-7 ergibt sich ein Verhältnis von 3:1 zu dem H-1 und korreliert somit mit der Strukturformel und den drei Protonen an dieser Position. Die Signale des H-7* und des H-7** sind durch weitere Signale überlagert. Der Gesamtbetrag der Signale bei 3,63 ppm steht in einem Verhältnis von 8:1 zu dem Signal von H-1. Dies korreliert mit der Strukturformel: An den insgesamt sechs Positionen H-6 und H-7** sind jeweils zwei Protonen und an den Positionen H-2, H-3, H-5 und H-6 jeweils ein Proton lokalisiert. Die Hydroxypropyl-Gruppe liegt somit in einem Verhältnis von 1:1 zu dem H-1 vor. Im Einklang mit den Ergebnissen von β -Cyclodextrin ergibt sich für die Signale von OH-2 und OH-3 ein Verhältnis von 2:1 zu dem Signal des H-1. Somit ergibt sich eine Substitution von einem der insgesamt drei möglichen Hydroxylgruppen mit einer Hydroxypropyl-Gruppe. Für die Signale F-1/F-2 konnte keine Zuordnung gefunden werden. Aufgrund der Breite der Resonanzen ist es möglich, dass die Signale F-1/F-2 durch intramolekulare Wechselwirkungen über Wasserstoffbrückenbindungen zustande kommen. Diese beiden Signale finden sich auch in den Spektren von Propofol/HP β CD und Na-Propofolat/HP β CD (Abbildung 15/16).

Zur Überprüfung der Interpretation des gemessenen ^1H -NMR-Spektrums sowie zur Zuordnung der Resonanzsignale wurde die Software *NMR Predict* verwendet.¹⁵³ Mit Hilfe dieser Software kann zunächst eine Molekülstruktur gezeichnet werden. Anschließend wird auf Grundlage dieser Molekülstruktur ein

^1H -NMR-Spektrum berechnet. Für HP β CD wurde das ^1H -NMR-Spektrum für jeweils mit bis zu drei Isopropylgruppen substituierten Glukoseeinheiten (in der Strukturformel mit R bezeichnet) bei einer Messfrequenz von 300 MHz berechnet. Die besten Übereinstimmungen zeigten sich bei einer Substitution von einer Isopropylgruppe. Die OH-Gruppen sind in den Simulationsrechnungen nicht berücksichtigt. Das Simulationsspektrum ist in Abbildung 14 und die in der Abbildung markierten Positionen sind entsprechend den Protonen aus Abbildung 13 mit ihrer Multiplizität in Tabelle 5 dargestellt. Es zeigt sich eine Übereinstimmung mit dem ^1H -NMR-Spektrum (Abbildung 13) für die Positionen H-3, H-5, H-6, H-7* und H-7** bei einer chemischen Verschiebungen zwischen 3,5 – 3,8 ppm. Im Vergleich dazu zeigt sich bei dem gemessenen Wert von H-4 in Abbildung 13 mit 3,38 ppm ein leicht niedrigerer Wert in der chemischen Verschiebung als der errechnete Wert bei 3,28 ppm. Die Reihenfolge der in der Tabelle 5 dargestellten Protonen des HP β CD entspricht der Literatur.¹⁵⁴

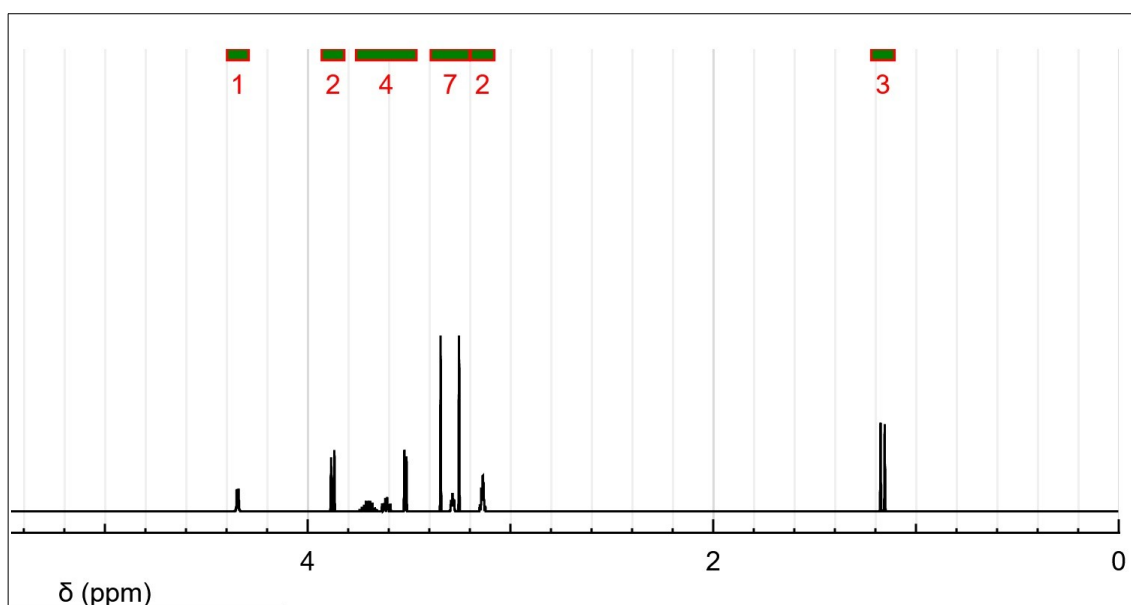


Abb. 14: Simulationsspektrum mit ^1H -NMR Predict für HP β CD (300 MHz), mit der Substitution von einer Isopropylgruppen (Eigene Darstellung)

Tab. 5: Berechnetes $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum für HP β CD, $^1\text{H-NMR Predict}$ (300 MHz)

		Delta (d) (ppm)	Multiplizität
Position 1	H-1	4,34	Singulett (d)
Position 2	H-3	3,8	Dublett (dd)
Position 4	H-5	3,7	Quintett (quin)
Position 4	H-6	3,61	Quartett (q)
Position 4	H-7*	3,52	Dublett (dd)
Position 7	H-2	3,34	Triplet (t)
Position 2	H-4	3,28	Dublett (dd)
Position 3	H-7	1,16	Singulett (d)

3.1.4 Propofol/HP β CD

Die Abbildung 15 zeigt die Auswertung des $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums für Propofol/HP β CD sowie die Zuordnung der Signale entsprechend der chemischen Verschiebungen und ist auf das Signal des $^1\text{H-1}$ des HP β CD referenziert.

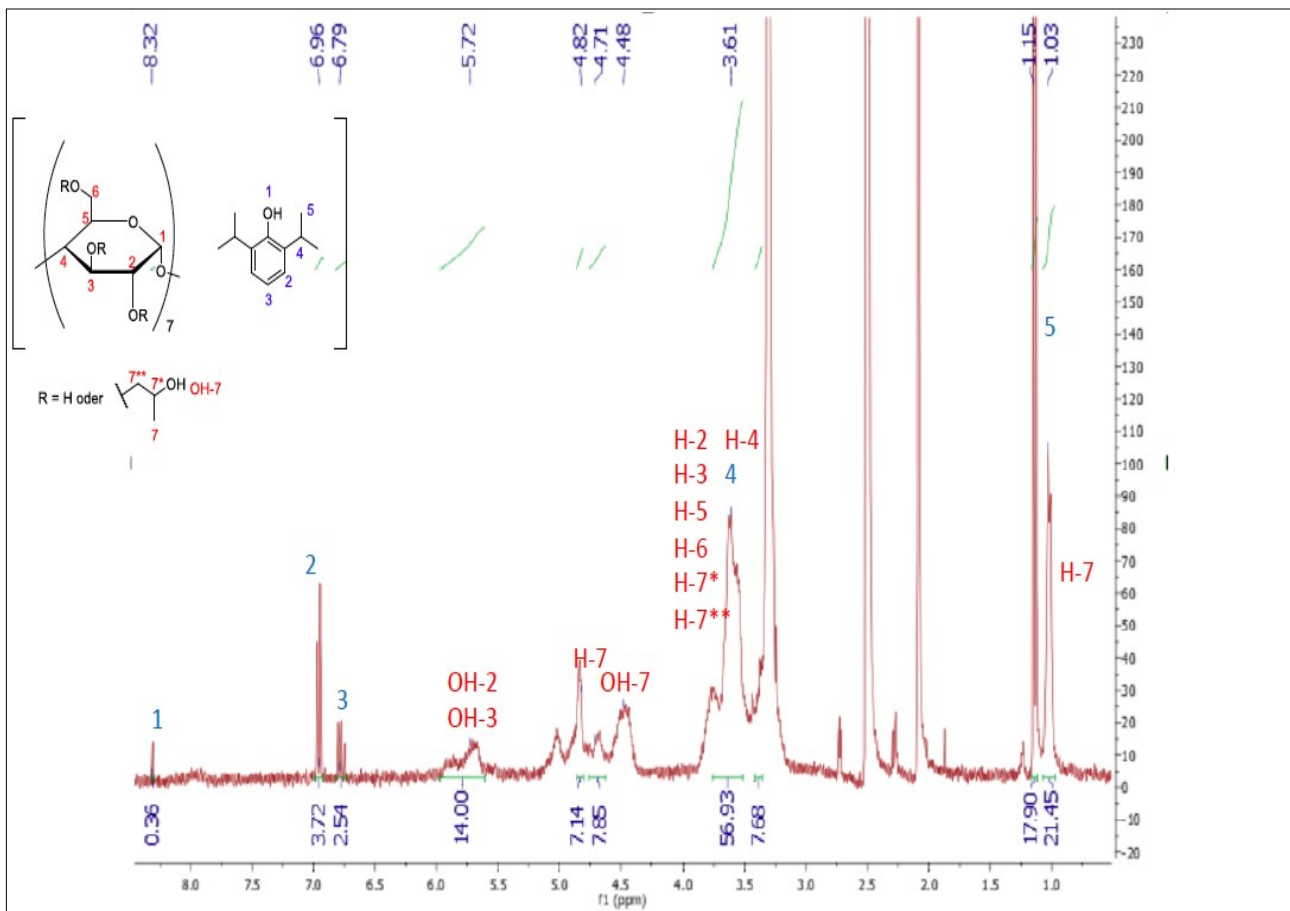


Abb. 15: Struktur und $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum für Propofol/HP β CD (DMSO- d_6 ; 300 MHz; 298 K)
(rote Beschriftung: HP β CD, blaue Beschriftung: Propofol) (Eigene Darstellung)

Die rote Beschriftung steht für die durch HP β CD hervorgerufenen Resonanzsignale, während die blauen Markierungen die Signale des Propofols kennzeichnen. Die Signale des Propofols korrespondieren mit denen aus

Abbildung 11, wobei die Position 4 des Propofols aufgrund der Überlagerung durch die Position 4 des HP β CD und dem Wasserpeak bei ca. 3,3 ppm nicht abgrenzbar ist.

Das Verhältnis zwischen den einzelnen ^1H -Kernen des Propofols entspricht dem aus Abbildung 11 und stimmt somit mit der Molekülstruktur überein. Die Signale des HP β CD stehen im Einklang mit denen aus Abbildung 13 und stehen im je gleichen Verhältnis zueinander, wie die Signale in Abbildung 13. Durch die Kombination aus charakteristischen Propofol- und HP β CD-Peaks in diesem Spektrum zeigt sich das Vorhandensein der beiden Strukturen in der untersuchten Substanz. Eine für die Cyclodextrinderivate spezifische Veränderung am H-3 und H-5 im Vergleich mit den Spektren des HP β CD ist aufgrund der Überlagerung mit den weiteren Signalen nicht feststellbar. Somit lässt sich eine Komplexbildung nicht eindeutig nachweisen. Im Gegensatz zu der Messung des Na-Propofolat/HP β CD (Abbildung 16) liegt in diesem Spektrum klar erkennbar ein Resonanzsignal der OH-Gruppe des Propofols vor. In Übereinstimmung mit der Abbildung des Propofols befindet sich dieses Signal bei 7,96 ppm und stimmt in seinem Integralwert mit der Position 3 des Propofol-Signals überein.

3.1.5 Na-Propofolol/HP β CD

Die Abbildung 16 zeigt die Auswertung des ^1H -NMR-Spektrums für Na-Propofolol/HP β CD sowie die Zuordnung der Signale entsprechend der chemischen Verschiebungen.

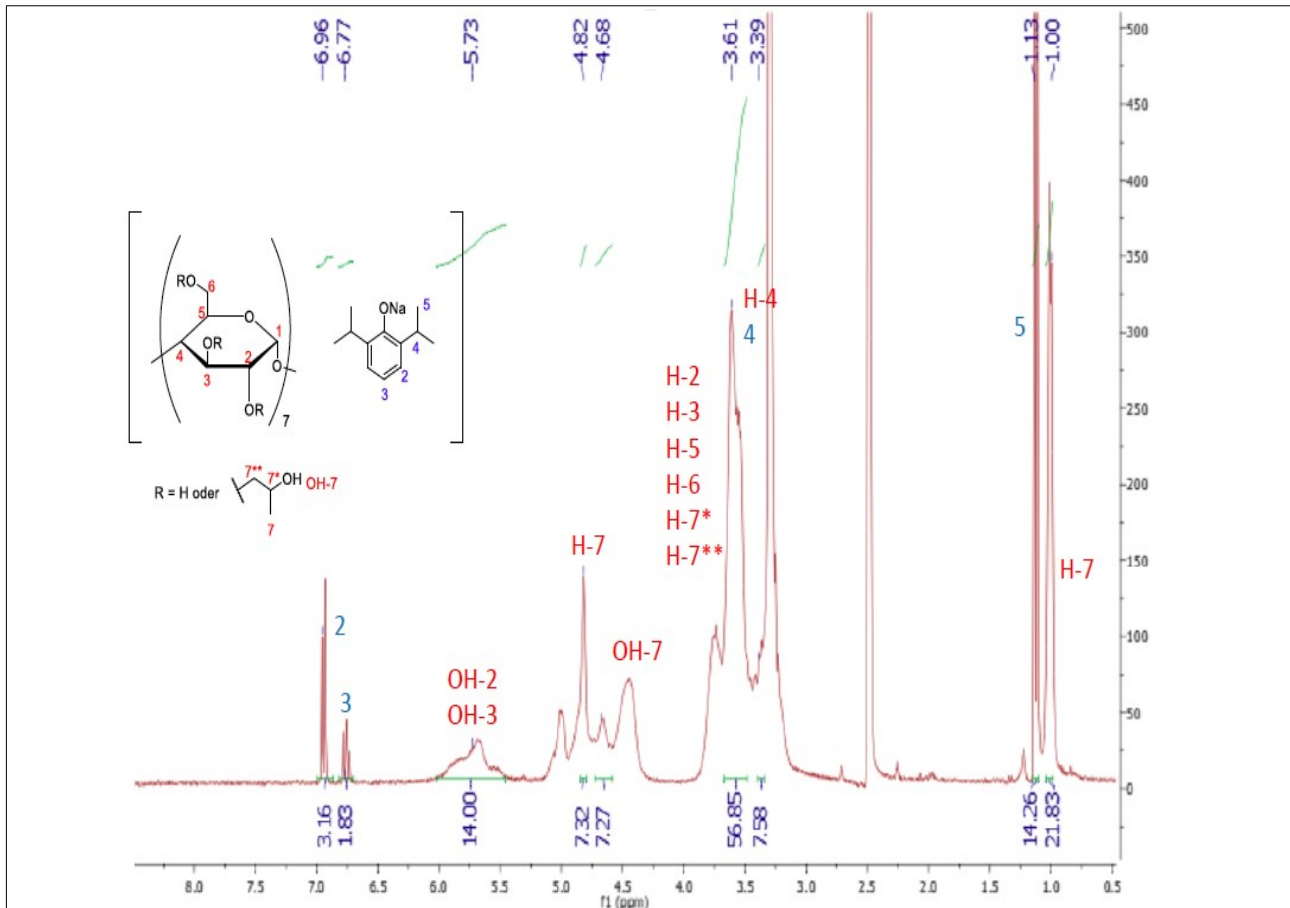


Abb. 16: Struktur und ^1H -NMR-Spektrum für Na-Propofolol-HP β CD. (DMSO- d_6 ; 300 MHz; 298 K) (rote Beschriftung: HP β CD, blaue Beschriftung: Propofol) (Eigene Darstellung)

Dieses Spektrum wurde analog zum Spektrum des HP β CD auf das Signal des ^1H -1-Protons referenziert. Die rote Beschriftung steht für die durch HP β CD hervorgerufenen Resonanzsignale, während die blauen Markierungen die Signale des Na-Propofolols repräsentieren.

Es zeigt sich das entsprechende Verhältnis der Integralwerte zwischen HP β CD und Na-Propofolat im Einklang mit dem ^1H -NMR-Spektrum des Propofol/HP β CD (Abbildung 15). In Übereinstimmung mit dem ^1H -NMR-Spektrum des Propofol/HP β CD (Abbildung 15) lässt sich auch in diesem Spektrum keine für die Cyclodextrinderivate spezifische Veränderung am H-3 und H-5 aufgrund der Überlagerung mit den weiteren Signalen nachweisen. Als Unterschied zu der Abbildung 15 ergibt sich, dass in diesem Spektrum das Signal der Hydroxylgruppe des Propofols fehlt. Dies legt nahe, dass in diesem Komplex Propofolat als deprotonierte Form des Propofols vorliegt.

3.1.6 Übersicht über die gemessenen ^1H -NMR-Spektren

Die Abbildung 17 zeigt eine Übersicht über die gemessenen Spektren. Zur besseren Darstellung sind Ausschnitte der einzelnen Bereiche der Spektren vergrößert dargestellt.

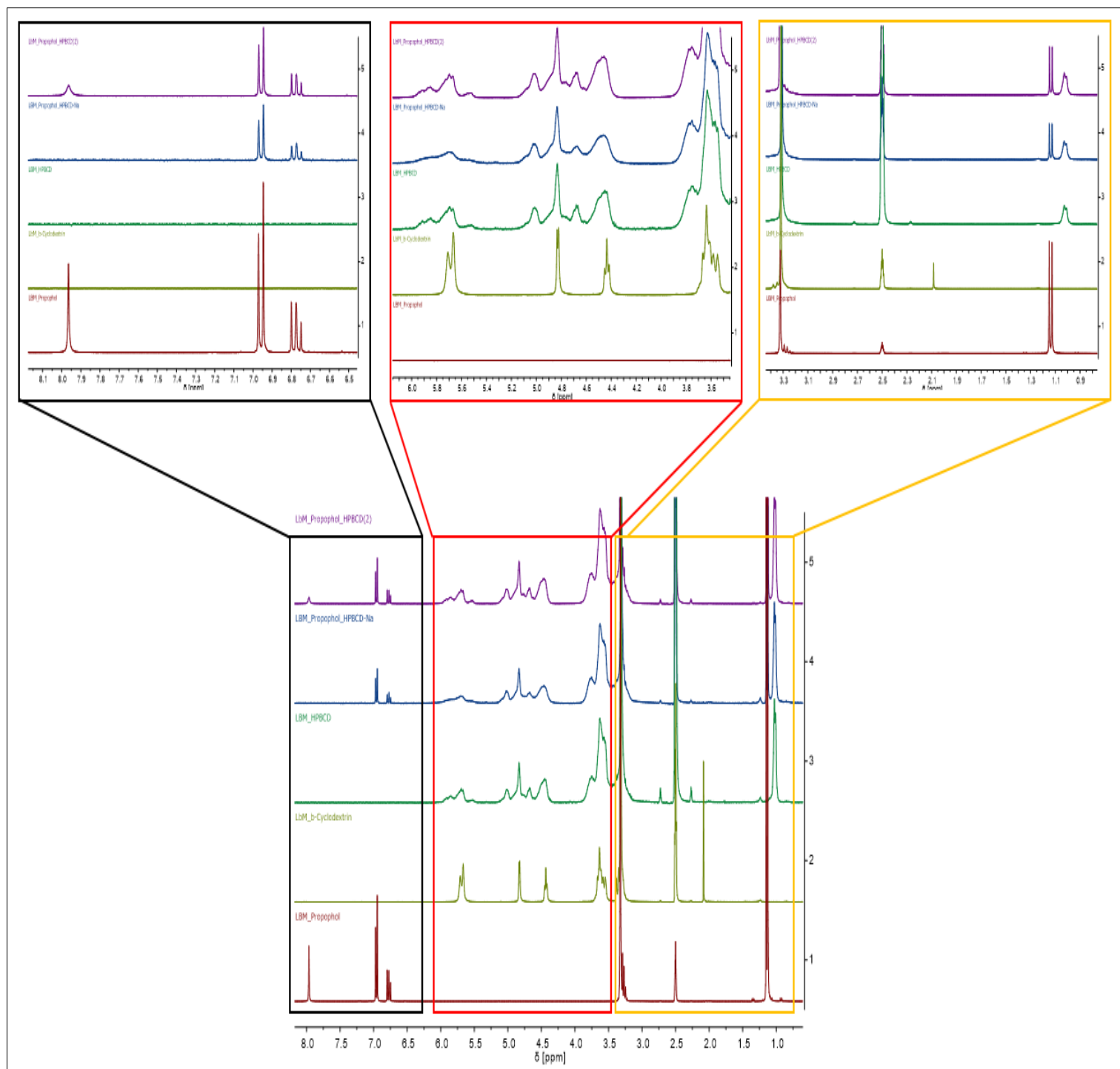


Abb. 17: Übersicht der ^1H -NMR-Spektren der gesamten, untersuchten Substanzen (DMSO- d_6 ; 300 MHz; 298 K) (rot: Propofol, hellgrün: β -CD, dunkelgrün: HP β CD, blau: Na-Propofolat/HP β CD, lila: Propofol/HP β CD) (Eigene Darstellung)

In der Vergrößerung der Bereiche zwischen 8,1 ppm und 6,5 ppm zeigen sich vor allem Signale des Propofols, die den Komplexen Propofol/HP β CD und Na-Propofolat/HP β CD entsprechen. Insbesondere ist die Hydroxylgruppe des Propofols in dem ^1H -NMR-Spektrum des Propofol/HP β CD evident. Diese fehlt in dem ^1H -NMR-Spektrum des Na-Propofolat/HP β CD.

In dem Ausschnitt zwischen 6,5 ppm und 3,5 ppm zeigt sich im Speziellen die Übereinstimmung zwischen den Spektren des HP β CD und den beiden Spektren von Propofol/HP β CD und Na-Propofolat/HP β CD. Eindeutig lässt sich hier der Unterschied zwischen dem Spektrum des HP β CD und des reinen β -CD erkennen.

Im Bereich zwischen 3,5 ppm und 0,5 ppm liegt das H₂O-Signal bei 3,3 ppm in allen gemessenen Spektren vor. Bei dem Signal zwischen 0,9 ppm und 1,1 ppm zeigt sich sowohl das Propofol-Signal der vierfach repräsentierten Methylgruppe (Abbildung 11) als auch das Signal des H-7-Protons des HP β CD bei 1,03 ppm (Abbildung 13) in den Spektren von Propofol/HP β CD und Na-Propofolat/HP β CD.

3.2 Molekulare Modellierungen der Substanzen

3.2.1 Molekulares Docking mit *AutoDock v.4.2.5.1*

Für Propofol/HP β CD und Na-Propofolat/HP β CD wurden mit Hilfe der Software *PyMol v.1.2*, *GTKDynamo v.1.8.1* und *AutoDock v.4.2.5.1* Modellierungen zur weiteren Strukturanalyse der Substanzen durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 18 dargestellt. Mittels der Software wurde eine Abschätzung der Enthalpiewert (ΔG_{bind}) vorgenommen. Die molekularen Modellierungen wurden mit freundlicher Unterstützung von Herrn Dr. Shityakov durchgeführt.

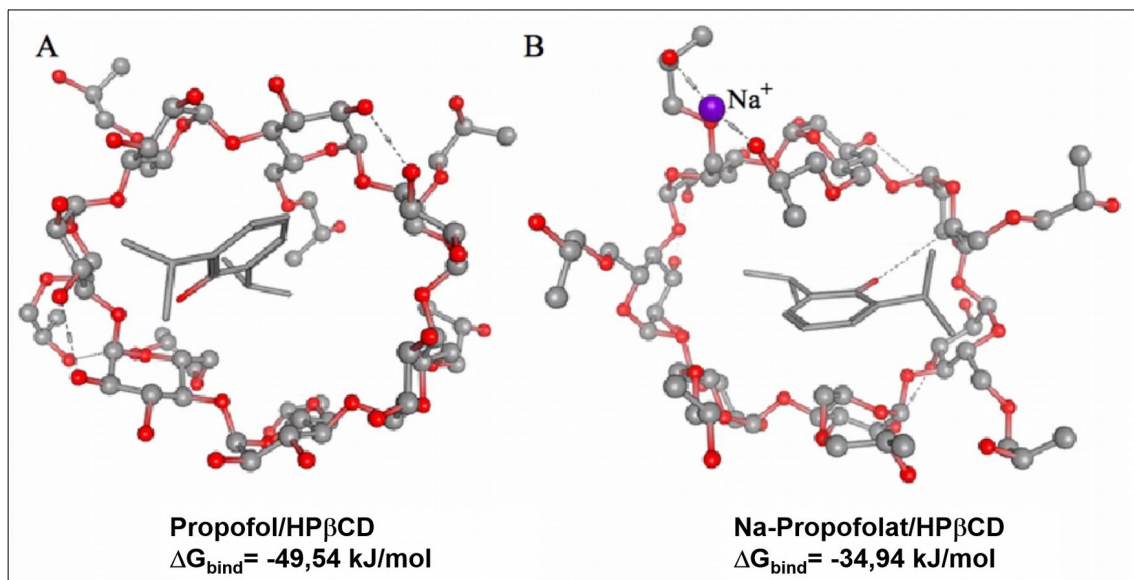


Abb. 18: Molekulare Modellierungen für Propofol/HP β CD und Na-Propofolat/HP β CD mittels *AutoDock v.4.2.5.1*, Enthalpiewert (ΔG_{bind}) in kJ/mol (Eigene Darstellung)

Deutlich erkennt man die Einbindung des Propofols im Inneren der Kavität des Cyclodextrinrings. Die Bindung des Propofols erfolgt nicht über den aromatischen Ring sondern über die peripheren Wasserstoffatome und die Wasserstoffbrückenbindungen. Unter den Komplexen ist der jeweilige, mit der Software ermittelte Enthalpiewert angegeben. Die gefundenen Werte der Bindungsenthalpie entsprechen in ihrer Größenordnung den schwachen Wasserstoffbrückenbindungen gemäß der Einteilung nach Jeffrey, wie man sie bspw. bei Proteinen findet.¹⁵⁵

Das Propofol ist von dem aus sieben Glukoseeinheiten bestehenden HP β CD umgeben. Im Unterschied zu dem mit A gekennzeichneten Komplex Propofol/HP β CD ist in dem mit B gekennzeichneten Komplex noch das Natrium abgebildet. Die weitere Struktur der beiden Komplexe zeigt eine weitgehende Übereinstimmung.

Für den Komplex A ergibt sich mit -49,54 kJ/mol ein niedrigerer Enthalpiewert als für Komplex B mit -34,94 kJ/mol. So lässt sich für den Komplex A des Propofol/HP β CD eine insgesamt erhöhte Stabilität im Vergleich zu dem Na-Propofolat/HP β CD vorhersagen. Geht man von gleichen Konzentrationen von Propofol/HP β CD und Na-Propofolat/HP β CD aus, ist zu erwarten, dass im Fall des Na-Propofolats die Konzentration an freiem Propofol höher ist, da aufgrund der schwächeren Bindung des Propofols das chemische Gleichgewicht in Richtung der dissoziierten Moleküle verschoben wird. Ist das Ziel eine länger wirkende Dosierung bei einer mehr oder weniger gleichen Menge an Propofol zu erreichen, empfiehlt sich der Einsatz des Propofol/HP β CD, da hier die Bindung des Propofols an den Komplex fester ist. Somit würde Propofol langsamer freigesetzt und kann über einen längeren Zeitraum wirken.

3.2.2 Molekulardynamik-Simulationen

Die Abbildung 19 zeigt die Ergebnisse der Molekulardynamik-Simulationen. Analoge Simulationen wurden bereits früher an Propofol und weiteren Cyclodextrinderivaten durchgeführt.¹⁰¹ Die Molekulardynamik-Simulationen wurden mit freundlicher Unterstützung von Herrn Dr. Shityakov durchgeführt.

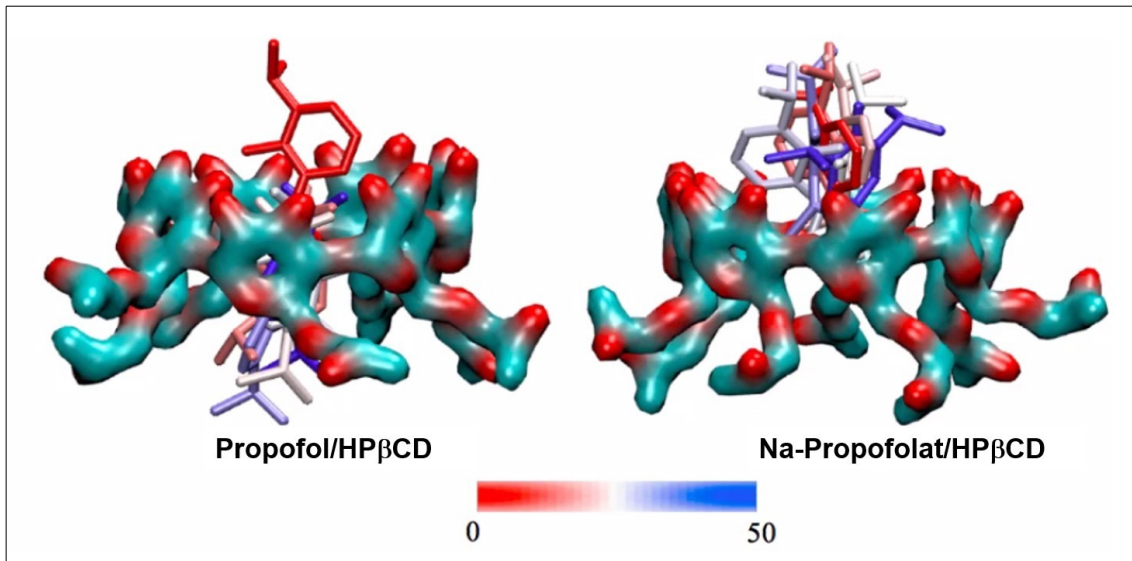


Abb.19: Molekulardynamik-Simulationen für Propofol/HPβCD und Na-Propofolat/HPβCD, 50 ns lange Simulation, Proteinstrukturen: blau, Liganden: entweder einfarbig oder nach Atomsorten koloriert. (Sauerstoffatome: rot, Kohlenstoffatome: cyan, Wasserstoffbrückenbindungen fehlen) (Radius der Probe 0,4 Å, Elektronendichte 0,7, Gittergröße 0,5) (Eigene Darstellung)

Die Proteinstrukturen sind blau dargestellt und die Liganden werden entweder einfarbig oder nach Atomsorten koloriert gezeigt. Sauerstoffatome werden rot, Kohlenstoffatome cyan gekennzeichnet. Zur besseren Übersicht wurden die Wasserstoffbrückenbindungen nicht abgebildet.

Im Resultat zeigen sich die gleichen Ergebnisse wie bei den statischen Berechnungen. Anhand der Simulationen erkennt man, dass der Benzolring oberhalb der Ebene des Cyclodextrinrings angeordnet ist. Auch dies korrespondiert mit den statischen Simulationen, da auch bei diesen die Bindung des Propofols über Wasserstoffbrückenbindungen an den Substituenten des Benzolrings erfolgt.

3.3 Differential Scanning Calorimetry (DSC)

Zur weiteren Analyse der Komplexbildung wurde die DSC zur Bestimmung thermodynamischer Parameter von Propofol/HP β CD und Na-Propofolat/HP β CD durchgeführt.

In der Abbildung 20 ist exemplarisch die DSC-Messung für einen vollständigen Lauf für Na-Propofolat/HP β CD dargestellt. Der erste Heizzyklus ist grün, das anschließende Abkühlen rot und das zweite Erhitzen ist lila dargestellt. Der Peak beim ersten Erhitzen zwischen 30 °C und 125 °C resultiert aus der Abgabe von Wasser aus der Cavität des Cyclodextrins und ist charakteristisch für die DSC-Messungen für HP β CD.^{156,157} Bei dem zweiten Erhitzen zeigt sich bei 227 °C eine Stufenbildung als Phasenübergang zweiter Ordnung.¹⁵⁸ Dieser Phasenübergang zweiter Ordnung entspricht einem Glasübergang.

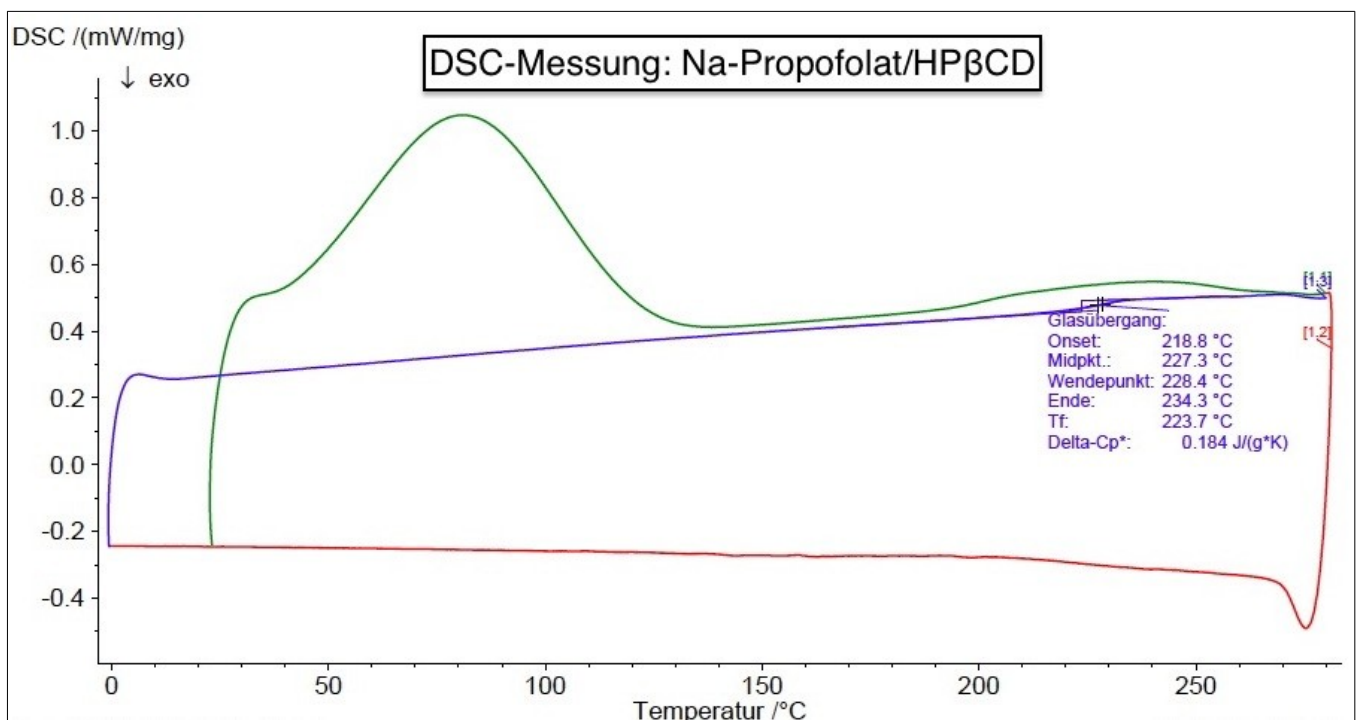


Abb. 20.: Originalausdruck der DSC-Messung für Na-Propofolat/HP β CD; DSC 204 F1 Phoenix, Volumenfluss: 20 mL/min N₂, Aufheizrate: 10 °C/min (0 °C bis 280 °C) (erstes Erhitzen grün, Abkühlen rot, zweites Erhitzen lila) (x-Achse: Temperatur [°C], y-Achse: spezifische Wärmestrom (heat flow) [W/g]) (Eigene Darstellung)

In der Abbildung 21a ist das erste Erhitzen und in der Abbildung 21b das zweite Erhitzen für den Temperaturbereich von 150 °C - 280 °C von HP β CD, Propofol/HP β CD und Na-Propofolat/HP β CD vergrößert dargestellt.

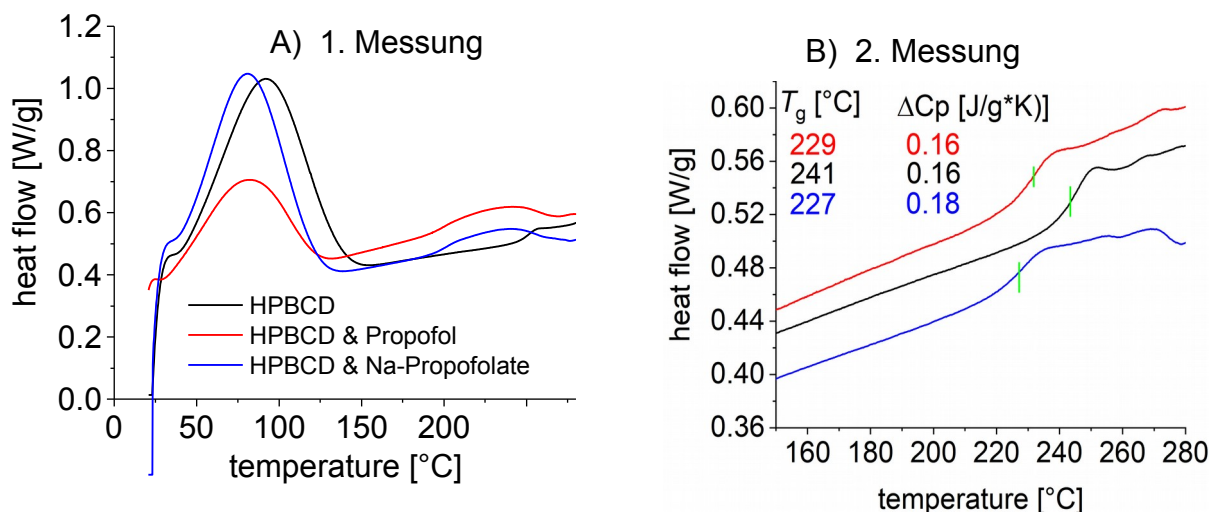


Abb.21: DSC-Messungen für HP β CD (schwarz), Propofol/HP β CD (rot), Na-Propofolat/HP β CD (blau); DSC 204 F1 Phoenix, Volumenfluss: 20 mL/min N₂; Aufheizrate: 10 °C/min (0°C bis 280 °C); erste Erhitzung (21a) und zweite Erhitzung (21b) (x-Achse: Temperatur [°C], y-Achse: spezifische Wärmestrom (heat flow) [W/g]) (Eigene Darstellung)

Bei dem ersten Erhitzen zeigen sich in Abbildung 21a für die Substanzen ähnliche, leicht versetzte Peaks zwischen 30 °C und 125 °C bzw. 150 °C. Die unterschiedliche Höhe der Peaks wird durch die unterschiedliche Höhe der Einwaage bedingt. Bei gleicher molarer Masse an Wasser und Cyclodextrin wäre von einer gleichen Höhe aller Peaks in diesem Temperaturbereich auszugehen. Wie oben beschrieben wird in diesem Bereich Wasser aus der Struktur abgegeben.

Die Abbildung 21b zeigt das zweite Erhitzen der Substanzen für den Bereich von 150 °C – 280 °C mit T_g als der jeweiligen Temperatur des Glasübergangs. Wie in der Abbildung 21b dargestellt, ergibt sich mit 241 °C ein höherer Wert für

HP β CD als für Propofol/HP β CD und Na-Propofolat/HP β CD, bei denen die T_g -Werte mit 229 °C und 227 °C nahe beieinander liegen.

Abbildung 22 zeigt eine Übersicht über den Temperaturbereich von 0 °C – 280 °C für das zweite Erhitzen einer weiteren Messung für HP β CD, Propofol/HP β CD und Na-Propofolat/HP β CD.

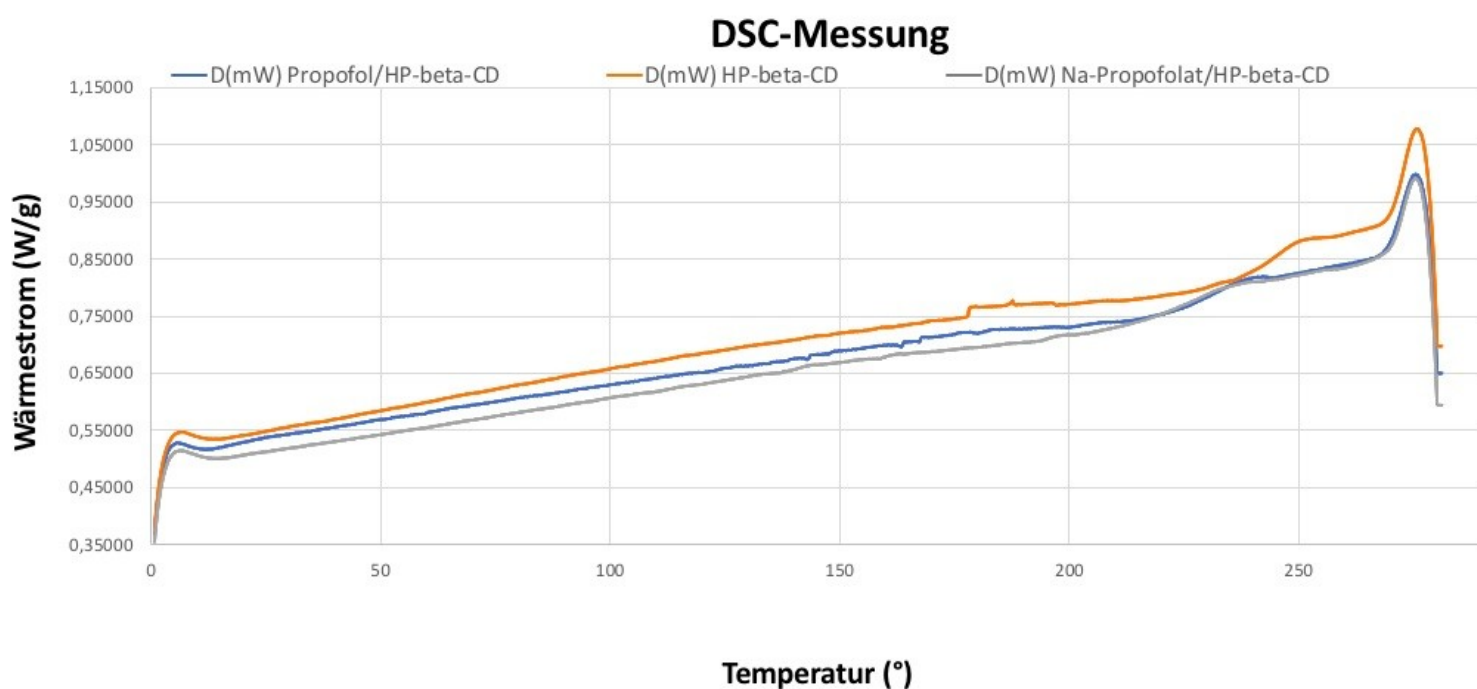


Abb. 22: DSC-Messungen für HP β CD, Propofol/HP β CD und Na-Propofolat/HP β CD für das zweite Erhitzen; DSC 204 F1 Phoenix, Volumenfluss: 20 mL/min N₂; Aufheizrate: 10 °C/min (0 °C bis 280 °C) (x-Achse: Temperatur [°C], y-Achse: spezifische Wärmestrom (heat flow) [W/g]) (Eigene Darstellung)

Man erkennt in dem Temperaturbereich zwischen 270 °C und 280 °C für alle drei Substanzen einen gleichen Peak. Auch hier ist die unterschiedliche Peakhöhe bedingt durch die unterschiedlichen Einwaagen. Der Peak liegt deutlich höher als der Siedepunkt des Propofols, der in der Literatur bei 256 °C angegeben ist.⁶³ Es zeigt sich kein Unterschied in diesem Temperaturbereich zwischen den Messungen für HP β CD und den Propofol enthaltenden

Substanzen. Da sich somit kein Hinweis für ein Verdampfen des Propofols ergibt, ist anzunehmen, dass Propofol weiterhin an die Cyclodextrinderivate gebunden ist. Somit ist von einer Komplexbindung bei Propofol/HP β CD und Na-Propofolat/HP β CD auszugehen.

Zum einen zeigt sich eine Reduktion der Glasübergangstemperatur für die Substanzen mit Propofol gegenüber HP β CD, wie aus der Abbildung 21 b ersichtlich wird. Zum anderen legt die DSC-Messung nahe, dass Propofol auch bei höheren Temperaturen, die über dem Siedepunkt von 256 ° liegen, weiterhin in den Komplexen Propofol/HP β CD und Na-Propofolat/HP β CD gebunden ist, da sich kein Peak als Hinweis für das Verdampfen des Propofols bei Propofol/HP β CD und Na-Propofolat/HP β CD zeigt.

3.4 Zytotoxizitätstests

3.4.1 Auswertung des MTT-Tests

Die in dieser Arbeit untersuchten Substanzen wurden mit Hilfe des MTT-Tests auf ihre Zytotoxizität an CerebEND-Zellen getestet. Die Messung der MTT-Reduktion erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 540 nm mit einer Referenzwellenlänge von 620 nm nach 24-stündiger Exposition. Die Abbildung 23 zeigt die Auswertung des dreimalig durchgeführten MTT-Tests im Boxplotformat. Die gesamten Daten des MTT-Tests finden sich im Anhang 1.

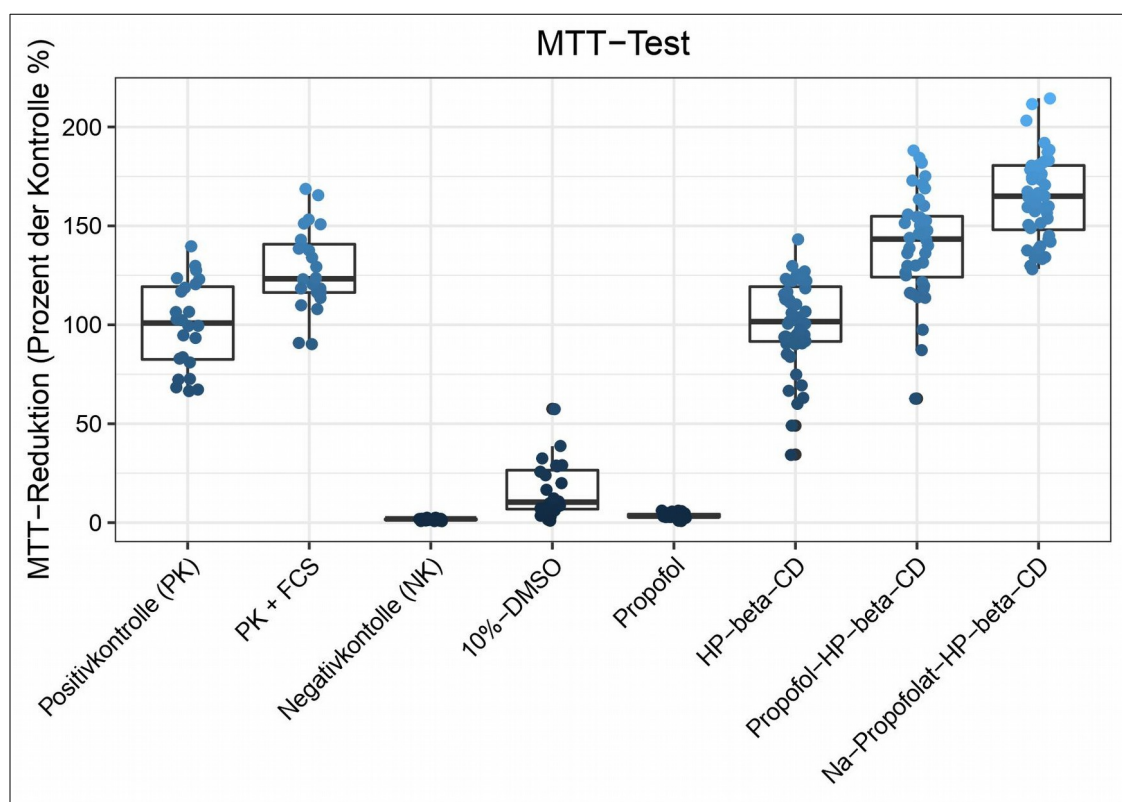


Abb. 23: Darstellung der Resultate des MTT-Tests im Boxplotformat nach 24-stündiger Exposition bei 37 °C; photometrische Messung bei 540nm/Referenzwellenlänge 620nm; alle Messwerte sind dargestellt, leicht gejittered in x-Richtung zur Visualisierung, CerebEND-Zellen, n = 3, Referenz: Mittelwert der Positivkontrolle, Substanzen: PK, PK + FCS*, NK*, 10%-DMSO-Lösung*, Propofol*, HPβCD, Propofol/HPβCD*, Na-Propofolat/HPβCD* (statistisch signifikant mit * gekennzeichnet) (Eigene Darstellung)

Aus Abbildung 23 ist zu erkennen, dass für den MTT-Test eine niedrige Streuung vorliegt. Bedingt durch die niedrige Streuung kann von einem repräsentativen Ergebnis der Messungen ausgegangen werden. Die Auswertung wird entsprechend der Auswertungen anderer Autoren des MTT-Tests in Prozent im Verhältnis zum Mittelwert der PK angegeben.^{159,160} Die entsprechenden statistischen Angaben sind in Klammern hinter den Ergebnissen in Prozent dargestellt.

Eine Zunahme der toxischen Wirkung resultiert in einer Abnahme der MTT-Reduktion.¹⁶⁰ Die Ergebnisse zeigen einen Anstieg der MTT-Reduktion auf 128,2 % ($p_{\text{adj}} < 0,001$) durch die Hinzugabe des FCS im Vergleich zu der Kontrolle mit Zellkulturmedium (PK). Im Vergleich dazu zeigt sich im Vergleich zur PK eine deutliche Verringerung der MTT-Reduktion bei den mit der zehnpromzentigen DMSO-Lösung inkubierten Zellen auf 16,4 % ($p_{\text{adj}} < 0,001$) und bei der NK auf 1,9 % ($p_{\text{adj}} < 0,001$). Bei der Auswertung der Testsubstanzen zeigen sich für Propofol mikroskopisch kaum vitale Zellen. Mit einer deutlichen Verringerung der MTT-Reduktion auf 3,5 % ($p_{\text{adj}} < 0,001$) im Vergleich zur PK ergibt sich für die mit Propofol behandelten Zellen ein mit dem Ergebnis der NK vergleichbares Resultat. Im Gegensatz dazu findet man für HP β CD mit 101,6 % ($p_{\text{adj}} = 1,0$) einen Wert, der im Bereich der PK liegt und sich nicht signifikant von dieser unterscheidet. Mit 140,5 % ($p_{\text{adj}} < 0,001$) für Propofol/HP β CD und 164,5 % ($p_{\text{adj}} < 0,001$) für Na-Propofolat/HP β CD zeigt sich für diese Substanzen im Vergleich zur PK ein deutlicher Anstieg der MTT-Reduktion.

Nach 24-stündiger Exposition lässt sich zusammenfassend für den MTT-Test somit eine ausgeprägte zytotoxische Wirkung für Propofol feststellen, während sich für die Substanzen HP β CD, Propofol/HP β CD und Na-Propofolat/HP β CD keine Zytotoxizität nachweisen lässt.

3.4.2 Auswertung des Laktatdehydrogenase-Assays (LDH-Assays)

Die in dieser Arbeit untersuchten Substanzen wurden durch den LDH-Assay auf ihre Zytotoxizität getestet. Als Zelllinie wurden CerebEND-Zellen verwendet und die photometrische Messung erfolgte bei einer Wellenlänge von 492 nm. Die Ergebnisse des LDH-Assays sind in Abbildung 24 dargestellt. Die gesamten Daten der drei Versuche sind im Anhang 2 abgebildet.

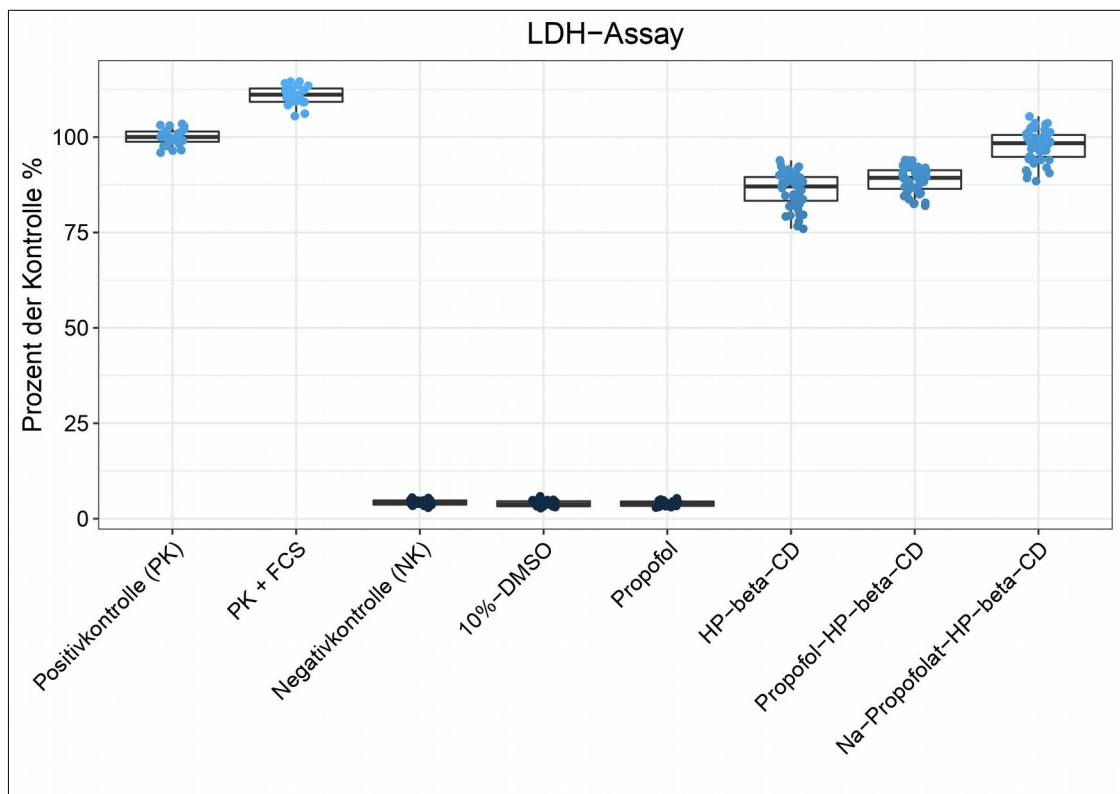


Abb. 24: Darstellung der Resultate des LDH-Assays im Boxplotformat nach 24-stündiger Exposition bei 37 °C; photometrische Messung bei 492 nm; alle Messwerte sind dargestellt, leicht ge jittered in x-Richtung zur Visualisierung, CerebEND-Zellen, n = 3, Referenz: Mittelwert der Positivkontrolle, Substanzen: PK, PK + FCS*, NK*, 10%-DMSO-Lösung*, Propofol*, HPβCD*, Propofol/HPβCD*, Na-Propofolat/HPβCD* (statistisch signifikant mit * gekennzeichnet) (Eigene Darstellung)

Die Auswertung wird entsprechend der Auswertungen anderer Autoren in Prozent im Verhältnis zur PK angegeben.¹⁶¹ Die entsprechenden statistischen Angaben sind in Klammern hinter den Ergebnissen in Prozent dargestellt. Auch in diesem Fall findet sich eine geringe Streuung der Messdaten, die somit ein repräsentatives Ergebnis der Messungen nahelegen.

Eine Zunahme der LDH-Aktivität korreliert mit einer Zunahme der zerstörten Zellen. Für die Zellen, die mit Zellkulturmedium und FCS inkubiert wurden, zeigt sich eine Verringerung der LDH-Aktivität mit einer somit geringeren Menge zerstörter Zellen. Im Vergleich zur PK ergibt sich eine auf 111 % ($p_{\text{adj}} < 0,001$) erhöhte Farbintensität.

Für die Negativkontrollen resultiert eine deutliche Zunahme der LDH-Aktivität mit einer Verringerung der Farbintensität auf 4,3 % ($p_{\text{adj}} < 0,001$) für die Negativkontrolle ohne Zellen (NK) und auf 4 % ($p_{\text{adj}} < 0,001$) für die mit der zehnprozentigen DMSO-Lösung inkubierten Zellen.

Bei der Auswertung der Testsubstanzen zeigt sich für Propofol eine deutliche Zunahme der LDH-Aktivität. Bei einer Verringerung der Farbintensität auf 3,9 % ($p_{\text{adj}} < 0,001$) ergibt sich ein mit den Negativkontrollen vergleichbarer Wert.

Im Vergleich dazu resultiert für HP β CD eine wesentlich geringere Zunahme der LDH-Aktivität bei einer Verringerung der Farbintensität auf 86,2 % ($p_{\text{adj}} < 0,001$). Für Propofol/HP β CD mit 88,8 % ($p_{\text{adj}} < 0,001$) und für Na-Propofolat/HP β CD mit 97,9 % ($p_{\text{adj}} < 0,001$) zeigt sich eine noch geringere Zunahme der LDH-Aktivität.

Insgesamt lässt sich bei dem 24-stündigen LDH-Assay ein ausgeprägter Anstieg der LDH-Aktivität für Propofol nachweisen, während sich für die Substanzen HP β CD, Propofol/HP β CD und Na-Propofolat/HP β CD eine deutlich geringere Zunahme ergibt.

3.4.3 Auswertung des XTT-Tetrazoliumreduktionstests (EZ4U-Tests)

Die in dieser Arbeit untersuchten Substanzen wurden durch den EZ4U-Test an CerebEND-Zellen auf ihre Zytotoxizität getestet. Die Ergebnisse der drei Versuche sind in Abbildung 25 dargestellt. Die gesamten Daten dieser Versuche sind im Anhang 3 abgebildet.

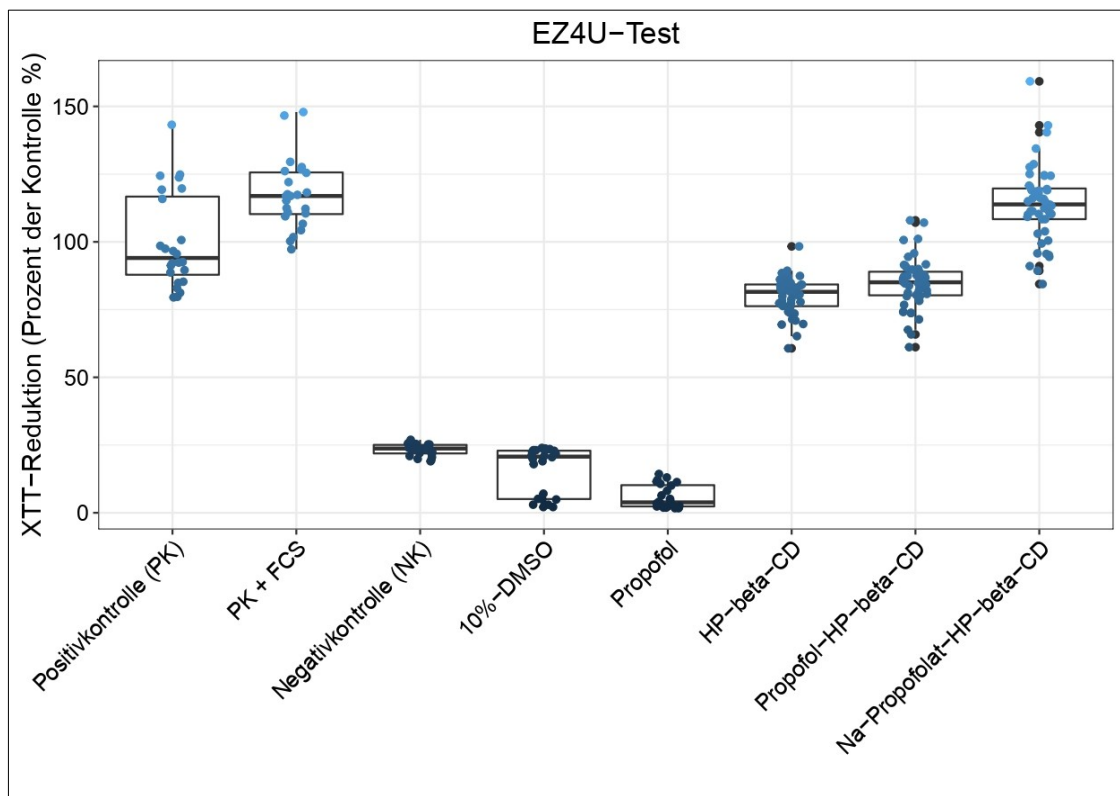


Abb. 25: Darstellung der Resultate des EZ4U-Tests im Boxplotformat nach 24-stündiger Exposition bei 37 °C; photometrische Messung bei 450 nm/ Referenzwellenlänge von 590 nm; alle Messwerte sind dargestellt, leicht ge jittered in x-Richtung zur Visualisierung, CerebEND-Zellen; n=3, Referenz: Mittelwert der Positivkontrolle Substanzen: PK, PK + FCS*, NK*, 10%-DMSO-Lösung*, Propofol*, HPβCD*, Propofol/HPβCD*, Na-Propofolat/HPβCD* (statistisch signifikant mit * gekennzeichnet) (Eigene Darstellung)

Die Auswertung erfolgte in Referenz zum Mittelwert der PK (100%). Entsprechend dem MTT-Test zeigt sich auch hier ein Anstieg der toxischen Wirkung durch eine Abnahme der MTT-Reduktion. Im Vergleich zur PK zeigt sich eine Zunahme der MTT-Reduktion der mit FCS inkubierten Zellen auf 117,5 % ($p_{\text{adj}} < 0,001$). Für die NK zeigt sich eine deutliche Abnahme der MTT-Reduktion auf 23,3 % ($p_{\text{adj}} < 0,001$) und für die mit der zehnpromzentigen DMSO-Lösung inkubierten Zellen ein Rückgang der MTT-Reduktion auf 15,9 % ($p_{\text{adj}} < 0,001$).

Bei der Auswertung der Testsubstanzen zeigt sich für Propofol mit einer Abnahme der MTT-Reduktion auf 5,9 % ($p_{\text{adj}} < 0,001$) eine sogar ausgeprägtere zytotoxische Wirkung als für die NK und für die mit der zehnpromzentigen DMSO-Lösung inkubierten Zellen.

Für HP β CD ergab sich im Vergleich zur PK ein Rückgang der MTT-Reduktion auf 80,0 % ($p_{\text{adj}} < 0,001$). Für Propofol/HP β CD zeigt sich mit einer Abnahme der MTT-Reduktion auf 84,8 % ($p_{\text{adj}} < 0,001$) ein vergleichbarer Wert.

Im Vergleich dazu zeigt sich für Na-Propofolat/HP β CD mit einer Zunahme der MTT-Reduktion auf 114 % ($p_{\text{adj}} < 0,001$) im Vergleich zur PK ein erhöhter Wert mit einer Abnahme der Zytotoxizität.

Insgesamt lässt sich bei dem 24-stündigen EZ4U-Test eine ausgeprägte zytotoxische Wirkung für Propofol nachweisen, während für die Testsubstanzen ein deutlich geringerer Rückgang der MTT-Reduktion besteht. Der gemessene Wert liegt für HP β CD und Propofol/HP β CD unterhalb und für Na-Propofolat/HP β CD oberhalb der PK.

3.5 Auswertung des Comet-Assays

3.5.1 Comet-Assay: Auswertung der Vorversuche

Zur Analyse der Genotoxizität der Substanzen wurde der Comet-Assay mit der Zelllinie HL-60 verwendet. Zur Etablierung der Methodik wurden Vorversuche mit H_2O_2 durchgeführt. Die NK liegt bei 8,6 % ($p_{adj} < 0,001$). Für H_2O_2 ergab sich eine konzentrationsbezogene Zunahme der DNA-Schäden mit Werten von 8,6 % ($p_{adj} < 0,001$) für 12,5 μmol pro Well, von 21,8 % ($p_{adj} = 0,001$) für 25 μmol pro Well, von 54 % ($p_{adj} < 0,001$) für 50 μmol pro Well und von 79,3 % ($p_{adj} = 0,001$) für 100 μmol pro Well gegenüber der PK. Die Ergebnisse sind in Abbildung 26 und in Anhang 5 abgebildet und stimmen mit der Literatur überein.¹⁶²

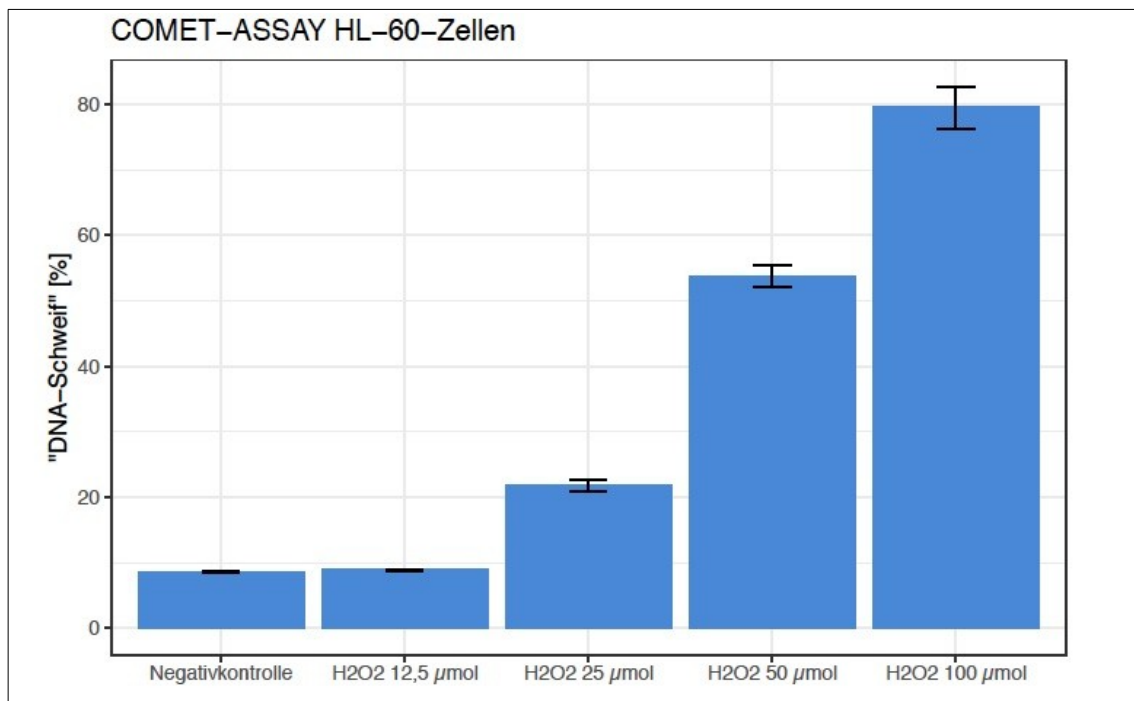


Abb. 26: Darstellung der Resultate der Vorversuche des Comet-Assays; nach 24-stündiger Exposition bei 37 °C, HL-60-Zellen, $n=3$, Referenz: Mittelwert der Positivkontrolle, Substanzen: NK*, 12,5 μmol H_2O_2 *, 25 μmol H_2O_2 *, 50 μmol H_2O_2 *, 100 μmol H_2O_2 * (statistisch signifikant mit * gekennzeichnet) (Eigene Darstellung)

3.5.2 Comet-Assay: Auswertung der Testsubstanzen

Vor der Auswertung des Comet-Assays erfolgte die Auswertung der Zellvitalität. Für die jeweiligen Substanzen sind repräsentative Ausschnitte der Objektträger mit den lebenden Zellen (grün) und abgestorbenen Zellen (rot) in Abbildung 27 dargestellt. Bei den mit Propofol inkubierten Zellen zeigen sich mikroskopisch keine lebenden Zellen mehr, so dass für die mit Propofol inkubierten Zellen keine Untersuchung des Zellschweifs vorgenommen werden konnte.

Die mit den weiteren untersuchten Substanzen zeigten mikroskopisch eine ausreichende Zellvitalität von über 70 % als Voraussetzung für die Auswertung des Comet-Assays.¹⁶³ Beispielfhaft sind repräsentative Bilder der Auswertungen in Abbildung 28 abgebildet. Eine Übersicht über die gesamte Auswertung der drei Tests sowie der Zellvitalität der 200 pro Testsubstanz und pro Versuch mikroskopisch ausgewerteten Zellen findet sich im Anhang 4 und Anhang 6.

In Abbildung 29 sind die Ergebnisse des dreifach durchgeführten Comet-Assays dargestellt. Die photometrische Auswertung erfolgt jeweils in Referenz zu dem Mittelwert der PK (100%). Im Vergleich zur PK zeigt sich für die NK mit 30,2 % ($p_{\text{adj}} < 0,001$) eine deutliche Abnahme des DNA-Schadens. Für HP β CD resultiert mit 32,1 % ($p_{\text{adj}} = 0,008$) eine mit der NK vergleichbare Schweifbildung.

Bei der Auswertung der Testsubstanzen ergibt sich im Vergleich dazu mit 35,2 % ($p_{\text{adj}} = 0,004$) für Propofol/HP β CD und mit 37,9 % ($p_{\text{adj}} = 0,02$) für Na-Propofolat/HP β CD eine leichte Zunahme des DNA-Schadens.

Insgesamt liegt der DNA-Schaden für die Substanzen mit 1,9 % für HP β CD, mit 5 % für Propofol/HP β CD und mit 7,7 % für Na-Propofolat/HP β CD über dem Wert der NK, jedoch entsprechend deutlich unter der PK.

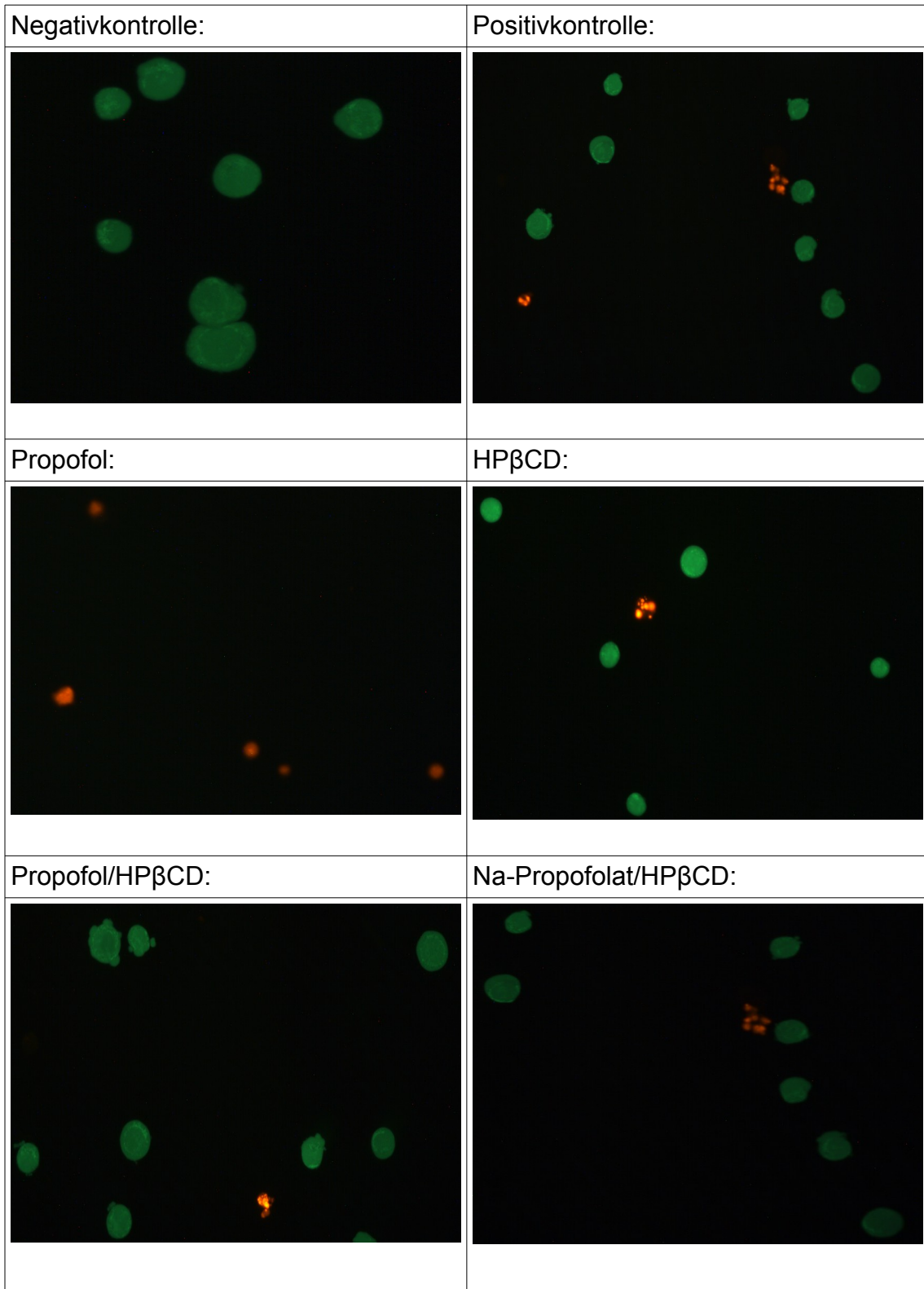


Abb. 27: Repräsentative Zellvitalität der HL-60-Zellen (Comet-Assay) (Eigene Darstellung)

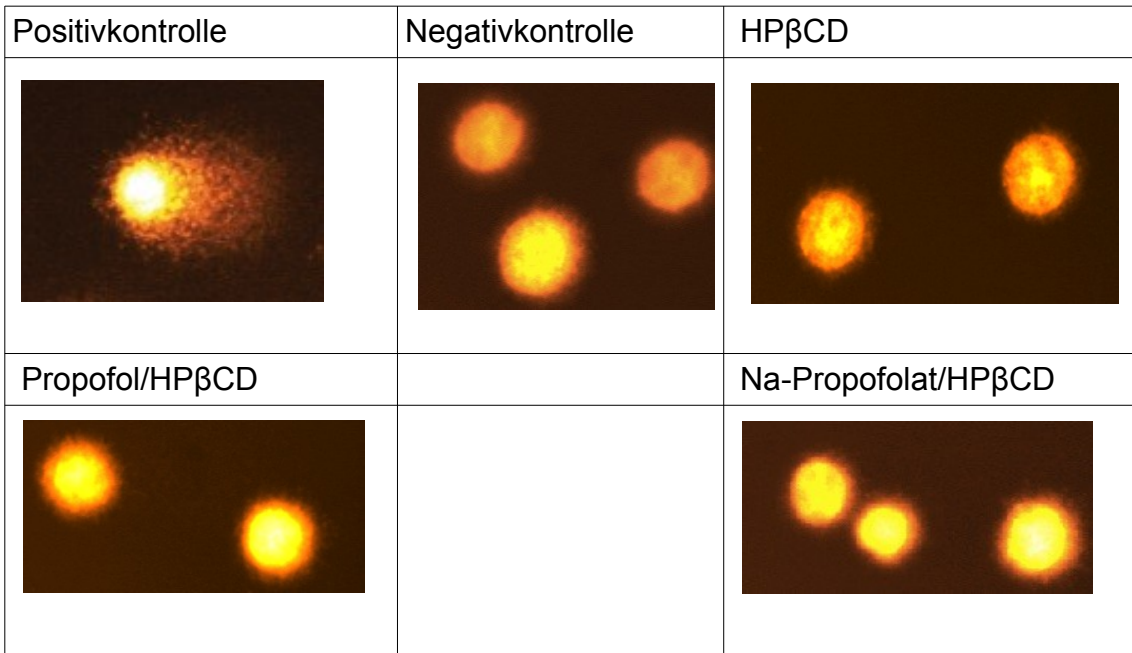


Abb. 28: Repräsentative HL-60-Zellen bei Auswertung des Comet-Assay (Eigene Darstellung)

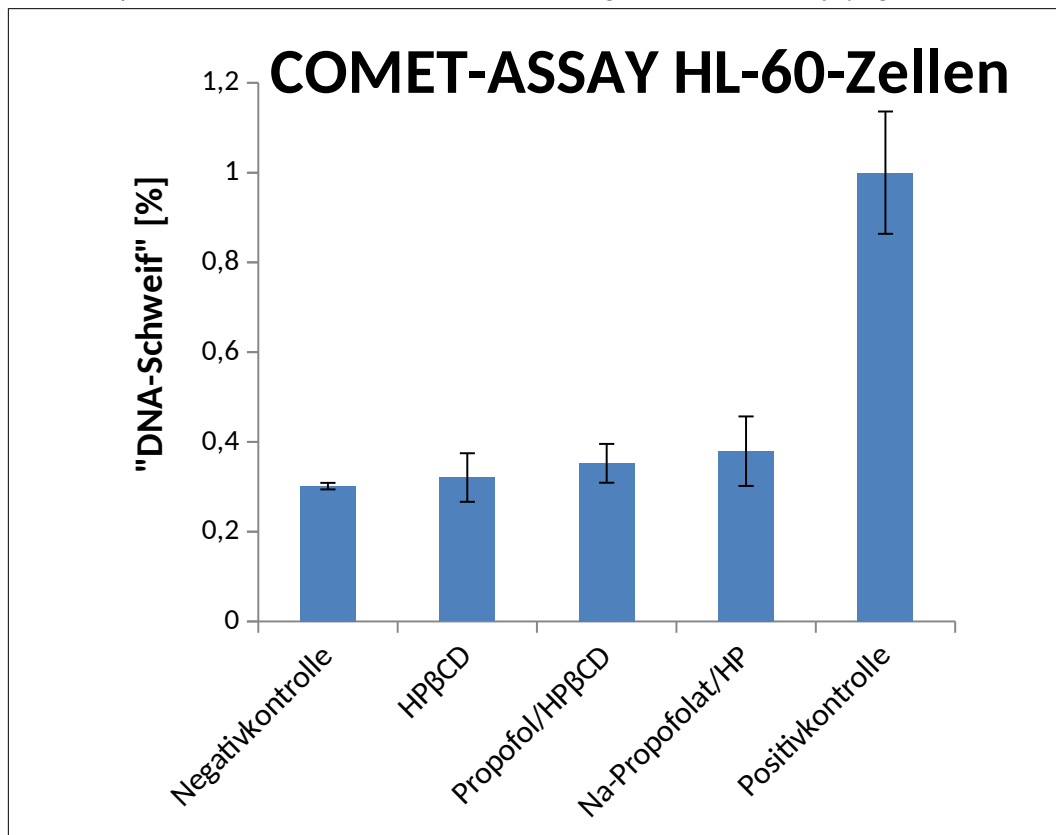


Abb.29: Darstellung der Resultate des Comet-Assays nach 24-stündiger Exposition bei 37 °C, HL-60-Zellen, n=3, Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichungen, Referenz: Mittelwert der Positivkontrolle, Substanzen: NK*, HP β CD*, Propofol/HP β CD*, Na-Propofolat/HP β CD* (statistisch signifikant mit *gekennzeichnet)(eigene Darstellung)

3.6 Graphische Darstellung der Zytotoxizitätstests und des Comet-Assays

In Abbildung 30 sind die Resultate der Zytotoxizitätstests (MTT-Tests, LDH-Assay, EZ4U-Test) und des Comet-Assays zur besseren Ansicht in einer Abbildung dargestellt. Nähere Angaben zur Darstellung sind in den jeweiligen Abschnitten aufgeführt.

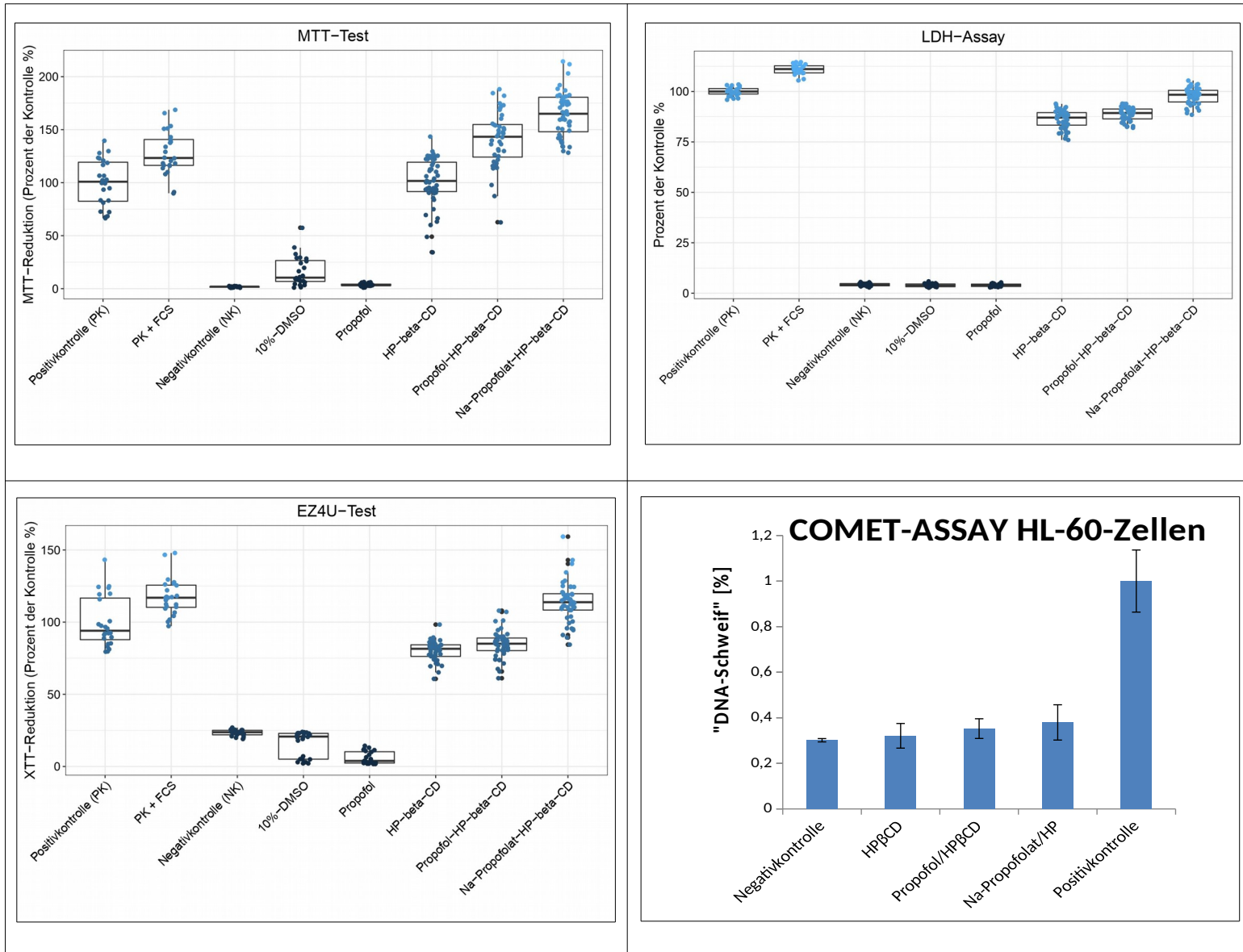


Abb. 30: Darstellung der Resultate des MTT-Tests, LDH-Assays, EZ4U-Tests (CerebEND-Zellen) und des Comet-Assays (HL-60-Zellen) nach je 24-stündiger Exposition (Eigene Darstellung)

4. Diskussion

Das 2016 der Liste der *unentbehrlichen Arzneimittel* der WHO¹ hinzugefügte Narkotikum Propofol verdankt die breite klinische Verwendung dem schnellen Wirkungseintritt, der geringen Kumulation wie auch den vergleichbar wenigen Nebenwirkungen des Medikamentes. Dennoch verbleiben neben Blutdruckabfall,³¹ Bradykardie³² und Hyperlipidämie³³ auch die anaphylaktische Reaktion und das zwar selten auftretende Propofol-Infusions-Syndrom (PRIS), welches aber mit einem zuweilen tödlichen Ausgang als besonders gefürchtete Komplikation nach einer Propofolapplikation einhergeht, als Nebenwirkungen.³⁷ Diese Komplikationen bedingen das Interesse an der Untersuchung weiterer Formulierungen des Narkotikums. Neben verschiedenen Ansätzen wie beispielsweise der Verwendung von Nanopartikel-Trägern oder Prodrugs besteht eine mögliche Option in der Verwendung von Cyclodextrinen als Trägersubstanzen. Durch die Möglichkeit der Cyclodextrine Einschlusskomplexe mit anderen Molekülen zu bilden, resultiert ein weit gefasster pharmakologischer Anwendungsprozess für die aus α -(1,4)-Glucopyranoseeinheiten aufgebauten cyclischen Oligosaccharide.⁴⁷ Im Rahmen dieser Arbeit wurden HP β CD, Propofol/HP β CD und Na-Propofolat/HP β CD hinsichtlich ihrer chemischen, biologischen und physikalischen Eigenschaften untersucht.

4.1 ¹H-NMR-Spektroskopie

Durch die ¹H-NMR-Spektroskopie sollte die potentielle Komplexbildung des Narkotikums mit dem Cyclodextrinderivat HP β CD untersucht werden. Da die physiochemischen Eigenschaften der Cyclodextrinderivate variieren,⁴³ wurde zur Etablierung der Methodik neben Propofol, HP β CD, Propofol/HP β CD und

Na-Propofolat/HP β CD auch β -Cyclodextrin untersucht und die Ergebnisse mit der Literatur verglichen.

Im Fall des $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums von Propofol (Abbildung 11) entsprechen die Integralfächen unter den Signalen der Molekülstruktur und stimmen mit der Literatur überein.⁶³ Insbesondere zeigt sich für die Hydroxylgruppe mit 7,96 ppm eine vergleichsweise hohe Resonanzfrequenz aufgrund der starken Elektronegativität des Sauerstoffs und des Einflusses des aromatischen Rings, während sich für die Methylgruppe mit 1,15 ppm ein eher niedrigeres Resonanzsignal ergibt. Auch die für β -Cyclodextrin vorgenommene $^1\text{H-NMR}$ -Messung entspricht der Literatur (Abbildung 12).^{152,164} Für Propofol als auch für β -Cyclodextrin ergab sich bei ca. 3,29 ppm der für das Lösungsmittel DMSO- d_6 typische H_2O -Peak.¹⁶⁵ Die vergleichbaren Ergebnisse in anderen Veröffentlichungen legen eine korrekte Zuordnung der Signale nahe.¹⁵² Für HP β CD (Abbildung 13) zeigen sich zwar der Literatur entsprechende Signale, da die Signale zum Teil abweichend interpretiert wurden, erfolgte zusätzlich die Berechnung des $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums auf Basis der Molekülstruktur mit Hilfe der Software *NMR Predict*.^{153,157,166} Im Vergleich zu dem $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des β -Cyclodextrins (Abbildung 12) zeigen sich Unterschiede in der chemischen Verschiebung der Signale durch die Substitution der Isopropylgruppen an den drei Hydroxylgruppen, die mit der Abkürzung R in Abbildung 13 gekennzeichnet sind. Die beste Übereinstimmung ergibt sich bei nur einer Substitution an einer der Hydroxylgruppen des Cyclodextrinrings. Die Zuordnung der verschiedenen Signale zu den Protonen wurde entsprechend der Ergebnisse der Rechnungen durchgeführt.

Das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des Propofol/HP β CD (Abbildung 15) zeigt die charakteristischen Peaks der beiden Substanzen und belegt das Vorhandensein von Propofol und HP β CD, wie auch aus der Übersicht über die Spektren der gesamten, untersuchten Substanzen ersichtlich wird (Abbildung 17). Das Verhältnis der Integralwerte der jeweiligen Signale entspricht den Integralwerten sowohl von Propofol als auch von HP β CD. Durch die Überlagerung mit weiteren Signalen lässt sich basierend auf den Spektren

keine Aussage über die chemischen Verschiebungen zwischen dem H-3 und dem H-5 des HP β CD treffen. Für eine Komplexbildung eines β -Cyclodextrinderivates mit einem Medikament sollte sich an diesen Positionen eine chemische Verschiebung zeigen.¹⁵⁷

In den von *Trapani et al.* durchgeführten Versuchen konnte für das Lösungsmittel D₂O eine chemische Verschiebung des Propofol/HP β CD gegenüber den einzelnen Substanzen Propofol und des HP β CD für H-3 und H-5 gezeigt werden.⁷¹ Aufgrund der Überlagerung in den hier durchgeführten Messungen lässt sich die Frage, ob und in welcher Weise Propofol in dem Inneren des Hohlraumes des HP β CD lokalisiert ist, mit Hilfe der ¹H-NMR-Spektroskopie nicht beantworten. Erschwerend kommt hinzu, dass auch aufgrund der Überlagerung durch den Peak des Wassers mit dem Peak des H-3 und H-5 des HP β CD eine genauere Interpretation nicht möglich ist. Weitere ¹H-NMR-Untersuchungen der Substanzen sollten ein Lösungsmittel mit möglichst wenig Störsignalen in diesem Bereich favorisieren. Dass die Auswertungen des HP β CD bzw. der Substanzen korrekt durchgeführt wurden, zeigt sich in der hohen Übereinstimmung zwischen den Signalen der jeweiligen Positionen der einzelnen Substanzen als auch bei der Komplexbildung.

Zudem war es Ziel der Arbeit, Na-Propofolat/HP β CD mittels ¹H-NMR-Spektroskopie zu untersuchen. Die Integralwerte des ¹H-NMR-Spektrums von Na-Propofolat/HP β CD (Abbildung 16) stehen im Einklang mit denen des ¹H-NMR-Spektrums von Propofol/HP β CD (Abbildung 15). Das Fehlen des Signals der Hydroxylgruppe in Abbildung 16 bildet dabei den wesentlichen Unterschied. Basierend auf den ¹H-NMR-Spektren lässt sich somit für diese Substanzen zeigen, dass in dem untersuchten Komplex Propofolat als deprotonierte Form des Propofols vorliegt. Dies entspricht dem 2012 angemeldeten Patent für Propofolat. In diesem wird beschrieben, dass Propofol als deprotonierte Form des Propofols vorkommt und somit in dieser Zusammensetzung mit HP β CD als Anion vorliegt.⁸⁶

Das molare Verhältnis von Propofol/HP β CD zu freiem HP β CD wurde von *Lofsson* auf Grundlage seiner Berechnungen für wasserlösliches Propofol und

Lösungen des Cyclodextrinderivates mit 1:2 beziffert.¹⁶⁷ Dies legt nahe, dass unter der Annahme von einem Gast-Wirt-Verhältnis von Propofol und Cyclodextrin von 1:1 in diesem Fall nur jedes dritte HP β CD in einem Komplex mit Propofol gebunden ist. In welchem Verhältnis Propofol und HP β CD für die beiden Festkörperkomplexe vorliegen, kann durch die ¹H-NMR-Spektroskopie nicht endgültig geklärt werden.

4.2 Molekulare Modellierungen

Sowohl die statischen als auch die dynamischen Modellierungen lassen Rückschlüsse auf die Struktur der Substanzen zu. Aufgrund des niedrigeren Enthalpiewertes der Bindung des Propofols an den Cyclodextrinring lässt sich für Propofol/HP β CD eine insgesamt deutlich erhöhte Stabilität der Bindungsfestigkeit gegenüber Na-Propofolat/HP β CD vorhersagen. Geht man von gleichen Konzentrationen von Propofol/HP β CD und Na-Propofolat/HP β CD aus, ist zu erwarten, dass im Fall des Na-Propofolats die Konzentration an freiem Propofol höher ist, da aufgrund der schwächeren Bindung des Propofols das chemische Gleichgewicht in Richtung der dissoziierten Moleküle verschoben wird. Ist das Ziel, eine länger wirkende Dosierung bei einer mehr oder weniger gleichen Menge an Propofol zu erreichen, empfiehlt sich der Einsatz des Propofol/HP β CD, da hier die Bindung des Propofols an den Komplex fester ist. Somit würde Propofol langsamer freigesetzt und würde über einen längeren Zeitraum wirken.

Die durchgeführten statischen und dynamischen Modellierungen dieser Arbeit stehen zum Teil im Gegensatz zu der Arbeit von *Trapani et al.*. Bei *Trapani et al.* wurde beschrieben, dass der gesamte aromatische Ring des Propofols in der Cavität des Cyclodextrinderivates lokalisiert und durch Van-der-Waals-Kräfte gebunden ist.⁷¹ Hingegen ergeben die Modellierungen in dieser Arbeit zum einen Enthalpiewerte, die in ihrer Größenordnung schwachen Wasserstoffbrückenbindungen entsprechen.¹⁵⁵ Dies korrespondiert mit

Untersuchungen, die ebenfalls für Einschlusskomplexe mit HP β CD diese Form der chemischen Bindungen beschreiben.^{168,169}

Zum anderen legen die Modellierungen dieser Arbeit nahe, dass lediglich die Methylgruppen und die Hydroxylgruppe des Propofols in den Cyclodextrinring hineinragen, während der aromatische Ring außerhalb des Rings lokalisiert ist. Für die Modellierungen dieser Arbeit sprechen die elektrostatischen Abstoßungen innerhalb des Cyclodextrinmoleküles: Die π -Elektronen, die die Doppelbindung verursachen, stehen senkrecht auf der Ebene des aromatischen Rings. Dadurch resultiert im Außenraum des Rings eine stark negative Ladungsdichte. Im Falle einer vollständigen Integration des aromatischen Rings des Propofols in die Cavität wäre somit eine starke Abstoßung mit den sich innerhalb des Cyclodextrinrings befindenden Elektronen aller Atome zu erwarten. Daher ist das Ergebnis der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten molekularen Modellierungen plausibel, dass die Hydroxylgruppen in die Cavität hineinragen und dort über Wasserstoffbrückenbindungen gebunden sind.

4.3 Differential Scanning Calorimetry (DSC)

Die DSC lässt weitere Rückschlüsse über die untersuchten Substanzen zu. Beim ersten Erhitzen zeigt sich zwischen 30 °C – 125 °C bzw. 150 °C ein Peak, der charakteristisch für HP β CD ist und in allen drei getesteten Substanzen zu erkennen ist. Dieser resultiert aus der Abgabe von Wasser aus der Cavität des Cyclodextrins (Abbildung 21a).^{156,157} Im Einklang dazu konnte ein Peak in dem entsprechenden Temperaturbereich bei den Untersuchungen anderer Medikamente mit β -Cyclodextrin und HP β CD nachgewiesen werden.^{107,156,157,170} Zudem ergibt sich bei dem ersten Erhitzen in dem Temperaturbereich zwischen 270 °C und 280 °C ein weiterer, in den Messungen aller drei Substanzen auftretender Peak. In diesem Temperaturbereich entspricht der Peak ebenfalls der Literatur, hier liegt der Schmelzpunkt des HP β CD (siehe Tab. 2).¹⁵⁶ Der

Peak liegt deutlich höher als der Siedepunkt des Propofols, der in der Literatur mit 256 °C angegeben wird.⁶ Da ein Peak als Hinweis auf das Verdampfen des Propofols fehlt, ist von einer Komplexbindung bei Propofol/HP β CD und Na-Propofolat/HP β CD auszugehen. Aus Abbildung 21b ergibt sich für das zweite Erhitzen mit 241 °C eine höhere Glasübergangstemperatur für HP β CD als für Propofol-HP β CD mit 229 °C und Na-Propofolat-HP β CD mit 227 °C. Dass es durch die Bildung von Einschlusskomplexen zu einer Reduktion der Glasübergangstemperatur im Vergleich zum HP β CD kommt, steht im Einklang mit der Literatur.¹⁷¹ Die vergleichsweise höhere Glasübergangstemperatur des HP β CD gegenüber anderen substituierten Derivaten des β -Cyclodextrins wird durch die Substitution des Wasserstoffstoffs an der Hydroxypropylgruppe bedingt, da sich durch eine Kettenverlängerung des Moleküls durch eine verringerte Ordnung eine erhöhte Beweglichkeit und somit eine geringere Glasübergangstemperatur ergibt.¹⁶⁴ Im Vergleich zu Cyclodextrinen und weiteren Kohlenhydraten mit einem höheren Molekulargewicht zeigt HP β CD eine hohe Glasübergangstemperatur. So liegt HP β CD mit einem Molekulargewicht von $M_w = 1400$ g/mol bezüglich der Glasübergangstemperatur beispielsweise 30 °C über der Glasübergangstemperatur des Polysaccharids Dextran 10 mit $M_w = 10.000$ g/mol und 90 °C über der Glasübergangstemperatur des methylierten β -Cyclodextrins mit einem ähnlichen Molekulargewicht von $M_w = 1310$ g/mol.¹⁷³

Die hohe Glasübergangstemperatur, die unter Beachtung der Relaxationsphänomene als Maßstab für die physikalische Stabilität eines Feststoffes betrachtet werden kann, bildet ein weiteres Argument für die Favorisierung des HP β CD zur Einbettung der Wirkstoffe gegenüber weiteren Cyclodextrinen.¹⁷³ Hohe Glasübergangstemperaturen sind ein Kennzeichen für starke intramolekulare Wechselwirkungen. Diese können sich ausbilden, wenn die intramolekulare Ordnung möglichst wenig gestört ist. Eine solche Störung wird verursacht durch den Einbau des Propofols in die Struktur. Insofern entspricht der Einbau des Propofols somit einer Absenkung der Glasübergangstemperatur, die an den Messungen zu erkennen ist. Gemeinsam

mit dem Fehlen des Verdampfungspeaks in der DSC-Messung untermauert die Absenkung der Glasübergangstemperatur die Komplexbildung des Propofols mit den untersuchten Cyclodextrinderivaten.

Ein Ziel der Arbeit war es, die Komplexbildung der Substanzen in Hinblick auf ihre physiko-chemischen Eigenschaften zu untersuchen. Als Ausgangslage wurde einerseits in früheren Untersuchungen eine für die medizinische Anwendung potentiell geeignete Stabilität für Propofol/HP β CD vermutet.⁷⁰ Andererseits konnte gezeigt werden, dass die Substitution einer Hydroxypropylgruppe, wie sie bei HP β CD vorliegt, mit einer schwächeren Komplexbindung assoziiert ist und die Komplexbildung erschwert.⁶⁰ Auf Grundlage der DSC-Messungen kann von einer Komplexbildung für Propofol/HP β CD ausgegangen werden. Darüberhinaus wird ebenso für das 2012 patentierte Na-Propofolat/HP β CD eine Komplexbildung nahegelegt, da auch für diese DSC-Messungen kein Verdampfen oberhalb der Siedetemperatur des Propofols festgestellt wurde. Mit einer Komplexbildung stimmen auch die molekularen Modellierungen überein, die für beide Substanzen Enthalpiewerte ergeben, die in dem Bereich der für HP β CD-Komplexe typischen Wasserstoffbrückenbindungen liegen.¹⁶⁸ Die durch die DSC-Messungen nahegelegte Komplexbildung korrespondiert mit der Literatur. So konnte durch *Weilers* physiko-chemische Untersuchungen für HP β CD das größte Potential zur Stabilisierung von Wirkstoffkomplexen im Vergleich zu anderen amorphen Trägersubstanzen inklusive Cyclodextrinderivaten gezeigt werden.¹⁷³ Dies bestätigt sich nicht zuletzt durch Veröffentlichungen, bei denen ebenfalls eine Komplexbildung zwischen HP β CD und verschiedenen Medikamenten gezeigt werden konnte.^{107,168,171} Allerdings konnte eine Komplexbildung ebenfalls für weitere Derivate des β -Cyclodextrins nachgewiesen werden.^{70,170} Für die Verwendung des HP β CD spricht aber in dem Kontext dieser Analyse die hohe Stabilität der Komplexe, die entscheidend ist für die Möglichkeit einer guten Lagerbarkeit der Medikamente und eine Grundvoraussetzung für eine breite klinische Verwendung darstellt.¹⁷³

Andererseits ist Propofol mit den in dieser Arbeit errechneten Bindungsenergien der Wasserstoffbrückenbindungen ausreichend schwach gebunden, so dass es bei der Anwendung abgespalten werden kann. Für weitere Untersuchungen empfiehlt sich an dieser Stelle die Bestimmung von Komplexbildungskonstanten, um die Abspaltung des Propofols aus dem Komplex besser zu quantifizieren. Ein weiteres Argument für HP β CD ist die im Vergleich zu weiteren β -Cyclodextrinderivaten für die Einbindung des Propofols in den Ring geeignete Größe der Cavität.¹⁷¹

Aus den ¹H-NMR-Spektren lässt sich aufgrund der Überlagerungen der Signale keine detaillierte Analyse der Komplexbildung vornehmen. Allerdings legt sowohl das gemessene als auch das errechnete ¹H-NMR-Spektrum des HP β CD eine Substitution von nur einer der insgesamt drei möglichen Hydroxylgruppen nahe (siehe 3.1.3). Die Signale des HP β CD sind dabei im gleichen Verhältnis wie die Signale des HP β CD in den ¹H-NMR-Spektren von Propofol/HP β CD (Abbildung 15) und Na-Propofolat/HP β CD (Abbildung 16) vorhanden. Daher kann argumentiert werden, dass entsprechend der Literatur ein niedriges Maß an Substitution für HP β CD für die Komplexbildung zu bevorzugen ist, wie es auch in den hier untersuchten Substanzen vorliegt.⁶⁰ Zur weiteren Analyse mittels NMR-Spektroskopie ist für zukünftige Untersuchungen die Verwendung einer 2D-NMR-Spektroskopie (z.B. ROESY, COSY) und ggf. eine Untersuchung mittels ¹H-NMR-Spektroskopie mit einer höheren Magnetfeldstärke zur besseren Auflösung zu empfehlen. Beides wurde bereits für andere HP β CD-Einschlusskomplexe verwendet und bildet die Grundlage für differenziertere Modellierungen, wenn auch die Autoren der Veröffentlichungen angeben, dass sich die Auswertung der Peaks der ¹H-NMR-Spektren für HP β CD schwierig gestaltet habe.¹⁷⁴ Auf diese Weise könnten Komplexe der Propofol/HP β CD weiter analysiert werden, wie es bereits für weitere Substanzen angewandt wurde.¹⁷⁵

4.4 Zytoxizitätstests

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit besteht in der Analyse der Zytotoxizität durch die dreimalige Durchführung des MTT-Tests, des LDH-Assays und des EZ4U-Tests für die zu untersuchenden Substanzen. Ergänzt wurden diese Testverfahren durch den Comet-Assay, um eine mögliche Genotoxizität der Substanzen zu ermitteln. Aus der Abbildung 30, die als Übersicht die Resultate dargestellt, wird die gleiche Größenordnung der Zytotoxizität der Substanzen in den jeweiligen Testverfahren evident. Sowohl für die Ergebnisse der Zytotoxizitätstests (CerebEND-Zelllinie) als auch für den Comet-Assay (HL-60-Zelllinie) zeigt sich ein ähnliches Verhältnis für die Substanzen HP β CD, Propofol/HP β CD und Na-Propofolat/HP β CD im Vergleich mit der PK.

Bei dem LDH-Assay liegen die Mittelwerte von Propofol/HP β CD 11,2 % ($p_{adj} < 0,001$), von Na-Propofolat/HP β CD 2,1 % ($p_{adj} < 0,001$) und von HP β CD 13,8 % ($p_{adj} < 0,001$) unter dem Mittelwert der PK. Dies entspricht den Ergebnissen des EZ4U-Tests, bei dem die Substanzen mit einer Differenz von 15,2 % ($p_{adj} < 0,001$) für Propofol/HP β CD und 20 % ($p_{adj} < 0,001$) für HP β CD unter der PK liegen. Na-Propofolat/HP β CD überschreitet in dieser Untersuchung die PK um 14 % ($p_{adj} < 0,001$).

Bei der Auswertung des MTT-Tests zeigt sich im Vergleich dazu eine noch geringere Zytotoxizität für die getesteten Substanzen. So liegen die Resultate mit 40,5 % ($p_{adj} < 0,001$) für Propofol/HP β CD, mit 64,5 % ($p_{adj} < 0,001$) für Na-Propofolat/HP β CD und mit 1,6 % für HP β CD ($p_{adj} = 1,0$) über dem Mittelwert der PK.

Zusammenfassend liegen für den LDH-Assay alle drei Substanzen unter der PK und für den MTT-Test alle drei Substanzen oberhalb der PK. Für den EZ4U-Test liegen Propofol/HP β CD und HP β CD unterhalb der PK, während für Na-Propofolat/HP β CD ein Mittelwert oberhalb der PK resultiert.

In allen drei Testverfahren zeigen die untersuchten Substanzen die gleiche Reihenfolge in ihren zytotoxischen Eigenschaften. So besitzt

Na-Propofolat/HP β CD die niedrigsten Zytotoxizitätswerte und HP β CD die vergleichsweise höchsten. Für Propofol ergaben die drei Testverfahren eine sehr hohe Zytotoxizität mit kaum verbleibenden vitalen Zellen. Dies deckt sich mit den Publikationen, die an verschiedenen Zelllinien eine hohe Zytotoxizität des Narkotikums nachweisen konnten.^{176–182} Auf welche Weise die Zytotoxizität des Propofols vermittelt wird, wird in den genannten Arbeiten diskutiert. Einer neueren Veröffentlichung zufolge fungiert Propofol als klassischer Protonophor, wobei die Zytotoxizität auf Grundlage der Translokation von Protonen durch Doppellipidschichten beruhen könnte.¹⁸³ Laut der Autoren dieser Arbeit würde die mitochondriale Depolarisation die Apoptose durch die Aktivierung von Caspase-9, Caspase-3 und DNA-Fragmentation induzieren.¹⁸³ Inwieweit sich dieser Mechanismus bestätigen lässt, ist noch nicht abschließend geklärt. In der vorliegenden Arbeit zeigt sich durch die Komplexbildung mit dem Cyclodextrinderivat eine stark reduzierte Zytotoxizität für das Propofol. Der Effekt der Cyclodextrine, durch Komplexbildung eine verminderte Zytotoxizität der andernfalls zytotoxischen Medikamente hervorzurufen, konnte bereits für andere Arzneimittel beschrieben werden.^{170,184,185} Demgegenüber stehen Veröffentlichungen, die Hinweise für eine Verstärkung des zytotoxischen Potentials durch Cyclodextrinderivate liefern.¹⁸⁶ Für Propofol/HP β CD und Na-Propofolat/HP β CD ergibt sich auf Grundlage der in dieser Arbeit verwendeten Testverfahren (MTT-Test, LDH-Assay, EZ4U-Test) keine Zytotoxizität für die untersuchte CerebEND-Zelllinie.

4.4.1 Zytotoxizität des Propofols an der Blut-Hirn-Schranke

Um Rückschlüsse auf die Effekte der Substanzen auf die Prozesse an der Blut-Hirn-Schranke ziehen zu können, wurden für die Versuche CerebEND-Zellen gewählt. Diese endotheliale Zelllinie wird aus dem Kleinhirn neonataler Mäuse gewonnen.⁷⁸ Neben der bereits genannten Aktivierung der Apoptose spielen für die Zytotoxizität des Propofols für die BHS-Zellen weitere Faktoren wie die Einschränkung der neuronalen Differenzierung im Mausmodell¹⁸⁷ sowie die Aktivierung von Mikroglia durch Propofol eine Rolle.^{188–190} Auch die durch Propofol induzierte Störung der BHS-Durchlässigkeit wurde bereits im Mausmodell gezeigt und könnte auf der durch Propofol gesteigerten Aktivierung der Hitzeschockproteine (HSP) beruhen.¹⁹¹ In diesem Zusammenhang werden zunehmend Mittel zur Reduktion der Zytotoxizität des Propofols gesucht. Aktuelle Untersuchungen konnten dabei protektive Effekte für zwei Mittel der Gichtbehandlung, das Urikostatikum Febuxostat und das Urikosurikum Benzbromaron, gegen durch Propofol induzierte Schäden an endothelialen Gehirnzellen zeigen.^{188,192}

4.4.2 Zytotoxizität des β -Cyclodextrins und des HP β CD an der Blut-Hirn-Schranke

Die Interaktion der Cyclodextrinderivate mit der Blut-Hirn-Schranke variiert entsprechend der Größe der Cyclodextrinringe. So wurde für die α -Cyclodextrine die höchste und für die γ -Cyclodextrine die niedrigste Zytoxizität an BHS-Endothelzellen beschrieben.¹⁹³ Allerdings liegen auch deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Cyclodextrinen vor. So zeigt sich für β -Cyclodextrin an intestinalen Caco-2-Zellen eine hohe Zytotoxizität, während sich in einer weiteren Untersuchung für HP β CD bei der gleichen Zelllinie bei einer Dosierung der mittleren inhibitorischen Konzentration von bis zu 200 mmol/l keine Zytotoxizität nachweisen ließ.^{194–196}

In einem Review, das gezielt die toxischen Effekte des HP β CD untersuchte, bestätigte sich die limitierte Toxizität dieses Cyclodextrinderivates.¹⁹⁷ Aus den Untersuchungen an Ratten, Mäusen und Hunden zeigte sich insbesondere für die orale Applikation ein gutes Vertragen der Substanz, während die intravenöse Anwendung histopathologische Veränderungen an Lunge, Leber und Niere bei den Tieren ergab, die sich aber vollständig reversibel zeigten.¹⁹⁷ Für Menschen wurde im Rahmen dieses Reviews ein weitgehend gutes Vertragen des HP β CD ohne Einschränkung der Nierenfunktion beschrieben. Hingegen wurde in einer späteren Untersuchung aufgrund einer für Mäuse und Ratten nachgewiesenen Erhöhung der Transaminasewerte nach der Gabe von HP β CD vor einer Hepatotoxizität gewarnt und eine ausschließlich vorsichtige Verwendung des Cyclodextrinderivates gefordert.¹⁹⁸ Inwieweit dies ein Hindernis für die klinische Verbreitung des Propofol/HP β CD bzw. des Na-Propofolat/HP β CD sein könnte, bleibt Gegenstand weiterer Forschung. Allerdings bietet neben den fortgesetzten Untersuchungen zu Komplexbildungen zwischen HP β CD und anderen Medikamenten auch die Einstufung des Cyclodextrinderivates durch die US-amerikanische FDA (*Food and Drug administration*) als extrem sichere, pharmazeutisch inaktive Trägersubstanz, Grund für die Annahme, dass HP β CD weiterhin für die Komplexbildung mit Medikamenten in Frage kommt.^{199,200}

Auch an Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke zeigt sich für HP β CD im Gegensatz zu β -Cyclodextrin keine Zytotoxizität.²⁰¹ Dies entspricht den Resultaten dieser Arbeit, die für HP β CD keine Zytotoxizität an der CerebEND-Zelllinie in allen drei Versuchen ergaben. Ebenfalls steht dies in Übereinstimmung mit der Verwendung des HP β CD in weiteren Anwendungsbereichen. So zeigt sich in einer aktuellen Studie für HP β CD gegenüber weiteren Cyclodextrinderivaten eine deutlich geringere Zytotoxizität an Retinazellen.¹⁹⁴

4.4.3 Propofol/HP β CD und Na-Propofolat/HP β CD an der Blut-Hirn-Schranke

In welchem Umfang durch die Komplexbildung mit dem HP β CD die Zytotoxizität des Propofols an der Blut-Hirn-Schranke reduziert wird, kann in dieser Arbeit nicht abschließend beantwortet werden und muss in weiterführenden Untersuchungen ermittelt werden. Zumindest legen die Resultate dieser Arbeit nahe, dass keine Erhöhung der Zytotoxizität der CerebEND-Zelllinie durch die Gabe von Propofol/HP β CD und Na-Propofolat/HP β CD resultiert. In diesem Zusammenhang korrespondieren diese Ergebnisse mit anderen Untersuchungen, die eine Reduktion bzw. eine fehlende Erhöhung der Zytotoxizität durch die Komplexbildung mit Cyclodextrinen zeigen konnten.^{184,185} Ansatzpunkte für weitere Untersuchungen bestehen in der dosisabhängigen Untersuchung der Zytotoxizität. Auf zusätzliche, bereits veröffentlichte Optionen zur Vorhersage der Zytotoxizität von Cyclodextrinkomplexen an der Blut-Hirn-Schranke kann dabei zurückgegriffen werden.²⁰²

Einen weiteren zentralen Aspekt für die Untersuchung der Cyclodextrinkomplexe stellt der Transport des Narkotikums an der Blut-Hirn-Schranke dar. In diesem Zusammenhang wurde bereits für weitere HP β CD-Einschlusskomplexe eine gesteigerte BHS-Permeabilität beschrieben.²⁰³ Im Rahmen ihrer Arbeit untersuchte *Appelt-Menzel* die Transportgeschwindigkeit für Propofol/HP β CD und Na-Propofolat/HP β CD an BHS-Endothelzellen. Gegenüber Propofol zeigte sich hierbei für Propofol/HP β CD als auch für Na-Propofolat/HP β CD eine bis zu dreifach erhöhte Transportgeschwindigkeit an stammzellbasierten BHS-Modellen.²⁰⁴ Dieses Ergebnis bildet ein zentrales Argument für die Fortführung detaillierter Untersuchungen von Propofol/HP β CD und Na-Propofolat/HP β CD an der Blut-Hirn-Schranke, wie sie auch von *Appelt-Menzel* gefordert wurden.²⁰⁴

4.5 Comet-Assay

Mit Hilfe des Comet-Assays wurde die genotoxische Wirkung der Substanzen an der HL-60-Zelllinie untersucht. Durch die vor der eigentlichen Auswertung durchgeführte Bestimmung der Zellvitalität zeigten sich ausreichende Werte für HP β CD, Propofol/HP β CD und Na-Propofolat/HP β CD an den HL-60-Zellen (siehe Anhang 4). Demgegenüber weist das Propofol als Lipidemulsion eine hohe Letalität der Zellen auf, so dass keine Auswertung des Comet-Assays vorgenommen werden konnte. Die Zellvitalität der verwendeten Zellen, die über 70 % liegen sollte, stellt eine Grundbedingung für die Auswertung des Comet-Assays dar.¹⁶³

Die durch die Vorversuche mit H₂O₂ etablierte Auswertung zeigt für die Substanzen HP β CD, Propofol/HP β CD und Na-Propofolat/HP β CD fehlende genotoxische Effekte nach 24-stündiger Exposition bei 37 °C an den HL-60-Zellen. Dies korrespondiert mit weiteren Arbeiten, in denen ein mit β -Cyclodextrinderivaten assoziierter, protektiver Effekt im Comet-Assay beschrieben wurde.^{205,206} Für HP β CD legen zudem weitere Versuchsreihen anderer Autoren Hinweise auf eine nicht vorhandene Genotoxizität nahe. So zeigt das β -Cyclodextrinderivat keine Genotoxizität in dem DNA-Synthese-Test zur Messung eines DNA-Schadens, in dem Maus-Lymphom-Test zur Detektion von Genmutationen und in dem Humanlymphozytentest zum Nachweis einer möglichen chromosomalen Anomalie.¹⁹⁷ Die Ergebnisse dieser drei Tests stimmen mit den in diesem Versuch ermittelten Resultaten des Comet-Assays überein und unterstützen die These, dass HP β CD keine genotoxische Wirkung zeigt.¹⁹⁷

Bezüglich der Genotoxizität der Komplexe zwischen HP β CD und anderen Arzneimitteln entspricht das Resultat dieser Arbeit weiteren Veröffentlichungen, für die ebenfalls keine Genotoxizität für HP β CD-Komplexe nachgewiesen wurde.^{206,207} Als weiterer Ansatzpunkt können zukünftig neben der in dieser Arbeit getesteten akuten Toxizität (MTT-Test, LDH-Assay und EZ4U-Test) und

der akuten Genotoxizität (Comet-Assay) weitere Aspekte der Substanzen wie die chronische Toxizität bzw. die chronische Genotoxizität sowie die Kanzerogenität untersucht werden.²⁰⁸

4.6 Alternative Formulierungen von Propofol

In seinem 2010 im *British Journal of Anaesthesia* veröffentlichten Artikel *Exploring the frontiers of propofol formulation strategy: is there life beyond the milky way?* stellt Egan die Frage, ob durch die unterschiedlichen Formulierungen des Propofols eine Reduktion der Nebenwirkungen ermöglicht werden kann.³⁹ Inwiefern Komplexe aus Cyclodextrinen und Propofol bei dieser Fragestellung eine tragende Rolle spielt, bleibt abzuwarten. Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen zeigen zumindest, dass die Propofol/HP β CD-Formulationen gewisse Erfolgsaussichten versprechen, denen weiter nachgegangen werden kann. So zeigt sich einerseits auf Basis dieser Arbeit bestätigt, was Baker et al. für die Einschlusskomplexe zwischen Cyclodextrinen und Medikamenten beschrieben haben. Durch die in dieser Arbeit nachgewiesene Komplexbildung kommt es zu einer Veränderung der physikalischen, chemischen und biologischen Eigenschaften sowohl gegenüber dem Medikament als auch gegenüber dem Cyclodextrinderivat.⁴³ Beispielsweise zeigt sich im Gegensatz zum Propofol als Lipidemulsion keine Zytotoxizität des in dem Komplex mit HP β CD gebundenen Propofols mehr. Andererseits legen weitere Arbeiten eine nur wenig veränderte Wirkung der Formulierungen der Cyclodextrinen/Propofol-Komplexe gegenüber dem Propofol als Lipidemulsion nahe. So konnte für eine Formulierung von Propofol mit dem Cyclodextrinderivat Sulfobutylether- β -cyclodextrin (SBE β CD) bei einer dreistündigen Infusion am Schweinmodell eine weitgehende Übereinstimmung der pharmakologischen und pharmakodynamischen Eigenschaften mit dem Propofol als Lipidemulsion nachgewiesen werden.²⁰⁹ Wenn auch keine direkt entsprechende Untersuchung für HP β CD vorliegt, scheint auch für die

Propofol/HP β CD-Komplexe eine mit Propofol vergleichbare Wirkung zu resultieren. So wurde sogar passend zu der bereits angesprochenen erhöhten Transportgeschwindigkeit an der Blut-Hirn-Schranke eine reduzierte Induktionszeit und eine verlängerte Wirkungszeit für Propofol/HP β CD im Vergleich zu dem Propofol am Mausmodell beschrieben.^{71,204} Auch in weiteren Untersuchungen zeigt sich für eine weitere HP β CD-Formulierung ein wirksamer Transport des Propofols mit einem raschen Narkoseeintritt.²¹⁰ Ausgehend von seiner Arbeit argumentierten *Mcintosh et al.* für ein Drei-Kompartiment-Modell zur pharmakokinetischen Beschreibung des Propofol/HP β CD für Säugetiere, entsprechend dem Drei-Kompartiment-Modell von *Cockshott* zur Analyse der Verteilung des Propofols als Lipidemulsion (siehe 1.3).²¹⁰ Als Herausforderung für die zukünftige Verwendung von Cyclodextrinen wurde allerdings die erneute Bindung des Cyclodextrinderivates an andere lipophile Substanzen nach einer Desorption des Propofols an dem Wirkungszielort beschrieben.⁴³ In diesem Zusammenhang wird beispielsweise das Muskelrelaxanz Rocuronium genannt, für das ebenfalls Bindungen an Cyclodextrine nachgewiesen wurden.^{43,211} Dies könnte zu einer unerwünschten Verkürzung der Wirkung des Muskelrelaxanz führen. Detaillierte Untersuchungen werden somit zur weiteren Analyse der pharmakologischen Eigenschaften des Propofol/HP β CD als auch zur Untersuchung der potentiellen Interaktionen mit anderen Medikamenten notwendig sein. Als Vorschlag zur Umgehung dieser Probleme kommt die zusätzliche Applikation pharmazeutisch inaktiver Substanzen, die stark an die Cyclodextrinderivate binden und andere Substanzen aus dem Komplex verdrängen, in Betracht.

Aufgrund der vielversprechenden Ausgangslage wurden bereits erste Untersuchungen zur Veränderung der Nebenwirkungen des Propofols durch die Cyclodextrinformulierungen vorgenommen. Hierbei zeigte sich bis dato keine Verbesserung des Nebenwirkungsprofiles. Im Gegenteil ergab sich bei gesunden Erwachsenen eine Zunahme des Injektionsschmerzes durch eine Propofolverbindung mit Sulfobutylether- β -cyclodextrin (SBE β CD).²¹² Ebenso resultierte entsprechend der Gabe des Propofols als Lipidemulsion auch bei

einer Bolusgabe des Propofol/HP β CD in wässriger Lösung bei einer Dosierung von 5 mg/kg eine Bradykardie der untersuchten Ratten, die nicht nach einer Bolusgabe des alleinigen HP β CD auftrat.⁴⁵

Ein großer Vorteil des HP β CD liegt aber in der Vielfalt der Verwendungsmöglichkeiten, die von der beschriebenen Formulierung als wässrige, injektionsgeeignete Lösung⁸⁶ bis hin zu einer hypothetischen, sublingualen Applikationsform reichen.¹⁶⁷ Für Letzteres sprechen nicht zuletzt auch die günstigen pharmakokinetischen Voraussetzungen wie sie von *Lofsson et al.* beschrieben wurden, als auch das gute Vertragen von oralen HP β CD-Formulationen im Tiermodell.^{167,197} Die durch die Komplexe reduzierte Induktionszeit, verlängerte Wirkungszeit und die erhöhte Transportgeschwindigkeit an der Blutschranke könnten gegebenenfalls zu einer Reduzierung der Dosierung führen, die eine Verbesserung des Nebenwirkungsprofiles bedingen könnte.^{71,204} Auch neuere Formulierungen wie Na-Propofolat/HP β CD als Ergänzungen der Applikationsmöglichkeiten könnten Ansatzpunkte für eine weitere Forschung mit HP β CD liefern. Insbesondere wäre auch im Kontext der bereits 1996 durchgeführten Studie, in der für die wässrige Lösung des Propofol/HP β CD nach Bolusgabe eine Bradykardie beschrieben wurde, eine neuere Analyse der klinischen Wirkung weiterer Propofol/HP β CD-Formulierungen von Interesse. Bei der Frage der Umsetzbarkeit der Formulierungen werden die entscheidenden Kriterien die Dosierung als auch die Wirkung des Medikamentes bei der gegebenen Dosierung bleiben.¹⁶⁷

Zusammenfassend stellen Propofol/HP β CD und Na-Propofolat/HP β CD eine potentiell zukunftssträchtige Alternative zur Verwendung des konventionellen Propofols dar und sollten als Option in weiterführender Forschung untersucht werden.

5. Zusammenfassung

Trotz des breiten, klinischen Einsatzes des Propofols haben sich aufgrund bestehender Nebenwirkungen zunehmend Bestrebungen entwickelt, alternative Formulierungen zur Lipidemulsion zu finden. In dieser Arbeit wurden die Substanzen Propofol/HP β CD und Na-Propofolat/HP β CD als alternative Formulierungen des Propofols mittels ^1H -NMR-Spektroskopie, molekularer Modellierungen, DSC-Messungen, Zytotoxizitätstests (MTT-Test, LDH-Assay, EZ4U-Test) und dem Comet-Assay als Genotoxizitätstest auf biologische, chemische und physikalische Eigenschaften untersucht. Die Frage nach der Komplexbildung zwischen Propofol und HP β CD lässt sich nicht allein auf Basis des 1D- ^1H -NMR-Spektrums beantworten. Allerdings lässt sich mit Hilfe der ^1H -NMR-Spektroskopie für Na-Propofolat/HP β CD das Vorliegen als deprotonierte Form nachweisen. Andererseits legen aber die DSC-Messungen eine Komplexbildung zwischen Propofol und HP β CD nahe. Zum einen ergibt sich das aus den unterschiedlichen Glasübergangstemperaturen der Substanzen. Zum anderen zeigt der Kurvenverlauf für HP β CD als auch für Na-Propofolat/HP β CD und Propofol/HP β CD keinen Verdampfungspeak bis zu der untersuchten maximalen Temperatur von 280 °C trotz des Propofol-Siedepunktes von 256 °C. Die molekularen Modellierungen legen nahe, dass die Bindung zwischen Propofol und Cyclodextrin über die Isopropylgruppen des Propofols erfolgt, wobei der aromatische Ring nicht in die Cavität des Cyclodextrinringes eindringt. Aus den molekularen Modellierungen ergeben sich Enthalpiewerte, die in ihrer Größenordnung schwachen Wasserstoffbrückenbindungen entsprechen. Für das Na-Propofolat/HP β CD lässt sich eine leichtere Abspaltung des Propofols aus dem Komplex voraussagen, wohingegen für Propofol/HP β CD die Abspaltung langsamer, aber über einen längeren Zeitraum erfolgen dürfte. Im Vergleich zu der hohen Zytotoxizität des Propofols als Lipidemulsion ergibt sich aus den an der CerebEND-Zelllinie durchgeführten Zytotoxizitätstests für HP β CD,

Propofol/HP β CD und Na-Propofolat/HP β CD kein Nachweis einer Zytotoxizität nach 24-stündiger Exposition. Die Resultate zeigen für die drei Testverfahren die jeweils gleiche Reihenfolge mit der höchsten Zellvitalität für die mit Na-Propofolat/HP β CD behandelten Zellen und der niedrigsten Zellvitalität für HP β CD. In dem Comet-Assay zeigt sich nach 24-stündiger Exposition bei 37 °C für HP β CD, Propofol/HP β CD und Na-Propofolat/HP β CD keine genotoxische Wirkung an der HL-60-Zelllinie. Die Ergebnisse dieser Arbeit sprechen für die Fortsetzung der Untersuchungen von Propofol/HP β CD und Na-Propofolat/HP β CD als aussichtsreiche Option der Propofol-Formulierungen.

6. Literaturverzeichnis

1. WHO Model List of Essential Medicines, 2019; (21):1. Zuletzt abgerufen am 21.06.2022 unter:
<http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/273826/EML-20-eng.pdf?ua=1>.
2. Vanlersberghe C, Camu F. Propofol. *Handb Exp Pharmacol*. 2008; (182):227-252. doi:10.1007/978-3-540-74806-9_11
3. Sebel PS, Lowdon JD. Propofol: a new intravenous anesthetic. *Anesthesiology*. 1989;71(2):260-277.
4. Diedrich DA, Brown DR. Analytic Reviews: Propofol Infusion Syndrome in the ICU. *J Intensive Care Med*. 2011;26(2):59-72. doi:10.1177/0885066610384195
5. Zacharowski K, ed. 2 Propofol. In: *Pssst...A/NS-Secrets!*. 2015th ed. Georg Thieme Verlag; 2015. doi:10.1055/b-0035-107536
6. DrugBank. Propofol. 2022:1. Zuletzt abgerufen am 21.06.2022 unter:
<https://www.drugbank.ca/drugs/DB00818>
7. Yip GMS, Chen Z-W, Edge CJ, et al. A propofol binding site on mammalian GABAA receptors identified by photolabeling. *Nat Chem Biol*. 2013;9(11):715-720. doi:10.1038/nchembio.1340
8. Frenkel C, Urban BW. Interactions of intravenous anaesthetics with human CNS ion channels: electrophysiologic investigations using a novel voltage-clamp technique. *Anaesthetist*. 1994;43(4):229-234. doi:10.1007/s001010050052
9. Walter S Hans. *Anästhesie - Intensivmedizin - Notfallmedizin: Für Studium und Ausbildung*. Schattauer Verlag; 2016; (9):15-27.
10. Andrade J, Deeprose C. Unconscious memory formation during anaesthesia. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol*. 2007;21(3):385-401. doi:10.1016/j.bpa.2007.04.006
11. Nordström O, Sandin R. Recall during intermittent propofol anaesthesia. *Br J Anaesth*. 1996;76(5):699-701. doi:10.1093/bja/76.5.699

12. Zacny JP, Coalson DW, Young CJ, et al. Propofol at conscious sedation doses produces mild analgesia to cold pressor-induced pain in healthy volunteers. *J Clin Anesth*. 1996;8(6):469-474. doi:10.1016/0952-8180(96)00126-2
13. Kurt M, Bilge SS, Kukula O, Celik S, Kesim Y. Anxiolytic-like profile of propofol, a general anesthetic, in the plus-maze test in mice. *Pol J Pharmacol*. 2003;55(6):973-977.
14. Matsuo M, Ayuse T, Oi K, Kataoka Y. Propofol produces anticonflict action by inhibiting 5-HT release in rat dorsal hippocampus. *Neuroreport*. 1997;8(14):3087-3090. doi:10.1097/00001756-199709290-00016
15. Nadeson R, Goodchild CS. Antinociceptive properties of propofol: involvement of spinal cord gamma-aminobutyric acid(A) receptors. *J Pharmacol Exp Ther*. 1997;282(3):1181-1186.
16. Borgeat A, Stirnemann HR. [Antiemetic effect of propofol]. *Anaesthesist*. 1998;47(11):918-924. doi:10.1007/s001010050643
17. Striebel HW. *Anästhesie-Intensivmedizin-Notfallmedizin: Für Studium Und Ausbildung*. Schattauer Verlag; 2016;9:53,280.
18. Maße & Dosierungen in der Kinderanästhesie, Kinderintensiv- und Kindernotfallmedizin, Göttingen, 2010. Zuletzt abgerufen am 21.06.2022 unter: https://auf-der-bult.de/fileadmin/media/docs/KIB-ARZ/Ma%C3%9Fe_und_Dosierungen_Kinder_An%C3%A4IntensivNotfall_11-09-13__2_.pdf
19. Bolkenius D, Dumps C, Halbeck E. Medikamente zur intravenösen Narkoseinduktion: Propofol. *Anaesthesist*. 2018;67(2):147-162. doi:10.1007/s00101-017-0397-y
20. Raoof AA, Augustijns PF, Verbeeck RK. In vivo assessment of intestinal, hepatic, and pulmonary first pass metabolism of propofol in the rat. *Pharm Res*. 1996;13(6):891-895. doi:10.1023/a:1016057229478
21. Gladtko E, Hattingberg HM von. *Pharmakokinetik: Eine Einführung*. Springer-Verlag; 1973;1,40.
22. Mazoit JX, Samii K. Binding of propofol to blood components: implications for pharmacokinetics and for pharmacodynamics. *Br J Clin Pharmacol*. 1999;47(1):35-42. doi:10.1046/j.1365-2125.1999.00860.x

23. Schüttler J, Schwilden H. Pharmakologische Grundlagen in der Anästhesiologie. In: Rossaint R, Werner C, Zwißler B, eds. *Die Anästhesiologie*. Springer Reference Medizin. Springer; 2019:223-226. doi:10.1007/978-3-662-54507-2_14
24. Sahinovic MM, Struys MMRF, Absalom AR. Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Propofol. *Clin Pharmacokinet*. 2018;57(12):1539-1558. doi:10.1007/s40262-018-0672-3
25. Thiel H, Roewer N. *Anästhesiologische Pharmakotherapie: von den Grundlagen der Pharmakologie zur Medikamentenpraxis ; 214 Tabellen*. Georg Thieme Verlag; 2009;2:128.
26. Simons PJ, Cockshott ID, Douglas EJ, Gordon EA, Hopkins K, Rowland M. Disposition in male volunteers of a subanaesthetic intravenous dose of an oil in water emulsion of ¹⁴C-propofol. *Xenobiotica*. 1988;18(4):429-440. doi:10.3109/00498258809041679
27. Kanto J, Gepts E. Pharmacokinetic implications for the clinical use of propofol. *Clin Pharmacokinet*. 1989;17(5):308-326. doi:10.2165/00003088-198917050-00002
28. Hiraoka H, Yamamoto K, Miyoshi S, et al. Kidneys contribute to the extrahepatic clearance of propofol in humans, but not lungs and brain. *Br J Clin Pharmacol*. 2005;60(2):176-182. doi:10.1111/j.1365-2125.2005.02393.x
29. Cummings GC, Dixon J, Kay NH, et al. Dose requirements of ICI 35,868 (propofol, 'Diprivan') in a new formulation for induction of anaesthesia. *Anaesthesia*. 1984;39(12):1168-1171.
30. Tan CH, Onsiong MK. Pain on injection of propofol. *Anaesthesia*. 1998;53(5):468-476. doi:10.1046/j.1365-2044.1998.00405.x
31. Patrick MR, Blair IJ, Feneck RO, Sebel PS. A comparison of the haemodynamic effects of propofol ('Diprivan') and thiopentone in patients with coronary artery disease. *Postgrad Med J*. 1985;61 Suppl 3:23-27.
32. Tramèr MR, Moore RA, McQuay HJ. Propofol and bradycardia: causation, frequency and severity. *Br J Anaesth*. 1997;78(6):642-651.
33. Eddleston JM, Shelly MP. The effect on serum lipid concentrations of a prolonged infusion of propofol--hypertriglyceridaemia associated with propofol administration. *Intensive Care Med*. 1991;17(7):424-426.

34. Sosis MB, Braverman B. Growth of *Staphylococcus aureus* in four intravenous anesthetics. *Anesth Analg*. 1993;77(4):766-768.
35. Bennett SN, McNeil MM, Bland LA, et al. Postoperative infections traced to contamination of an intravenous anesthetic, propofol. *N Engl J Med*. 1995;333(3):147-154. doi:10.1056/NEJM199507203330303
36. Fudickar A, Bein B. Propofol infusion syndrome: update of clinical manifestation and pathophysiology. *Minerva Anesthesiol*. 2009;75(5):339-344.
37. Krajčová A, Waldauf P, Anděl M, Duška F. Propofol infusion syndrome: a structured review of experimental studies and 153 published case reports. *Crit Care*. 2015;19. doi:10.1186/s13054-015-1112-5
38. Kam PCA, Cardone D. Propofol infusion syndrome. *Anaesthesia*. 2007;62(7):690-701. doi:10.1111/j.1365-2044.2007.05055.x
39. Egan TD. Exploring the frontiers of propofol formulation strategy: is there life beyond the milky way? *Br J Anaesth*. 2010;104(5):533-535. doi:10.1093/bja/aeq059
40. Song D, Hamza M, White PF, Klein K, Recart A, Khodaparast O. The Pharmacodynamic Effects of a Lower-lipid Emulsion of Propofol: A Comparison with the Standard Propofol Emulsion. *Anesthesia & Analgesia*. 2004;98(3):687-691. doi:10.1213/01.ANE.0000103184.36451.D7
41. Soltész S, Silomon M, Gräf G, Mencke T, Boulaadass S, Molter GP. Effect of a 0.5% dilution of propofol on pain on injection during induction of anesthesia in children. *Anesthesiology*. 2007;106(1):80-84. doi:10.1097/00000542-200701000-00015
42. Momot KI, Kuchel PW, Chapman BE, Deo P, Whittaker D. NMR Study of the Association of Propofol with Nonionic Surfactants. *Langmuir*. 2003;19(6):2088-2095. doi:10.1021/la026722g
43. Baker MT, Naguib M. Propofol The Challenges of Formulation. *Anesthes*. 2005;103(4):860-876.
44. Welliver M, McDonough JP. Anesthetic Related Advances with Cyclodextrins. *The Scientific World JOURNAL*. 2007;7:364-371. doi:10.1100/tsw.2007.83
45. Bielen S, Lysko G, Gough W. The effect of a cyclodextrin vehicle on the cardiovascular profile of propofol in rats. *Anesthesia and analgesia*. 1996;82(5):920—924. doi:10.1097/00000539-199605000-00005

46. Deubner R. Quantitative NMR-Spektroskopie zur Reinheitsbestimmung von Arzneistoffen. 2004:19-23,160.
47. Kremer C. Synthese und Evaluation von neuen allosterischen Rezeptoren auf β -Cyclodextrinbasis. 2014:12.
48. Pandey A, Hofer R, Taherzadeh M, Nampoothiri M, Larroche C. *Industrial Biorefineries and White Biotechnology*. Elsevier; 2015.
49. Ueda H, Endo T, Nagase H, Kobayashi S, Nagai T. Isolation, purification, and characterization of cyclomaltoheptaose (ϵ -CD). *J Incl Phenom Macrocycl Chem*. 1996;25(1):17-20. doi:10.1007/BF01041527
50. Freudenberg K. Hydrolysis and optical rotation of cellulose, starch, and cycloglucans. *Journal of Polymer Science*. 1957;23(104):791-799. doi:10.1002/pol.1957.1202310422
51. Stella VJ, Rajewski RA. Cyclodextrins: their future in drug formulation and delivery. *Pharm Res*. 1997;14(5):556-567. doi:10.1023/a:1012136608249
52. Saha S, Roy A, Roy K, Roy MN. Study to explore the mechanism to form inclusion complexes of β -cyclodextrin with vitamin molecules. *Scientific Reports*. 2016;6:35764. doi:10.1038/srep35764
53. Straßnig C. Synthese von Rezeptormolekülen auf Basis von β -Cyclodextrin [Beta-Cyclodextrin]. 2007:3-7. doi:10.22028/D291-22378
54. Baykal A, Bozkurt A, Jeremy R, et al. Multistimuli-responsive magnetic assemblies. In: *Stimuli Responsive Polymeric Nanocarriers for Drug Delivery Applications*. Elsevier; 2019:155-193.
55. Szejtli J. Introduction and General Overview of Cyclodextrin Chemistry. *Chem Rev*. 1998;98(5):1743-1754. doi:10.1021/cr970022c
56. Lindner K, Saenger W. Crystal and molecular structures of cyclomaltoheptaose inclusion complexes with HI and with methanol. *Carbohydrate Research*. 1982;107(1):7-16. doi:https://doi.org/10.1016/S0008-6215(00)80771-5
57. Challa R, Ahuja A, Ali J, Khar RK. Cyclodextrins in drug delivery: An updated review. *AAPS PharmSciTech*. 2005;6(2):E329-E357. doi:10.1208/pt060243
58. Rajewski RA, Stella VJ. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 2. In vivo drug delivery. *J Pharm Sci*. 1996;85(11):1142-1169. doi:10.1021/js960075u

59. Müller BW, Brauns U. Hydroxypropyl- β cyclodextrin derivatives: Influence of average degree of substitution on complexing ability and surface activity. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1986;75(6):571-572. doi:10.1002/jps.2600750609
60. Pitha J. Amorphous water soluble derivatives of cyclodextrins: From test tube to patient. *Journal of Controlled Release*. 1987;6(1):309-313.
61. Loftsson T, Moya-Ortega MD, Alvarez-Lorenzo C, Concheiro A. Pharmacokinetics of cyclodextrins and drugs after oral and parenteral administration of drug/cyclodextrin complexes. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2016;68(5):544-555. doi:10.1111/jphp.12427
62. Pure IU of, Data ACC on E, Serjeant EP, Dempsey B, Pure IU of, solution ACC on EDD constants of organic acids in aqueous. Ionisation Constants of Organic Acids in Aqueous Solution. Oxford ; New York : Pergamon Press; 1979. <https://trove.nla.gov.au/version/45246226>.
63. PubChem. Propofol; 2019;(1):1. Zuletzt abgerufen am 21.06.2022 unter: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4943>.
64. Chemical Book. BETA-CYCLODEXTRIN 2019;(1):1. Zuletzt abgerufen am 21.06.2022: https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB8289713.htm
65. Hydroxypropyl-beta-cyclodextrin | Sicherheitsblatt ThermoFisherScientific 2020, Zuletzt abgerufen am 22.06.2022 unter: https://www.fishersci.de/chemical/ProductData_uk/wercsitemCode=10388870&lang=DE
66. Freitas MR de, Rolim LA, Soares MF de LR, Rolim-Neto PJ, Albuquerque MM de, Soares-Sobrinho JL. Inclusion complex of methyl- β -cyclodextrin and olanzapine as potential drug delivery system for schizophrenia. *Carbohydrate Polymers*. 2012;89(4):1095-1100. doi:10.1016/j.carbpol.2012.03.072
67. Lee CW, Kim SJ, Youn YS, et al. Preparation of bitter taste masked cetirizine dihydrochloride/ β -cyclodextrin inclusion complex by supercritical antisolvent (SAS) process. *The Journal of Supercritical Fluids*. 2010;55(1):348-357. doi:10.1016/j.supflu.2010.05.028
68. Zingone G, Rubessa F. Preformulation study of the inclusion complex warfarin- β -cyclodextrin. *International Journal of Pharmaceutics*. 2005;291(1):3-10. doi:10.1016/j.ijpharm.2004.11.013

69. Babu MKM, Godiwala TN. Toward the Development of an Injectable Dosage Form of Propofol: Preparation and Evaluation of Propofol–Sulfobutyl Ether 7– β –Cyclodextrin Complex. *Pharmaceutical Development and Technology*. 2005;9(3):265-275. doi:10.1081/PDT-200031428
70. Shityakov S, Salmas RE, Durdagi S, et al. Characterization, in Vivo Evaluation, and Molecular Modeling of Different Propofol-Cyclodextrin Complexes To Assess Their Drug Delivery Potential at the Blood-Brain Barrier Level. *J Chem Inf Model*. 2016;56(10):1914-1922. doi:10.1021/acs.jcim.6b00215
71. Trapani G, Latrofa A, Franco M, Lopedota A, Sanna E, Liso G. Inclusion complexation of propofol with 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin. Physicochemical, nuclear magnetic resonance spectroscopic studies, and anesthetic properties in rat. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1998;87(4):514-518. doi:10.1021/js970178s
72. Broscheit J, Roewer N. Pharmazeutische Zubereitung, 2012;(1):1-8. Zuletzt abgerufen am 22.06.2022: <https://patentimages.storage.googleapis.com/9f/cf/2b/37e4b0d9663d82/WO2012104730A1.pdf>.
73. Waibel B. *NMR-Methoden Zur Identifizierung von Makromolekül-Ligand-Interaktionen*. 2008:31-34.
74. Even J, Bertault M, Girard A, Délugeard Y, Marqueton Y. Optical and calorimetric studies on the role of lattice mode softening in assisting a thermally enhanced solid state reaction. *Chemical Physics Letters*. 1997;267(5):585-589. doi:10.1016/S0009-2614(97)00121-8
75. Gill P, Moghadam TT, Ranjbar B. Differential scanning calorimetry techniques: applications in biology and nanoscience. *J Biomol Tech*. 2010;21(4):167-193.
76. Schmitz S, Desel C. Zellvitalität, Apoptose und Nekrose, Autophagie. In: Schmitz S, Desel C, eds. *Der Experimentator Zellbiologie*. Springer Berlin Heidelberg; 2018:131-148. doi:10.1007/978-3-662-56111-9_6
77. Koch A. Expression von Transportern, Rezeptoren und Zell-Zell-Kontakt Proteinen an der Blut-Hirn-Schranke: Vergleich zwischen immortalisierten und primären Hirndothelzellen. Würzburg; 2019:13.
78. Gaiser F. Der Einfluss von NMDA-Rezeptor-Modulatoren auf die Blut-Hirn Schranke unter ischämischen Bedingungen. Würzburg; 2018:23-24.

79. Burek M, Salvador E, Förster CY. Generation of an immortalized murine brain microvascular endothelial cell line as an in vitro blood brain barrier model. *J Vis Exp*. 2012;(66):e4022. doi:10.3791/4022
80. Heyn B, Hipler B, Kreisel G, Schreer H, Walther D. Anorganische Synthesechemie: Ein integriertes Praktikum. Springer-Verlag; 2013;(1): 210-211.
81. Kleinsasser NH, Weissacher H, Wallner BC, Kastenbauer ER, Harréus UA. Zytotoxizität und Genotoxizität von Fluoriden in humaner Mukosa und Lymphozyten. *Laryngorhinootologie*. 2001;80(4):187-190. doi:10.1055/s-2001-13760
82. Bonacker D, Stoiber T, Böhm KJ, et al. Genotoxicity of inorganic lead salts and disturbance of microtubule function. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 2005;45(4):346-353. doi:10.1002/em.20100
83. Müller T. Übersichtsartikel Cancerogene und genotoxische Wirkung von Mycotoxinen. *Food / Nahrung*. 1987;31(2):117-125. doi:10.1002/food.19870310205
84. Schnurstein A. Untersuchungen zur Genotoxizität in Fischen und Fischzellen mit der Einzelzell-Gelelektrophorese (Comet Assay) - Möglichkeiten und Grenzen im Umweltmonitoring -. doi:10.11588/heidok.00001595
85. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res*. 1988;175(1):184-191.
86. Yedjou CG, Tchounwou PB. In-vitro cytotoxic and genotoxic effects of arsenic trioxide on human leukemia (HL-60) cells using the MTT and alkaline single cell gel electrophoresis (Comet) assays. *Mol Cell Biochem*. 2007;301(0):123-130. doi:10.1007/s11010-006-9403-4
87. Beyer T. Quantitative NMR-Spektroskopie in der pharmazeutischen Analytik–Identität, Reinheit und Gehalt von Arzneistoffen. 2011;(1):9-17,19-23.
88. Goos G, Bauer FL. Informatik 1: Eine einführende Übersicht. 4., verb. Aufl. 1991. Berlin: Springer; 2008;(4):66-164 .
89. Hesse M, Meier H, Zeeh B. Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie. Georg Thieme Verlag; 2005;(1): 1-7.

90. Schwalbe H. Skript NMR-Spektroskopie, Biophysikalische Chemie für Biochemiker IV; Frankfurt, 2002;(1): 35
91. Friebolin H. Ein- Und Zweidimensionale NMR-spektroskopie. 5. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH; 2013;(5): 143-165.
92. Ruhland K. Grundlagen der NMR-Spektroskopie - Skript zur Vorlesung; Augsburg; 2004.
93. Reichenbächer M, Popp J, eds. NMR-Spektroskopie. In: *Strukturanalytik organischer und anorganischer Verbindungen: Ein Übungsbuch*. Teubner; 2007:172-256,191. doi:10.1007/978-3-8351-9204-1_4
94. Skoog DA, Leary JJ. Kernresonanzspektroskopie (NMR). In: Skoog DA, Leary JJ, eds. *Instrumentelle Analytik: Grundlagen — Geräte — Anwendungen*. Springer-Lehrbuch. Springer; 1996:335-386. doi:10.1007/978-3-662-07916-4_14
95. Pradeepkiran JA, Sainath SB. *Brucella Melitensis: Identification and Characterization of Potential Drug Targets*. Academic Press; 2021:80-81.
96. Schauer S. Untersuchungen zu Cyclodextrinkomplexen von typischen nichtsteroidalen Antiphlogistika, Würzburg. 2011:79.
97. Bachega JFR, Timmers LFSM, Assirati L, Bachega LR, Field MJ, Wymore T. GTKDynamo: a PyMOL plug-in for QC/MM hybrid potential simulations. *J Comput Chem*. 2013;34(25):2190-2196.
98. Shityakov S, Salmas RE, Durdagi S, Roewer N, Förster C, Broscheit J. Solubility profiles, hydration and desolvation of curcumin complexed with γ -cyclodextrin and hydroxypropyl- γ -cyclodextrin. *Journal of Molecular Structure*. 2017;1134:91-98.
99. Forli S. Charting a path to success in virtual screening. *Molecules*. 2015;20(10):18732-18758.
100. Schäfer KA. Molekulardynamik-Simulationen von mechanisch und thermodynamisch induzierter Kinetik supramolekularer Konformationsänderungen. 2019:3-5.
101. Shityakov S, Salmas RE, Durdagi S, et al. Characterization, in Vivo Evaluation, and Molecular Modeling of Different Propofol–Cyclodextrin Complexes To Assess Their Drug Delivery Potential at the Blood–Brain Barrier Level. *Journal of Chemical Information and Modeling*. 2016;56(10):1914-1922. doi:10.1021/acs.jcim.6b00215

102. Das R, Baker D. Macromolecular modeling with rosetta. *Annu Rev Biochem.* 2008;77:363-382.
103. Köhn J. Entwicklung eines thermisch stabilen und flexiblen Polymers auf Basis von PLA für medizinische Anwendungen. Berlin; 2015;(1):16-17.
104. Masberg S. Differentialkalorimetrie (DSC) und Differentialthermoanalyse (DTA) bei hohen Drücke. Bochum; 1999;(1):32-40.
105. Singh R, Bharti N, Madan JR, Hiremath SN. Characterization of Cyclodextrin Inclusion Complexes - A Review. *Journal of Pharmaceutical Science and Technology.* 2010.
106. Mura P, Maestrelli F, Cirri M, Furlanetto S, Pinzauti S. Differential scanning calorimetry as an analytical tool in the study of drug-cyclodextrin interactions. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry.*2003;73(2):635-646. doi:10.1023/A:1025494500283
107. Ficarra R, Ficarra P, Di Bella MR, et al. Study of β -blockers/ β -cyclodextrins inclusion complex by NMR, DSC, X-ray and SEM investigation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* 2000;23(1):33-40. doi:10.1016/S0731-7085(00)00261-2
108. Grandelli HE, Stickle B, Whittington A, Kiran E. Inclusion complex formation of β -cyclodextrin and Naproxen: a study on exothermic complex formation by differential scanning calorimetry. *J Incl Phenom Macrocycl Chem.* 2013;77(1):269-277. doi:10.1007/s10847-012-0241-6
109. Kfoury M, Auezova L, Fourmentin S, Greige-Gerges H. Investigation of monoterpenes complexation with hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *J Incl Phenom Macrocycl Chem.* 2014;80(1):51-60. doi:10.1007/s10847-014-0385-7
110. Hsing CH, Chen CL, Lin WC, Lin CF. Propofol Treatment Inhibits Constitutive Apoptosis in Human Primary Neutrophils and Granulocyte-Differentiated Human HL60 Cells. *PLoS One.* 2015;10(6). doi:10.1371/journal.pone.0129693
111. Tsuchiya M, Asada A, Arita K, et al. Induction and mechanism of apoptotic cell death by propofol in HL-60 cells. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica.* 2002;46(9):1068-1074. doi:10.1034/j.1399-6576.2002.460903.x
112. McKune CM, Brosnan RJ, Dark MJ, Haldorson GJ. Safety and efficacy of intramuscular propofol administration in rats. *Vet Anaesth Analg.* 2008;35(6):495-500. doi:10.1111/j.1467-2995.2008.00418.x

113. Hsing CH, Chen YH, Chen CL, et al. Anesthetic propofol causes glycogen synthase kinase-3 β -regulated lysosomal/mitochondrial apoptosis in macrophages. *Anesthesiology*. 2012;116(4):868-881. doi:10.1097/ALN.0b013e31824af68a
114. Yang C, Gao J, Yan N, et al. Propofol inhibits the growth and survival of gastric cancer cells in vitro through the upregulation of ING3. *Oncol Rep*. 2017;37(1):587-593. doi:10.3892/or.2016.5218
115. Yang N, Liang Y, Yang P, Yang T, Jiang L. Propofol inhibits lung cancer cell viability and induces cell apoptosis by upregulating microRNA-486 expression. *Braz J Med Biol Res*. 2017;50(1):e5794. doi:10.1590/1414-431X20165794
116. Tatsumi K, Hirotsu A, Daijo H, Matsuyama T, Terada N, Tanaka T. Effect of propofol on androgen receptor activity in prostate cancer cells. *Eur J Pharmacol*. 2017;809:242-252. doi:10.1016/j.ejphar.2017.05.046
117. Bonath K. Gesellschaft für Versuchstierkunde: Society for Laboratory Animal Science. *Laboratory Animals*. 1987;21(2):180-182. doi:10.1177/002367728702100218
118. PSS, PROMILA M. Human Body Measurements: Concepts And Applications. PHI Learning Pvt. Ltd.; 2009;(1):114.
119. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983;65(1-2):55-63.
120. Berridge MV, Tan AS. Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Arch Biochem Biophys*. 1993;303(2):474-482. doi:10.1006/abbi.1993.1311
121. Reischmann P. Zelluläre Modelle für die direkte Analyse der Aktivität tumorrelevanter Signalwege. Mainz; 2017:36-37.
122. Gerecke C. In vivo- und in vitro-Komplementaktivierung durch den monoklonalen CD20- Antikörper Rituximab bei der Behandlung von Non-Hodgkin-Lymphomen. vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin. 2006;(1): 21-22.
123. Rogan Grant: Reduction of MTT to its formazan MTT assay. 2022. Zuletzt abgerufen am 22.06.2022 unter: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:MTT_reaction.svg

124. Trivedi MK, Mondal SC, Gangwar M, Jana S. Immunomodulatory potential of nanocurcumin-based formulation. *Inflammopharmacol.* 2017;25(6):609-619. doi:10.1007/s10787-017-0395-3
125. Schrödel A. Die Rolle des fetalen Kälberserums in Zellkulturmedien. *Biologie in unserer Zeit.* 2007;37(5):289-289. doi:10.1002/biuz.200790079
126. Ott J. Vergleich der Anwendbarkeit unterschiedlicher Tetrazoliumsalze in Biotoxizitätsassays in Anwesenheit von Nickel- und Kupferionen. Kiel; 2012:8.
127. Decker T, Lohmann-Matthes ML. A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity. *J Immunol Methods.* 1988;115(1):61-69.
128. Ayar A. Unterschiede von neuronalen und oligodendrozytären Vorläuferzellen beim Stickstoffmonoxid-induzierten Zelltod und der Bindung von humanen Antikörpern. Gießen. 2014;(1):33-34.
129. Böttger S. *Untersuchungen Zur Synergistischen Zytotoxizität Zwischen Saponinen Und Ribosomen Inaktivierenden Proteinen Typ I.* PhD Thesis. Freie Universität Berlin; 2013:36-38.
130. Dojindo Molecular Technologies, Cytotoxicity LDH Assay Kit-WST - Technical Manual; Rockville (USA); 2012;(1):1.
131. Kumar P, Nagarajan A, Uchil PD. Analysis of Cell Viability by the Lactate Dehydrogenase Assay. *Cold Spring Harb Protoc.* 2018;2018(6):pdb.prot095497. doi:10.1101/pdb.prot095497
132. Edling Y, Sivertsson LK, Butura A, Ingelman-Sundberg M, Ek M. Increased sensitivity for troglitazone-induced cytotoxicity using a human in vitro co-culture model. *Toxicology in Vitro.* 2009;23(7):1387-1395.
133. Scudiero DA, Shoemaker RH, Paull KD, et al. Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Res.* 1988;48(17):4827-4833.
134. Tada H, Shiho O, Kuroshima K, Koyama M, Tsukamoto K. An improved colorimetric assay for interleukin 2. *J Immunol Methods.* 1986;93(2):157-165.

135. Jelinek A, Klöcking HP. In vitro toxicity of surfactants in U937 cells: cell membrane integrity and mitochondrial function. *Experimental and Toxicologic pathology*. 1998;50(4-6):472-476.
136. Jastrzębska AM, Radziun E, Rosłon M, et al. In vitro assessment of antibacterial properties and cytotoxicity of Al₂O₃–Ag nanopowders. *null*. 2011;110(6):353-359. doi:10.1179/1743676111Y.0000000023
137. Hennerbichler S, Reichl B, Pleiner D, Gabriel C, Eibl J, Redl H. The influence of various storage conditions on cell viability in amniotic membrane. *Cell and Tissue Banking*. 2007;8(1):1-8. doi:10.1007/s10561-006-9002-3
138. Roehm NW, Rodgers GH, Hatfield SM, Glasebrook AL. An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT. *J Immunol Methods*. 1991;142(2):257-265.
139. Neuhaus W, Piontek A, Protze J, et al. Reversible opening of the blood-brain barrier by claudin-5-binding variants of Clostridium perfringens enterotoxin's claudin-binding domain. *Biomaterials*. 2018;161:129-143.
140. Ostling O, Johanson KJ. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1984;123(1):291-298. doi:10.1016/0006-291x(84)90411-x
141. Nehls S. Anwendung des Comet Assay (Einzelzell-Gelelektrophorese) an Zellen von Fischen zum Nachweis gentoxischer Wirkungen im aquatischen Biomonitoring. Berlin. 2013;(1): 5-8,16-18,26-28. doi:10.18452/16830
142. Weigel J. Untersuchungen zur Zytotoxizität mittels WST-I-Assay und zur Gentoxizität mittels Comet-Assay von Portlandkompositzementen mit unterschiedlichen Zusatzstoffen, sowie Klinker und Kalksteinmehl in humanen Lungenzellen. Gießen. 2012 ;(1):13-15.
143. Moreno-Villanueva M. Automatisierte Quantifizierung von DNA-Schädigung und DNA-Reparatur und deren Anwendung in der genetischen Toxikologie und Altersforschung. Konstanz; 2008;(1): 20-22, 43-44.
144. Kahmann C. Quantifizierung von DNA-Schäden an adhaerenten Zelllinien nach Bestrahlung mit 188 Re-bzw. Röntgenstrahlung unter Zugabe von Methimazol, Nicotinamid und Perchlorat durch den Comet Assay. 2007:5-7.

145. Mouchet F, Gauthier L, Mailhes C, Ferrier V, Devaux A. Comparative study of the comet assay and the micronucleus test in amphibian larvae (*Xenopus laevis*) using benzo(a)pyrene, ethyl methanesulfonate, and methyl methanesulfonate: establishment of a positive control in the amphibian comet assay. *Environ Toxicol.* 2005;20(1):74-84. doi:10.1002/tox.20080
146. Gallagher R, Collins S, Trujillo J, et al. Characterization of the continuous, differentiating myeloid cell line (HL-60) from a patient with acute promyelocytic leukemia. *Blood.* 1979;54(3):713-733.
147. Collins SJ, Ruscetti FW, Gallagher RE, Gallo RC. Terminal differentiation of human promyelocytic leukemia cells induced by dimethyl sulfoxide and other polar compounds. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1978;75(5):2458-2462.
148. Müller B. Induktion und Reparatur von DNS-Schäden im Comet-Assay, klonogene Überlebensrate und Mikrokernfrequenz von humanen Zellen unterschiedlicher Herkunft nach Röntgenbestrahlung. Würzburg. 2006;(1):26-31.
149. Bajpayee M, Kumar A, Dhawan A. The Comet Assay: Assessment of In Vitro and In Vivo DNA Damage. In: Dhawan A, Bajpayee M, eds. *Genotoxicity Assessment: Methods and Protocols.* Springer New York; 2019:237-257. doi:10.1007/978-1-4939-9646-9_12
150. Lehmann T. NMR-Spektroskopie. Skript zur organisch-chemischen Grundausbildung im Rahmen des Bachelorstudiengangs Chemie an der Freien Universität Berlin. Berlin; 2016;(1): 21,48.
151. Kastner F., Eigenschaften der wichtigsten NMR- Lösungsmittel Regensburg; 2010;(1): 1.
152. Schneider HJ, Hacket F, Rüdiger V, Ikeda H. NMR Studies of Cyclodextrins and Cyclodextrin Complexes. *Chem Rev.* 1998;98(5):1755-1786.
153. Binev Y, Marques MMB, Aires-de-Sousa J. Prediction of ¹H NMR Coupling Constants with Associative Neural Networks Trained for Chemical Shifts. *J Chem Inf Model.* 2007;47(6):2089-2097. doi:10.1021/ci700172n
154. Wang F, Yang B, Zhao Y, et al. Host-guest inclusion system of scutellarein with 2-hydroxypropyl-beta- cyclodextrin: Preparation, characterization, and anticancer activity. *Journal of biomaterials science Polymer edition.* 2014;25. doi:10.1080/09205063.2014.884875155.

155. Jeffrey GA. *An Introduction to Hydrogen Bonding*. Vol 12. Oxford university press New York; 1997:79-97.
156. Kohata S, Jyodoi K, Ohyoshi A. Thermal decomposition of cyclodextrins (α -, β -, γ -, and modified β -CyD) and of metal—(β -CyD) complexes in the solid phase. *Thermochimica acta*. 1993;217:187-198.
157. Qiu C, Gao LN, Yan K, Cui YL, Zhang Y. A promising antitumor activity of evodiamine incorporated in hydroxypropyl- β -cyclodextrin: pro-apoptotic activity in human hepatoma HepG2 cells. *Chemistry Central Journal*. 2016;10(1):46. doi:10.1186/s13065-016-0191-y
158. Figura L. Thermische Größen. In: *Lebensmittelphysik*. Springer; 2021:305-388.
159. Lee J, Hong SW, Kim MJ, et al. Metformin, resveratrol, and exendin-4 inhibit high phosphate-induced vascular calcification via AMPK-RANKL signaling. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2020;530(2):374-380. doi:https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.07.136
160. Demmer I. Untersuchungen zum Einfluss von Niacin auf primäre Mikroglia der Ratte in vitro. 2019:36-43.
161. Lu L, Wang S, Fu L, Liu D, Zhu Y, Xu A. Bilobalide protection of normal human melanocytes from hydrogen peroxide-induced oxidative damage via promotion of antioxidant expression and inhibition of endoplasmic reticulum stress. *Clinical and Experimental Dermatology*. 2016;41(1):64-73. doi:10.1111/ced.12664
162. Benhusein GhazallaM, Mutch E, Aburawi S, Williams FaithM. Genotoxic effect induced by hydrogen peroxide in human hepatoma cells using comet assay. *Libyan Journal of Medicine*. 2010;5(1):4637. doi:10.3402/ljm.v5i0.4637
163. Speit G, Hoffmann H. Optimierung des Comet Assay für den Einsatz im Biomonitoring. 2005;(1): 6-16.
164. Gao Y, Li G, Zhou Z, Guo L, Liu X. Supramolecular assembly of poly(β -cyclodextrin) block copolymer and benzimidazole-poly(ϵ -caprolactone) based on host-guest recognition for drug delivery. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2017;160:364-371. doi:10.1016/j.colsurfb.2017.09.047
165. Spiteller, P. Universität Bremen, Instrumentelle Analytik, Deuterierte Lösungsmittel. Zuletzt abgerufen am 22.06.2022 unter: https://www.ia.uni-bremen.de/nmr/d_lsm.html

166. Balan M. NMR Techniques for Characterization of Cyclodextrins and their Inclusion Complexes. *Petru Poni*. 2017;(1): 31-36.
167. Loftsson T, Hreinsdóttir D, Másson M. Evaluation of cyclodextrin solubilization of drugs. *Int J Pharm*. 2005;302(1-2):18-28. doi:10.1016/j.ijpharm.2005.05.042
168. Al-Abboodi AS, Al-Sheikh WM, Eid EEM, Azam F, Al-Qubaisi MS. Inclusion complex of clausenidin with hydroxypropyl- β -cyclodextrin: Improved physicochemical properties and anti-colon cancer activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 2021;29(3):223-235. doi:10.1016/j.jsps.2021.01.006
169. Geng Q, Li T, Wang X, et al. The mechanism of bensulfuron-methyl complexation with β -cyclodextrin and 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin and effect on soil adsorption and bio-activity. *Sci Rep*. 2019;9(1):1882. doi:10.1038/s41598-018-38234-7
170. Ficarra R, Tommasini S, Raneri D, et al. Study of flavonoids/beta-cyclodextrins inclusion complexes by NMR, FT-IR, DSC, X-ray investigation. *J Pharm Biomed Anal*. 2002;29(6):1005-1014.
171. George S, Vasudevan D. Studies on the Preparation, Characterization, and Solubility of 2-HP- β -Cyclodextrin-Mecizine HCl Inclusion Complexes. *J Young Pharm*. 2012;4(4):220-227. doi:10.4103/0975-1483.104365
172. Reaktionen von Makromolekülen. In: *Makromoleküle*. John Wiley & Sons, Ltd; 2009:547-581. doi:10.1002/9783527626472.ch15
173. Weiler C. Generierung leicht dispergierbarer. Inhalationspulver mittels Sprühtrocknung. Mainz; 2008;(1): 85.
174. Anderson AM, Kirtadze T, Malanga M, et al. Cyclodextrin dimers: A versatile approach to optimizing encapsulation and their application to therapeutic extraction of toxic oxysterols. *International Journal of Pharmaceutics*. 2021;606:120522. doi:10.1016/j.ijpharm.2021.120522
175. Rodríguez-López MI, Mercader-Ros MT, Lucas-Abellán C, et al. Comprehensive characterization of linalool-HP- β -cyclodextrin inclusion complexes. *Molecules*. 2020;25(21):5069.
176. Xu YB, Du QH, Zhang MY, Yun P, He CY. Propofol suppresses proliferation, invasion and angiogenesis by down-regulating ERK-VEGF/MMP-9 signaling in Eca-109 esophageal squamous cell carcinoma cells. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2013;17(18):2486-2494.

177. Guo XG, Wang S, Xu YB, Zhuang J. Propofol suppresses invasion, angiogenesis and survival of EC-1 cells in vitro by regulation of S100A4 expression. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2015;19(24):4858-4865.
178. Palanisamy A, Friese MB, Cotran E, et al. Prolonged Treatment with Propofol Transiently Impairs Proliferation but Not Survival of Rat Neural Progenitor Cells In Vitro. *PLOS ONE*. 2016;11(7):e0158058. doi:10.1371/journal.pone.0158058
179. Yuan J, Cui G, Li W, et al. Propofol Enhances Hemoglobin-Induced Cytotoxicity in Neurons. *Anesth Analg*. 2016;122(4):1024-1030. doi:10.1213/ANE.0000000000001123
180. Ecimovic P, Murray D, Doran P, Buggy DJ. Propofol and Bupivacaine in Breast Cancer Cell Function In Vitro – Role of the NET1 Gene. *Anticancer Res*. 2014;34(3):1321-1331.
181. Wu KC, Yang ST, Hsia TC, et al. Suppression of Cell Invasion and Migration by Propofol Are Involved in Down-regulating Matrix Metalloproteinase-2 and p38 MAPK Signaling in A549 Human Lung Adenocarcinoma Epithelial Cells. *Anticancer Res*. 2012;32(11):4833-4842.
182. Seehase M, Jennekens W, Zwanenburg A, et al. Propofol administration to the maternal-fetal unit improved fetal EEG and influenced cerebral apoptotic pathway in preterm lambs suffering from severe asphyxia. *Mol Cell Pediatr*. 2015;2(1):4. doi:10.1186/s40348-015-0016-4
183. Onizuka S, Ikewaki N, Shiraishi S. A Mechanism by Which Propofol Induces Cytotoxicity. *Journal of Drug Metabolism & Toxicology*. 2017;08(03). doi:10.4172/2157-7609.1000230
184. Bouquet W, Boterberg T, Ceelen W, et al. In vitro cytotoxicity of paclitaxel/ β -cyclodextrin complexes for HIPEC. *International Journal of Pharmaceutics*. 367(1-2):148-154.
185. Kiss T, Fenyvesi F, Pasztor N, et al. Cytotoxicity of different types of methylated β -cyclodextrins and ionic derivatives. *Die Pharmazie*. 2007;62:557-558. doi:10.1691/ph.2007.7.7051
186. Grosse PY, Bressolle F, Pinguet F. Antiproliferative effect of methyl-beta-cyclodextrin in vitro and in human tumour xenografted athymic nude mice. *Br J Cancer*. 1998;78(9):1165-1169.

187. Wang H, Luo Z, Xue Z gang, Cang J. Propofol inhibits neuronal differentiation of mouse embryonic stem cells in vitro. *Chinese Medical Journal*. 2013;126(21):4186-4188.
188. Hao J, Zhang W, Tong R, Huang Z. Febuxostat Prevents the Cytotoxicity of Propofol in Brain Endothelial Cells. *ACS Omega*. 2021;6(8):5471-5478. doi:10.1021/acsomega.0c05708
189. Liang C, Du F, Cang J, Xue Z. Pink1 attenuates propofol-induced apoptosis and oxidative stress in developing neurons. *J Anesth*. 2018;32(1):62-69. doi:10.1007/s00540-017-2431-2
190. Al-Jahdari WS, Saito S, Goto F, Nakano T. Propofol induces growth cone collapse and neurite retractions in chick explant culture[Le propofol provoque un collapsus des cônes de croissance et des rétractions des neurites de poussin embryonnaire en culture]. *Can J Anesth*. 2006;53(11):1078. doi:10.1007/BF03022874
191. Sharma HS, Pontén E, Gordh T, Eriksson P, Fredriksson A, Sharma A. Propofol promotes blood-brain barrier breakdown and heat shock protein (HSP 72 kd) activation in the developing mouse brain. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2014;13(9):1595-1603.
192. Huang Z, Huang B, Wei Q, et al. The Protective Effects of Benzbromarone Against Propofol-Induced Inflammation and Injury in Human Brain Microvascular Endothelial Cells (HBMVECs). *Neurotox Res*. 2021;39(5):1449-1458. doi:10.1007/s12640-021-00387-1
193. Monnaert V, Tilloy S, Bricout H, Fenart L, Cecchelli R, Monflier E. Behavior of α -, β -, and γ -cyclodextrins and their derivatives on an in vitro model of blood-brain barrier. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2004;310(2):745-751.
194. Prajapati M, Christensen G, Paquet-Durand F, Loftsson T. Cytotoxicity of β -Cyclodextrins in Retinal Explants for Intravitreal Drug Formulations. *Molecules*. 2021;26(5):1492. doi:10.3390/molecules26051492
195. Róka E, Ujhelyi Z, Deli M, et al. Evaluation of the Cytotoxicity of α -Cyclodextrin Derivatives on the Caco-2 Cell Line and Human Erythrocytes. *Molecules*. 2015;20(11):20269-20285. doi:10.3390/molecules201119694
196. Kiss T, Fenyvesi F, Bácskay I, et al. Evaluation of the cytotoxicity of β -cyclodextrin derivatives: Evidence for the role of cholesterol extraction. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2010;40(4):376-380. doi:10.1016/j.ejps.2010.04.014

197. Gould S, Scott RC. 2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP- β -CD): A toxicology review. *Food and Chemical Toxicology*. 2005;43(10):1451-1459. doi:10.1016/j.fct.2005.03.007
198. Thackaberry EA, Kopytek S, Sherratt P, Trouba K, McIntyre B. Comprehensive Investigation of Hydroxypropyl Methylcellulose, Propylene Glycol, Polysorbate 80, and Hydroxypropyl-Beta-Cyclodextrin for use in General Toxicology Studies. *Toxicol Sci*. 2010;117(2):485-492. doi:10.1093/toxsci/kfq207
199. Anderson AM, Kirtadze T, Malanga M, et al. Cyclodextrin dimers: A versatile approach to optimizing encapsulation and their application to therapeutic extraction of toxic oxysterols. *International Journal of Pharmaceutics*. 2021;606:120522.
200. Loftsson T, Duchene D. Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. *International journal of pharmaceutics*. 2007;329(1-2):1-11.
201. Shityakov S, Salmas RE, Salvador E, Roewer N, Broscheit J, Förster C. Evaluation of the potential toxicity of unmodified and modified cyclodextrins on murine blood-brain barrier endothelial cells. *The Journal of Toxicological Sciences*. 2016;41(2):175-184.
202. Shityakov S, Roewer N, Broscheit JA, Förster C. In silico models for nanotoxicity evaluation and prediction at the blood-brain barrier level: A mini-review. *Computational Toxicology*. 2017;2:20-27.
203. Breitzkreuz-Korff O. Charakterisierung und Modulation von Claudinen zur Öffnung der Blut-Hirn-Schranke. 2018:66-68. doi:10.17169/refubium-8365
204. Appelt-Menzel A. Etablierung und Qualifizierung eines humanen Blut-Hirn-Schranken-Modells unter Verwendung von induziert pluripotenten und multipotenten Stammzellen. Würzburg; 2016:85-86.
205. Karim Z, Khan MJ, Maskat MY, Adnan R. Immobilization of horseradish peroxidase on β -cyclodextrin-capped silver nanoparticles: Its future aspects in biosensor application. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*. 2016;46(4):321-327. Doi:10.1080/10826068.2015.1031389
206. Calabrò ML, Tommasini S, Donato P, et al. The rutin/beta-cyclodextrin interactions in fully aqueous solution: spectroscopic studies and biological assays. *J Pharm Biomed Anal*. 2005;36(5):1019-1027. doi:10.1016/j.jpba.2004.09.018

207. Macecek J, Kolárová H, Psotová J, et al. Assessment of Cellular Damage by Comet Assay After Photodynamic Therapy in vitro. *Acta medica (Hradec Králové) / Universitas Carolina, Facultas Medica Hradec Králové*. 2004;47:327-329. doi:10.14712/18059694.2018.117
208. Lenz M. Zytotoxische Effekte von Platin (IV) chlorid auf Zellstämme aus Leber-und Nierengewebe. Tübingen; 2006:5-7.
209. Egan TD, Kern SE, Johnson KB, Pace NL. The Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Propofol in a Modified Cyclodextrin Formulation (Captisol®) Versus Propofol in a Lipid Formulation (Diprivan®): An Electroencephalographic and Hemodynamic Study in a Porcine Model. *Anesthesia & Analgesia*. 2003;97(1):72. doi:10.1213/01.ANE.0000066019.42467.7A
210. Mcintosh MP, Rajewski RA. Comparative canine pharmacokinetics– pharmacodynamics of fospropofol disodium injection, propofol emulsion, and cyclodextrin-enabled propofol solution following bolus parenteral administration. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2012;101(9):3547-3552. doi:10.1002/jps.23195
211. Adam JM, Bennett DJ, Bom A, et al. Cyclodextrin-Derived Host Molecules as Reversal Agents for the Neuromuscular Blocker Rocuronium Bromide: Synthesis and Structure– Activity Relationships. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2002;45(9):1806-1816.
212. Wallentine CB, Shimode N, Egan TD, Pace NL. Propofol in a Modified Cyclodextrin Formulation: First Human Study of Dose–Response with Emphasis on Injection Pain. *Anesthesia & Analgesia*. 2011;113(4):738. doi:10.1213/ANE.0b013e31822b8648

7. Geräte und Materialien

Geräte	Hersteller
CC200 F1 Controller	NETZSCH (Selb, Deutschland)
DSC 204 F1 Phoenix	NETZSCH (Selb, Deutschland)
NMR-Fourier 300 (1 H; 300 MHz)	Bruker Biospin (Rheinstetten, Deutschland)
Software-/Auswertungsprogramme / Datenbanken	Hersteller
<i>Amber Molecular Dynamics Package 12</i>	NAFlex (Barcelona, Spanien)
<i>Autodock v.4.2.5.1</i>	Scripps Research (San Diego, USA)
<i>GAFF (General Amber Force Field)</i>	NAFlex (Barcelona, Spanien)
<i>GLYCAM_06j-1</i>	Professor Robert J. Woods (<i>University of Georgia</i> , Athens, USA)
<i>GTKDynamo v.1.8.1</i>	<i>EAZY Hybrid</i> (Brasilien)
<i>Komet 5 (Comet-Assay)</i>	BFi OPTiLAS (Gröbenzell, Deutschland)
<i>Magellan Tecan</i>	Tecan AG (Männedorf, Schweiz)
<i>MestreNova v.12.0.4 (NMR-Programm)</i>	<i>Mestrelab Research</i> (A Coruña, Spanien)
<i>PubChem (Datenbank)</i>	<i>United States National Library of Medicine</i> (USA)
<i>Pymol v.1.2</i>	DeLano Scientific LLC (San Francisco, USA)
<i>ROSETTA v.5.98</i>	BakerLab (<i>University of Washington</i> , USA)
Materialien	Hersteller
Deckgläser (24 mm x 24 mm)	Glaswarenfabrik Karl Hecht (Sondheim vor der Rhön, Deutschland)
Elektrophoresekammer (<i>Sub Cell</i>)	<i>BioRad</i> (Hercules, USA)
Fluoreszenzmikroskop	<i>Labophot 2</i> (Nikon GmbH, Düsseldorf,

	Deutschland)
Glasflaschen (steril, mit Deckel)	Glison (Middleton, USA)
Glasküvette (Hellmann-Küvette) (mit Aluminiumfolie verpackt)	Glison (Middleton, USA)
Glaspipette (20 µl, 100 µl, 200 µl und 1000 µl)	Glison (Middleton, USA)
Glaspipetten (steril mit Pipettierhilfe)	Glison (Middleton, USA)
Laborschüttler	GLW (Kißlegg, Deutschland)
Lichtmikroskop mit Zellkammer	Kern & Sohn (Balingen, Deutschland)
Mikrowelle	Bosch (Gerlingen, Deutschland)
Reaktionsgefäße mit anhängendem Deckel	Glison (Middleton, USA)
Röhrchen (konisch)	Glison (Middleton, USA)
Superfrost Objektträger (76 mm × 26 mm × 1 mm)	Glaswarenfabrik Karl Hecht (Sondheim vor der Rhön, Deutschland)
Videokamera (5.1 MP CMOS <i>Microscopic Camera</i>)	Excelitas PCO (Keilheim, Deutschland)
Vortex	GLW (Kißlegg, Deutschland)

7.1 Medien und Lösungen für die Zellkulturen

Medien und Lösungen für die Zellkulturen	Hersteller
<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> (DMEM mit 4500 mg/l Glukose, L-Glutamin, Natriumhydrogencarbonat) (D-5796)	Sigma-Aldrich (St.Louis, USA)
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS) (D-8537)	Sigma-Aldrich (St.Louis, USA)
Fetales Kälberserum (FCS) (F-7524)	Sigma-Aldrich (St.Louis, USA)
<i>Hanks' Balanced Salt Solution</i> (HBSS) (mit Mg ⁺² und Ca ⁺² modifiziert) (55037C)	Sigma-Aldrich (St.Louis, USA)
Zytotoxizitätstests	Hersteller
<i>Cell Proliferation Kit I</i> (MTT-Test) (MTT-Stammlösung (M2128)) (11465007001)	Roche (Basel, Schweiz)
<i>Cytotoxicity Detection Kit</i> (LDH-Assay) (eingefroren) (11644793001)	Roche (Basel, Schweiz)
<i>Cell Proliferation & Toxicity Assay</i> (EZ4U-Test) (04-BI-5000)	Alpco (Salem, USA)

7.2 Chemikalien

	Hersteller
Agarose- <i>HighMeltingPoint</i> (1g Schmelzpunkt: 95 °C)(CAS Nr.[9012-36-6])	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Agarose- <i>LowMeltingPoint</i> (A4018) (1g Schmelzpunkt: 42°C)	Sigma-Aldrich (St.Louis, USA)
DABCO (CAS-Nummer: [280-57-9])	Sigma-Aldrich (St.Louis, USA)
DMSO (CAS Nr.: [67-68-5]) MW:78,13 g/mol	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure di-Natriumsalz Dihydrat, Titriplex III) MW: 372 g/mol	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Gel Red-Stocklösung/ 1,4Diazabicyclo[2.2.2]octan (DABCO) (H ₂ O ₂ -Stock 30 %)	Sigma-Aldrich (St.Louis, USA)
HPβCD	Wacker Chemie (München, Deutschland)
Methanol (CAS Nummer: [67-56-1]) (MW: 32,04 g/mol)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Methylmethansulfonat (CAS Nummer: [66-27-3]) (MW: 110.13 g/mol))	Sigma-Aldrich (St.Louis, USA)
Na-N-Lauroylsarcosinat (MW: 293,39 g/mol)	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
Na-Propofolat/HPβCD (Zusammensetzung per 1,0ml: Propofol 15 mg, HPβCD 249,9 mg, Ascorbinsäure 5,0mg, EDTA 0,2mg)	<i>Cyclolab</i> (Budapest, Ungarn)
Natriumchlorid (MW: 58,44 g/mol)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Natriumhydroxid (MW: 40,00 g/mol)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
PBS/CMF-Puffer (KN: 10010023)	ThermoFisher (Waltham, USA)
Propofol (1%, 10 mg/ml)	Fresenius (Bad Homburg,

	Deutschland)
Propofol/HP β CD	<i>Cyclo/ab</i> (Budapest, Ungarn)
TRIS (MW: 121,14 g/mol)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Triton X-100 (X-100-500ml)	Sigma-Aldrich (St.Louis, USA)
Wasserstoffperoxid-Lösung (H ₂ O ₂) 30 % (w/w) in H ₂ O (CAS Nr.: [67-68-5])	Sigma-Aldrich (St.Louis, USA)

7.3 Lösungen

Lösungen	Herstellung
DABCO	<ul style="list-style-type: none"> • 250 mg DABCO-Pulver • 10 ml PBS • 90 ml Glycerin
Elektrophoresepuffer (pH 14)	<p>Stammlösung:</p> <ul style="list-style-type: none"> • 200 g NaOH-Lösung (5 mol) • 74,46g EDTA-Lösung (0,2 mol) (Titriplex III) <p>auf 1 l destilliertes H₂O auffüllen</p> <p>Gebrauchslösung:</p> <ul style="list-style-type: none"> • 120 ml NaOH-Lösung (5 mol) • 10 ml EDTA-Lösung (0,2 mol) <p>auf 1 l destilliertes H₂O auffüllen</p>
GelRedGebrauchslösung	<ul style="list-style-type: none"> • 10 µl Stocklösung • 990 µl destilliertem H₂O
HMP-Agaroselösung in PBS/CMF (1,5 %)	<ul style="list-style-type: none"> • 1500 mg Agarose 0,75 % zu • 100 ml PBS/CMF-Puffer • Die Agaroselösung in der Mikrowelle aufkochen bis sie vollständig flüssig ist. Menzel Superfrost Objektträger bis zur Hälfte in die flüssige Agarose eintauchen, die Rückseite abwischen und den Objektträger liegend trocknen lassen.
LMP-Agaroselösung in PBS/CMF (0,5 %)	<ul style="list-style-type: none"> • 50 mg Agarose 0,5 % zu • 10 ml PBS/CMF-Puffer • Die Agaroselösung sehr kurz in der Mikrowelle aufkochen und anschließend im

	Wasserbad auf 37 °C temperieren.
Lysepuffer (pH 10)	<ul style="list-style-type: none"> • 146,10 g NaCl (2,5 mol) • 37,22 g EDTA (100 mmol) • 1,21 g Tris (10 mmol) • 10,00 g Na-Sarxosinat (1%) zu einem 1 l destilliertem H ₂ O hinzufügen (pH 10 mit NaOH Lösung (5 mol) einstellen)
Lysepuffer- Gebrauchslösung	89 % Lysepuffer, 10 % DMSO, 1 % Triton X-100 <ul style="list-style-type: none"> • 66,75 ml Lysepuffer (pH 10) • 7,5 ml DMSO (10%) • 0,75 ml Triton X-100 (am Tag vor der Durchführung herzustellen)
Neutralisationspuffer (pH 7,5)	<ul style="list-style-type: none"> • 48,45 g des Tris (0,4 mol) zu 1 l destilliertem H₂O hinzufügen (pH 7,5 mit HCl (9%) einstellen)

I. Abkürzungsverzeichnis

adj	Adjustiert
API	<i>Active Pharmacological Ingredient</i>
β-CD	β-cyclodextrin
BHS	Blut-Hirn-Schranke
CMF	Calcium-Magnesium-frei
DABCO	Triethylendiamin (1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan)
DME	Dimethylether
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSC	<i>Differential Scanning Calorimetry</i> (dt.: Differentialkalorimetrie)
EDTA	<i>Ethylendiamintetraessigsäure di-Natriumsalz Dihydrat, Titriplex III</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
EZ4U	XTT-Tetrazoliumreduktionstest
FCS	dt.: Fetales Kälberserum
fs	Femtosekunde
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FID	<i>free induction decay</i>
FT	Fourier-Transformation
GABA	Gamma-Aminobuttersäure
HCl	Chlorwasserstoffsäure
HL-60-Zellen	Humane Leukämie Zellen
HMP	<i>High Melting Point</i>
HSP	Hitzeschockproteine
HPβCD	Hydroxypropyl-β-cyclodextrin
INT	2-[4-Iodophenyl]-3-[4-nitrophenyl]-5-phenyltetrazoliumchlorid
LDH	Laktatdehydrogenase
LMP	<i>Low Melting Point</i>

MMS	Methylmethansulfonat
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
MW	dt.: Molekulargewicht
NAD	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid
NADP	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
Na-Propofolat/ HP β CD	Natrium-Propofolat/Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin
NK	Negativkontrolle
ns	Nanosekunde
NMR	dt.: Kernspinresonanz
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PK	Positivkontrolle
PRIS	Propofol-Infusionssyndrom
Propofol	2,6-Diisopropylphenol
Propofol/HP β CD	Propofol/Hydroxypropyl- β -cyclodextrin
SBE β CD	Sulfobutylether- β -Cyclodextrin
TIVA	Total intravenöse Anästhesie
TMS	Tetramethylsilan
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (THAM)
UDP	Uridindiphosphat
WHO	<i>World Health Organisation</i>
WST	wasserlösliches Tetrazoliumsalz
ZNS	zentrales Nervensystem

II. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Strukturformel von Propofol	1
Abb. 2: Darstellung von α -, β -, und γ -Cyclodextrin.....	7
Abb. 3a: Stereochemische Konfiguration des β -Cyclodextrin.....	8
Abb. 3b: Hohlraumstruktur des β -Cyclodextrins.....	8
Abb. 4: Hohlraumstruktur des β -Cyclodextrins.....	9
Abb. 5: Schematische Darstellung der verschiedenen Kopplungsdistanzen....	19
Abb. 6: Mit PyMol berechnete Struktur des β -Cyclodextrins.....	21
Abb. 7: Darstellung der Reduktionsreaktion des MTT-Tests.....	28
Abb. 8: Darstellung der beiden Reaktionsschritte des LDH-Assays.....	31
Abb. 9: Darstellung des Funktionsprinzips des Comet-Assays.....	36
Abb. 10: Mikroskopische Auswertung eines Kometenschweifes	40
Abb. 11: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Propofol.....	42
Abb. 12: $^1\text{H-NMR}$ -Auswertung für β -Cyclodextrin (β -CD).....	44
Abb. 13: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin.....	46
Abb. 14: Simulationsspektrum mit $^1\text{H-NMR}$ Predict für HP β CD.....	48
Abb. 15: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums von Propofol-HP β CD.....	50
Abb. 16: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Na-Propofolat-HP β CD.....	52
Abb. 17: Übersicht der $^1\text{H-NMR}$ -Spektren der untersuchten Substanzen.....	54
Abb. 18: AutoDock-Modellierungen	56
Abb. 19: Molekulare Dynamik-Simulationen	58
Abb. 20: Original Ausdruck der DSC-Messung für Na-Propofolat/HP β CD.....	59
Abb. 21a: DSC-Messungen: erste Erhitzung	60
Abb. 21b: DSC-Messungen: zweite Erhitzung.....	60
Abb. 22: DSC-Messungen: das zweite Erhitzen.....	61
Abb. 23: Darstellung der Resultate des MTT-Tests im Boxplotformat.....	64
Abb. 24: Darstellung der Resultate des LDH-Assays im Boxplotformat.....	65
Abb. 25: Darstellung der Resultate des EZ4U-Tests im Boxplotformat.....	67
Abb. 26: Darstellung der Resultate der Vorversuche des Comet-Assays.....	69

<i>Abb. 27: Repräsentative Zellvitalität der HL-60-Zellen.....</i>	<i>71</i>
<i>Abb. 28: Repräsentative HL-60-Zellen bei Auswertung des Comet-Assay.....</i>	<i>72</i>
<i>Abb. 29: Darstellung der Resultate des Comet-Assays</i>	<i>72</i>
<i>Abb. 30: Resultate der Zytotoxizitätstests und des Comet-Assays.....</i>	<i>73</i>

III. Tabellenverzeichnis

<i>Tab. 1: Übersicht über die Standarddosierungen für Propofol.....</i>	<i>3</i>
<i>Tab. 2: Physikalische und chemische Eigenschaften der Substanzen.....</i>	<i>12</i>
<i>Tab. 3: Kalkulationen für die Zytotoxizitätstests und dem Comet-Assay.....</i>	<i>27</i>
<i>Tab. 4: Übersicht über Mengenangaben der Vorversuche.....</i>	<i>38</i>
<i>Tab. 5: Berechnetes ¹H-NMR-Spektrum für HPβCD.....</i>	<i>49</i>

IV. Anhang

Anhang 1: *Gesamte Resultate des MTT-Tests nach 24-stündiger Exposition bei 37 °C; photometrische Messung bei 540nm/Referenzwellenlänge 620nm; alle Messwerte sind dargestellt, CerebEND-Zellen, n = 3 (1-8 Zahlenreihe: 1. Versuch, 9-16 Zahlenreihe: 2. Versuch, 17-24 Zahlenreihe: 3. Versuch)*
Referenz: Mittelwert der Positivkontrolle

NK	DMSO	PK	PK + FCS	HP-β-CD	HP-β-CD	Propofol/HP-β-CD	Propofol/HP-β-CD	Na-Propofol/HP-β-CD	Na-Propofol/HP-β-CD	Propofol
0,014	0,292	0,834	1,164	0,693	1,183	1,730	1,296	1,376	1,650	0,042
0,023	0,240	0,664	1,136	0,839	1,103	1,603	1,438	1,598	2,116	0,042
0,018	0,084	0,933	0,900	0,952	1,268	1,687	0,627	1,334	1,819	0,042
0,009	0,282	0,674	0,909	1,155	1,221	1,881	1,136	1,664	1,763	0,042
0,018	0,325	0,721	1,183	1,037	1,221	1,749	1,155	1,489	1,565	0,033
0,019	0,575	0,683	1,206	0,749	1,004	1,819	1,183	1,504	1,593	0,047
0,018	0,108	0,810	1,164	0,631	0,933	1,159	1,428	1,282	1,706	0,042
0,019	0,099	0,726	1,159	0,598	0,490	1,315	0,872	1,343	1,537	0,033
0,023	0,033	0,829	1,400	0,664	1,221	1,263	1,541	1,296	1,805	0,042
0,018	0,070	0,994	1,428	1,230	0,938	1,197	1,466	1,376	1,805	0,047
0,009	0,259	1,188	1,376	1,018	0,853	1,216	1,527	1,574	1,782	0,033
0,018	0,386	1,230	1,230	0,919	1,126	1,386	1,301	1,758	1,805	0,033
0,014	0,084	1,065	1,654	0,905	1,013	1,494	1,461	1,829	2,145	0,037
0,009	0,089	1,027	1,079	0,905	0,975	1,362	1,400	1,871	1,744	0,033
0,009	0,287	0,994	1,183	1,112	0,938	1,636	1,711	1,815	1,918	0,023
0,009	0,122	1,023	1,098	1,018	0,900	1,513	1,140	1,673	2,032	0,033
0,018	0,198	1,065	1,235	0,942	1,065	1,475		1,824	1,338	0,028
0,023	0,165	0,947	1,386	1,004	1,433	0,975		1,593	1,386	0,028
0,014	0,042	1,296	1,338	0,947	1,254	1,362		1,433	1,645	0,056
0,018	0,033	1,277	1,291	1,060	1,126	1,249		1,419	1,617	0,061
0,018	0,077	1,395	1,513	1,254	1,296	1,504		1,735	1,513	0,033
0,018	0,061	1,169	1,687	1,230	0,344	1,555		1,735	1,452	0,033
0,014	0,009	1,235	1,508	1,249	1,164	1,546		1,763	1,650	0,028
0,014	0,014	1,206	1,532	0,933	1,254	1,843		1,885	1,395	0,042

Anhang 2: Gesamte Resultate des LDH-Assays nach 24-stündiger Exposition bei 37 °C, photometrische Messung bei 492 nm; alle Messwerte sind dargestellt, CerebEND-Zellen, n = 3 (1-8 Zahlenreihe: 1. Versuch, 9-16 Zahlenreihe: 2. Versuch, 17-24 Zahlenreihe: 3. Versuch)
Referenz: Mittelwert der Positivkontrolle

NK	DMSO	PK	PK + FCS	HP-β-CD	HP-β-CD	Propofol/HP-β-CD	Propofol/HP-β-CD	Na-Propofolat/HP-β-CD	Na-Propofolat/HP-β-CD	Propofol
0,048	0,038	0,965	1,111	0,824	0,919	0,826	0,892	0,981	0,912	0,035
0,036	0,048	1,030	1,137	0,861	0,884	0,849	0,906	0,997	0,964	0,030
0,052	0,045	0,989	1,101	0,837	0,881	0,837	0,883	0,990	0,949	0,045
0,033	0,049	1,034	1,145	0,821	0,899	0,824	0,897	0,940	0,968	0,047
0,055	0,058	1,016	1,125	0,810	0,794	0,864	0,876	1,030	0,940	0,033
0,045	0,030	1,014	1,111	0,871	0,796	0,845	0,870	1,035	0,884	0,038
0,043	0,048	1,031	1,123	0,840	0,779	0,827	0,846	0,964	0,892	0,041
0,054	0,031	0,991	1,135	0,821	0,792	0,862	0,860	1,004	0,930	0,031
0,047	0,027	1,012	1,061	0,818	0,893	0,871	0,933	0,904	0,974	0,033
0,045	0,032	0,999	1,105	0,796	0,883	0,852	0,938	0,905	1,003	0,035
0,028	0,035	1,004	1,092	0,938	0,835	0,940	0,907	1,054	0,997	0,041
0,043	0,032	1,008	1,145	0,935	0,849	0,938	0,919	1,014	1,033	0,049
0,033	0,047	0,977	1,141	0,879	0,845	0,905	0,922	1,004	0,987	0,041
0,048	0,045	0,964	1,089	0,846	0,866	0,919	0,894	1,023	0,996	0,032
0,047	0,031	0,958	1,106	0,883	0,874	0,899	0,912	1,024	0,986	0,048
0,039	0,043	0,997	1,120	0,914	0,846	0,909	0,887	1,035	1,012	0,036
0,035	0,042	1,001	1,122	0,922	0,846	0,919	0,893	1,009	0,972	0,053
0,041	0,036	0,975	1,111	0,909	0,922	0,891	0,926	0,986	0,990	0,039
0,043	0,039	0,981	1,091	0,766	0,906	0,856	0,901	0,938	1,018	0,033
0,033	0,049	1,027	1,091	0,759	0,893	0,819	0,891	0,920	0,961	0,047
0,039	0,034	1,019	1,103	0,878	0,903	0,869	0,923	0,964	0,973	0,039
0,048	0,036	0,995	1,083	0,906	0,892	0,911	0,912	0,944	1,008	0,028
0,047	0,035	0,993	1,054	0,879	0,869	0,915	0,883	0,942	0,981	0,031
0,035	0,032	1,009	1,134	0,856	0,914	0,874	0,921	0,974	0,988	0,045

Anhang 3: Gesamte Resultate des EZ4U-Tests nach 24-stündiger Exposition bei 37 °C;
 photometrische Messung bei 450 nm/ Referenzwellenlänge von 590 nm; alle
 Messwerte sind dargestellt, CerebEND-Zellen, n = 3 (1-8 Zahlenreihe: 1. Versuch,
 9-16 Zahlenreihe: 2. Versuch, 17-24 Zahlenreihe: 3. Versuch)
 Referenz: Mittelwert der Positivkontrolle

NK	DMSO	PK	PK + FCS	HP-β- CD	HP-β- CD	Propofol/ HP-β-CD	Propofol/ HP-β-CD	Na-Propo folat/ HP-β-CD	Na-Propo folat/ HP-β-CD	Propo- fol
0,250	0,049	0,852	1,066	0,758	0,803	0,741	0,865	1,004	1,039	0,034
0,250	0,051	0,848	1,094	0,709	0,713	0,611	0,867	0,911	1,120	0,019
0,252	0,049	0,795	1,109	0,735	0,763	0,737	0,916	1,286	1,132	0,019
0,256	0,070	0,812	1,043	0,722	0,829	0,713	0,878	0,944	1,092	0,051
0,252	0,021	0,797	0,972	0,737	0,842	0,863	0,904	1,207	1,113	0,064
0,254	0,029	0,829	1,017	0,771	0,825	0,782	0,874	0,893	1,083	0,027
0,258	0,029	0,974	1,122	0,741	0,814	0,658	0,912	0,844	1,137	0,040
0,269	0,021	0,895	1,002	0,696	0,837	0,737	0,887	1,083	1,105	0,023
0,215	0,218	0,912	1,182	0,857	0,884	0,837	1,011	1,139	1,244	0,106
0,224	0,228	1,006	1,173	0,816	0,840	0,812	0,897	1,102	1,113	0,100
0,198	0,179	0,921	1,152	0,822	0,822	0,803	0,884	1,179	0,993	0,121
0,220	0,209	0,966	1,175	0,872	0,773	0,872	1,006	1,592	1,276	0,115
0,237	0,228	0,925	1,479	0,983	0,844	0,944	0,872	1,250	1,244	0,025
0,235	0,239	1,432	1,466	0,861	0,818	0,846	0,876	1,101	1,124	0,017
0,237	0,237	1,192	1,261	0,829	0,694	0,831	0,675	1,190	0,955	0,044
0,232	0,230	1,197	1,169	0,874	0,893	0,848	0,957	1,188	1,246	0,019
0,237	0,230	1,237	1,267	0,872	0,773	1,079	0,914	1,429	1,190	0,023
0,237	0,235	1,248	1,295	0,782	0,778	0,899	0,852	1,031	1,158	0,029
0,239	0,224	1,244	1,254	0,607	0,765	0,767	0,741	0,957	1,162	0,036
0,235	0,230	1,158	1,276	0,651	0,799	1,071	0,799	1,344	1,173	0,017
0,190	0,211	0,923	1,169	0,842	0,820	0,859	0,820	1,404	1,194	0,130
0,209	0,205	0,985	1,124	0,861	0,760	0,844	0,842	0,951	1,161	0,113
0,205	0,198	0,955	1,105	0,852	0,805	0,799	0,807	1,149	1,203	0,081
0,194	0,190	0,887	1,220	0,848	0,788	0,820	0,848	1,102	1,149	0,143

Anhang 4: Auswertung der Zellvitalität des Comet-Assays vor der Auswertung mittels der Auswertungssoftware Komet 5 (Bfi OPTiLAS, Gröbenzell, Deutschland) nach 24-stündiger Exposition bei 37 °C; mikroskopisch wurden jeweils 200 Zellen pro Test und pro Substanz ausgezählt HI-60-Zellen, n = 3, (V1 = Versuch 1, V2 = Versuch 2, V3 = Versuch 3), Angaben in Prozent

	V1 Lebend:	V1 Tod:	V2 Lebend:	V2 Tod:	V3 Lebend:	V3 Tod:
PK	97,5	2,5	97,5	2,5	98,5	1,5
NK	97	3	98	2	98,5	1,5
HP-β-CD	96,5	3,5	97,5	2,5	99	1
Propofol/ HP-β-CD	81,5	18,5	94	6	91,5	8,5
Na- Propofat/ HP-β-CD	85	15	87,5	12,5	87,5	12,5
Propofol	0	100	0	100	0	100

Anhang 5: Auswertung der Vorversuche des Comet-Assays mittels der Auswertungssoftware Komet 5 (Bfi OPTiLAS, Gröbenzell, Deutschland) nach 24-stündiger Exposition bei 37 °C; n = 3, (V1 = Versuch 1, V2 = Versuch 2, V3 = Versuch 3)
Referenz: Mittelwert der Positivkontrolle, dargestellt sind die Mittelwerte der einzelnen Tests in Prozent

	NK	12,5 µmol H ₂ O ₂	25 µmol H ₂ O ₂	50 µmol H ₂ O ₂	100 µmol H ₂ O ₂
V1	8,6	8,8	21,8	53,9	79,3
V2	8,5	8,9	22,6	55,3	82,8
V3	8,6	8,7	20,8	51,9	76,4

Anhang 6: Auswertung der Testsubstanzen des Comet-Assays mittels der

Auswertungssoftware Komet 5 (Bfi OPTiLAS, Gröbenzell, Deutschland)

nach 24-stündiger Exposition bei 37 °C; n = 3 ,

(V1 = Versuch 1, V2 = Versuch 2, V3 = Versuch 3)

Referenz: Mittelwert der Positivkontrolle, dargestellt sind die Mittelwerte der einzelnen Tests in Prozent

	Negativkontrolle	HP-β-CD	Propofol/HP-β-CD	Na-Propofolat/HP-β-CD
V1	29,3	27,7	33,6	33,3
V2	30,4	38,1	40,1	46,8
V3	30,7	30,3	31,9	33,6

V. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen beteiligten Personen meinen großen Dank aussprechen, die mich bei der Durchführung meiner Dissertation unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Professor Jens Broscheit und meinem Betreuer Dr. med. Dr. rer. nat. Sergey Shityakov für die ausgezeichnete Betreuung. Zudem möchte ich einen besonderen Dank an Professor Christoph Otto als Gutachter der Dissertation aussprechen. Besonders danken möchte ich zudem Professorin Helga Stopper sowie Professor Robert Luxenhofer für die tatkräftige Unterstützung und für die Möglichkeit in denen, von Ihnen zur Verfügung bereitgestellten Laboren, die Experimente durchführen zu dürfen. Besonders danken möchte ich Dr. rer. nat. Michael Lübtow für seine Unterstützung. Besonders herzlich möchte ich mich bei Dr. rer. nat. Jürgen Kowalczyk und Dr. rer. nat. Dominik Dolles für ihre enorme Unterstützung, produktiven Anregungen und für das mehrfache Korrekturlesen bedanken.

Außerdem möchte ich mich bei der Bischöflichen Studienförderung Cusanuswerk bedanken, die mich im Rahmen meines gesamten Studiums und insbesondere bei der Promotion ideell und finanziell gefördert hat.

Meiner Familie und meinen Freunden danke ich für ihre Geduld und Ermutigungen zu der Arbeit an dieser Dissertation. Insbesondere danken möchte ich meiner Mutter für die Motivation und die liebevolle Anteilnahme, meinem Vater für seine zuverlässige Hilfe und seine guten Ideen, meinem Bruder David für die fortwährende Inspiration und seine großartige Hilfe, Ann Sophie für ihre liebevolle Unterstützung, meinem Onkel Johannes für sein Engagement, sowie meiner Oma für ihre aufbauenden Worte und guten Gedanken.