

Aus dem Institut für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Penetrationseigenschaften und Biokompatibilität von
dPGS-Nanocarriern auf oraler Mukosa und
immortalisierten Epithelzellen – eine *ex vivo* und
in vitro - Studie

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Katrin Vogel

Datum der Promotion: 03.12.2021

Für meine Familie und A.

Hinweis zur Gender-Formulierung:

Bei allen Bezeichnungen, die auf Personen bezogen sind, meint die gewählte Formulierung beide Geschlechter, auch wenn aus Gründen der leichteren Lesbarkeit die männliche Form ausgeschrieben wurde, z.B. Arzt, Patient etc.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	1
Abbildungsverzeichnis	6
Tabellenverzeichnis	6
Zusammenfassung.....	7
Abstract.....	9
1 Einleitung	10
1.1 Anatomischer Aufbau der oralen Mukosa.....	11
1.2 Entzündliche Erkrankungen der oralen Mukosa	14
1.3 Parodontitis.....	14
1.3.1 Klinisches Bild und Ätiopathogenese der Parodontitis	15
1.3.2 Epidemiologie der Parodontitis.....	17
1.3.3 Klassifikation der Parodontitis	18
1.3.4 Therapie der Parodontitis.....	19
1.4 Oraler Lichen planus.....	20
1.4.1 Definition	21
1.4.2 Klassifikation und klinisches Erscheinungsbild.....	22
1.4.3 Therapie des oralen Lichen planus	22
1.5 Topische Applikation von Medikamenten in der Mundhöhle	23
1.5.1 Schwierigkeiten der topischen Applikation	23
1.5.2 Nebenwirkungen der topischen Applikation	24
1.6 Nanocarrier in der Medizin	25
1.6.1 Nanozahnmedizin.....	25
1.6.2 Drug-Targeting-Systeme	27
1.6.3 Anforderungen an Nanocarrier für den Wirkstofftransport.....	28
1.7 Die angewandten Nanocarrier	29
1.7.1 Dendritisches Polyglycerolsulfat und hyperbranched Poly(glycerol- co- caprolacton)-Sulfat.....	29
1.7.2 Interaktion der Nanocarrier mit Epithelzellen	32
1.7.3 Risiken und Nebenwirkungen der Nanotechnologie	33
1.8 Fragestellung und Hypothesen	34

2	Material und Methoden	36
2.1	Materialien	36
2.1.1	Instrumente und Geräte.....	36
2.1.2	Zellkultur	38
2.1.3	Verbrauchsmaterialien.....	40
2.1.4	Chemikalien.....	42
2.1.5	Verwendete Antikörper	43
2.1.6	Primer für die quantitative Real-Time PCR	43
2.1.7	Kits.....	44
2.1.8	Verwendete Nanocarrier	44
2.1.9	Angewandte Software-Programme	45
2.2	Angewandte Methoden	45
2.2.1	Versuchsaufbau zur Untersuchung der Penetration	46
2.2.2	Zellinkubation mit den Nanocarriern dPGS und h(PG-co-PCL)S	51
2.2.3	Zytotoxizität von dPGS und h(PG-co-PCL)S	57
2.2.4	Analyse der Daten und statistische Methodik	59
3	Ergebnisse	60
3.1	Penetrationsverhalten von dPGS und h(PG-co-PCL)S in einem porcinen ex vivo-Schleimhautmodell	60
3.1.1	Die Auswertung mit dem konfokalen Laser-Scanning- Mikroskop	60
3.1.2	Quantifizierung des ex vivo- Versuchs.....	64
3.2	Einfluss der Nanocarrier auf die Ausschüttung pro-inflammatorischer Zytokine in immortalisierten gingivalen Keratinozyten	70
3.2.1	Bestimmung der RNA-Konzentration und Gelelektrophorese.....	71
3.2.2	Quantitative Echtzeit- Polymerase-Kettenreaktion (qRT- PCR)	71
3.3	Einfluss der Nanocarrier auf die metabolische Aktivität in immortalisierten gingivalen Keratinozyten	74
3.3.1	Auswertung der Ergebnisse des MTT-Assays.....	75
4	Diskussion	77
4.1	Limitationen der eingesetzten Methoden	79
4.1.1	Penetrationsverhalten von dPGS und h(PG-co-PCL)S ex vivo	79
4.1.2	Einfluss von dPGS- und h(PG-co-PCL)S-NC auf immortalisierte orale Epithelzellen	81

4.1.3	Limitationen der Methodik – MTT Assay	83
4.1.4	Verwendung immortalisierter Zelllinien	83
4.2	Wirkungsweise der dPGS- und h(PG-co-PCL)S-NC auf oraler Mukosa und in oralen Epithelzellen.....	84
4.2.1	Unterschiede im Penetrationsverhalten.....	84
4.2.2	Immunantwort von OKG4-Zellen auf dPGS- und h(PG-co-PCL)S-NC..	87
4.2.3	Zytotoxizität der Nanocarrier <i>in vitro</i>	89
4.3	Ausblick und Zusammenfassung.....	90
5	Literaturverzeichnis.....	94
6	Eidesstattliche Versicherung.....	107
7	Lebenslauf.....	109
8	Publikationen	111
9	Danksagung	112

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildungen
A.dest.	Destilliertes Wasser (lat. <i>aqua destillata</i>)
BOP	Blutung auf Sondieren (engl. <i>bleeding on probing</i>)
BSA	Bovines Serumalbumin
CAL	Klinischer Attachmentverlust (engl. <i>clinical attachment loss</i>)
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure (engl. <i>complementary deoxyribonucleic acid</i>)
CLSM	konfokales Laser-Scanning Mikroskop
Ct	Zyklusschwellenwert (engl. <i>cycle threshold</i>)
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. <i>deoxyribonucleic acid</i>)
dPG	dendritisches Poly-Glycerol
dPGS	dendritisches Poly-Glycerol-Sulfat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	und andere (lat. <i>et alii/aliae/aliam</i>)
EtBr	Ethidiumbromid
FLIM	Fluoreszenzlebensdauer Mikroskopie (engl. <i>fluorescence lifetime imaging microscopy</i>)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
h	Stunden
h(PG-co-PCL)S	hyperbranched Poly(glycerol-co-Polycaprolactone)-Sulfat
IL	Interleukin
IL-1 β	Interleukin-1 beta
kb	Kilobasen
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter

MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NC	Nanocarrier
nm	Nanometer
OKG4	Immortalisierte humane orale Keratinozyten der Gingiva
OLP	oraler Lichen planus
OT	Objektträger
pH-Wert	Negativer dekadischer Logarithmus der H_3O^+ -Ionenkonzentration
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
Pen	Penicillin
PFA	Paraformaldehyd
PMN	Polymorphkernige neutrophile Granulozyten
qRT-PCR	Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (engl. <i>quantitative realtime polymerase chain reaction</i>)
RNA	Ribonukleinsäure (engl. <i>ribonucleic acid</i>)
RNFW	RNA-freies Wasser (engl. <i>RNA-free water</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. <i>revolutions per minute</i>)
s	Sekunden
SRP	Scaling- und Root-Planning (nicht-chirurgische Parodontitisbehandlung; engl. <i>debridement</i>)
Strep	Streptomycin
TBS	Dreifach gepufferte Salzlösung (engl. <i>tris-buffered saline</i>)
TNF- α	Tumornekrose Faktor-alpha
U	Umdrehungen
V	Volt
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: die verschiedenen Qualitäten der oralen Mukosa.....	12
Abbildung 2: Schematisierter Aufbau der Mundschleimhaut.....	13
Abbildung 3: Klinisches Bild der Parodontitis.....	16
Abbildung 4: Klinisches Bild des oralen Lichen planus	21
Abbildung 5: Übersicht über verschiedene Modelle von Nanocarriern.....	26
Abbildung 6: Schematischer chemischer Aufbau des dPGS-NC.....	30
Abbildung 7: Schematischer chemischer Aufbau des h(PG-co-PCL)S-NC	31
Abbildung 8: Methoden zur Bestimmung des Penetrationsverhaltens von Carrier-Systemen.....	48
Abbildung 9: Amplifikationsplot der qRT-PCR	56
Abbildung 10: Zeitabhängige Penetration des Rhodamin-B markierten dPGS- NC	61
Abbildung 11: Zeitabhängige Penetration des Rhodamin-B markierten h(PG-co- PCL)S-NC	63
Abbildung 12: Quantifizierung des dPGS-NC in auskleidender Mukosa.....	65
Abbildung 13: Quantifizierung des dPGS-NC in mastikatorischer Mukosa.....	66
Abbildung 14: Quantifizierung des h(PG-co-PCL)S-NC in auskleidender Mukosa	67
Abbildung 15: Quantifizierung des h(PG-co-PCL)S-NC in mastikatorischer Mukosa	68
Abbildung 16: Darstellung der relativen Genexpression von IL-1 β und IL-6 nach dPGS-NC-Inkubation.....	71
Abbildung 17: Darstellung der relativen Genexpression von IL-1 β und IL-6 nach h(PG-co-PCL)S-NC-Inkubation	72
Abbildung 18: Auswertung des MTT-Assays	75

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Penetrationseigenschaften des dPGS- und h(PG-co-PCL)S-NC	70
---	----

Zusammenfassung

Die lokale medikamentöse Therapie oraler Entzündungserkrankungen wird durch die chemischen, physischen und physikalischen Gegebenheiten der Mundhöhle erschwert. Speichelfluss und gingivales Sulkusfluid oder die Bewegung der Zunge verursachen Verdünnungseffekte bzw. mechanische Einflüsse. Dies erschwert das Anhaften topisch applizierter Medikamente auf der oralen Schleimhaut. Nanocarrier auf der Basis chemisch synthetisierter Polymere könnten diesen gezielten Medikamententransport (Drug-Targeting) durch Verbesserung von Adhäsion und Penetration erleichtern und zu einer Wirkstoffanreicherung im Zielgewebe führen. Dendritisches Polyglycerolsulfat (dPGS) und dessen Derivat - hochverzweigtes Polyglycerol-co-Polycoprolactan-Sulfat (h(PG-co-PCL)S) - sind Polymere, die als solche Drug-Targeting-Systeme genutzt werden könnten. h(PG-co-PCL)S weist Esterbindungen auf, welche eine bessere Abbaubarkeit als dPGS durch körpereigene Enzyme garantieren. Das nachgewiesene anti-inflammatorische Potential, z.B. durch eine L- und P-Selektin-Hemmung, macht beide Nanocarrier zu attraktiven Kandidaten für die Therapie oraler Entzündungserkrankungen. Beide Polymere wurden in vorangegangenen Studien *in vitro* als biokompatibel eingestuft und zeigten die Fähigkeit, in humane Haut zu penetrieren.

In der vorliegenden Arbeit wurde das Penetrationsverhalten erstmals auf der oralen Mukosa mit Applikationszeiten von maximal 5 min evaluiert. Es konnte gezeigt werden, dass nach bereits 30 s eine statische Adhärenz und nach 5 min auch eine Penetration in bukkale und mastikatorische Mukosa möglich war. In mastikatorischer Mukosa akkumulierten beide Nanocarrier im *Stratum corneum* und penetrierten nur in geringen Mengen in tiefere viable Epithelschichten. Eine Penetration über die Basalmembran in die *Lamina propria* hinaus konnte nicht beobachtet werden.

dPGS und h(PG-co-PCL)S provozierten unter den gewählten Bedingungen keine Ausschüttung pro-inflammatorischer Zytokine, was darauf hinweisen könnte, dass nach Applikation diese Nanocarrier keine Entzündungsreaktion ausgelöst wird. Während mit dPGS-NC keine Reduzierung der mitochondrialen Aktivität in oralen Epithelzellen mit unterschiedlich hohen Konzentrationen

nachgewiesen werden konnte, zeigte der h(PG-co-PCL)S-NC nach 24 h mit der höchsten Konzentration ($c = 50 \mu\text{g/ml}$) eine leicht reduzierte mitochondriale Aktivität. Die durchgeführten Grundlagenexperimente stellen die Basis für die weitere Evaluation dieser Nanocarrier in den oralen epithelialen Geweben *in vivo* und *in vitro* dar.

Abstract

Local drug therapy of oral inflammatory diseases is complicated by the chemical and physical conditions of the oral cavity. Salivary flow and gingival sulcus fluid as well as the movements of the tongue are causing dilution effects and mechanical influences. This makes it difficult for topically applied drugs to adhere to the oral mucosa. Nanocarriers based on chemically synthesized polymers could facilitate this targeted drug transport (drug targeting) by improving adhesion and penetration and leading to the accumulation of the drug in the target tissue. Dendritic polyglycerol sulfate (dPGS) and its derivative - hyper branched polyglycerol-co-polycaprolactane sulfate (h(PG-co-PCL)S) - are polymers that could be used as such drug targeting systems. h(PG-co-PCL)S-NC exhibits ester bonds, that ensure better degradability than dPGS-NC by endogenous enzymes. The demonstrated anti-inflammatory potential, e.g. through L- and P-selectin inhibition, makes both nanocarriers attractive candidates for the therapy of oral inflammatory diseases. Both polymers were found to be biocompatible in previous studies *in vitro* and exhibited the ability to penetrate into the human skin.

In the present work, the penetration behavior was evaluated for the first time on the oral mucosa with application times of maximum 5 min. It was shown that static adherence was possible after 30 sec and penetration into buccal and masticatory mucosa after 5 min. In masticatory mucosa, both nanocarriers accumulated in the *stratum corneum* and penetrated only in small amounts into deeper viable epithelial layers. Penetration beyond the basement membrane into the *lamina propria* was not observed.

Under the selected conditions, dPGS- and h(PG-co-PCL)S-NC did not provoke the release of pro-inflammatory cytokines, which may indicate that no inflammatory response is induced after application of those nanocarriers. While no reduction of mitochondrial activity was detected with dPGS-NC in oral gingival epithelial cells at different concentrations, h(PG-co-PCL)S-NC showed slightly reduced mitochondrial activity after 24 h with the highest concentration (c = 50 µg/ml). These experiments are the basis for further evaluation of these nanocarriers in oral epithelial tissues *in vivo* and *in vitro*.

1 Einleitung

Die orale Mukosa besitzt eine Barrierefunktion und schützt vor dem Eindringen von Mikroorganismen (Radlanski, 2001). Entzündungserkrankungen der oralen Schleimhaut sind für Patienten schmerzhaft und teilweise schwer zu therapieren. Physiologische Gegebenheiten, wie Speichelfluss erschweren eine topische Applikation von Medikamenten in der Mundhöhle durch Verdünnung der Wirkstoff-Konzentration (Greenstein and Tonetti, 2000). Daher wird in schweren Erkrankungsfällen auf eine systemische Anwendung zurückgegriffen, welche erhebliche Nebenwirkungen mit sich bringen kann (Turos et al., 2007).

Die Erforschung und Herstellung eines wirksamen Medikamententransport-Systems (Drug-Targeting-System) zur Therapie oraler Entzündungserkrankungen ist Gegenstand aktueller Forschung. Die Nanotechnologie hat in vielen Teilen der Medizin (Nanomedizin) mit vielversprechenden Möglichkeiten Einzug gehalten (Hafner et al., 2014). Moleküle im Nanogrößenbereich von 1-100 nm, welche als Träger z.B. von Medikamenten fungieren, werden Nanocarrier genannt (Ghosh et al., 2019). Diese werden bereits in der Augenheilkunde (Diebold and Calonge, 2010), Dermatologie (Papakostas et al., 2011) oder in der Krebsforschung (Dias et al., 2020) eingesetzt, um Diagnostik und Therapie zu verbessern (Hafner et al., 2014). *Ex vivo*-Studien mit speziellen, sogenannten „Core-multishell“ (CMS-)-Nanocarriern konnten deren Aufnahme in oraler Mukosa nachweisen (Jager et al., 2018) und zeigen, dass CMS-NC Medikamente, wie z.B. Dexamethason transportierten und freisetzten (Jager et al., 2018, Yamamoto et al., 2016). Ein weiterer daraufhin untersuchter Nanocarrier war dendritisches Polyglycerol-Sulfat (dPGS), welcher in vorausgegangenen Studien gute anti-inflammatorische und funktionelle Ergebnisse lieferte (Pant et al., 2017, Reimann et al., 2017, Silberreis et al., 2019b).

Allerdings wurde in früheren Studien erkannt, dass ursprünglich verwendete Strukturen des dPGS-NC nicht vollständig degradierten, sondern verstärkt in Leber und Niere akkumulierten (Ferraro et al., 2018, Khandare et al., 2010). Daraufhin wurde ein dPGS-Derivat, das hochverzweigte (hyperbranched) Poly(glycerol-co-Polycaprolactone)-Sulfat (h(PG-co-PCL)S) entwickelt, welches durch den Einbau zusätzlicher Esterbindungen eine verbesserte Bio-

abbaubarkeit aufwies (Ferraro et al., 2018). Untersuchungen mit den Nanocarriern dPGS und h(PG-co-PCL)S auf oraler Mukosa erfolgten bisher noch nicht. In der vorliegenden Arbeit wurde sowohl der dPGS- Nanocarrier als auch dessen Derivat h(PG-co-PCL)S in Hinblick auf Penetrationseigenschaften in oraler Mukosa, der Expression von Entzündungsmediatoren und der Viabilität oraler Epithelzellen evaluiert.

1.1 Anatomischer Aufbau der oralen Mukosa

Die Mundhöhle ist mit Schleimhaut (Mukosa) ausgekleidet und dient als Barriere gegen das Eindringen pathogener Mikroorganismen und Fremdstoffen, sowie als Schutz vor mechanischen Einwirkungen (Presland and Jurevic, 2002, Radlanski, 2001).

Die orale Mukosa weist je nach Lokalisation und Funktion drei verschiedene Beschaffenheiten auf (Abb. 1) (Groeger and Meyle, 2015, Squier and Kremer, 2001). Regionen, die funktionell am Kauvorgang beteiligt sind und stark beansprucht werden, wie Gingiva oder harter Gaumen, weisen eine rigide mastikatorische, ortho-para-keratinisierte Mukosa auf. Die auskleidende (bukkale) Mukosa bedeckt Abschnitte der Mundhöhle, wie Wangeninnenseite oder Mundboden, welche z.B. eine gute Artikulation ermöglichen.

Die Zungenoberfläche ist mit spezialisierter Mukosa bekleidet (Abb. 1), in welche die Geschmacksknospen eingebettet sind. Die Farbe der Mukosa wird von der Struktur des Epithels, der Dicke, der Menge an Melanin und der Durchblutung der darunterliegenden *Lamina propria* bestimmt. Bukkale Mukosa erscheint rosig-pink, mastikatorische Mukosa erscheint blass-rot. In gesundem Zustand zeigt die bukkale Mukosa eine Stippelung (Kramer et al., 1978)

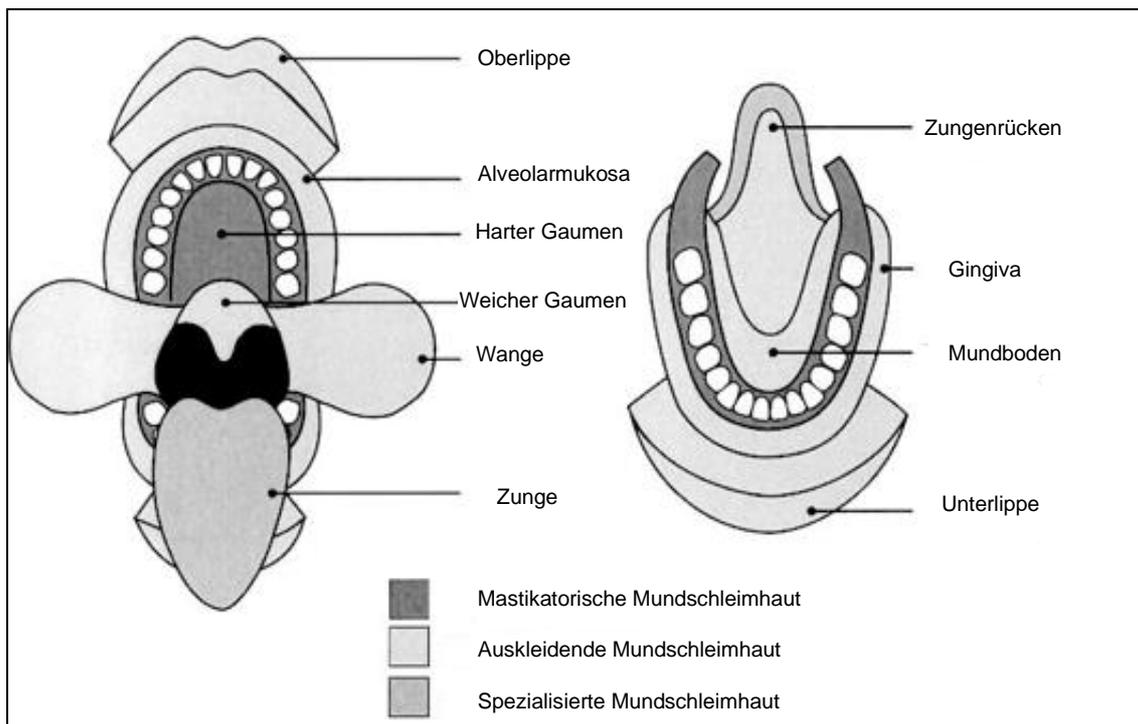


Abbildung 1: die verschiedenen Qualitäten der oralen Mukosa
schematisierte Darstellung der Lokalisation der unterschiedlichen Qualitäten der Schleimhaut;
Abbildung modifiziert nach Squier und Kremer (Squier and Kremer, 2001)

Histologisch besteht die orale Mukosa aus einem mehrschichtigen Plattenepithel und einer darunter liegenden Schicht aus fibrösem Bindegewebe, der *Lamina propria* (Papagerakis et al., 2014, Radlanski, 2001). In dieser befinden sich Blut- und Lymphgefäße, sowie Nervenfasern. Die Mukosa ist über Zell-Matrix-Verbindungen, sogenannten Hemidesmosomen, mit dem darunter liegenden Knochen verbunden (Schreurs et al., 2020).

Die mastikatorische Mukosa (Abb. 2 A) ist keratinisiert und weist auf der Oberfläche ein rigides *Stratum corneum* auf, welches aus degradierten Korneozyten besteht. Weiter basal liegt das *Stratum granulosum* mit abgeflachten Granula-bestückten-Korneozyten (Abb. 2 A). Das darunter liegende *Stratum spinosum* besteht aus kubischen, über Desmosomen verbundene Epithelzellen (Groeger and Meyle, 2015) und liegt über dem *Stratum basale*, welches eng aneinandergereihte, hochprismatische Epithelzellen aufweist (Papagerakis et al., 2014). In der darunter liegenden *Lamina propria mucosae* befinden sich Kollagenfasern, welche zur

Stabilisierung der Mukosa vor mechanischen Einwirkungen beim Kauvorgang beitragen.

Die sogenannte auskleidende (bukcale) Mukosa (Abb. 2 B) ist nicht keratinisiert (Groeger and Meyle, 2015) und wird histologisch durch ein *Stratum superficiale* mit abgeflachten Epithelzellen, ein weiter apikal liegendes *Stratum intermedium* mit kubischen Epithelzellen und dem darunterliegenden *Stratum basale* beschrieben (Radlanski, 2001). Die *Lamina propria mucosae* der auskleidenden Mukosa weist im Vergleich zur mastikatorischen Mukosa weniger Kollagenfasern auf, wodurch diese elastischer wird.

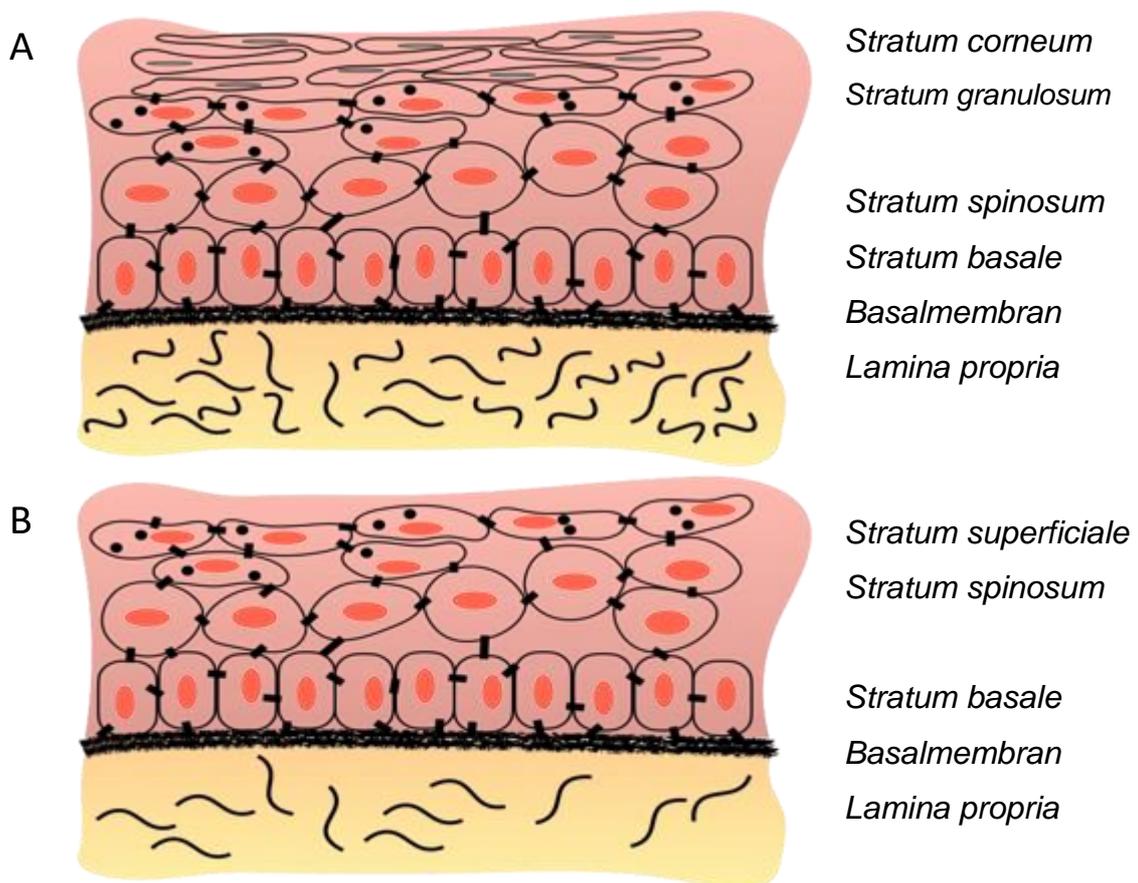


Abbildung 2: Schematisierter Aufbau der Mundschleimhaut mit den einzelnen *Strati* der mastikatorischen (A) und auskleidenden (B) Mukosa modifiziert nach (Radlanski, 2001)

1.2 Entzündliche Erkrankungen der oralen Mukosa

Mehr als 700 verschiedene Bakterien wurden bislang in der Mundhöhle beschrieben (Dewhirst et al., 2010). Die vermutete Anzahl der im Mund lebenden Mikroorganismen ist dagegen weitaus höher. Das orale Mikrobiom organisiert sich symbiotisch im sogenannten Biofilm, welcher alle Bereiche der oralen Kavität, wie den Zahnhalteapparat (Parodont), Zähne, Zunge, Gaumen und die orale Schleimhaut besiedeln kann. Orale Entzündungserkrankungen wie Parodontitis sind die immunologische Reaktion auf einen in eine Dysbiose geratenen Biofilm (Hajishengallis and Korostoff, 2017, Pozo, 2018, Sanz et al., 2017). Für die Zerstörung des Zahnhalteapparates ist allerdings nicht der Biofilm selbst, sondern eine übermäßige Immunantwort auf die vorhandenen Mikroorganismen mitverantwortlich (Hajishengallis, 2014, Hajishengallis and Korostoff, 2017). Durch verschiedene Faktoren wie genetische Prädispositionen (Schaefer, 2018), Zigarettenkonsum (Freitag-Wolf et al., 2019, Johnson and Guthmiller, 2007), Ernährung und systemische Vorerkrankungen, wie z.B. Diabetes mellitus Typ2, kann die Entstehung einer Parodontitis begünstigt werden (Bartold and van Dyke, 2013, Genco and Sanz, 2020, Johnson and Guthmiller, 2007, Papapanou et al., 2018).

Des Weiteren können Autoimmunerkrankungen wie z.B. oraler Lichen planus oder das bullöse Schleimhautpemphigoid als Mundschleimhauterkrankungen auftreten oder ein geschwächtes Immunsystem (z.B. bei HIV) zu einer sehr schmerzhaften Pilzerkrankung (orale Candidiasis), sowie multiplen Aphten führen (Marable et al., 2016, Mollen et al., 2017, Pozo, 2018).

1.3 Parodontitis

Parodontitis zählt zu den 6 häufigsten chronischen Entzündungserkrankungen des Menschen weltweit (Kassebaum et al., 2014). Die Erkrankung des Zahnhalteapparates (Parodont) ist bakteriell induziert und multifaktoriell bedingt (Papapanou et al., 2018). Durch komplexe Interaktionen zwischen pathogenen Mikroorganismen und dem Immunsystem kommt es im Verlauf der Erkrankung zu einer irreversiblen Zerstörung des Parodonts. Im Falle einer Nichtbehandlung kann es zu Zahnverlust kommen (Ramseier et al., 2017). Bei

systemischen Erkrankungen, wie Diabetes mellitus Typ 2 (Graziani et al., 2017, Nascimento et al., 2018), kardio-vaskulären Erkrankungen (Friedewald et al., 2009, Moroni et al., 2018) und rheumatoider Arthritis (Scher et al., 2014) wurde eine Assoziation mit moderat bis schwerer Parodontitis erkannt (Genco and Sanz, 2020, Jepsen et al., 2017).

1.3.1 Klinisches Bild und Ätiopathogenese der Parodontitis

Das klinische Bild der Parodontitis ist charakterisiert durch einen mithilfe einer parodontalen Messsonde klinisch messbaren Attachmentverlust (CAL) an mehr als zwei nicht-benachbarten Zähnen, einer Blutung auf Sondieren > 10 % und einem röntgenologisch erkennbaren Knochenrückgang. Zusätzlich können Rezessionen (Zahnfleischrückgang) vorhanden sein (Tonetti and Sanz, 2019). Des Weiteren kann es zu erhöhter Zahnlockerung und Zahnwanderungen, Plaque-Biofilm-Ablagerungen, vergrößerten Zahnzwischenräumen, geschwollenem Zahnfleisch und in besonders akuten Phasen zu Eiterbildung in den Zahnfleischtaschen (Abb. 3) kommen (Papapanou et al., 2018).

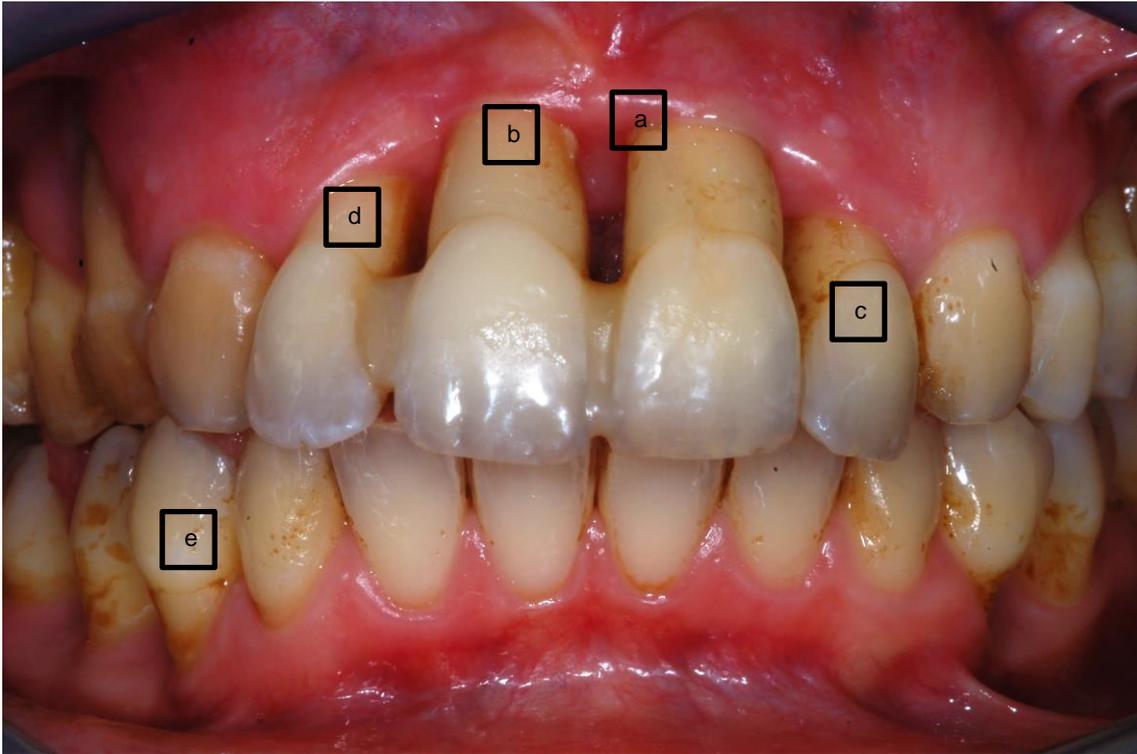


Abbildung 3: Klinisches Bild der Parodontitis

a: Rötung und Schwellung der Gingiva b: Blutung/Eiteraustritt c: Plaque-Biofilm Ablagerungen
d: vergrößerte Zahnzwischenräume e: Zahnfleischrückgang

Quelle: Institut für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde an der Charité

Die Ätiologie der Parodontitis ist multifaktoriell und wird unter anderem durch eine Dysbiose der in der Mundhöhle vorhandenen Mikroorganismen verursacht (Papapanou et al., 2018), die sich im sogenannten Biofilm organisieren. Dieser besiedelt feste Unterlagen und hat Kontakt zu einer flüssigen Umgebung, wie Speichel oder Sulkusfluid. Die Mikroorganismen im Biofilm ändern ihre Eigenschaften gegenüber denen, die sie unter planktonischen Umständen haben (Axelsson and Lindhe, 1981) und begünstigen im ausgereiften Stadium eine Chronifizierung systemischer Erkrankungen (Darveau, 2010, Genco and Sanz, 2020). Eine Dysregulation des Immunsystems auf die vorhandenen Bakterien (Hajishengallis, 2014, Hajishengallis and Korostoff, 2017) führt zur Manifestation der Entzündungserkrankung Parodontitis.

Epithelzellen produzieren pro-inflammatorische Zytokine als Reaktion auf fremde mikrobielle Antigene (Dommisch et al., 2012, Hajishengallis and Korostoff, 2017). Zu diesen Zytokinen gehören unter anderem Interleukin-1 β (IL-1 β), Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-8 (IL-8) und der Tumornekrosefaktor- α

(TNF- α) (Groeger and Meyle, 2015, Meyle and Chapple, 2015). Diese Zytokine führen zu einer Aktivierung der ersten Abwehrzellen des angeborenen Immunsystems: polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN). PMNs stehen im Austausch mit den vor Ort vorhandenen Immun- und Epithelzellen und sind in der Lage Bakterien zu degradieren und zu phagozytieren. Genetik, Verhaltens- und Umweltfaktoren, sowie Medikamente können die Funktion von PMNs verändern und somit eine Störung der Homöostase des Immunsystems auslösen (Meyle and Chapple, 2015).

Die bei einer Parodontitis vorliegende Dysbalance bewirkt, dass zum einen proteolytische Enzyme nicht mehr geregelt gehemmt werden, reaktive Sauerstoffspezies vermehrt gebildet und zu oxidativem Stress führen. Dadurch liegt eine erhöhte Konzentration an Matrix-Metallo-Proteinase vor, welche gewebeabbauend agieren (Chapple and Matthews, 2007). Antimikrobielle Peptide und antioxidative Schutzsysteme, welche die körpereigene Immunabwehr regeln, sind zudem nicht in ausreichender Zahl vorhanden und es kommt zu vermehrter Gewebedestruktion. Dies bewirkt, dass die Entzündungsreaktion immer weiter nach apikal des Zahnes wandert und den Alveolarknochen, sowie das übrige Parodont irreversibel abbaut (Meyle and Chapple, 2015).

1.3.2 Epidemiologie der Parodontitis

Die fünfte deutsche Mundgesundheitsstudie untersuchte die Prävalenz der Parodontitis in Deutschland, wonach jeder zweite Patient in der Gruppe der 65 bis 74 Jährigen (65 %) an einer mild bis moderaten und jeder fünfte an einer schweren Parodontitis erkrankt ist (Cholmakow-Bodechtel et al., 2016). Weltweit sind 50 % der Bevölkerung an einer milden bis moderaten Parodontitis und 11 % an einer schweren Form erkrankt (Kassebaum et al., 2014).

1.3.3 Klassifikation der Parodontitis

Die ehemalige Klassifikation in chronisch und aggressive Parodontitis (Armitage, 1999) wurde 2018 durch die aktuelle Klassifikation abgelöst. Es wurde eine Stadium- und Grad-Einteilung entwickelt (Tonetti et al., 2018), welche eine reflektierte und patienten-individualisierte Diagnose ermöglicht.

Anhand von Röntgenbildern, der Messung des BOP und des interdentalen CAL wird zunächst entschieden, ob es sich um „parodontale Gesundheit“ (BOP < 10 %, kein röntgenologisch vorhandener Knochenverlust, kein interdentaler CAL), „Gingivitis“ (BOP ≥ 10 %, kein röntgenologisch vorhandener Knochenverlust, kein interdentaler CAL) oder um „Parodontitis“ handelt (Tonetti and Sanz, 2019). Des Weiteren wird das Vorhandensein bukkaler Rezessionen und ein früherer Zahnverlust bei der Klassifikation miteinbezogen. Liegt eine Parodontitis vor, wird das Stadium der Erkrankung bestimmt („Staging“), indem durch Messung von je 6 Sondierungstiefen pro Zahn und die Erstellung eines Röntgenstatus eine umfassende Befundaufnahme durchgeführt wird. Das Stadium der Parodontitis richtet sich nach Schwere der Erkrankung, Komplexität und Verteilungsmuster und wird aus den Werten der Sondierungstiefe, des Knochenverlusts und dem CAL, bzw. der Anzahl der betroffenen Zähne (< 30 % = lokalisiert, > 30 % = generalisiert) bestimmt. Die anschließende Grad-Einteilung („Grading“) ist ein Indikator für die Progression der Erkrankung. Diese wird entweder mittels direkten Nachweises anhand vorausgegangener Befunde (Röntgenbilder, CAL, Knochenverlust) aus den letzten 5 Jahren ermittelt oder mittels indirekten Nachweises. Dieser wird mithilfe eines Röntgenstatus und dem Verhältnis Knochenabbau/Alter des Patienten evaluiert. (Tonetti et al., 2018, Tonetti and Sanz, 2019). Zusätzlich werden Risikofaktoren wie Zigarettenkonsum und Vorliegen einer Diabetes-erkrankung (Diabetes mellitus Typ 2) mit als Modifikation der Grad-Einteilung einbezogen.

Damit ist es möglich, eine zeitlebens aktuelle Einordnung des Erkrankungsstatus der chronischen Entzündungserkrankung Parodontitis zu erheben und dementsprechende Therapieschritte einzuleiten.

1.3.4 Therapie der Parodontitis

Aktuelle Richtlinien versuchen mittels verschiedener Therapieansätze eine der Komplexität der Erkrankung angepasste Behandlung zu ermöglichen (Sanz et al., 2020, Suvan et al., 2020). Zu diesen gehört primär die regelmäßige Entfernung des sub- und supragingivalen Biofilms (Axelsson and Lindhe, 1981) mit Hand- und/oder Ultraschallinstrumenten (Suvan et al., 2020). In schwerzugänglichen Bereichen, wie in sehr tiefen Zahnfleischtaschen oder Furkationsbereichen, verbleibt oft ein Rest an subgingivalem Zahnstein, der nicht entfernt werden konnte. Deshalb wurden adjuvante Therapieansätze entwickelt. Dazu gehören z.B. die adjuvante photodynamische Therapie (Al-Khureif et al., 2020) oder der Einsatz von Lasern (Salvi et al., 2020). Heterogene Ergebnisse der dazu aktuellen Studien belegen allerdings einen sehr begrenzten Mehrwert gegenüber der konservativen, nicht-chirurgischen mechanischen Therapie (Salvi et al., 2020).

Eine exzellente Mundhygiene und die Umstellung von Lifestyle-Faktoren wie Rauchen oder Ernährungsgewohnheiten sind Voraussetzungen für einen erfolgreichen Therapieverlauf (Alexandridi et al., 2018, Ramseier et al., 2020, Suvan et al., 2020).

Zusätzlich ist es möglich durch minimal-invasive chirurgische Eingriffe die parodontale Situation regenerativ oder resektiv zu therapieren (Sanz et al., 2020). Bezüglich der chirurgischen Therapie bei Zähnen mit Furkationsbeteiligung zeigte sich zwischen den unterschiedlichen Therapieverfahren kaum ein Unterschied zur nicht-chirurgischen Therapie (Dommisch et al., 2020). Aufgrund der Komplexität und des chronischen Krankheitsverlaufes ist es wichtig, dass Patienten engmaschig betreut und lebenslang therapiert werden (Cobb, 2002, Ramseier et al., 2019). Häufig auftretende Faktoren wie vertikale Defekte, erhöhte Zahnbeweglichkeit oder eine Beteiligung der Furkation (Dommisch et al., 2020) erschweren die Behandlung zusätzlich. Bei der unterstützenden Parodontitistherapie (UPT) wird ein individuell auf Progressionsrate und das gemäß einer Stadium- und Gradeinteilung basierende Intervall festgelegt, nach dem ein Biofilmmanagement im Sinne der UPT durchgeführt werden sollte (Ramseier et al., 2019). Damit soll frühzeitiger

Zahnverlust und eine rapide Progression der Erkrankung verhindert werden (Ramseier et al., 2019). Zusätzlich können bei schweren Formen der Parodontitis spezielle systemische Antibiotika adjuvant zum Einsatz kommen (Greenstein and Tonetti, 2000, Harks et al., 2015, Pretzl et al., 2019, West et al., 2021). Zusätzlich zeigten Studienergebnisse mit adjuvant lokal applizierten Antibiotika-Präparaten eine Verbesserung gegenüber der Kontrollgruppe ohne Antibiotikagabe (Herrera et al., 2020, Sanz et al., 2020, West et al., 2021). Neue Therapiekonzepte zielen darauf ab, anti-inflammatorisch wirksame Medikamente der überschießenden Immunantwort bei einer Parodontitis entgegenzusetzen (Preshaw, 2018). Diese sollen dem dysregulierten Status des Immunsystems helfen, wieder in einen kontrollierten Zustand überzugehen (Sulijaya et al., 2019). Ein Beispiel hierfür ist die Hemmung der Matrix-Metallo-Proteinasen durch Chlorhexidinbis(D-gluconat) (Chlorhexidin), welches adjuvant nach dem Entfernen des supra- und subgingivalen Biofilms appliziert wird (Prietto et al., 2020). Chlorhexidin wirkte sowohl antioxidativ, als auch proteolytisch gegenüber Parodontitispathogenen und bewirkte dadurch im Vergleich zur Kontrollgruppe geringere CAL- und Sondierungstiefen-Werte (da Costa et al., 2017, Prietto et al., 2020).

Das Therapieziel bei der Behandlung der Parodontitis ist eine Sondierungstiefe von $\leq 4-5$ mm und eine 10-20 %ige Blutung auf Sondierung (Feres et al., 2020).

1.4 Oraler Lichen planus

Lichen planus ist eine chronisch-rezidivierende Autoimmunerkrankung, die auf der äußeren Haut und in ca. 70 % ebenfalls als orale Manifestation vorkommt (Dommisch and Schmidt-Westhausen, 2021, Shavit et al., 2020).

Die genaue Ätiologie der Erkrankung ist noch nicht hinreichend bekannt (González-Moles et al., 2019). Typisches Erscheinungsbild ist eine weißliche, netzartige Epithelveränderung der Mundschleimhaut, die sogenannte „Wickham´sche Streifung“ (Kramer et al., 1978) (Abb. 2). Mit einer weltweiten Prävalenz von 1,01 % ist diese eine der häufigsten Autoimmunerkrankungen der oralen Schleimhaut (González-Moles et al., 2020). Die Welt-

gesundheitsorganisation (WHO) beschreibt das Krankheitsbild des Lichen planus als „präkanzeröse Bedingung“ (Warnakulasuriya et al., 2007). Bei etwa 1 % der Patienten mit einer lichenoiden Erkrankung findet in einem Beobachtungszeitraum von fünf Jahren eine Entartung statt (Silverman et al., 1985). Frauen erkranken mit 75 % häufiger an oralem Lichen planus als Männer (Eisen, 2000).



Abbildung 4: Klinisches Bild des oralen Lichen planus mit der typischen "Wickham'schen Streifung", siehe Pfeilmarkierung; freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Univ.-Prof. Dr. med. dent. H.Dommisch, Institut für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde an der Charité-Universitätsmedizin Berlin

1.4.1 Definition

Es wird zwischen einer oralen lichenoiden Reaktion und dem oralen Lichen planus (OLP) unterschieden (Ismail et al., 2007, Mollen et al., 2017). Eine lichenoiden Reaktion der Mundschleimhaut steht im Zusammenhang mit externen Einwirkungen. Zu diesen zählen z.B. Amalgamlegierungen, überstehende Füllungsränder, bereits bekannte Hauterkrankungen (wie z.B. Lupus) oder frühere Knochenmarktransplantation (González-Moles et al., 2020). Können äußere Einwirkungen ausgeschlossen werden und liegt ein immunhistochemischer Nachweis spezifischer Antikörper vor (Payeras et al., 2013), spricht man von einem OLP (Payeras et al., 2013).

1.4.2 Klassifikation und klinisches Erscheinungsbild

Der OLP kann in der Mundhöhle sehr unterschiedlich ausgeprägt sein. Die klinischen Anzeichen kommen meist symmetrisch vor. Es werden sechs unterschiedliche Erscheinungsformen des OLP beschrieben: papulös, plaqueförmig, retikulär, bullös, atrophierend, erosiv-ulzerierend (Andreasen, 1968). Bei der retikulären, meist asymptomatischen Form zeigen sich netzartige, retikuläre Streifen, welche als nicht-abwischbare weißliche Schleimhautveränderungen zu erkennen sind (Al-Hashimi et al., 2007). Die erythematöse Form zeigt sich in rötlichen Flecken an der Schleimhaut, wohingegen bei der erosiven und schmerzhaftesten Form zusätzlich offene Läsionen beobachtet werden (Andreasen, 1968). In der Mundhöhle sind meist die Bereiche des Planum bukkale, die Zunge, die labiale Mukosa und die Gingiva beidseitig betroffen (Kramer et al., 1978). Es wird vermutet, dass bei der erosiv-ulzerierenden und atrophischen Form vermehrt maligne Entartungen der Zellen stattfinden können (Kramer et al., 1978).

Histologisch zeigt sich der OLP in einer Anhäufung von Immunzellen (Lymphozyten). Diese reagieren auf eine autoimmun-bedingte verstärkte Entzündungsreaktion durch erhöhtes Vorkommen von Entzündungsmediatoren, wie Zytokine und T-Helfer-Zellen. Dies wiederum stimuliert die Apoptose von Keratinozyten, den Hauptzellen der oralen Mundschleimhaut (Payeras et al., 2013, Zaslansky et al., 2018).

Es treten Krankheitssymptome wie Mundbrennen, erhöhte Schmerzempfindlichkeit und spontane Schmerzen beim Zähneputzen oder beim Verzehr von sauren oder scharfen Speisen auf (Holmstrup et al., 1988).

1.4.3 Therapie des oralen Lichen planus

Die Ursache für die Entstehung eines OLP ist noch nicht hinreichend bekannt, weshalb die Therapie erst beim Auftreten der Symptome begonnen wird (Al-Hashimi et al., 2007). Es werden cortisonhaltige Salben und Mundspüllösungen angewendet. Zusätzlich wird eine gute Mundhygiene empfohlen (Lozada-Nur and Miranda, 1997) und der Verzicht auf würzige/scharfe Nahrung (Mollen et al., 2017).

Bei einem schweren Krankheitsverlauf oder bei Kombination des OLP mit anderen Mundschleimhautrekrankungen kann in Ausnahmefällen eine systemische Cortisontherapie angeordnet werden (Al-Hashimi et al., 2007). Durch die Chronifizierung und dem Risiko der malignen Entartung bei OLP, müssen Patienten lebenslang betreut werden (González-Moles et al., 2019). Eine vollständige Ausheilung wurde in der Literatur bislang nicht beschrieben (Al-Hashimi et al., 2007) und die aktuellen Therapieoptionen sind limitiert (Zaslanasky et al., 2018).

1.5 Topische Applikation von Medikamenten in der Mundhöhle

Mit der topischen Applikation von Medikamenten auf oraler Mukosa wird versucht, Nebenwirkungen systemisch verabreichter Medikamente zu minimieren (Greenstein and Tonetti, 2000, Zadik et al., 2017), Resistenzentwicklungen zu verhindern (Van Winkelhoff et al., 2000) und die Wirkstoffkonzentration lokal aufrecht zu erhalten (Goodson et al., 1979, Jepsen and Jepsen, 2016).

Gegenwärtig werden Mundspüllösungen (z.B. Chlorhexidin bei Gingivitis/Parodontitis), Lutschtabletten (Nystatin bei Mundsoor-Erkrankungen), die das Medikament enthalten oder haftbare Salben (z.B. Volon-A Haftsalbe bei OLP) auf die erkrankte Stelle im Mund aufgebracht (Tonetti et al., 2012, Zadik et al., 2017).

1.5.1 Schwierigkeiten der topischen Applikation

Die topische Therapie in der Mundhöhle ist vielen Limitationen ausgesetzt. Flüssigkeiten wie Speichel und Sulkusfluid, welches am Übergang von Zahn zu Zahnfleisch (Sulkus) gebildet wird, verhindern ein Anhaften von Wirkstoffen (Dawes, 1987, Humphrey and Williamson, 2001, Pedersen et al., 2018). Die Menge an gebildetem Sulkusfluid nimmt abhängig vom Grad einer Entzündung zu und ist im entzündeten Zustand etwa 5,5fach höher (Barros et al., 2015, Dommisch et al., 2015). Die Mukusschicht auf der Oberfläche der Mundhöhle stellt eine weitere Barriere für Penetration und Adhärenz von Medikamenten dar

(Roblegg et al., 2012). In Summe führt dies zu verminderter Bioverfügbarkeit und Wirkstoffkonzentration von Medikamenten und zu erheblichen Verdünnungseffekten. Darüber hinaus ist die Applikationsart und -dauer durch die mechanische Einwirkung der Zunge während des Kauvorgangs beeinflusst und erschwert. Patienten werden bei der topischen Applikation eines Medikaments gebeten für bis zu 15 min den Mund offen zu halten, nicht auszuspülen und für weitere 30-60 min nichts zu trinken oder zu essen (Albuquerque et al., 2016). Dies schränkt den Patienten-Komfort stark ein und erfordert eine hohe Compliance der Patienten für die meist langandauernde Therapie.

1.5.2 Nebenwirkungen der topischen Applikation

Aufgrund der oben genannten Schwierigkeiten wird bei topischer Applikation von Medikamenten meistens eine sehr hohe Wirkstoffkonzentration gewählt (Torchilin, 2000). Dies schließt eine zusätzlich systemische Wirkung nicht vollständig aus.

Orale Pilzkrankungen (Candidiasis) sind eine häufig auftretende Nebenwirkung der topischen Applikation von Medikamenten (Marable et al., 2016). Weitere lokal auftretende Nebenwirkungen bei der topischen Applikation von Cortisonpräparaten können Mundbrennen, Geschmacksirritationen, Haarleukoplakie, Mundtrockenheit, Cheilitis oder Überempfindlichkeiten sein (Lozada-Nur et al., 1994, Park et al., 2013).

Besonders bei atrophisch oder ulzerierter Schleimhaut (z.B. bei erosiv-ulzerierter Form des OLP) ist eine systemische Absorption möglich und es können entsprechende Nebenwirkungen auftreten (González-Moles et al., 2002). Dazu gehören Hirsutismus (unnatürlicher Haarwuchs) und das „Vollmondgesicht“ (Lozada-Nur and Miranda, 1997) oder allergische Hautreaktionen und Magen-Darm-Unverträglichkeiten bei topisch angewandeter Antibiotikatherapie (Jepsen and Jepsen, 2016, Pretzl et al., 2019).

Die Vermeidung der genannten Komplikationen sollten verstärkt in den wissenschaftlichen Fokus rücken, um zum einen die Anwendung systemisch verabreichter Medikamente zu reduzieren und zum anderen die topische

Applikation noch effektiver und biowirksamer zu gestalten (Narang and Narang, 2015, Neuberger et al., 2005). Eine vielversprechende Möglichkeit liegt in der Anwendung wirkstoffbeladener Nanocarrier (Faraji and Wipf, 2009, Freitas, 2005).

1.6 Nanocarrier in der Medizin

Mit seiner Rede „Viel Spielraum nach unten“ legte der Physiker Richard Feynman 1959 den Grundbaustein für die Erforschung und Entwicklung der Nanotechnologie (Freitas, 2005). Robert Freitas veröffentlichte 1999 seinen ersten Literaturband über Nanomedizin und gilt als einer der Vorreiter im Bereich der sogenannten Nanoroboter in der Medizin, welche zur Stärkung der Immunabwehr, für die Nanochirurgie oder zur Beschleunigung der körpereigenen Regeneration zum Einsatz kommen sollen (Freitas, 2005). Vor allem Diagnostik- und Therapiemöglichkeiten gelangen durch die Anwendung von Technologien oder Partikeln in Nanogröße zu völlig neuen Dimensionen und sind heutzutage Gegenstand der Forschung.

1.6.1 Nanozahnmedizin

Unter dem Begriff „Nanodentistry“ („Nanzahnmedizin“) werden Konzepte und Anwendungsmöglichkeiten der Nanotechnologie zusammengefasst (Freitas, 2000, Kavooosi et al., 2018, Sinha et al., 2017). Diese wird besonders in den Bereichen Diagnose, Prävention, Prothetik, Implantologie oder als Medikamententräger zukünftig wichtiger Teil der modernen Zahnmedizin sein (Carrouel et al., 2020, Faraji and Wipf, 2009, Hafner et al., 2014). In der Nanomedizin werden Moleküle in Form von Proteinen, Mizellen, Emulsionen, Liposome, Polymere, Nanokapseln, Dendrimeren oder als Nanopartikel verwendet (Dias et al., 2020, Jain and Thareja, 2019, Kavooosi et al., 2018).



Abbildung 5: Übersicht über verschiedene Modelle von Nanocarriern modifiziert nach Jain und Tareja (Jain and Thareja, 2019). Die in der vorliegenden Arbeit angewendeten Nanocarrier sind in der Unterkategorie „Polymere Nanocarrier- Dendrimere“ zu finden.

Des Weiteren wurden sogenannte „Nanoroboter“ entwickelt, die vor allem in der medizinischen Tumorthherapie und Chirurgie zum Einsatz kommen sollen (Aeran et al., 2015, Freitas, 2005, Freitas, 2006, Kavooosi et al., 2018, Shrestha and Kishen, 2016, Sinha et al., 2017). Allen gemeinsam ist die Größe zwischen 1-100 nm und deren synthetische Herstellung (Freitas, 2005).

Die Kariesprävention kann durch die Anwendung antimikrobieller und remineralisierender Nanopartikeln verbessert werden (Carrouel et al., 2020). Erforscht wird der antimikrobielle Einsatz von Metall- und Metalloxid-Nanopartikeln, welche ebenfalls kariesprotektiv wirken können (Ahmed et al., 2019), die Stärkung der Zahnhartsubstanz durch die Einlagerung von Nanopartikeln mit Hydroxylapatit (Chen et al., 2005) und eine beschleunigte Remineralisation der Zahnhartsubstanz mit Fluoridnanopartikeln bewirken sollen (Nozari et al., 2017). Um den Medikamententransport in das Zielgewebe (Drug-Targeting) zu verbessern, kommen sogenannte „Nanocarrier“ zum Einsatz (Faraji and Wipf, 2009).

1.6.2 Drug-Targeting-Systeme

Als Drug-Targeting bezeichnet man nach Torchilin die Eigenschaft einer Substanz, sich unabhängig der Applikationsart qualitativ und quantitativ im Zielgewebe anzureichern (Torchilin, 2000). Es soll das Aufrechterhalten der Wirkstoffkonzentration und eine Reduktion der Gesamtmenge des angewendeten Wirkstoffes mit gleichzeitig vereinfachter Administration des Medikaments bewirken (Torchilin, 2000). Das Drug-Targeting ist abhängig von den physikalischen Eigenschaften des Trägers (z.B. magnetische Nanopartikel (Hussein-Al-Ali et al., 2014), den chemisch-physikalischen Eigenschaften des Zielgewebes (pH-Wert und Temperatur) und forcierten Wechselwirkungen zwischen Substanz und Wirkungsort (gezielte Ligandenbindung) (Torchilin, 2000). Ebenfalls können Zielort und Freisetzungsmechanismus mittels entsprechender chemischer Synthese der Substanz gesteuert werden. Beispielsweise kann bei einer Entzündungsreaktion pH-Wert und Temperatur für ein Drug-Targeting genutzt werden (Achazi et al., 2020, Desai et al., 2016). Als Vehikel für das Drug-Targeting-System werden Liposome, Mizellen, Makromoleküle (synthetische Polymere) oder deren Kombination genutzt (El-Sayed et al., 2005, Ferraro et al., 2018, Ghosh et al., 2019, Ray et al., 2019, Reimann et al., 2017).

Im Folgenden soll ein Schwerpunkt auf die Beschreibung synthetischer Polymere gelegt werden, da die in dieser Arbeit verwendeten Nanocarrier zu dieser Gruppe gehören (Abb. 5).

Synthetische Polymere besitzen ein Polymergerüst mit unterschiedlichen Domänen, welches aus einem für Löslichkeitserhöhung/Biokompatibilität-verantwortlichen Anteil, dem Bindungsanteil für Medikamente und dem eigentlichen Wirkstoff besteht (Ringsdorf, 1975). Die zu transportierenden Medikamente werden entweder über chemische Verbindungen, wie z.B. Ester, Amide, Imine oder Carbonate oder durch physikalische Interaktionen, wie hydrophobe Wechselwirkungen gebunden (Jain and Thareja, 2019). Das Polymer kann als Schalensystem (Core-Multi-Shell), linear, sternförmig oder baumartig/stark-verzweigt (dendritisch, hyperbranched) gestaltet sein.

1.6.3 Anforderungen an Nanocarrier für den Wirkstofftransport

Das optimale Drug-Targeting-System verbessert durch Adhärenz und Penetration am Gewebe den Wirkstofftransport von lokal angewandten Medikamenten. Dabei wird keine Immunantwort ausgelöst und kein Einfluss auf die Gerinnungskaskade ausgeübt. Des Weiteren sollte das Drug-Targeting-System biokompatibel, (Du et al., 2016, Kumar et al., 2014), bioabbaubar und in geringen Konzentrationen ausreichend wirksam sein (Rade et al., 2018).

Bei der Anwendung in der Zahnmedizin spielt zusätzlich eine hohe Wirksamkeit in kurzer Zeit eine entscheidende Rolle. Denn im Gegensatz zur Anwendung auf der Haut, bei der die lokale Anwendung von Substanzen selbst bei längeren Anwendungszeiten einfach, gut akzeptiert und komfortabel ist (Baroli, 2010), ist die Applikation auf oraler Mukosa vor weitere Herausforderungen gestellt. Nanocarrier welche in der Mundhöhle angewendet werden, müssen Speichel, Sulkusfluid und die physikalische Barriere der Mundschleimhaut überwinden (Jager et al., 2018). Um z.B. dadurch entstehende Verdünnungseffekte des Wirkstoffes zu verhindern, müssen Nanocarrier ausreichend an die Mukosaoberfläche adhären. Dies wurde bereits mit biodegradierbaren Polymeren auf der Basis von Chitosan, Polypropylene, Poly- ϵ -caprolactone und Polyglycerol untersucht (Narang and Narang, 2015, Jager et al., 2018). Zum einen spielt die linear-dendritische Kernarchitektur des Nanocarriers (Abb. 6 und 7) eine Rolle in der Zielbindungsaffinität (Ferraro et al., 2018) und bewirkt dadurch eine verbesserte Adhäsion der Drug-Targeting-Systeme. Zum anderen sind Oberflächeneigenschaften, wie z.B. die Ladung (negative Ladung des dPGS-Nanocarriers) oder pH-Wert verantwortlich für eine Anlagerung an die Oberfläche der oralen Mukosa (Baroli, 2010, Cho et al., 2013, Kumar et al., 2014, Papakostas et al., 2011, Torchilin, 2000). Um eine Aggregation der Nanocarrier bei Adhärenz untereinander zu verhindern und in wässriger Umgebung zu stabilisieren, werden Wirkstofftransporter häufig mit hydrophilen Außenschalen versehen (Du et al., 2016, Ferraro et al., 2018).

Ob allerdings die alleinige Adhäsion auf der Oberfläche eine verbesserte Wirkung des Nanocarriers zur Folge hat, wird kontrovers diskutiert (Bae, 2009, Jager et al., 2018, Kumar et al., 2014). Der genaue Wirkmechanismus, der zum

verbesserten Medikamententransport durch Nanocarrier führt, ist Gegenstand aktueller Forschung (Kumar et al., 2014).

Bei Penetration überwindet der Wirkstofftransporter die natürlichen Barrieren des Körpers und transportiert damit Medikamente in tiefere viable Epithelschichten der oralen Mukosa. Dies ist abhängig von der Größe, Molekulargewicht und Oberflächeneigenschaften des Nanocarriers (Ai et al., 2011, Ferraro et al., 2018, Kumar et al., 2014). Es wurde gezeigt, dass Nanopartikel mit einer Größe von 30 nm in der Lage sind, über die transzelluläre Route in tiefere viable Hautschichten zu penetrieren (Baroli, 2010). Alnasif und Mitarbeiter konnten zeigen, dass durch Dendrimer-basierte Nanocarrier (siehe Abbildung 6 und 7), welche mit Lipiden und Proteinen der Hautoberfläche interagierten, die rigide Struktur des *Stratum corneum* aufgelockert wurde und die Penetration der Nanocarrier in tiefere viable Schichten der Haut gelang (Alnasif et al., 2004).

Unter diesen Gesichtspunkten sollte dendritisches Polyglycerolsulfat und dessen in der Bioabbaubarkeit verbessertes Derivat, das hochverzweigte (hyperbranched) Poly(glycerol-co-caprolacton)-Sulfat untersucht werden. Beide chemische Strukturen entsprechen den Anforderungen an Drug-Targeting-Systeme und sind synthetisch modifizierbar.

1.7 Die angewandten Nanocarrier

1.7.1 Dendritisches Polyglycerolsulfat und hyperbranched Poly(glycerol-co-caprolacton)-Sulfat

Dendritisches Polyglycerolsulfat (dPGS) ist ein negativ geladenes, sulfatiertes Derivat von dendritischem Polyglycerol (dPG); das Nanomaterial ist wasserlöslich und basiert auf Polyether (Calderón et al., 2010, Pant et al., 2017, Weinhart et al., 2011a). dPGS wurde 2004 zuerst als funktionelles Heparin-Analogon aufgrund der moderat gerinnungshemmenden Wirkung entdeckt (Türk et al., 2004). Der chemische Aufbau von dPGS ist teilweise linear und dendritisch (Abb. 6). In der 3D-Struktur zeigt sich ein stark verzweigtes (dendrimeres), polysulfatiertes Polymer (Calderón et al., 2010). Das anti-

inflammatorische Potential von dPGS ohne Wirkstoffbeladung wurde erst später entdeckt (Rade et al., 2018). dPGS ist in der Lage, eine Entzündungsreaktion unter anderem durch die Bindung an P- und L-Selektin zu drosseln (Boreham et al., 2015, Pant et al., 2017, Weinhart et al., 2011b). Selektine sind Zelladhäsionsmoleküle, die z.B. auf Leukozyten und Epithelzellen zu finden sind und für deren Einwanderung in Entzündungsgewebe verantwortlich sind. Dort setzen sie eine Reihe von weiteren Reaktionen einer Kaskade in Gang, welche eine übermäßige Immunantwort auslösen und zu Gewebsdestruktion führen können (Dernedde et al., 2010).

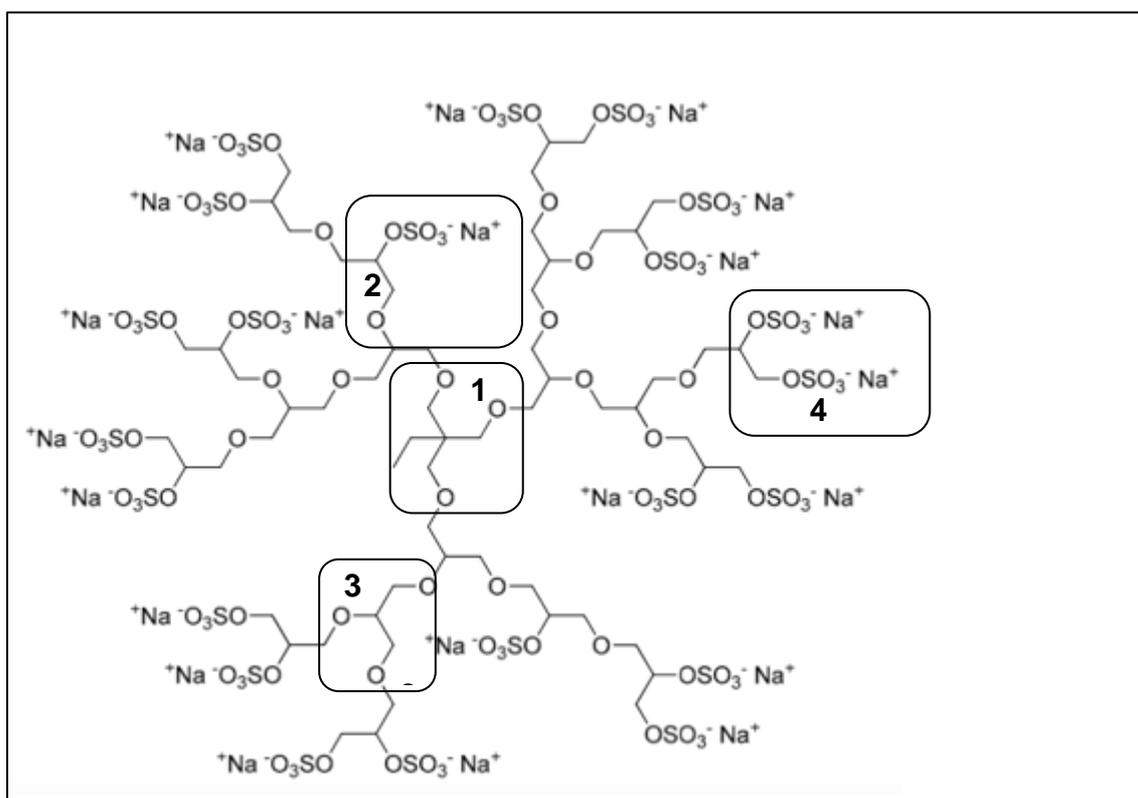


Abbildung 6: Schematischer chemischer Aufbau des dPGS-NC
 Modifiziert nach Rade et al; 1: Kern, 2: linearer Abschnitt, 3: dendritischer Anteil, 4: terminaler, sulfatierter Anteil (Rade et al., 2018)

dPGS war metabolisch sehr stabil und konnte bis zu 30 Tagen nach dessen Gabe im Körper nachgewiesen werden. Dabei akkumulierte es in Niere, Leber und Milz (Pant et al., 2015, Pant et al., 2017). Um die Bioabbaubarkeit zu verbessern, wurde 2018 von Ferraro und Mitarbeitern ein Derivat synthetisiert,

das Oligocaprolacton-Ketten im verzweigten Gerüst (h(PG-co-PCL)S) (Abb. 7) trägt, welche durch endogene Esterasen spaltbar sind. Das anti-inflammatorische Potential des Derivats ist vergleichbar mit dem des dPGS (Ferraro et al., 2018).

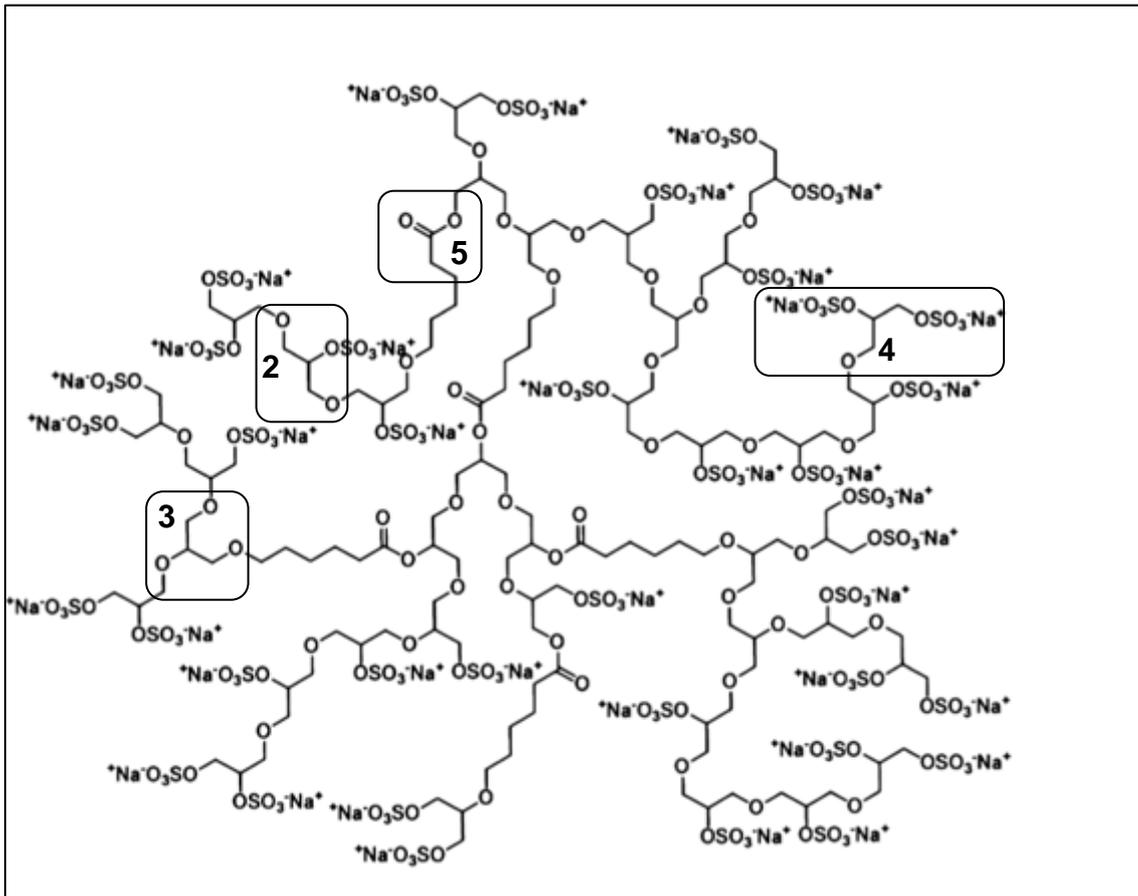


Abbildung 7: Schematischer chemischer Aufbau des h(PG-co-PCL)S-NC
 Modifiziert nach Ferraro et al; 2: linearer Abschnitt, 3: dendritischer Anteil, 4: terminaler, sulfatierter Anteil, 5: Esteranteil (Ferraro et al., 2018)

Eine Anwendung der Nanocarrier dPGS sowie dessen Derivat h(PG-co-PCL)S ist aus folgenden Gründen zur Anwendung auf der oralen Mukosa denkbar:

- Einfache chemische Synthetisierbarkeit ohne Verwendung von Fremdorganismen (Calderón et al., 2010, Ferraro et al., 2018, Reimann et al., 2017)
- Bereits durchgeführte *in vivo*-Versuche zeigten eine gute Biokompatibilität von dPGS (Dernedde et al., 2010).

- Eine Penetration der dPGS-NC in die Haut, die der Schleimhaut strukturell ähnlich ist, wurde bereits nachgewiesen (Küchler et al., 2009).
- Fähigkeit des Nanocarriers dPGS sich in entzündlich verändertem Gewebe anzureichern und dessen anti-inflammatorischen Potentials (Dernedde et al., 2010).

Zum jetzigen Zeitpunkt sind noch keine Daten zu den biologischen Wirkungsweisen von dPGS-Nanocarriern auf oraler Schleimhaut bekannt.

1.7.2 Interaktion der Nanocarrier mit Epithelzellen

Epithelzellen bilden die Epithelschicht als Schutzbarriere auf Oberflächenstrukturen des Körpers und schützen vor dem Eindringen von Fremdstoffen (Groeger and Meyle, 2015, Stolte et al., 2020). Als primäre Immunantwort auf das Eindringen von Fremdstoffen sind gingivale Epithelzellen in der Lage, proinflammatorische Zytokine, wie IL-1 β und IL-6 zu sezernieren (Eskan et al., 2008, Groeger and Meyle, 2015, Irwin and Myrillas, 1998, Stolte et al., 2020).

IL-1 β führt zu einer gesteigerten Produktion von Chemokinen, welche die Chemotaxis von Leukozyten begünstigt (Eskan et al., 2008). Des Weiteren bewirkt dessen Sekretion eine erhöhte Anzahl an Adhäsionsmolekülen im Endothel, wodurch die Chemotaxis in entzündetes Gewebe erleichtert wird (Yang et al., 2003). Das Zytokin IL-1 β spielt eine zentrale Rolle in der Regulation anderer Zytokine der angeborenen Immunantwort (Groeger and Meyle, 2015). IL-6 aktiviert das unspezifische Immunsystem durch die Produktion von Immunglobulinen und sogenannten Akute-Phase-Proteinen (Groeger and Meyle, 2015). Es wird hauptsächlich von Makrophagen und T-Zellen ausgeschüttet und liegt in der Zelle im nicht-entzündeten Zustand in Vesikeln verpackt vor (Irwin and Myrillas, 1998).

Aufgrund der geringen Größe von 1-100 nm ist es möglich, dass Nanocarrier körpereigene Schutzbarrieren überwinden und potentiell eine Immunantwort auslösen können. In vorangegangenen Arbeiten wurde dies mit der Feinstaubbelastung verglichen, die zu einer verstärkten Expression von Zytokinen führt, wenn diese in den Körper gelangen (Faraji and Wipf, 2009,

Roberts et al., 2008, Seaton et al., 1995). Eine gute Biokompatibilität zeichnet sich durch eine geringe/keine inflammatorische Antwort und damit mit einer nicht-regulierten Zytokinexpression der Epithelzellen, aus (Cho et al., 2013, Ferraro et al., 2018, Sousa-Herves et al., 2015).

Darüber wird eine unzulängliche Biokompatibilität und eine mögliche Zytotoxizität von Drug-Targeting-Systemen durch eine Hemmung der mitochondrialen Aktivität sichtbar (Kumar et al., 2018).

1.7.3 Risiken und Nebenwirkungen der Nanotechnologie

Trotz der vielfältigen Möglichkeiten von Nanocarriern birgt diese Technologie Risiken und Probleme, die genau untersucht werden müssen. Das große Oberflächen-/Volumen-Verhältnis führt dazu, dass Nanopartikel sehr reaktiv sind und Schutzbarrieren im Körper leicht überwinden können (Aeran et al., 2015, Roblegg et al., 2012). Eine Akkumulation und Aggregation von Nanopartikeln in bestimmten Organen, wie Niere oder Leber, die zur Gewebetoxizität bis hin zum Organversagen führen können, sind denkbar und können zum jetzigen Wissenstand nicht ausgeschlossen werden (Ferraro et al., 2018, Subramani and Ahmed, 2018). Des Weiteren ist noch nicht ausreichend bekannt, ob Interaktionen zwischen Nanocarrier und DNA/RNA auftreten und zu Mutationen führen (Sinha et al., 2017). Unbekannt ist auch, ob die Veränderung physiologischer Gegebenheiten die Eigenschaften der Nanopartikel, wie z.B. spontane Akkumulation oder Agglomeration der Partikel, beeinflusst (Ghosh et al., 2019). Hinzu kommt die bisher noch nicht ausreichende Biokompatibilität der Nanocarrier und die Frage nach einer potenziellen Immunantwort auf die Applikation von Nanopartikeln (Faraji and Wipf, 2009).

Eine Akzeptanz der Gesellschaft ist nur zu erreichen, wenn Risiken und Nebenwirkungen ausreichend erforscht und damit umfassende Sicherheit im Einsatz der Nanotechnologie gewährleistet werden kann (Ai et al., 2011). Diese Risiken und Nebenwirkungen müssen mit geeigneten wissenschaftlichen Methoden *in vitro* und *in vivo* untersucht werden. In der vorliegenden Arbeit steht die grundlagenwissenschaftliche Fragestellung im Vordergrund, welche

das Risiko- und Wirkungspotential der Nanocarrier dPGS und h(PG-co-PCL)S weiter eruieren soll.

1.8 Fragestellung und Hypothesen

Vor dem Hintergrund der erstmaligen Beschreibung des dPGS- und h(PG-co-PCL)S- Nanocarriers auf oraler Mukosa wurden folgende Hypothesen formuliert:

Arbeitshypothese:

Die dPGS- und h(PG-co-PCL)S-Nanocarrier zeigen eine Penetration in oraler Schleimhaut und es gibt diesbezüglich einen Unterschied in auskleidender und mastikatorischer Mukosa.

Zusätzlich wurde folgende Sekundärhypothese formuliert:

Die Nanocarrier-vermittelte topische Anwendung auf oraler Mukosa ist möglich und dPGS-, sowie h(PG-co-PCL)S-Nanocarrier beeinflussen weder die metabolische Aktivität noch provozieren diese eine Regulation der mRNA-Zytokinexpression von IL-1 β und IL-6 an oralen Epithelzellen.

Zur Überprüfung der Hypothesen wurden folgende Fragen explorativ ausgewertet:

Fragestellungen zur vorliegenden Arbeit:

1. Penetrieren die Nanocarrier dPGS und h(PG-co-PCL)S die Epithelzellschicht der oralen Mukosa?
2. Gibt es Unterschiede bezüglich der Penetrationstiefe von dPGS- und h(PG-co-PCL)S-Nanocarriern zwischen bukkaler und mastikatorischer Mukosa?
3. Sind 30 s Applikationszeit von dPGS- und h(PG-co-PCL)S-Nanocarriern ausreichend für eine Penetration in viable Epithelzellschichten der oralen Mukosa?

4. Wird durch die Nanocarrier dPGS und h(PG-co-PCL)S eine Regulation der Zytokinexpression von IL-1 β und IL-6 in gingivalen Epithelzellen hervorgerufen?
5. Beeinflussen die Nanocarrier dPGS und h(PG-co-PCL)S die metabolische Aktivität von gingivalen Epithelzellen?

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Instrumente und Geräte

Geräte	Hersteller
Absaugsystem Vacusafe & Vacuboy	Integra Biosciences, CH
Absorbance Microplate Reader Sunrise TM	Tecan, CH
Akkubetriebene Pipettierhilfe	Brand, D
AxioCam b/w 412-311	Carl Zeiss, D
BioPhotometer Typ 6131 04825	Eppendorf, D
Brutschrank	Heraeus Instruments, D
Chirurgische Pinzette	Henry Schein, USA
CO2-Inkubator CB220	Binder, D
Einmalskalpell	Henry Schein, USA
Flockeneisbereiter AF-10 ASB 0600	Scotsman, I
Fluoreszenzkontrollgerät, Colibri Controller	Carl Zeiss, D
Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200	Carl Zeiss, D
Gelelektrophoresekammer (SDS-PAGE)	Bio-Rad Laboratories, USA
Konfokales Laser-Scanning-Mikroskop LSM700	Carl Zeiss, D
MAT	
Lichtmikroskop Diavert	Leica, D
Lichtmikroskop Nikon TMS-F	Nikon, D
Micro-Zentrifuge Tomy Capsulefuge PMC-060	Tomy Kogyo, J
Microm HM 560 Cryostat	Thermo Fisher Scientific, USA
Mikrobiologische Sicherheitswerkbank	Esco Lifesciences, D
Airstream® Class II Biological Safety Cabinet AC2-4E1	
Mikrodrop Spektrophotometer	Thermo Fisher Scientific, USA
PCR Cycler	Biometra, D
Photometer-Drucker Thermal Printer DPU-414	Selko Solutions, J

Präzisionswaage Adventurer® Analytical AR2140	Ohaus, USA
Rotationsschüttler Stuart Gyro-Rocker SSL3	Cole-Parmer, D
Rotationsschüttler Typ 3005	GFL, D
Schlittenmikrotom Typ 1208	Leitz, D
Schüttelinkubator Stuart SI 50	Cole-Parmer, D
Schwingmühle	Retsch, D
Sterilbank	Thermo Fisher Scientific, USA
Stromquelle für die Elektrophorese	Biometra, D
Thermomixer 5436	Eppendorf, D
Tischzentrifuge	Thermo Fisher Scientific, USA
Tube-Rotator	Hartenstein, D
UV-Transilluminator	Vilber Lourmat, F
VersaDoc™ Imaging System 4000 MP	Bio-Rad Laboratories, USA
Vortex-Mixer Vortex-Genie®2	Scientific Industries, USA
Waage CHYO MK-2000B Petite Balance	YMC, J
Wasserbad	Köttermann
Zahnärztliche Pinzette	Henry Schein, USA
Zahnärztliche Schere	Henry Schein, USA
Zentrifuge 1K15	Sigma-Aldrich, USA
Zentrifuge Megafuge® 1.0	Thermo Fisher Scientific, USA

2.1.2 Zellkultur

2.1.2.1 Zelllinie

Keratinocyten	
OKG4 (hTERT)	
Immortalisierte humane orale Keratinocyten der Gingiva	AG Rheinwald, Boston, Massachusetts, USA (Dickson et al., 2000, Lindberg and Rheinwald, 1990)

2.1.2.2 Zellkulturlösungen, Medien, Zusätze, Puffer

Lösungen, Medien, Zusätze	Hersteller
Amphotericin B, 250 µg/ml	Biochrom, D
BSA, bovines Serumalbumin	PAN-Biothech, D
Kollagen A	Biochrom, D
Kollagen IV	Sigma-Aldrich, USA
Kollagenase Typ I DermaLife K	Biochrom, D
DermaLife K	Life Line Cell Technology, USA
Dispase II	Sigma-Aldrich, USA
Fluoromount TM Aqueous Mounting Medium	Sigma-Aldrich, USA
Nutragen® Type I Bovine Collagen Solution	Advanced BioMatrix, USA
Penicillin-Streptomycin (10,000 U/ml; 10 mg/ml)	PAN-Biotech, D
Stabiles Glutamin (L-Analyt-L-Glutamin)	PAN-Biotech, D
Ziegenserum	PAN-Biotech, D

Derma Life Medium High Calcium:

330 ml Derma Life

1 % AB

825 µl Calciumchlorid 2-hydrat: $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$; M = 142,02 g/mol

Puffer:

10x PBS

164 g NaCl

31,2 g Na_2HPO_4

2 g Na_2HPO_4

2 l Aq. dest.

pH 7,8

1x TBS

150 mM NaCl

7,7 mM Tris

in Aq. dest.

pH 7,5

50x TAE-Puffer:

242 g Tris

57 ml Essigsäure

100 ml 0,5 M EDTA (pH 8)

ad 1 l H_2O

pH-Wert 8.3

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Deckgläser ECN 631-1570	VWR International, USA
DURAN® Bechergläser und Laborgewindeflaschen	Sarstedt, D
Einmal-Küvetten	
Einweg-Pasteurpipette aus Glas	Carl Roth, D
Einwegklingen #819	Leica Biosystems, D
Falcon® 6-Well, 12-Well Clear Flat Bottom TC-treated Multiwell Cell Culture Plate	Corning, USA
Falcon® 70 µm Cell Strainer	Corning, USA
Falcon® 96-Well Clear Flat Bottom TC-treated Culture Microplate	Corning, USA
Falcon® Cell Culture Dishes 100x20 mm; 60x15 mm	Corning, USA
Falcon® Conical Tubes 15 ml, 50 ml	Corning, USA
Falcon® Tissue Culture Treated Flasks, 75 cm ² ; 25 cm ² ; 12,5 cm ²	Corning, USA
Fluoromount™ Einbettmedium	Sigma-Aldrich, USA
Immersionsöl	Carl Roth, D
ImmunoPen™	Merck, D
Inkubationscontainer Nunc™ 167063 Nunclon™ 4-Well	Thermo Fischer, USA
KIMTECH® Science Präzisionstücher	Kimberly-Clark, USA
Kunststoffröhrchen 0,6 mm Durchmesser	Thermo Fischer, USA
Laborpipetten	Eppendorf, D
Menzel-Gläser Deckgläser, 20x26	Menzel, D
Parafilm "M" Laboratory Film	Pechiney Plastic Packaging, USA
PCR Reaktionsgefäße (ml)	Sarstedt, D
Peel-A-Way™ embedding molds S-22	Sigma-Aldrich, USA
Pipettenspitzen Biosphere® Filter Tips 2,5 µl, 10 µl, 100 µl, 300 µl, 1000 µl	Sarstedt, D

Pipettenspitzen epT.I.P.S [®] , 5 ml	Eppendorf, D
Pipettenspitzen mit Filter	Biosphere Plus
Reaktionsgefäße (1.5 ml; 2 ml)	Eppendorf, D
Röhre 5 ml, 57x15,3 mm	Sarstedt, D
Rotilabo [®] -Spritzenfilter 0,45 µm	Carl Roth, D
Safe-Lock Tubes 1,5 ml, 2,0 ml	Eppendorf, D
SafeSeal Gefäß 0,5 ml	Sarstedt, D
Serologische Pipettenspitzen	Sarstedt, D
Skalpellsgriff RS Figur 3	Henry Schein, USA
Skalpellsklingen #11	Schreiber, D
Sterican [®] Kanüle ø 0,90 x 40 mm; ø 0,80 x 40 mm,	B. Braun Melsungen, D
SuperFrost Ultra Plus	Thermo Fischer, USA
Tissue Freezing Medium	Leica Biosystems, D
Tissue-Tek [®] Mega-Cassette [®] Einbettkassetten	Sakura Fineteek, NL
Tissue-Tek [®] O.C.T. [™] Compound	Sakura Fineteek, NL
TM Adhäsions-Objektträger	Thermo Fischer Scientific, USA
Zellkulturflaschen	Falcon, DK
Zellkulturplatten	TPP, CH
Zellschaber, 16 cm 2-Pos.-Klinge	Sarstedt,D.
96-Well Clear Flat Bottom Polystyrene High Bind Microplate	Corning, USA

2.1.4 Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
Agarose	SERVA Electrophoresis, D
AgNO ₃	Carbolution Chemicals
Ampicillin	Gibco by life technologies
Bovines Serum Albumin BSA	Sigma-Aldrich, USA
DEPC Wasser	Ambion
DNase I recombinant	Roche
Ethidiumbromid (EtBr)	Carl Roth, D
Ethanol	Merck, D
Ethanol ≥ 99,5 %; ≥ 96 %, vergällt	Carl Roth, D
GeneRuler 1 kb DNA Marker	Thermo Fisher Scientific, USA
GlycoBlue	Thermo Fisher Scientific, USA
Isopropanol	Sigma Aldrich, USA
Kaliumchlorid, ≥ 99,5 % Magnesiumchlorid- Hexahydrat	Carl Roth, D
Methanol	KMF, D
Milli-Q® hochreines Wasser	Merck, D
O'Range Ruler 50 bp	Thermo Fisher Scientific, USA
PBS	Biochrom, D
Penicillin/Streptomycin	Biochrom, D
RNase Out	Thermo Fisher Scientific, USA
Saponin	Sigma Aldrich, USA
Tissue Freezing Medium	Leica, D
Triton™ X-100	Sigma Aldrich, USA
Trypan-Blau-Lösung, 0,4 %	Sigma-Aldrich, USA

Trypsin EDTA 1X, 0,25 % Trypsin, 2,21 mM EDTA	Corning, USA
Trypsin/EDTA	Biochrom, D
Tween® 20	Sigma-Aldrich, USA
Ultra Pure Water	Biochrom, D
β-Mercaptoethanol	Carl Roth, D
6x LD Puffer	Thermo Fisher Scientific, USA

2.1.5 Verwendete Antikörper

Primärantikörper	Hersteller	
<u>Antikörper</u>	<u>Wirt</u>	
Zytokeratin Pan Type I/II (MA5-13156)	Mouse	Thermo Fisher, USA

Sekundärantikörper	Hersteller	
<u>Antikörper/Fluoreszenzfarbstoff</u>		
Goat anti-Mouse IgG, Alexa Fluor® 488		Thermo Fisher, USA
1:4000		
HO Hoest 1:3000		

2.1.6 Primer für die quantitative Real-Time PCR

Das Design der qRT-Primer erfolgte mit Hilfe der Primer3-Software (Version 2.4.0.; California, USA) (Untergasser et al., 2012). Hierfür wurden die cDNA-Sequenzen der Gene von „Ensemble Genome Browser“ (Hinxton, United Kingdom) bezogen und anschließend in das Primer3 Programm geladen. Die qRT-Primer wurden so gewählt, dass diese eine Produktgröße von 70-120 bp, sowie eine Annealing-Temperatur von 60 °C erzielten. Falls möglich wurden die Primer so designt, dass diese entweder Exon-übergreifend waren oder so, dass die Forward- und Reverse-Primer in unterschiedlichen Exons liegen. Die Primer (siehe unten) wurden anschließend mit der Blast-Funktion im UCSC Genome Browser (siehe <https://www.genome.ucsc.edu/>) validiert, um sicher zu gehen,

dass diese nicht mehrfach im menschlichen Genom binden. Anschließend wurden die Primer bei der Firma metabion (München, D) bestellt.

Die verwendeten Oligonukleotide (Sequenz 5'→3') waren:

Oligonukleotid	Forward	Reverse
GAPDH	CAAATTCCATGGCACCGTCA	CCTGCAAATGAGCCCCAG
IL-1 β	GAGCAACAAGTGGTGTCTCC	AACACGCAGGACAGGTACAG
IL-6	ACAACCTGAACCTTCCAAAGA	GTTGGGTCAGGGGTGGTTAT

2.1.7 Kits

Kits	Hersteller
High-capacity cDNA Reverse Transcription-Kit	Thermo-Fisher, USA
MaxBlock™ Autofluorescence Reducing Reagent-Kit	Dianova, D
RNeasy Mini-Kit	Qiagen, DK

2.1.8 Verwendete Nanocarrier

Carrier-System	Sample-Nummer	Hersteller	Ausgangskonzentration	Arbeitskonzentration
dPGS	#SRD-185	freundlicherweise	c = 10	5 μ g /ml,
dPGS-RB	#SRD-202/234	überlassen von der AG Haag, Freie Universität Berlin	mg/mL	25 μ g /ml, 50 μ g /ml
h(PG-co-PCL)S	#mf0044	freundlicherweise	c = 5 mg/mL	5 μ g /ml,
h(PG-co-PCL)S-RB	#mf0069	überlassen von der AG Haag, Freie Universität Berlin		25 μ g /ml, 50 μ g /ml

Die Nanocarrier dPGS und h(PG-co-PCL)S

Die chemische Synthese der Nanocarrier erfolgte in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Rainer Haag (Institut für Chemie und Biochemie – Organische Chemie, Freie Universität Berlin, Takusstraße 3, 14195 Berlin).

Beide Nanocarrier lagen gelöst in „Apothekerwasser“ (Ampuwa®) vor und wurden bei -4 °C gelagert. Für die Untersuchung der Penetrationseigenschaften der Nanocarrier mit Hilfe des konfokalen Laser-Scanning (CLSM)- Mikroskops, wurden jeweils Derivate, an die der Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin-B gekoppelt war, verwendet. Diese lagen ebenfalls in „Apothekerwasser“ (Ampuwa®) gelöst vor und wurden lichtgeschützt bei -4 °C gelagert.

Der dPGS-NC (c = 10 mg/ml) hatte ein mittleres Molekulargewicht (Mn) von Mn = 13,300 g/mol, dessen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin-B gelabeltes Derivat lag bei Mn = 12,200 g/mol. Der h(PG-co-PCL)SNC (c = 5 mg/ml) hatte ein mittleres Molekulargewicht von Mn = 37,400 g/mol und das gelabelte Derivat lag bei Mn = 38,000 g/mol.

2.1.9 Angewandte Software-Programme

Softwares	Hersteller
GraphPad PRISM Version 8	GraphPad, USA
ImageJ 1.52a (siehe https://imagej.nih.gov/ij/)	Wayne Rasband, USA
Microsoft® Office 365	Microsoft, USA
Pages Version 10.3.5	Apple Inc, USA
ZEN-black edition Version 14.0.0.0	Carl Zeiss, D
ZEN-blue edition Version 2.3	Carl Zeiss, D

2.2 Angewandte Methoden

Die Nanocarrier dPGS und h(PG-co-PCL)S wurden bezüglich der Penetrationseigenschaften, das Hervorrufen einer potentiellen Immunantwort und der Beeinflussung der Zellviabilität mit *ex vivo*- und *in vitro*- Versuchen evaluiert. Die experimentellen Versuche fanden von Juni 2017 bis August 2019 im Labor des CharitéCentrum3 für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde (Abteilung

für Parodontologie, Oralmedizin und Oralchirurgie, Direktor Univ.- Prof. Dr. med. dent. Henrik Dommisch, Aßmannshäuser Straße 4-6, 14197 Berlin), sowie im Labor des Instituts für Biochemie (Arbeitsgruppenleiterin Zelladhäsionsvermittelte Signaltransduktion PD Dr. rer. nat. Kerstin Danker, Charitéplatz 1, 10117 Berlin) statt.

2.2.1 Versuchsaufbau zur Untersuchung der Penetration

2.2.1.1 Beschreibung des *ex vivo*-Schleimhautmodells

Die für das *ex vivo*-Modell verwendeten Tiere waren Schweine, welche für die spezielle fachärztliche Ausbildung im hierfür ausgerichteten medizinischen Kompetenzzentrum „Medizin im Grünen“ (Medizinisches Kompetenzzentrum, c/o HCx Consulting GmbH, Ulmenstraße 12, 15864 Wendisch Rietz unter der Leitung von Prof. Dr. rer. nat. Heiko Ziervogel) zur Verfügung standen. Nach Abschluss der operationstechnischen Übungen wurden die Tiere euthanisiert. Direkt danach wurde auskleidende Schleimhaut aus der Wangen- und beweglichen Gingivaregion und mastikatorische Schleimhaut aus der Gaumen- und unbeweglichen Gingivaregion isoliert. Hierbei wurde darauf geachtet, dass die entnommenen Proben frei von dem darunterliegenden Fett- und Muskelgewebe waren. Die Mukosa wurde bei Raumtemperatur entnommen und in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) bei -20 °C gelagert.

Die Nummerierung der Spender (S) bezog sich auf die Reihenfolge der Entnahme der Gewebe. Von S5 konnte nicht ausreichend Mundschleimhaut gewonnen werden, weshalb für die Versuche mit dem h(PG-co-PCL)S-NC ebenfalls Gewebe von S1 verwendet wurde.

2.2.1.2 Bestimmung des Penetrationsverhaltens

Der Franz-Zell-Diffusions-Assay ist ein international anerkanntes Modell, um Freisetzungsrates, Penetration und Speicherrates eines Medikaments an der Haut zu untersuchen (Roblegg et al., 2012). Die Franz-Zelle besteht aus zwei Kammern, welche durch die zu untersuchende Haut voneinander getrennt sind. In die obere Kammer wird das zu untersuchende Medikament eingegeben und

in der unteren Kammer befindet sich phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) mit einer Temperatur von 32 °C. Die obere Kammer wird wie ein Stempel auf die Haut gespannt, um eine genau begrenzte Fläche auf die oben genannten Aspekte des Medikaments hin zu untersuchen (Cerqueira-Coutinho et al., 2015). In Anlehnung an den für Penetrationsstudien üblicherweise eingesetzten Franz-Zell-Assay (Jager et al., 2018) wurde ein Modell etabliert (Abb. 8) mit dem auf einer verkleinerten Schleimhautfläche von 0,6 mm die Penetrationseigenschaften nach kurzen Inkubationszeiten der Nanocarrier untersucht werden konnten. Im selbst entwickelten Modell wurde die Mukosa direkt auf vorgewärmtes PBS (32 °C) gelegt und mithilfe eines Kunststoffröhrchens die zur Applikation verwendete Fläche begrenzt. Nach Beendigung der Penetrationszeit wurde der nicht-adhärente und penetrierte Nanocarrier mit einem fusselfreien Tuch entfernt, um die Penetration zu stoppen. Ein ständiges Umspülen der Spenderhaut war aufgrund der sehr kurzen Behandlungszeiten nicht erforderlich (Abb. 8).

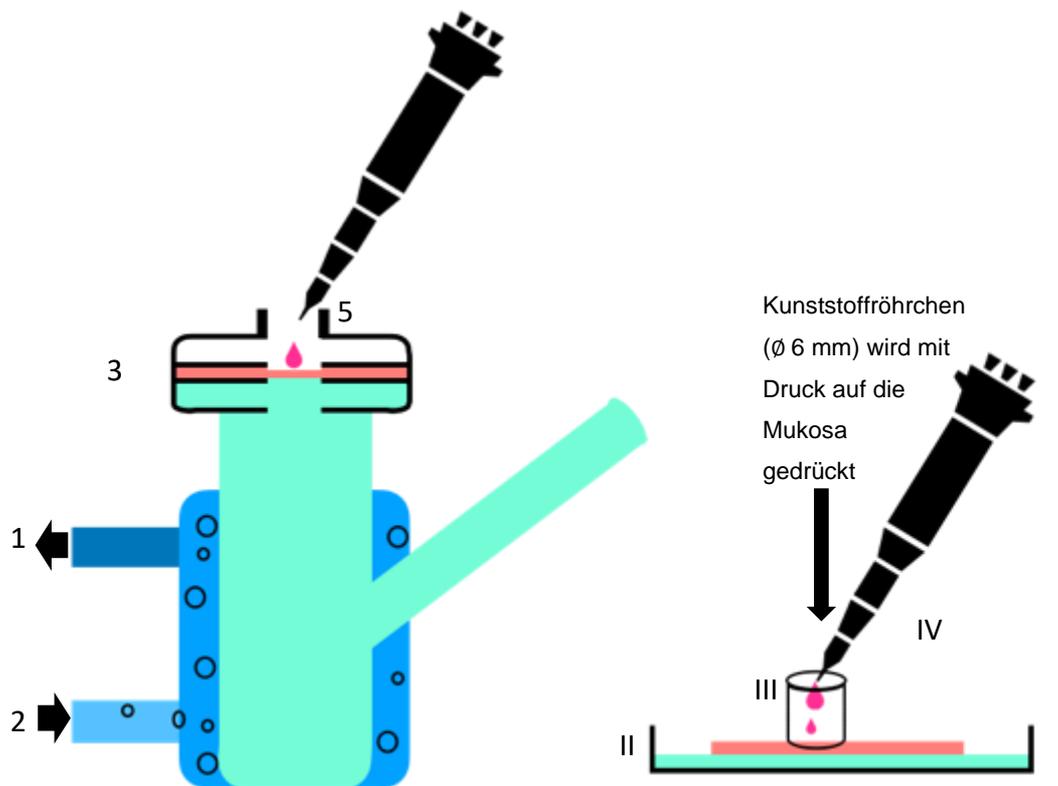


Abbildung 8: Methoden zur Bestimmung des Penetrationsverhaltens von Carrier-Systemen
Klassische Franz-Zelle (links) und das im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Modell (rechts),
modifiziert nach (Roblegg et al., 2012)

1 Wasserausgang 37 °C

2 Wasserzufuhr 37 °C

3 Spenderkammer mit Membran/Haut

4 Rezeptorflüssigkeit PBS

5 Aufgabe der Substanz auf einen

Durchmesser von 6 mm

6 Probeentnahmeröhrchen

I Spenderkammer (Petrischale) mit Mukosa

II Rezeptorflüssigkeit PBS

III Kunststoffröhrchen (Ø 6 mm)

IV Aufgabe der Substanz

2.2.1.3 Durchführung des Penetrationsversuchs

Die dPGS- und h(PG-co-PCL)S-NC waren für die Visualisierung der Penetration mit dem Farbstoff Rhodamin-B gelabelt. Die aufgetaute Schleimhaut wurde in eine Petrischale mit vorgewärmtem PBS (37 °C) gelegt, um physiologische Bedingungen zu imitieren. Ähnlich dem Franz-Zell-Assay wurde die zu untersuchende Fläche mit einem Stempel in Form eines dünnen

Kunststoffröhrchens auf die Schleimhaut gedrückt und für 30 s, 1 min und 5 min mit 2 µl des jeweiligen farbstoffgekoppelten Nanocarriers (dPGS; c = 10 mg/ml und h(PG-co-PCL)S; c = 5 mg/ml) inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurde der Nanocarrier mit einem fusselreien Tuch abgetupft und die Schleimhaut mit PBS gespült, um die Penetration des Nanocarriers zu stoppen. Die mit dem Nanocarrier inkubierte porcine Mukosa wurde anschließend in einer Peel-A-Way™-Form mit Tissue Freezing-Medium (Leica, D.) in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Dadurch wurde das Gewebe innerhalb kürzester Zeit auf tiefe Temperaturen (-80 °C) abgekühlt, um Gefrierartefakte zu vermeiden. Die Untersuchung der Penetrationseigenschaften wurde jeweils an drei biologischen Replikaten durchgeführt. Kontrollgruppe war die Penetration der Mukosa mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) für 5 min. Die Lagerung erfolgte abgedunkelt bei -80 °C.

2.2.1.4 Immunfluoreszenz-Analyse

Von den kryokonservierten Geweben wurden mithilfe eines Gefriermikrotoms Kryoschnitte hergestellt. Die Herstellung der Kryoschnitte und die Färbung der Objektträger (OT) fand im Labor des Instituts für Biochemie statt. Der Transport der Proben erfolgte auf Trockeneis bei -78 °C.

Die Schnitte wurden mit einer Dicke von 7 µm angefertigt (Jager et al., 2018). Je Spender, Penetrationszeit und Schleimhautqualität (auskleidend/mastikatorisch) wurden auf mindestens vier OT jeweils vier Gewebeschnitte aufgezogen, um die Penetrationsfläche umfassend abzubilden. Alle anschließenden Arbeitsschritte erfolgten, soweit möglich, abgedunkelt. Um die Penetration der NC mittels konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop analysieren zu können, wurden die Schleimhäute zunächst auf dem OT mit 4 % PFA und 0,02 % Saponin in PBS für 30 min bei 4 °C in der Dunkelkammer fixiert, danach 1 min mit PBS gewaschen und bei -20 °C gelagert (Jager et al., 2018). In einem nächsten Schritt erfolgten drei Waschungen mit PBS für 3 min jeweils bei Raumtemperatur in einer Küvette auf der Wippe. Um die in Geweben oftmals auftretende Autofluoreszenz zu reduzieren, wurde das MaxBlock Autofluorescence Reducing-Verfahren eingesetzt. Hierfür wurde die

überschüssige Flüssigkeit vorsichtig mit einem Tuch entfernt und die zu färbende Fläche mit einem ImmunoPen begrenzt. In einem ersten Schritt wurde Reagenz A (Autofluorescence Reducing Reagent) aus dem Kit aufgetragen und für 5 min inkubiert. Im nächsten Schritt wurden die Gewebeschnitte für 1 min vorsichtig mit 60 % Ethanol gewaschen und anschließend mit destilliertem Wasser (A. dest) abgespült. Es folgten zwei Waschschrte mit PBS und 0,5 % Tween-20 für jeweils 3 min. Das nachfolgende Permeabilisieren erfolgte mit 0,1 % Triton-X 100 in TBS für 10 min. Daraufhin wurden die OT wieder kurz mit TBS gespült und dreimalig für 5 min mit PBS/0,5 % Tween-20 gewaschen. Im nächsten Schritt folgte die Blockierung der Gewebe mit 3 %-BSA in PBS für 1,5 h in einer feuchten Dunkelkammer bei Raumtemperatur. Im nächsten Schritt wurde der murine primäre Antikörper Zytokeratin Pan (1:1000 in 3 % BSA in PBS), zur späteren Visualisierung des Epithels, für 12 h bei 4 °C in einer Dunkelkammer aufgegeben. Danach erfolgten drei Waschungen für jeweils 5 min mit PBS/0,05 % Tween-20 bei Raumtemperatur auf einer Wippe. Die OT wurden anschließend für 1,5 h bei Raumtemperatur mit dem Sekundärantikörper Goat anti-Mouse IgG (GAM 488, 1:4000 in PBS 0,1 % Tween-20, Alexa Fluor®) und Hoechst (H0, 1:3000 in PBS 0,1 % Tween-20) bei Raumtemperatur in einer feuchten Dunkelkammer inkubiert. Der anschließende Waschschrte erfolgte dreimalig für 5 min mit PBS / 0,05 % Tween-20. Im Anschluss wurde das MaxBlock Autofluorescence Reducing-Verfahren weitergeführt und die OT für 5 min in A.dest gewaschen. Nach vorsichtigem Trocknen der OT mit einem Tuch wurde Reagenz B (Post-Detection Conditioner) aufgetragen und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Abschließend wurden die OT dreimalig für jeweils 2 min mit A. dest. gewaschen. Die im Anschluss getrockneten OT wurden mit Fluoromount™Aqueous Mounting-Medium eingedeckelt und über Nacht getrocknet.

2.2.1.5 Analyse mit dem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop

Mithilfe eines konfokalen Laser-Scanning Mikroskop LSM 700 MAT (CLSM), welches freundlicherweise von der Zahnklinik der Charité - Universitätsmedizin

Berlin unter Leitung von Univ.-Prof. Dr. Sebastian Paris zur Verfügung gestellt wurde, konnten die Penetrationseigenschaften der Nanocarrier analysiert werden. Das CLSM ermöglicht das Durchscannen feiner Gewebsschichten, in welchen die Fluorochrome unterschiedlich intensiv angeregt werden. In der Schicht, in der die höchste Einfärbung mit Rhodamin-B zu sehen war, wurden hochauflösende Bilder in 20-facher Vergrößerung erstellt. Mit der Software ZEN-black wurden die Aufnahmen gespeichert. Zur Weiterbearbeitung wurden die Programme ZEN-blue und ImageJ verwendet. Um die verschiedenen Aufnahmen miteinander vergleichen zu können, wurden gleiche Belichtungszeiten gewählt und die Aufnahmen im Folgenden identisch bearbeitet.

2.2.1.6 Auswertung der Daten

Für die Auswertung des *ex vivo*-Penetrationsversuchs diente das Bildbearbeitungs- und Bildverarbeitungsprogramm ImageJ. Es wurde jeweils die durchschnittliche Fluoreszenz-Intensität (MFI) in den einzelnen Strati je Mukosaqualität (auskleidend/mastikatorisch) gemessen. Je Spender und Zeitpunkt wurden bis zu sechs Auswertungen analysiert. Die MFI entspricht in den nachfolgenden Graphen dem relativen Grauwertlevel und gibt den Mittelwert der Pixel pro gemessene Fläche an. Von der MFI wurde jeweils die Hintergrundfluoreszenz subtrahiert.

2.2.2 Zellinkubation mit den Nanocarriern dPGS und h(PG-co-PCL)S

Um eine potenzielle Immunantwort unter Einwirkung der Nanocarrier im Sinne einer Irritation auszuschließen, wurden immortalisierte humane orale Keratinozyten der Gingiva (OKG4) (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Susan Gibbs, Amsterdam University Medical Center, Niederlande) mit den Nanocarriern dPGS und h(PG-co-PCL)S inkubiert. Anschließend wurde der Einfluss der Nanocarrier auf die Expression pro-inflammatorischer Zytokine mit Hilfe der qRT-PCR (quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion) erfasst (Bustin and Mueller, 2005, Cho et al., 2013). Die hierfür verwendeten Kits

waren das RNeasy-Mini-Kit (Qiagen, DK) und das High-capacity cDNA Reverse Transcription-Kit (Thermo-Fisher, USA) (Freitag-Wolf et al., 2019). Alle Anwendungen erfolgten nach Angaben des Herstellers.

2.2.2.1 Zellkultur

Die Kultivierung der immortalisierten gingivalen Keratinozyten (OKG4(hTert)) erfolgte steril bei 37 °C und 5 %iger CO₂-Sättigung. Die Zellen wurden in Derma Life Complete K Medium + 1 % Amphotericin B +1 % Pen/Strep in T300-Flaschen kultiviert und alle 3-4 Tage im Verhältnis 1:5 gesplittet. Die Zellkulturflaschen wurden einen Tag vor dem Splitten der Zellen mit Kollagen-A beschichtet und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die OKG4-Zellen wurden gesplittet, indem sie mit PBS gewaschen und anschließend für ca. 5-7 min mit Trypsin/EDTA bei 37 °C inkubiert wurden. Das Trypsin/EDTA wurde mit DMEM+10 %FCS+ 1 % Pen/Strep inaktiviert und die Zellen anschließend bei 300 U/min für 5 min zentrifugiert (Stolte et al., 2020). Das Medium wurde abgesaugt und das Zellpellet in dem entsprechenden Kultivierungsmedium resuspendiert. Die Zellen wurden in die am Vortag mit Kollagen-A beschichtete Flasche überführt.

2.2.2.2 Zellzählung

Die Zellzählung erfolgte mittels einer Neubauer-Zählkammer (Zhang et al., 2020). Hierfür wurden 10 µL Zellsuspension mit 10 µL Trypanblau vermischt (Verhältnis 1:1) und in die mit einem Gläschen gedeckelte Zählkammer gesogen. Anschließend wurden die Zellen in den Kammern unter dem Lichtmikroskop gezählt. Die Zellzahl ergab sich aus der Bildung des Mittelwertes der ausgezählten Eckquadrate der Neubauer-Zählkammer x 2 (Verdünnungsfaktor) x 10⁴ (Kammerfaktor).

Die ermittelte Zellzahl (2×10^5 c/well) wurde 48 h vor Versuchsstart in kollagenbeschichteten (Kollagen IV) 6-Well Platten ausgesät. Nach 30 h wurde das Kultivierungsmedium (Kalziumkonzentration von $c = 60 \mu\text{M}$) durch Medium

mit höherer Kalziumkonzentration ausgetauscht ($c = 1,4 \text{ mM}$), um die Zellen zur Differenzierung anzuregen (Stolte et al., 2020).

2.2.2.3 Bestimmung eines potentiellen inflammatorischen Potentials der Nanocarrier

Nach weiteren 16 h wurden die Zellen für 3 h, 6 h und 12 h mit je $5 \text{ }\mu\text{g/mL}$, $25 \text{ }\mu\text{g/mL}$ und $50 \text{ }\mu\text{g/mL}$ der Nanocarrier dPGS und h(PG-co-PCL)S oder ohne Nanocarrier (Negativkontrolle) inkubiert.

Nach 3 h, 6 h und 12 h wurden die behandelten Zellen geerntet. Hierfür wurden die Zellen zweimalig mit PBS gewaschen.

Anschließend wurden pro Well $350 \text{ }\mu\text{l}$ RLT Puffer + $3,5 \text{ }\mu\text{l}$ β -Mercaptoethanol zu den Zellen gegeben und diese anschließend auf Eis von der Plastikoberfläche der Wells abgelöst. Der RLT-Puffer lysierte die Zellen und Gewebe und setzte dabei z.B. Nukleinsäuren frei. Für die RNA-Extraktion wurde das Zelllysat auf QIAgen Shredder-Säulen gegeben und 3 min bei maximaler Umdrehungszahl (14000 U/min) abzentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend bei $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

2.2.2.4 Isolierung von RNA aus Zellen

Für diesen Vorgang wurden verschiedene Puffer verwendet:

- RW1 Puffer: Puffer zum Waschen und zum Binden von Kohlenhydraten, Proteinen und Fetten, um diese anschließend zu entfernen
- RPE-Puffer: Puffer zum Waschen; dieser dient zur Bindung vor allem von Salzen aus vorangegangenen Waschschritten mit anderen Puffern und entfernt diese von der Säule

Für die RNA-Extraktion wurde das Zelllysat aufgetaut, $350 \text{ }\mu\text{l}$ Ethanol hinzugegeben und gut durchmischt. Das Lysat-Ethanol-Gemisch wurde auf die RNeasy Mini spin columns geladen und für 15 s bei $\geq 8000 \text{ rpm}$ zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und jeweils $350 \text{ }\mu\text{l}$ RW1 Puffer hinzugegeben. Nach erneuter Zentrifugation mit 8000 U/min wurde der Überstand wieder

verworfen. Im Anschluss wurde je Ansatz 10 µl DNase-I und 70 µl RDD-Buffer hinzugegeben. Die Inkubation erfolgte für 15 min bei Raumtemperatur.

Dieser DNase-I-Verdau wurde durchgeführt, um sicherzustellen, dass die RNA nicht durch genomische DNA verunreinigt war. Hierbei handelte es sich um eine unspezifische Endonuklease, welche doppel- und einzelsträngige DNA und Chromatin abbaut und durch Hydrolyse von Phosphodiester-Verbindungen Mono- und Oligonukleotide mit einer 5'-Phosphat- und einer 3'-Hydroxyl-Gruppe erzeugt. Anschließend wurden 700 µl RW1 Puffer zu jeder Säule gegeben und für 15 s bei 8000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Anschließend wurden 500 µl RPE-Puffer auf die Säulen geladen und für 15 s bei 8000 U/min zentrifugiert, der Überstand wurde erneut entfernt, die Waschung mit 500 µl RPE-Puffer wiederholt und für 2 min mit 8000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Säulen durch eine einminütige Zentrifugation (8000 U/min) getrocknet. Die Säulen wurden in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt, für 5 min mit RNA mit 50 µl RNase-freiem Wasser (RNFW) inkubiert und anschließend für 1 min bei ≥ 8000 rpm zentrifugiert, um die RNA vollständig zu eluieren (Bao et al., 2020). Für die anschließende cDNA-Synthese wurde zunächst die Menge der aus den OKG4-Zellen extrahierten RNA mittels Photometrie bestimmt.

2.2.2.5 Agarose-Gelelektrophorese

Um die Reinheit der RNA zu überprüfen, wurde diese auf einem 1 %igen Agarosegel aufgetrennt (Huggett et al., 2005). Für die Herstellung des 1 %igen Agarosegels wurden 2,5 g Agarosepulver in 250 ml 1x TAE -Puffer gelöst und erhitzt und anschließend, mit 5 µl Ethidiumbromid (EtBr) versetzt, als Gel gegossen. Die RNA wurde für die Gelelektrophorese mit einem farbstoff- und glycerinhaltigen Ladepuffer im Verhältnis 1:5 vorbereitet. Die Geltaschen des polymerisierten Gels wurden mit 5 µl der zu untersuchenden RNA beladen. Parallel wurde 1 µl des Markers GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder aufgetragen, um später die Größe der RNA-Banden im Gel bestimmen zu können. Die RNA wurde 20 min bei 110 V aufgetrennt. Danach wurde das Gel unter UV-Licht

ausgewertet. Die RNA wurde durch das EtBr sichtbar, welches sich zwischen den Basenpaaren der RNA einlagert hatte (Mühlhardt, 2013).

2.2.2.6 cDNA-Synthese

Aus der extrahierten RNA wurde mithilfe des Enzyms Reverse Transkriptase unter Verwendung des High-capacity cDNA Reverse Transcription-Kits die dazu komplementäre cDNA (Transkript) hergestellt (Bustin and Mueller, 2005). Es wurden 500 ng RNA in 8 µl RNFW (RNA-freies Wasser) eingesetzt und mit 1 µl dNTP's und 1 µl Oligo dT's bei 65 °C für 5 min erhitzt. Die anschließende Inkubation auf Eis diente dazu, dass sich die Sekundärstrukturen der RNA nicht zurückbilden konnten. Für die cDNA-Synthese wurde ein Mastermix aus 6 µl RNFW, 2 µl 10x Reverse Transkriptase-Puffer, 1 µl RNase Inhibitor und 1 µl Multiscribe Reverse Transkriptase hergestellt und zur RNA hinzugegeben (Biosystems, 2010). Die Reaktion wurde für 2 h bei 37 °C und anschließend für 5 min bei 85 °C inkubiert. Die cDNA wurde bis zur Durchführung der qRT-PCR bei -20 °C gelagert.

2.2.2.7 Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)

Die quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) wurde mithilfe des CFX Connect-Systems (BioRad) in Kombination eines SYBR Select Master-Mix (Thermo Fisher Scientific) unter Einhaltung der Hersteller-vorschriften durchgeführt (Bao et al., 2020, Bustin and Mueller, 2005, Nolan et al., 2006). Wie bei der klassischen PCR werden Zyklen durchlaufen, die sich in drei verschiedene Abschnitte gliedern. Die erste Phase bewirkt ein Trennen der Wasserstoffbrückenbindungen, damit die verwendete cDNA in Einzelsträngen vorliegt (Denaturierung). In der zweiten Phase (Annealing) wird durch Erhitzen auf 60 °C ein Anlagern der spezifischen Primer bewirkt. In der dritten Phase, der Elongation, erfolgt eine Verdopplung und Vervollständigung der Einzel- in Doppelstränge durch DNA-Polymerasen bei 72 °C. Der Vorteil gegenüber der klassischen PCR ist, dass eine Quantifizierung der gebildeten Produkte mithilfe eines fluoreszierenden Farbstoffes in Echtzeit verfolgt werden kann (Bustin and

Mueller, 2005). Der hierfür verwendete Fluoreszenzfarbstoff war SYBR Green I, welcher sich in die gebildeten Doppelstränge der cDNA einlagerte und durch die chemische Bindung ein Licht (Wellenlänge 520 nm) emittierte (Nolan et al., 2006). Der Zyklus, an dem ein ausreichend starkes Fluoreszenzsignal erreicht wird, wird als Schwellenwertzyklus (Ct) bezeichnet (Bustin and Mueller, 2005).

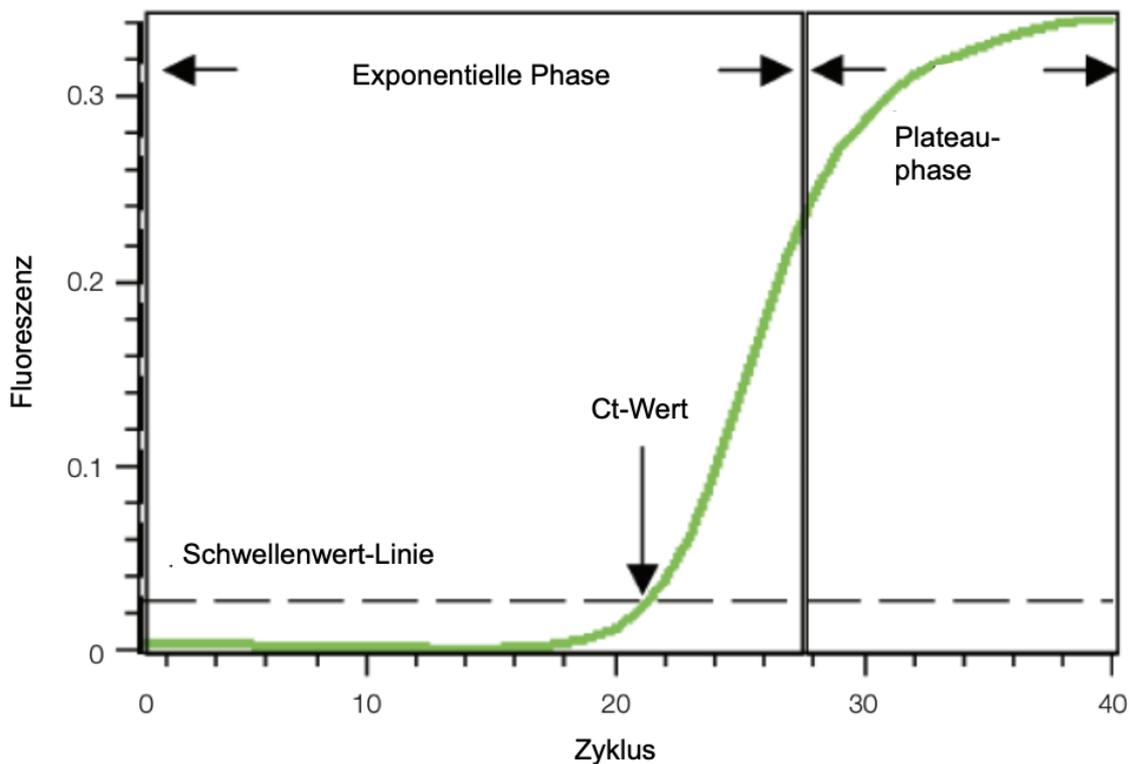


Abbildung 9: Amplifikationsplot der qRT-PCR mit den unterschiedlichen Phasen; modifiziert nach BioRad, qRT-PCR-Anwenderhandbuch (LifeScienceGroup, 2006)

Der bestimmte Ct-Wert wurde für die Auswertung der Daten verwendet. Bei der qRT-PCR ist es im Gegensatz zur PCR möglich, den Endpunkt zu bestimmen, welcher durch die Plateauphase angegeben wird (Bustin and Mueller, 2005). Das hier verwendete Programm der qRT-PCR umfasste 40 Zyklen (Bao et al., 2020, Nolan et al., 2006). Wird der Ct-Wert eines Transkripts innerhalb dieser Zeit nicht erreicht, war die Genexpression des untersuchten Gens zu schwach ausgeprägt. In der vorliegenden Arbeit wurde die Genexpression von IL-1 β und

IL-6 für die Auswertung auf die mRNA-Expression des Referenzgens GAPDH normalisiert (Nolan et al., 2006).

Der Ct-Wert wird bei exponentiellem Anstieg des Fluoreszenzsignal über 5 % (Fehlerannahme) erreicht. Die Auswertung der qRT-PCR erfolgte im Anschluss. Zunächst wurde der Δ Ct-Wert ermittelt (Schmittgen and Livak, 2008) und mit folgender Formel errechnet:

$$\Delta\text{Ct} = (\text{Ct-Wert (Kontrollgen)} - \text{Ct-Wert (Referenzgen GAPDH)})$$

Der Δ Ct-Wert gab Auskunft über das relative Genexpressionslevel der untersuchten Zytokine IL-1 β und IL-6. Mit dem $\Delta\Delta$ Ct-Wert (= (Δ Ct-Wert (Kontrollgen) - Δ Ct-Wert (Referenzgen GAPDH))) wurde dargestellt, wie sich die Probe bezüglich des Referenzgens verhielt.

Die qRT-PCR wurde daraufhin mit folgender Formel abschließend ausgewertet: $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}} = 2^{-(\Delta\text{Ct-Wert (Kontrollgen)} - \Delta\text{Ct-Wert (Referenzgen GAPDH)})}$ (Schmittgen and Livak, 2008).

Die angewandte, sog. „vergleichende Ct-Methode“ bat die Möglichkeit, die „x-fache Änderung“ der Expression darzustellen, unter der Annahme, dass die Effizienz der PCR annähernd bei 1 lag und die Effizienz des verwendeten Referenzgens und die des Kontrollgens nah beieinander lagen (Schmittgen and Livak, 2008).

2.2.3 Zytotoxizität von dPGS und h(PG-co-PCL)S

2.2.3.1 Bestimmung der metabolischen Aktivität mittels MTT-Assay

Eine Änderung der metabolischen Aktivität der Zellen unter Einwirkung der Nanocarrier wurde mit dem MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromid) Reduktions-Assay untersucht (Jager et al., 2018, Kumar et al., 2018).

Dieses Assay dient zur Einschätzung von Zellviabilität und Wachstumsrate einer Zellkultur unter Einwirkung des zu untersuchenden Wirkstoffs. Vorteilhaft ist sowohl dessen Präzision und Schnelligkeit, in der die Ergebnisse vorliegen, als auch die Auswertung ohne Verwendung radioaktiver Isotope (Mosmann, 1983). Mithilfe des MTT-Assays konnte die Dehydrogenasenaktivität der

Mitochondrien bestimmt und so eine Aussage über das Überleben der Zellen getroffen werden (Kumar et al., 2018). Nach Zugabe der MTT-Lösung zu den Zellen entstand aus der vorher gelben Lösung eine sich dunkelvioletts verfärbende Lösung. Dies geschah durch das Aufbrechen des Tetrazoliumrings durch Dehydrogenasen aus den Mitochondrien der Zellen (Mosmann, 1983). Das im Anschluss hinzugegebene saure Isopropanol lysierte die Zellen, wodurch das in Alkohol lösliche Formazan freigesetzt werden konnte. Mithilfe eines Plattenreaders mit einer Wellenlänge von 570 nm wurde die optische Dichte des in Alkohol gelösten Formazans bestimmt (Stolte et al., 2020), wobei die Extinktion proportional zur Anzahl der vitalen Zellen war (Kumar et al., 2018).

2.2.3.2 Inkubation der Zellen mit den Nanocarriern

Die Kultivierung der Zellen erfolgte wie in Abschnitt 2.2.2.1 beschrieben. Die ermittelte Zellzahl ($1,5 \times 10^4$ c/well) wurde 48 h vor Versuchsstart in kollagenbeschichteten (Kollagen IV) 96-Well Platten ausgesät. Die Inkubation der OKG4-Zellen erfolgte mit den Nanocarriern dPGS und h(PG-co-PCL)S.

Es wurden je Nanocarrier drei unterschiedliche Konzentrationen (5 µg/mL, 25 µg/mL und 50 µg/mL) nach drei Zeitpunkten (24 h, 48 h, 72 h) auf Zytotoxizität mit Hilfe des oben beschriebenen colorimetrischen Assays MTT überprüft.

Pro Konzentration und Zeitpunkt erfolgten je Nanocarrier vier technische Replikate. Als Kontrollen wurden je 96-Well Platte Folgendes untersucht:

- Vier Wells mit OKG4-Zellen mit reinem DermaLife Medium + 60 µM Ca^{2+}
- Ein Well ohne OKG4-Zellen mit reinem DermaLife Medium + 60 µM Ca^{2+}
- Jeweils ein Well ohne OKG4-Zellen mit 5 µg, 25 µg und 50 µg der jeweils beiden NC dPGS und h(PG-co-PCL)S
- Ein Well mit OKG4-Zellen mit reinem DermaLife Medium + 60 µM Ca^{2+} , bei dem die Zellen vor MTT-Stimulation maximal lysiert wurden. (Negativkontrolle für maximale Zytotoxizität) (Stolte et al., 2020).

20 min vor Ablauf des zu untersuchenden Zeitraums wurde das Well mit der Negativkontrolle einmalig mit PBS gewaschen und 100 µl 4 % Triton-X-100 in

PBS gelöst, zu den OKG4 Zellen gegeben und für 20 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert (Jager et al., 2018). Dies führte zur sogenannten maximalen Lyse und zeigte 100 % tote Zellen an.

2.2.4 Analyse der Daten und statistische Methodik

Die statistische Auswertung erfolgte mit:

GraphPad Prism® Version 8 für Windows, GraphPad Software, San Diego, California, USA.

Der Vergleich der Mittelwerte metrischer Variablen in den Versuchsgruppen mit der Kontrollgruppe erfolgte mit ANOVA und dem Post-Hoc Test nach Dunnetts. Die vorliegende präklinische Studie war rein explorativ und die Ergebnisse können nur als Tendenz gedeutet werden. Deshalb sollten die Ergebnisse in späteren klinischen Studien streng confirmatorisch überprüft werden.

Mit dem Symbol * wird der Größenbereich von p-Werten angegeben:

* $0,01 < p < 0,05$; ** $0,01 \leq p < 0,001$ *** $p < 0,001$

Statistische Analysen wurden in Zusammenarbeit mit dem Institut für Biometrie der Charité-Universitätsmedizin Berlin (Dr. K. Neumann, Charitéplatz 1, 10117 Berlin) durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Penetrationsverhalten von dPGS und h(PG-co-PCL)S in einem porcinen *ex vivo*-Schleimhautmodell

Zur Untersuchung der Penetration von dendritischem Poly-Glycerol-Sulfat (dPGS) und hyperbranched Poly-(glycerol – co – caprolacton)-Sulfat (h(PG-co-PCL)S) wurde ein *ex vivo*-Modell etabliert. Es sollte beantworten, ob die Nanocarrier in orale porcine Mukosa penetrierten. Zusätzlich wurde untersucht, ob die jeweiligen Nanocarrier in verschiedenen Qualitäten der Mundschleimhaut ein unterschiedliches Penetrationsverhalten aufwiesen und die Penetration mit sehr kurzen Inkubationszeiten möglich war. Beide Nanocarrier wurden an drei Spendern auf das Penetrationsverhalten untersucht. Als Kontrolle wurde phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) auf die Mukosa appliziert.

3.1.1 Die Auswertung mit dem konfokalen Laser-Scanning- Mikroskop

Nach der Inkubation mit dem jeweiligen Fluoreszenz-gekoppelten Nanocarrier, wurden Aufnahmen mit dem CLSM aufgenommen (Abb. 10+11). Zur Bewertung der Penetrationseigenschaften wurde der Objektträger, welcher das größte Nanocarrierapplikations-Areal abbildete, ausgewertet. Der jeweilige mit Rhodamin-B markierte Nanocarrier (-RB) wurde auf den CLSM-Bildern rot dargestellt, die Zellkerne erschienen blau und das Zytokeratin des Epithels grün. Die Intensität, mit der der Rhodamin-B-Kanal dargestellt wurde, war für alle Aufnahmen konstant bei 550 Gain/ μm .

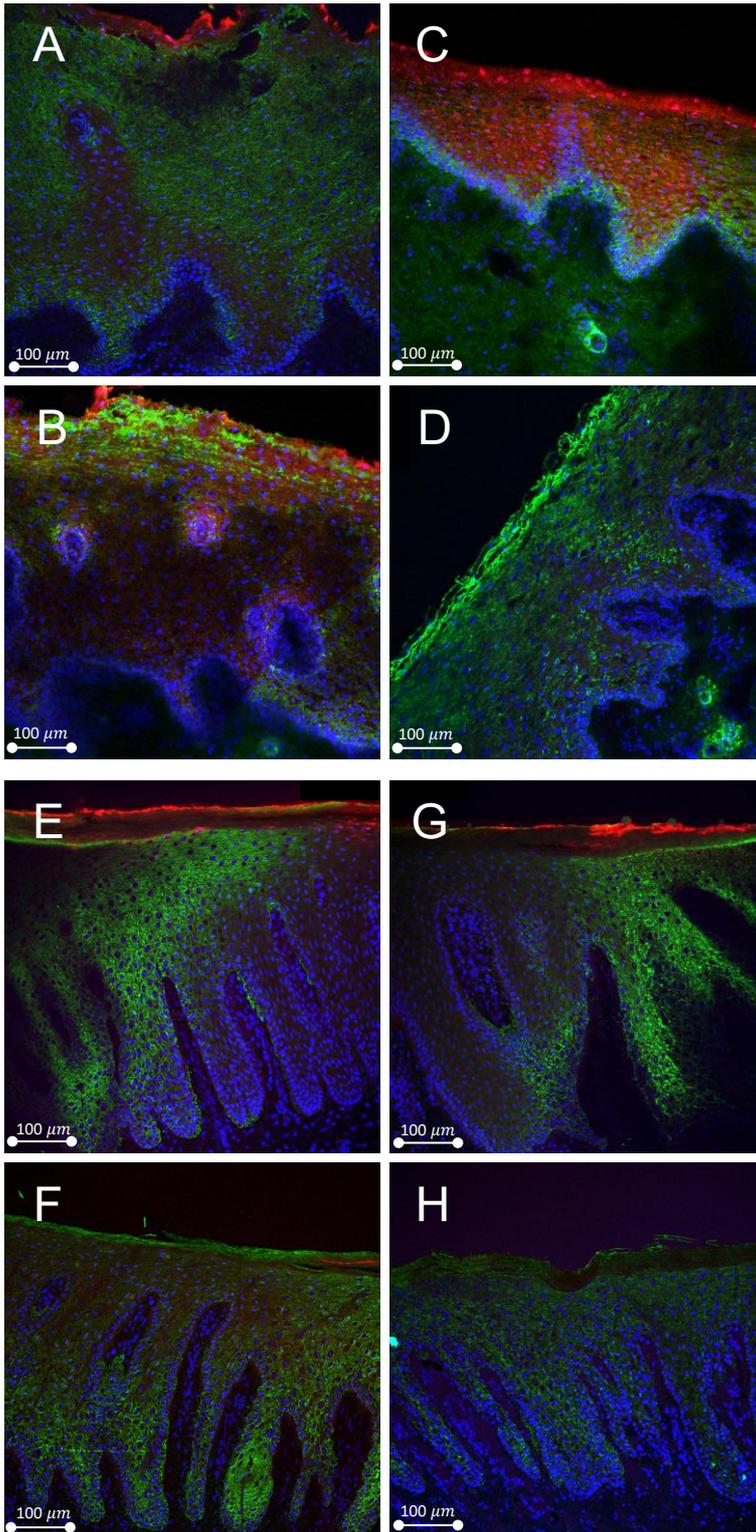


Abbildung 10: Zeitabhängige Penetration des Rhodamin-B markierten dPGS-NC
 dPGS-RB-Penetration in porciner auskleidender Mukosa (A-D) und mastikatorischer Mukosa (E-H);
 repräsentative Bilder der 30 s Penetration (A und E), 1 min Penetration (B und F), 5 min Penetration
 (C und G), Negativkontrolle mit PBS (D und H)
 Nanocarrier zeigen eine rote Färbung, Zellkerne blau; Zytokeratin wird grün dargestellt
 Zellkernfärbung mit DAPI (blau), Zytokeratinfärbung mit FITC (grün)
 Maßstabbalken 100 μm; Anzahl der biologischen Replikate n = 3

In den Abbildungen 10 A-H sind repräsentative CLSM-Aufnahmen des dPGS-NC zu sehen. Die Abbildungen 10 A-D zeigen Ausschnitte der Penetrationsuntersuchung in bukkaler (auskleidender) Mukosa. Nach 30 s überwog die statische Adhäsion auf dem *Stratum superficiale* gegenüber dem Eindringen in tiefere Epithelschichten. Nach 1 min und 5 min war eine Penetration bis zum *Stratum basale* zu erkennen. In der basal davon liegenden *Lamina propria* war keine Penetration des Nanocarriers sichtbar. Die Tiefe des penetrierten Nanocarriers in viable Epithelschichten nahm abhängig der Inkubationszeit zu. Des Weiteren korrelierte die Intensität des Nanocarriers dPGS mit der Inkubationszeit. Die Intensität des nach 30 s meist nur auf der Oberfläche adhärennten dPGS-Nanocarriers auf dem *Stratum superficiale* erschien sehr hoch, wohingegen nach Applikation für 5 min die Intensität der Rotfärbung im Gewebe höher erschien. In der *Lamina propria* der auskleidenden Mukosa war zu keinem Zeitpunkt eine Penetration des dPGS-NCs erkennbar. Die Abbildung 10 D zeigt die Negativkontrolle mit PBS, bei der keine Rotfärbung sichtbar war. In den Abbildungen 10 E-H sind repräsentative Abbildungen der Penetrationsuntersuchung mit dem dPGS-NC an mastikatorischer Mukosa dargestellt. Nach 30 s war überwiegend eine Anlagerung des dPGS-NCs an der Schleimhaut zu erkennen. Mit zunehmender Inkubationszeit penetrierte der dPGS-NC tiefer und in geringer Menge auch in viable Epithelschichten. Zusätzlich war zu erkennen, dass die Farbstoff-Intensität mit zunehmender Inkubationszeit abnahm und der dem *Stratum corneum* aufgelagerte Anteil am intensivsten gefärbt war. In der *Lamina propria* war keine Rotfärbung zu erkennen. Abbildung 10 H zeigt ein repräsentatives Bild, der mit PBS inkubierten mastikatorischen Schleimhaut als Negativkontrolle.

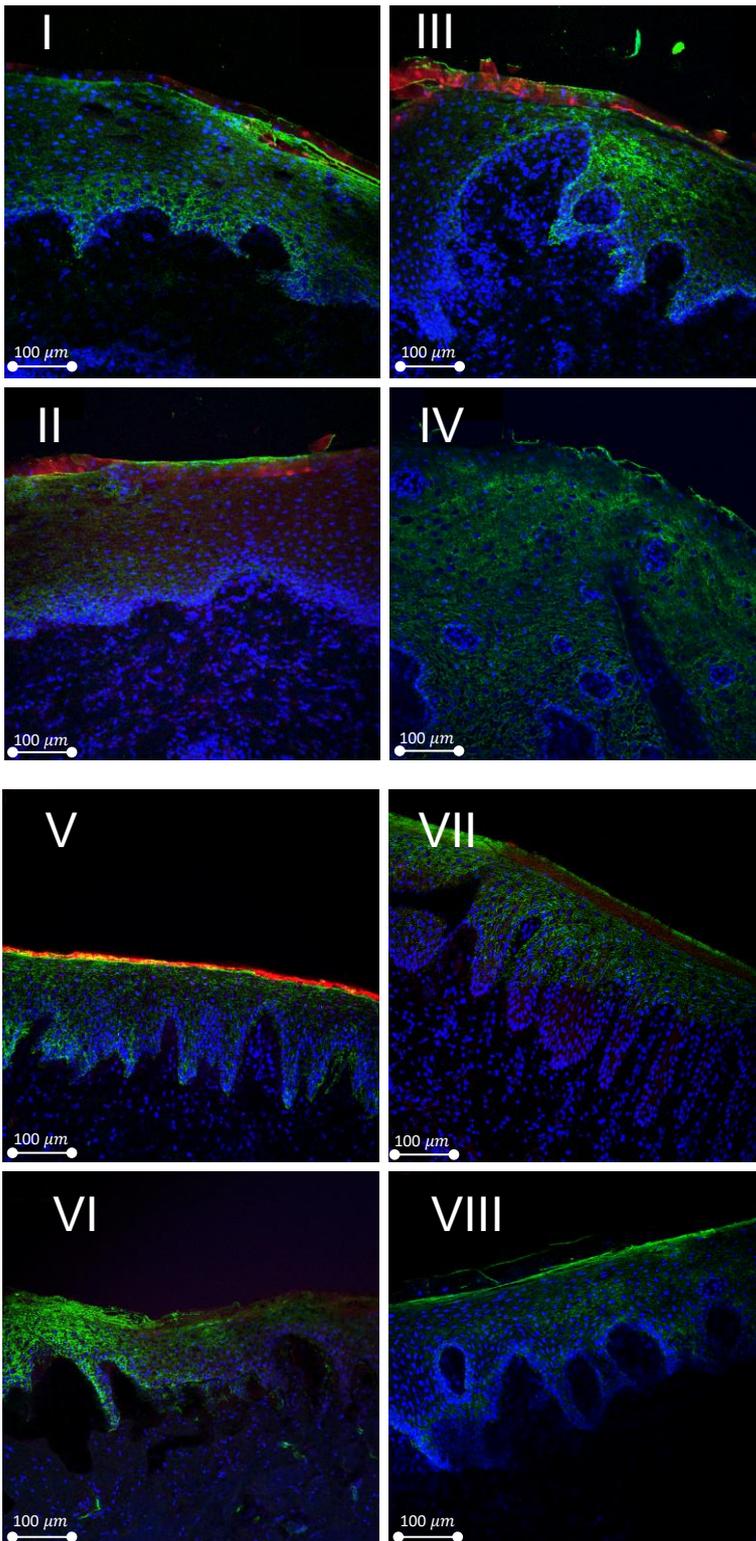


Abbildung 11: Zeitabhängige Penetration des Rhodamin-B markierten h(PG-co-PCL)S-NC in porciner auskleidender (I-IV) und mastikatorischer (V-VIII) Mukosa; repräsentative Bilder der 30 s Penetration (I und V), 1 min Penetration (II und V), 5 min Penetration (III und VII), Negativkontrolle mit PBS (IV und VIII)

Nanocarrier zeigen eine rote Färbung, Zellkerne blau; Zytokeratin wird grün dargestellt
 Zellkernfärbung mit DAPI (blau), Zytokeratinfärbung mit FITC (grün)

Maßstab Balken 100 μm; Anzahl der biologischen Replikate n = 3

Die Abb. I-VIII zeigen repräsentative Aufnahmen der Penetrationsuntersuchung mit h(PG-co-PCL)S-NC in auskleidender (I-IV) und mastikatorischer (V-VIII) Mukosa.

In auskleidender Mukosa lag der Nanocarrier h(PG-co-PCL)S nach 30 s Inkubationszeit auf dem *Stratum superficiale* auf. Eine Penetration in tiefere Epithelschichten war nicht erkennbar. Je länger die Inkubationszeit war, desto weniger intensiv erschien die Rotfärbung. Nach 1 min und 5 min war eine geringe Rotfärbung in tieferen viablen Schichten der auskleidenden Mukosa zu erkennen. Der Nanocarrier gelangte nicht in die *Lamina propria*. In mastikatorischer Mukosa adhärierte der h(PG-co-PCL)S-NC statisch nach 30 s am *Stratum corneum*. Mit zunehmender Inkubationszeit nahm die Intensität des roten Fluoreszenzfarbstoffes in viablen Epithelschichten ab. Eine Penetration in die *Lamina propria* war nicht zu erkennen.

3.1.2 Quantifizierung des ex vivo-Versuchs

Anhand der mit dem CLSM aufgenommenen Bildern war bereits ein Unterschied der Penetrationseigenschaften bezüglich Intensität und Eindringtiefe der beiden Nanocarrier dPGS und h(PG-co-PCL)S zu erkennen. Um dies detaillierter zu untersuchen, wurden die aufgenommenen Bilder anschließend mit dem Programm ImageJ (Version 1.52a, USA) analysiert und die Rhodamin-B Signale, die den gelabelten Nanocarrier markierten, quantifiziert. Die folgenden Abbildungen zeigen die graphische Darstellung der Ergebnisse der dPGS- und h(PG-co-PCL)S-NC, die anhand drei biologischer Replikate ermittelt wurden.

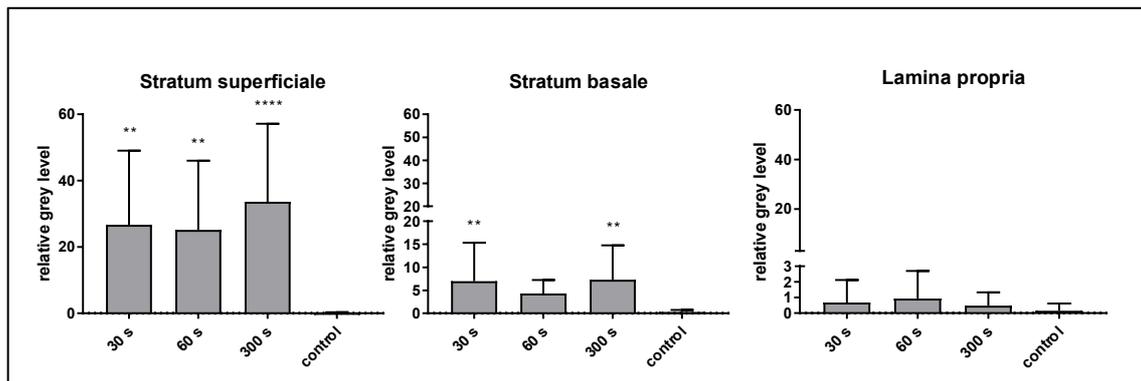


Abbildung 12: Quantifizierung des dPGS-NC in auskleidender Mukosa
 Darstellung des relativen Grauwertlevels ermittelt durch ImageJ und ANOVA. Die Analyse der Daten erfolgte durch den Dunnetts-Test (multiple testing) **p = 0,001; **p = 0,002; ***p < 0,0001; **p = 0,007; **p = 0,003; control = Applikation von PBS
 Anzahl der biologischen Replikate n = 3

Die Auswertung mittels ImageJ bestätigte den visuellen Eindruck am CLSM. Nach 30 s wurde das höchste Grauwertlevel im *Stratum superficiale* detektiert (p = 0,001). Im Vergleich dazu, nahm die MFI in den tieferen viablen Epithelschichten ab und konnte in der *Lamina propria* nur in sehr geringem Maße gemessen werden. Nach 1 min konnte die höchste MFI im *Stratum superficiale* gemessen werden (p = 0,002). Mit zunehmender Tiefe in viable Epithelschichten nahm die MFI ab. In der *Lamina propria* konnte ein Grauwertlevel im Bereich der Autofluoreszenz nach 1 min dPGS-Inkubation gemessen werden. Die größte Menge an dPGS-NC in auskleidender Mukosa (Abb. 10) befand sich im *Stratum superficiale* nach 5 min (p < 0,0001). Ähnlich der anderen Inkubationszeiten nahm die Menge an nachgewiesenem dPGS-NC mit zunehmender Eindringtiefe in auskleidender Mukosa ab und konnte in der *Lamina propria* nach 5 min nur in sehr geringer Menge quantifiziert werden. Unter Kontrollbedingungen war keine MFI darstellbar. Die geringen Werte repräsentieren die Autofluoreszenz des Gewebes bei dieser Wellenlänge. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass der dPGS-NC nicht über die Basalmembran in die *Lamina propria* gelangen konnte, da die geringen Werte im Bereich der MFI unter Kontrollbedingungen lagen.

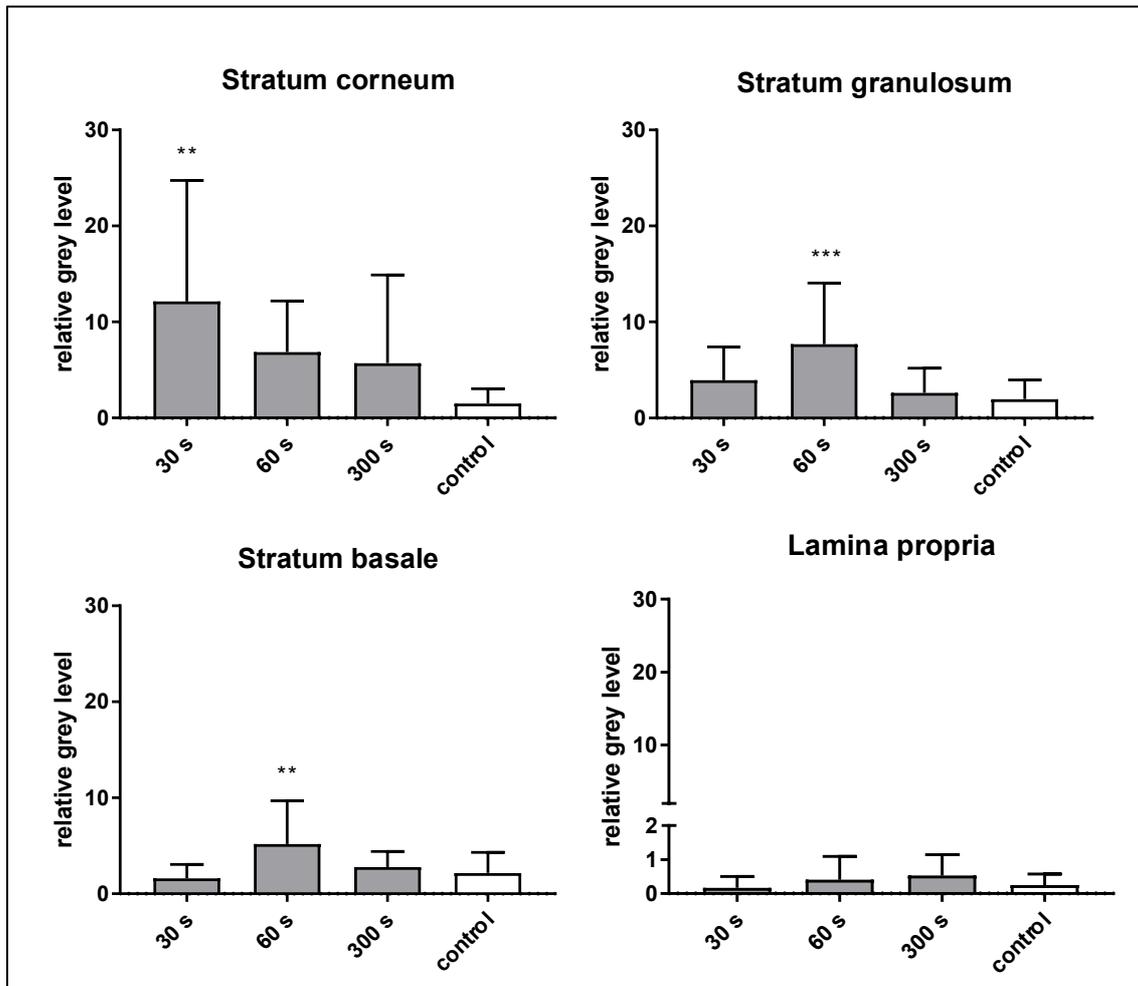


Abbildung 13: Quantifizierung des dPGS-NC in mastikatorischer Mukosa
 Darstellung des relativen Grauwertlevels ermittelt durch ImageJ und ANOVA. Die Analyse der Daten erfolgte durch den Dunnetts-Test (multiple testing) **p = 0,002; ***p = 0,0005; **p = 0,009; control = Applikation von PBS; Anzahl der biologischen Replikate n = 3

Die Quantifizierung des dPGS-NCs in mastikatorischer Mukosa mittels ImageJ-Auswertung zeigte nach 30 s-Inkubation die höchste MFI im *Stratum corneum* (p = 0,002). Die MFI des dPGS-NCs nahm mit zunehmender Tiefe der Messung in den viablen Epithelschichten ab und konnte in der *Lamina propria* nur in sehr geringer Menge nachgewiesen werden, entsprechend einer Autofluoreszenz des Gewebes. Die 60 s-Inkubation zeigte ein homogenes Grauwertlevel in allen gemessenen Hautschichten. Gleiches galt für die 5 min-Inkubation, bei der die MFI im *Stratum corneum* höher war als in den anderen viablen Epithelschichten. In der *Lamina propria* war der Nanocarrier für alle Zeitpunkte nur in sehr geringem Maße nachweisbar und lag nur geringfügig über der

Autofluoreszenz der Kontrolle. Unter Kontrollbedingungen konnte nur eine geringe MFI dargestellt werden. Dies entspricht der Autofluoreszenz des Gewebes. Dementsprechend konnte auch hier gezeigt werden, dass die dPGS-NC nicht über die Basalmembran in die *Lamina propria* penetrierten. Im Vergleich zur Penetrationsuntersuchung in auskleidender Mukosa zeigte sich an der mastikatorischen Mukosa insgesamt eine verminderte MFI des dPGS-NCs (Tab. 1).

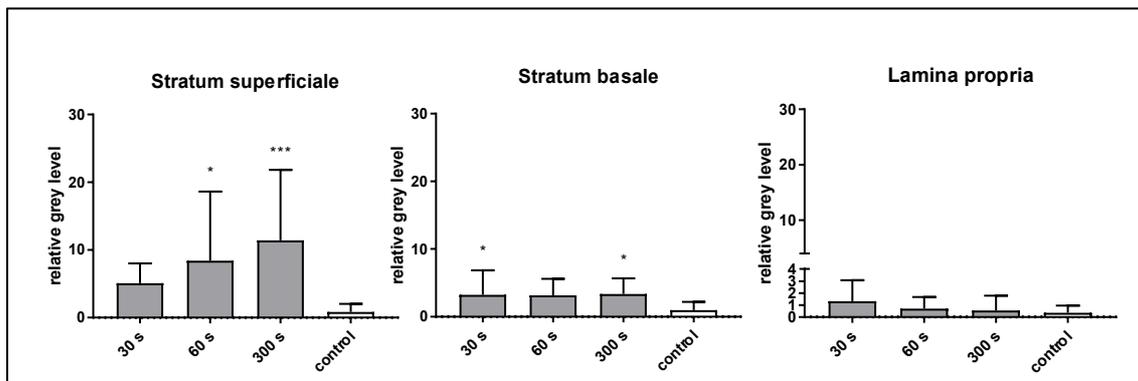


Abbildung 14: Quantifizierung des h(PG-co-PCL)S-NC in auskleidender Mukosa
Darstellung des relativen Grauwertlevels ermittelt durch ImageJ und ANOVA. Die Analyse der Daten erfolgte durch den Dunnetts-Test (multiple testing) * $p = 0,017$; *** $p = 0,0007$; * $p = 0,04$; * $p = 0,03$; control = Applikation von PBS; Anzahl der biologischen Replikate $n = 3$

Die Inkubation mit h(PG-co-PCL)S-NC in auskleidender Mukosa zeigte ein über die Zeit zunehmendes Fluoreszenzsignal im *Stratum superficiale*. Ähnlich zur Auswertung der Penetrationsuntersuchung mit dem dPGS-NC (Tab. 1) befand sich nach 5 min die höchste MFI im Vergleich zur Kontrolle im *Stratum superficiale* ($p = 0,0007$).

In tieferen Epithelschichten (*Stratum basale*) wurden nach allen Inkubationszeiten eine geringe MFI gemessen. Nach allen Zeitpunkten konnte eine geringe Menge des Nanocarriers h(PG-co-PCL)S in der *Lamina propria* nachgewiesen werden. Die gemessenen Grauwertlevel lagen nur geringfügig über der Autofluoreszenz der Kontrolle. Dementsprechend war von keiner Penetration des h(PG-co-PCL)S-NC über die Basalmembran auszugehen.

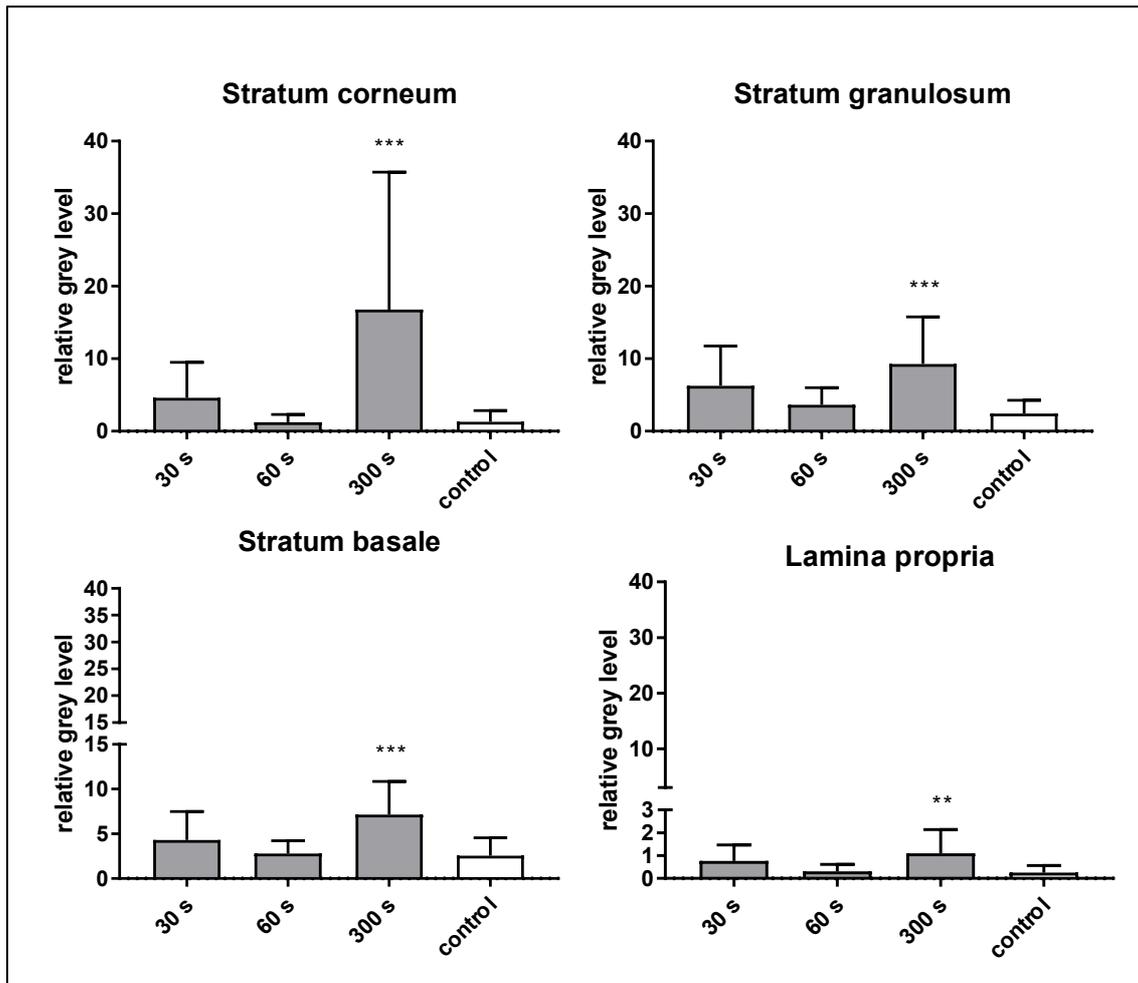


Abbildung 15: Quantifizierung des h(PG-co-PCL)S-NC in mastikatorischer Mukosa
 Darstellung des relativen Grauwertlevels ermittelt durch ImageJ und ANOVA. Die Analyse der Daten erfolgte durch den Dunnetts-Test (multiple testing) ***p = 0,0002; ***p = 0,0005; ***p = 0,0001; **p = 0,003; control = Applikation von PBS; Anzahl der biologischen Replikate n = 3

Die Penetrationsuntersuchungen mit dem h(PG-co-PCL)S-NC in mastikatorischer Mukosa ergab nach 30 s-Inkubationszeit eine im Vergleich zu den anderen Inkubationszeiten geringe MFI in den viablen Epithelschichten. In der *Lamina propria* konnte eine nur geringfügig über dem Wert der Autofluoreszenz liegende MFI quantifiziert werden. Nach 1 min zeigte sich eine geringe Menge (relative grey level < 5) in viablen Epithelschichten und eine MFI < 1 in der *Lamina propria*. Nach 5 min-Inkubationszeit konnte im Vergleich zu den anderen Inkubationszeiten und im Vergleich zur Kontrolle insgesamt der höchste Grauwert in den Epithelschichten *Stratum corneum* ($p = 0,0002$), *Stratum granulosum* ($p = 0,0005$) und *Stratum basale* ($p = 0,0001$) quantifiziert werden. Unter Kontrollbedingungen konnte ein geringer Grauwert im Sinne

einer Autofluoreszenz des Gewebes gemessen werden. Der h(PG-co-PCL)S-NC konnte in der *Lamina propria* für alle Inkubationszeitpunkte nur in sehr geringem Maße quantifiziert werden.

Im Vergleich zum dPGS-NC (Tab. 1) war nach einer Inkubationszeit von 5 min insgesamt mehr MFI in den viablen Epithelschichten *Stratum corneum*, *Stratum granulosum* und *Stratum basale* gemessen worden.

Die Quantifizierung der Nanocarrier dPGS und h(PG-co-PCL)S in oraler Mukosa zeigte unterschiedliche Verhalten der beiden Nanocarrier (Tab. 1). Dabei wurden die durchschnittlich gemessenen Grauwerte miteinander verglichen. Nach 30 s-Applikationszeit auf auskleidender Mukosa wurde der dPGS-NC in höherer Menge im Vergleich zum h(PG-co-PCL)S-NC im *Stratum superficiale* und *Stratum basale* quantifiziert. Dahingegen zeigte sich nach einminütiger Inkubation der beiden Nanocarrier, dass der dPGS-NC nur im *Stratum superficiale* höher quantifiziert wurde. Beim Vergleich der MFI in tieferen viablen Epithelschichten konnten beide Nanocarrier etwa in derselben Menge quantifiziert werden. Nach fünfminütiger Applikation der Nanocarrier konnte der dPGS-NC sowohl im *Stratum superficiale* als auch im *Stratum basale* in höherer Menge nachgewiesen werden. In der *Lamina propria* konnte für beide Nanocarrier ein ähnlich geringer Wert quantifiziert werden, welcher im Bereich der Autofluoreszenz des Gewebes lag.

Insgesamt konnte der Nanocarrier dPGS quantitativ besser in auskleidende Mukosa penetrieren und der h(PG-co-PCL)S-NC besser in mastikatorische Mukosa.

Beim Vergleich der beiden Nanocarrier auf mastikatorischer Mukosa konnte der dPGS-NC nach 30 s-Applikation im *Stratum corneum* in höherer Menge nachgewiesen werden. In tieferen viablen Schichten zeigte sich jedoch für den h(PG-co-PCL)S-NC eine höhere MFI nach 30 s. Nach 1 min war dahingegen der dPGS-NC in den viablen Epithelschichten der mastikatorischen Mukosa besser nachweisbar. Nach fünfminütiger Applikation der Nanocarrier konnte der h(PG-co-PCL)S-NC in deutlich höherer Menge im *Stratum corneum* und *Stratum granulosum*, sowie im *Stratum basale* quantifiziert werden.

	dPGS-NC			h(PG-co-PCL)S-NC		
Auskleidende Mukosa						
	30 s	1 min	5 min	30 s	1 min	5 min
<i>Stratum superficiale</i>	++	++	++	-	-	-
<i>Stratum basale</i>	+	=	+	-	=	-
<i>Lamina propria</i>	-	-	-	-	-	-

Mastikatorische Mukosa						
<i>Stratum corneum</i>	+	+	-	-	-	++
<i>Stratum granulosum</i>	-	+	-	+	-	++
<i>Stratum basale</i>	-	+	-	+	-	+
<i>Lamina propria</i>	-	-	-	-	-	-

Tabelle 1: Penetrationseigenschaften des dPGS- und h(PG-co-PCL)S-NC
Gegenüberstellung der unterschiedlichen Penetrationseigenschaften in den einzelnen viablen Epithelschichten in auskleidender und mastikatorischer Mukosa; Vergleich der gemessenen Grauwerte (MFI; Mittelwert der Pixel/Fläche) mittels ImageJ + : positiver Unterschied der MFI-Werte 1-10; ++ : positiver Unterschied der MFI-Werte < 10; - : negativer Unterschied der MFI-Werte ab < 10; = : Unterschied der MFI-Werte > 10

Die in dieser Arbeit verwendeten Kontrolluntersuchungen mit PBS, anstatt dPGS-RB/ h(PG-co-PCL)S-RB, konnten eine gewisse Autofluoreszenz des verwendeten porcinen Mukosagewebes zeigen. Weitere Kontrollversuche mit dem reinen Farbstoff Rhodamin-B wurden in einer weiteren Doktorarbeit durchgeführt. Dort konnte gezeigt werden, dass dieser selbst nicht in orale Mukosa penetrierte (nicht-publizierte Ergebnisse).

3.2 Einfluss der Nanocarrier auf die Ausschüttung pro-inflammatorischer Zytokine in immortalisierten gingivalen Keratinozyten

Zur Untersuchung der Biokompatibilität wurden immortalisierte humane orale Keratinozyten der Gingiva (OKG4) mit den Nanocarriern dPGS und h(PG-co-PCL)S inkubiert. Als Marker einer regulatorischen pro- und anti-inflammatorischen Zellantwort wurden die Genexpressionslevel der pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 β und IL-6 bestimmt.

3.2.1 Bestimmung der RNA-Konzentration und Gelelektrophorese

Mithilfe der qRT-PCR wurde eine auf den Nanocarrier-Stimulus hin stattfindende Regulation der Expression der Zytokine IL-1 β und IL-6 bewertet. Die Anwendung drei unterschiedlicher Konzentrationen und Inkubationszeiten untersuchte eine potentiell vorliegende Konzentrations-Wirkungs-Beziehung.

3.2.2 Quantitative Echtzeit- Polymerase-Kettenreaktion (qRT- PCR)

Mittels qRT-PCR wurde die Expression der pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 β und IL-6 (Eskan et al., 2008) getestet, um zu evaluieren, ob die Nanocarrier h(PG-co-PCL)S und dPGS eine Entzündungsantwort auf oralen Epithelzellen provozierten. Alle Werte wurden auf das Referenzgen Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) normalisiert (Barber et al., 2005).

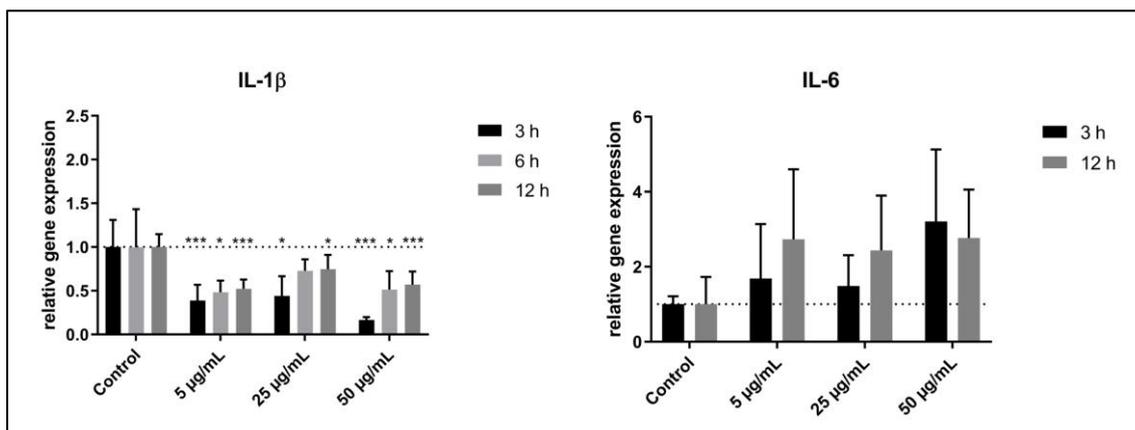


Abbildung 16: Darstellung der relativen Genexpression von IL-1 β und IL-6 nach dPGS-NC-Inkubation

Immortalisierte humane orale Keratinozyten der Gingiva (OKG4) wurden mit dPGS-NC für 3 h, 6 h, 12 h und drei verschiedenen Konzentrationen (5 μ g/ml, 25 μ g/ml, 50 μ g/ml) inkubiert. Kontrolle war die Inkubation der Epithelzellen mit Kultivierungsmedium (Derma Life Complete K Medium + 1 % Amphotericin B + 1 % Pen/Strep). Auswertung erfolgte durch Ermittlung der jeweiligen $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Werte aus erfolgter qRT-PCR; Darstellung mittels GraphPad Prism; Die Analyse der Daten erfolgte durch den Dunnetts-Test; ***p = 0,0005; *p = 0,0167; ***p < 0,0001; *p = 0,0186; *p = 0,0205; ***p < 0,0001; *p = 0,0185; ***p = 0,0002; Anzahl der technischen Replikate n = 6

Die Zytokinexpression von IL-1 β war in Nanocarrier-behandelten Zellen nach 3 h für alle angewendeten Konzentrationen im Vergleich zur Kontrolle signifikant reduziert, was sich besonders bei einer Nanocarrier-Konzentration von c = 50 μ g/ml zeigte (p < 0,0001). Die 6 h-Inkubation führte ebenfalls zu

einer signifikant reduzierten IL-1 β -Expression, besonders für die Nanocarrier-Konzentrationen 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ und 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Nach 12 h war die Expression von IL-1 β mit allen angewandten Nanocarrier-Konzentrationen im Vergleich zur Kontrolle ebenfalls signifikant reduziert, vor allem für die Nanocarrier-Konzentrationen 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ($p < 0,0001$) und 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ($p = 0,0002$). Die Zytokinexpression von IL-6 war nach 3 h und 12 h auswertbar. Insgesamt war die Expression von IL-6 für alle angewandten Nanocarrier-Konzentrationen im Vergleich zur Kontrolle erhöht und zeigte besonders nach 3 h mit einer Nanocarrier-Konzentration von 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ eine erhöhte Zytokinexpression (nicht signifikant). Bei der Auswertung der Ergebnisse der qRT-PCR für die IL-6-Expression zeigte sich ebenfalls keine Konzentrations- oder Zeitabhängigkeit der Zytokinexpression auf Nanocarrier-Inkubation.

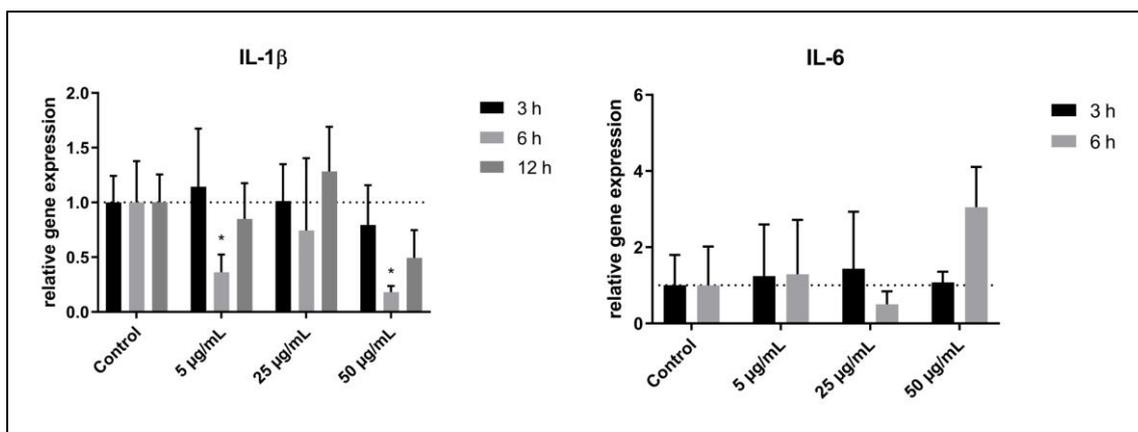


Abbildung 17: Darstellung der relativen Genexpression von IL-1 β und IL-6 nach h(PG-co-PCL)S-NC-Inkubation

OKG4-Zellen wurden mit h(PG-co-PCL)S-NC für 3 h, 6 h, 12 h mit drei verschiedenen Konzentrationen (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) inkubiert; als Kontrolle wurden die Epithelzellen mit Kultivierungsmedium (Derma Life Complete K Medium + 1 % Amphotericin B + 1 % Pen/Strep) inkubiert

Auswertung erfolgte durch Ermittlung der jeweiligen $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte aus erfolgter qRT-PCR; Darstellung mittels GraphPad Prism; die Analyse der Daten erfolgte durch den Dunnett-Test; * $p = 0,0309$; * $p = 0,0129$; Anzahl der technischen Replikate $n = 6$

Die mittels qRT-PCR ausgewertete IL-1 β -Expression nach h(PG-co-PCL)S-NC-Inkubation, zeigte nach der 3 h-Inkubation im Vergleich zur Kontrolle mit einer NC-Konzentration von mit 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ eine leicht erhöhte und mit einer NC-Konzentration von 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ eine leicht reduzierte Zytokinexpression. Mit einer

NC-Konzentration von 25 µg/ml zeigte sich keine Regulation der IL-1β-Expression. Diese Ergebnisse waren im Vergleich zur Kontrolle nicht signifikant. Es ist eine Tendenz zur konzentrationsabhängigen Reduktion der Zytokinexpression zu erkennen (nicht signifikant). Nach 6 h war die Zytokinexpression für alle angewandten Konzentrationen signifikant reduziert, besonders mit der angewandten NC-Konzentration von 5 µg/ml und 50 µg/ml. Nach 12 h- Inkubation des Nanocarriers h(PG-co-PCL)S war die Zytokinexpression für die Konzentrationen 5 µg/ml und 50 µg/ml reduziert und leicht erhöht bei eingesetzter Konzentration von 25 µg/ml (nicht signifikant).

Die Zytokinexpression von IL-6 war nach 3 h und 6 h auswertbar. Bei angewandter Konzentration von 5 µg/ml war die Zytokinexpression im Vergleich zur Kontrolle nach 3 h und 6 h leicht erhöht (nicht signifikant). Nach 3 h war die IL-6-Expression mit der Nanocarrier-Konzentration von 5 µg/ml und 25 µg/ml leicht erhöht (nicht signifikant). Bei der Inkubation mit 50 µg/ml des Nanocarriers zeigte sich dahingegen keine Regulation der Zytokinexpression im Vergleich zur Kontrolle (nicht signifikant). Nach 6 h war die Zytokinexpression von IL-6 mit c = 5 µg/ml leicht erhöht, stark reduziert mit c = 25 µg/ml und stark erhöht mit c = 50 µg/ml (nicht signifikant). Eine Zeit- oder Konzentrationsabhängige Aussage nach Inkubation mit dem h(PG-co-PCL)S-NC konnte nicht evaluiert werden.

3.3 Einfluss der Nanocarrier auf die metabolische Aktivität in immortalisierten gingivalen Keratinozyten

Soll eine Substanz in Zukunft *in vivo* eingesetzt werden, ist die Überprüfung der Biokompatibilität von besonderer Bedeutung. Diese ist abhängig von Ladung, Molekulargewicht, Bioverfügbarkeit und zytotoxischer Wirkung (Ferraro et al., 2018). Mithilfe des MTT-Assays wurde in einem *in vitro*-Versuch eine Regulation der metabolischen Aktivität durch die Nanocarrier dPGS und h(PG-co-PCL)S überprüft. Es wurden dabei drei unterschiedliche Konzentrationen und Messzeiten angewendet, um eine Aussage über die metabolische Aktivität von OKG4-Zellen in Abhängigkeit der Konzentration zu treffen.

Als Positiv-Kontrolle wurden Zellen verwendet, die während der Inkubationszeit ausschließlich mit Kultivierungsmedium kultiviert wurden. Die Farbreaktion dieses Ansatzes wurde auf 100 % metabolische Aktivität, bei der anzunehmen war, dass alle Zellen vital waren, gesetzt. Für die Negativ-Kontrolle zur Ermittlung einer vollständigen Zytotoxizität wurden Zellen mit Triton-X-100 aufgelöst (max.Lyse siehe 2.2.3.2).

3.3.1 Auswertung der Ergebnisse des MTT-Assays

Die folgenden Abbildungen zeigen die relative metabolische Aktivität der OKG4-Zellen nach Applikation der Nanocarrier in Abhängigkeit der Inkubationszeit und Konzentration.

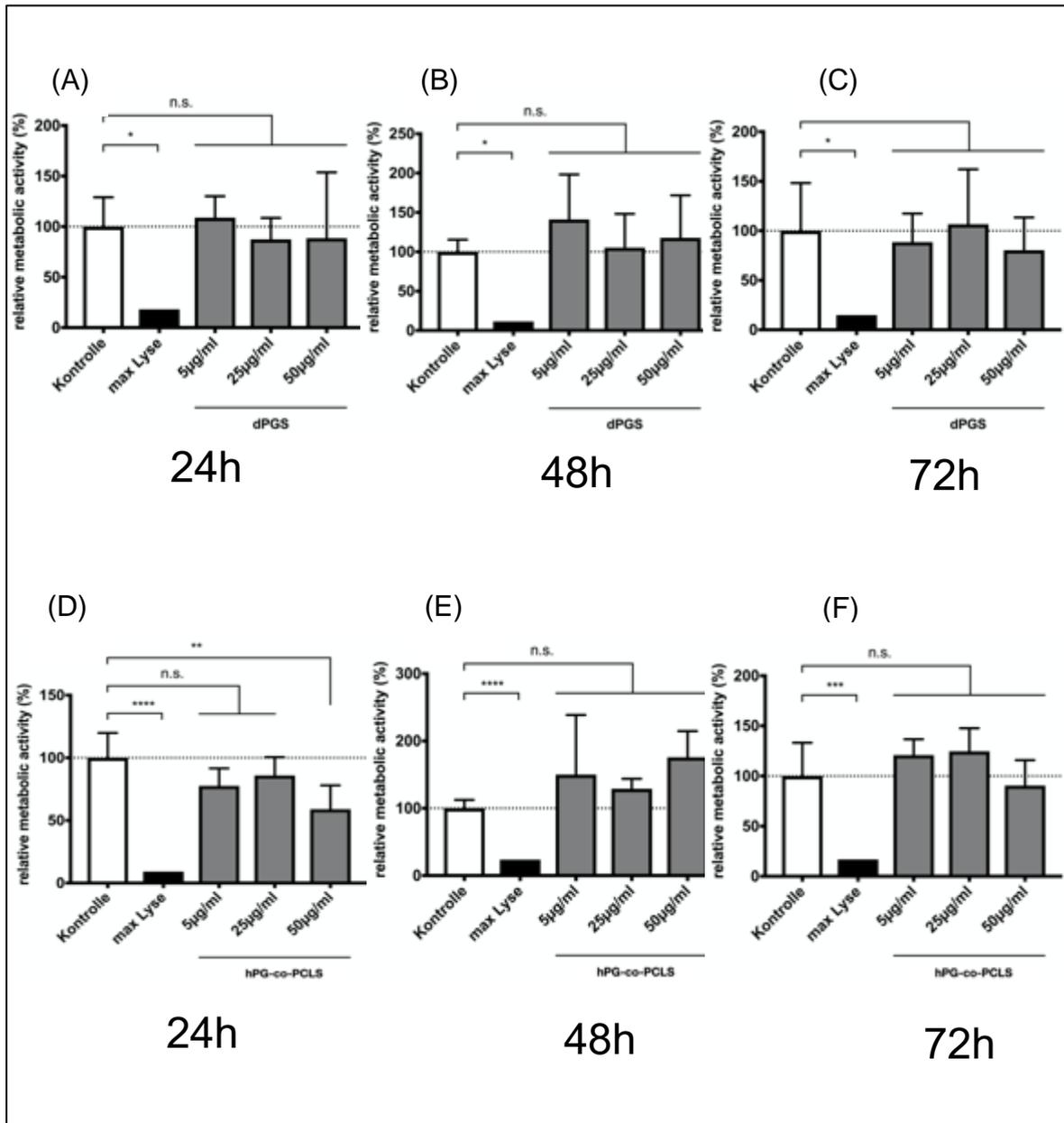


Abbildung 18: Auswertung des MTT-Assays

Darstellung der metabolischen Aktivität in % nach Applikation der Nanocarrier dPGS (A-C) und h(PG-co-PCL)S (D-F) mittels MTT Assay; Kontrolle: Zellen ohne Exposition mit Nanocarrier; max.Lyse: maximale Lyse; n.s : nicht signifikant; * $p < 0,001$; ** $p = 0,0052$ *** $p < 0,00001$; (ANOVA ;multiples Testen nach Dunnetts); die gestrichelte Linie zeigt den Kontroll-und Bezugswert von unbehandelten immortalisierten gingivalen Epithelzellen; Anzahl der technischen Replikate $n = 4$

Die Inkubation der OKG4-Zellen mit dem dPGS-NC (Abb. 20, A-C) einerseits, zeigte für keinen Zeitpunkt und keine der drei angewandten Konzentrationen einen Einfluss auf die metabolische Aktivität der Epithelzellen. Es war eine nicht signifikante Reduktion der metabolischen Aktivität nach 24 h für die dPGS-NC-Konzentrationen 25 µg/ml und 50 µg/ml und nach 72 h-Inkubationszeit für die Konzentrationen 5 µg/ml und 50 µg/ml zu erkennen. Nach 24 h ($c = 5 \mu\text{g/ml}$), 48 h (für alle Konzentrationen) und 72 h ($c = 25 \mu\text{g/ml}$) waren Steigerungen der metabolischen Aktivität zu erkennen, welche sich als nicht signifikant erwiesen. Andererseits bei Inkubation der oralen Epithelzellen mit dem h(PG-co-PCL)S-NC (Abb. 20, D-F), zeigte sich nach 24 h-Inkubationszeit für alle angewandten Konzentrationen eine Reduktion der metabolischen Aktivität, welche bei der höchsten Konzentration ($c = 50 \mu\text{g/ml}$) signifikant (** $p = 0,0052$) war. Nach einer Inkubationszeit von 48 h war die relative metabolische Aktivität der OKG4-Zellen für alle angewandten Konzentrationen erhöht (nicht signifikant), ein Effekt, der nach weiteren 24 h kompensiert werden konnte. Nach 72 h-Inkubation mit dem h(PG-co-PCL)S-NC war die metabolische Aktivität der Epithelzellen mit den Konzentrationen $c = 5 \mu\text{g/ml}$ und $c = 25 \mu\text{g/ml}$ erhöht (nicht signifikant) und für die höchste Konzentration $c = 50 \mu\text{g/ml}$ reduziert (nicht signifikant).

Beide angewandten Nanocarrier zeigten bis auf eine Ausnahme (h(PG-co-PCL)S nach 24 h, $c = 50 \mu\text{g/ml}$) keinen Einfluss auf die Zellviabilität.

4 Diskussion

Die Therapie oraler Entzündungserkrankungen ist aufgrund der physikalischen (z.B. pH-Wert, Temperatur) und physischen Gegebenheiten im Mundraum (z.B. Speichel, Bewegung der Zunge beim Kauvorgang) limitiert. Parodontitis ist die 6. häufigste Erkrankung des Menschen (Kassebaum et al., 2014) und zählt mit oralem Lichen planus zu den häufigsten Erkrankungen der Mundhöhle (Cholmakow-Bodechtel et al., 2016, Ismail et al., 2007, Kassebaum et al., 2014, Shavit et al., 2020, Dommisch and Schmidt-Westhausen, 2021).

Besonders bei schweren Krankheitsverläufen wird häufig auf die systemische Gabe von Medikamenten zurückgegriffen (Feres et al., 2015, Mollen et al., 2017, Pretzl et al., 2019, Shavit et al., 2020). Die Verteilung des Medikaments im Körper ist besser und es werden Mikroorganismen erreicht, die über den Blutkreislauf im gesamten Körper verteilt sind (Feres et al., 2015, Mombelli, 2012). Allerdings variiert die Konzentration des Medikaments in den unterschiedlichen Bereichen des Körpers und es kann zu systemischen Nebenwirkungen, allergischen Reaktionen oder Resistenzentwicklungen kommen. Darüber hinaus ist bei systemischer Gabe von Medikamenten eine gute Mitarbeit der Patienten nötig (Jepsen and Jepsen, 2016). Viele Therapieansätze bei oralen Entzündungserkrankungen basieren deshalb bereits auf dem Prinzip der topischen Applikation von Medikamenten, um systemische Nebenwirkungen zu reduzieren.

In der Parodontitistherapie sind in den letzten Jahren zahlreiche topische Ansätze erforscht und entwickelt worden. Diese reichen von in die Zahnfleischtasche applizierten Gelen (z.B. Metronidazolgel), Agaroseplättchen (z.B. Perio-Chip[®]) über Tetracyclinfäden (Actisite[®] - in Deutschland nicht mehr verfügbar), etc. (Goodson et al., 1979, Greenstein and Tonetti, 2000, Herrera et al., 2020). Diese Therapieansätze sollen die Entfernung der parodontalen Pathogene und eine Modulation der Immunantwort bewirken, indem diese direkt in den parodontalen Sulkus eingebracht werden und lokal eine Wirkung entfalten (Al-Khureif et al., 2020, Greenstein and Tonetti, 2000, Prietto et al., 2020, Sanz et al., 2020). Die Wirksamkeit lokal applizierter Medikamente wurde vor allem in der Behandlung von Parodontitis als Therapieansatz in zahlreichen

Studien erforscht (Goodson et al., 1979, Greenstein, 2006, Park et al., 2013). Die klinische Relevanz der topisch-applizierbaren Medikamente bezüglich einer Reduktion der Sondierungstiefe wird dabei oftmals als gering eingestuft (Feres et al., 2015, Greenstein, 2006, Herrera et al., 2020). Hinzu kommt, dass deren Anwendung mit erhöhtem Zeitaufwand, hohen Kosten und einer guten Patientencompliance verbunden ist und deshalb im klinischen Praxisalltag selten genutzt wird (Eickholz, 2010). Aus diesem Grund gilt bei der Therapie einer Parodontitis immer noch die nicht-chirurgische Entfernung des subgingivalen Biofilms mit Hand- und/oder Ultraschallinstrumenten als effektivste Therapie im Hinblick auf die Reduktion des klinischen Attachmentverlustes (Greenstein and Tonetti, 2000, Suvan et al., 2020). Patienten mit Parodontitis müssen lebenslang betreut und therapiert werden (Ramseier et al., 2019, Sanz et al., 2020).

Auch bei anderen oralen Entzündungserkrankungen wie dem oralen Lichen planus oder dem bullösen Schleimhautpemphigoid ist zwar eine topische Therapie mittels cortisonhaltiger Salben (z.B. Volon-A-Haftsalbe) möglich, aber aufgrund der physischen Gegebenheiten der Mundhöhle (s.o.) nur in hohen Dosen effektiv genug (Al-Hashimi et al., 2007). Eine Therapie, welche langfristig wirksam ist, existiert momentan nicht und Patienten leiden lebenslang an den Symptomen und Folgen der Erkrankung.

Deshalb sind Nanocarrier, welche topisch appliziert werden und ein verbessertes Drug-Targeting ermöglichen, ein vielversprechender Therapieansatz bei oralen Entzündungserkrankungen (Freitas, 2000). Nanocarrier werden bereits in der Dermatologie (Papakostas et al., 2011), Ophthalmologie (Diebold and Calonge, 2010) und in der Tumorthherapie (Dias et al., 2020) eingesetzt (Hafner et al., 2014) und zeigen dort einen deutlichen Therapieerfolg. Es wurde gezeigt, dass Nanocarrier am Ort der Applikation verbleiben (Bioadhäsion) und in orales Gewebe penetrieren können (Jager et al., 2018). Damit wurde bei der Anwendung in der Mundhöhle lokal eine hohe Konzentration aufrecht erhalten, ohne dass Medikamente durch Speichel oder Sulkusfluid verdünnt oder weggespült werden konnten (Carrouel et al., 2020). Studien, welche Nanocarrier als Medikamententräger untersuchten, zeigten,

dass die Konzentration am Wirkungsort bis zu 11 % höher war als die herkömmlicher Trägersysteme (Du et al., 2016, Jager et al., 2018, Reimann et al., 2017). Für die Therapie oraler Entzündungserkrankungen könnten Nanocarrier zum Einsatz kommen, welche aufgrund der chemischen Struktur bereits anti-inflammatorisch wirken und zusätzlich in der Lage sind antimikrobielle und anti-inflammatorische Medikamente zu transportieren (Ferraro et al., 2018, Jain and Thareja, 2019, Reimann et al., 2017, Sousa-Herves et al., 2015).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, das Potential des Polymers dPGS sowie dessen Derivats h(PG-co-PCL)S in Grundlagenexperimenten *ex vivo* und *in vitro* explorativ zu untersuchen.

4.1 Limitationen der eingesetzten Methoden

4.1.1 Penetrationsverhalten von dPGS und h(PG-co-PCL)S *ex vivo*

Die Franz-Diffusions-Zelle gilt als etablierter Versuchsaufbau, um Penetration und Adhäsion von Substanzen (Du et al., 2016, Jain and Thareja, 2019, Roblegg et al., 2012) *ex vivo* zu untersuchen. Das Gewebe wird während eines Versuchs über einen langen Zeitraum (4-6 h) auf konstanter Temperatur von 37 °C gehalten und kontinuierlich mit Flüssigkeit umspült, um ein Austrocknen des Gewebes zu verhindern (Roblegg et al., 2012).

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Modell nach dem Prinzip der Franz-Zelle aus mehreren Gründen nachgestellt. Die Wahl einer Penetrationszeit von maximal 5 min und das Umspülen der Probenunterseite mit PBS während des Versuchs, konnte ein Austrocknen der Mukosa verhindern. Die sehr kurzen Versuchszeiten der präklinischen Studie wurden mit Hinblick auf eine zukünftige Anwendung in der Zahnmedizin gewählt, da hier immer der Patientencomfort garantiert und eine erleichterte Anwendung für den Behandler realisiert werden muss. Dafür ist es erforderlich, dass das Aufbringen und die Adhäsion eines Medikamententrägersystems in möglichst kurzer Zeit in ausreichendem Maße gelingen.

Ein anderer Grund für das Nachstellen des Franz-Zell Modells war, dass für den Versuchsaufbau der vorliegenden Arbeit im Vergleich zur Verwendung einer Franz-Zelle kleinere Gewebestücke für die Versuchsdurchführung ausreichend waren und dadurch sehr sparsam gearbeitet werden konnte.

Für die Penetrationsuntersuchung wurde porcines Mukosagewebe eingesetzt, weil es so möglich war von einem Spender genügend Gewebe zu entnehmen. Zur Reduktion von Tierversuchen wurde in dieser Arbeit ein *ex vivo*-Modell etabliert, das kurz zuvor von euthanisierten Tieren gewonnen werden konnte. Weiterhin ist der Aufbau der oralen Schleimhaut des Schweines dem des Menschen sehr ähnlich, sodass die erhaltenen Ergebnisse zumindest teilweise auf humanes Gewebe übertragen werden konnten (Kumar et al., 2014).

Für die Untersuchungen wurden zunächst Spendergewebe von drei Tieren verwendet, um grundsätzlich die Penetrationseigenschaften der dPGS-Nanocarrier an oraler Mukosa zu charakterisieren. Für zukünftige Versuche muss die Testgruppe erhöht werden, um eindeutige Aussagen diesbezüglich treffen zu können. Zukünftige Versuchsaufbauten könnten außerdem der Fragestellung nachgehen, inwiefern die Penetrationseigenschaften durch irritierte Mukosa beeinflusst werden. Denkbare Modelle wären *ex vivo*-Versuche mit humanem Gewebe (Bsp. Einfluss Rauchen oder Tumorgewebe) und *in vivo*-Vergleiche mit gesunder und erkrankter Mukosa (Alnasif et al., 2004).

Die Auswertung und Darstellung der Ergebnisse aus dem Penetrationsversuch erfolgte durch Messung der unterschiedlichen Grauwerte in den einzelnen Epithelschichten der Mukosa, um die Intensität des Fluoreszenzfarbstoffes Rhodamin-B zu quantifizieren (Rancan et al., 2017a). Damit sollte versucht werden, eine Gegenüberstellung der Penetrationseigenschaften der Nanocarrier in den zwei unterschiedlichen Qualitäten der Schleimhaut (mastikatorisch und auskleidend) zu ermitteln. Die Auswertungsmethode zeigte Limitationen und die Aussagekraft der Ergebnisse kann nur als Tendenz betrachtet werden. Die Bildaufnahme mit dem CLSM ermöglichte ein Durchscannen durch die einzelnen Epithelschichten und kreierte dadurch ein dreidimensionales Bild. Das Fotografieren und die spätere Auswertung mit ImageJ ermöglichte allerdings nur ein zweidimensionales Bild, wodurch das

exakte Penetrationsverhalten des Nanocarriers in die orale Mukosa nicht vollständig abgebildet werden konnte. Eine andere Methode, welche für die Detektion Fluoreszenz-gelabelter-Nanocarrier denkbar wäre, ist die Fluoreszenz-lebensdauer-Mikroskopie (engl. Fluorescence- lifetime- imaging microscopy; FLIM) (Alexiev et al., 2017). FLIM ermöglicht eine hochsensitive Unterscheidung zwischen fluoreszenzmarkiertem dPGS/h(PG-co-PCL)S und vorhandener Hintergrundfluoreszenz, welches die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unter dem CLSM noch einmal mehr präzisieren könnte (Boreham et al., 2015). Mit der FLIM-Methode kann eine Quantifizierung der an Nanocarriergekoppelten Fluoreszenzpartikel mit entsprechenden Referenzwerten errechnet werden (Alexiev et al., 2017, Leite-Silva et al., 2013). Des Weiteren ist zu erwähnen, dass die Ergebnisse mit den Farbstoff-gelabelten Nanocarriern nicht 1:1 mit denen von nicht-gelabelten-Nanocarriern übereinstimmen könnten. Dies muss in weiteren Untersuchungen evaluiert werden.

Des Weiteren könnten die Penetrationseigenschaften und die Fähigkeit der Biodegradierbarkeit der dPGS-NC hinsichtlich äußerer Bedingungen, wie veränderter pH-Wert geänderte Ladung der Nanocarrier und irritierter Haut mit der FLIM-Methode untersucht werden (Achazi et al., 2020).

Für eine erste Aussage zur Penetrationsfähigkeit der Nanocarrier war die Untersuchung mittels CLSM dahingegen ausreichend.

4.1.2 Einfluss von dPGS- und h(PG-co-PCL)S-NC auf immortalisierte orale Epithelzellen

Die Untersuchung einer durch die Nanocarrier ausgelöste Entzündungsreaktion wurde mittels qRT-PCR auf oralen immortalisierten Epithelzellen evaluiert.

Die qRT-PCR besitzt im Gegensatz zur ursprünglichen PCR den Vorteil, dass die Quantität der gebildeten PCR-Produkte mithilfe eines Fluoreszenzfarbstoffs (SYBR Green) ermittelt werden kann (Bustin and Mueller, 2005). Die Methode der qRT-PCR ist weniger fehleranfällig, da eine Detektion der amplifizierten DNA direkt während der PCR in der Maschine stattfindet. Dahingegen kann es bei der herkömmlichen PCR durch Öffnen der Tubes oder das Beladen der Agarosegele zu Kreuzkontaminationen kommen (Bustin and Mueller, 2005,

Heid et al., 1996). In der vorliegenden Arbeit wurden die Primer von IL-1 β und IL-6 verwendet, um zu untersuchen, ob diese nach Inkubation der Nanocarrier hochreguliert wurden, was auf eine Entzündungsreaktion hindeuten könnte. Das Referenzgen war Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), welches neben β -Actin zu den am häufigsten verwendeten Referenzgenen in der qRT-PCR zählt (Barber et al., 2005). IL-1 β wird von den gingivalen Epithelzellen gebildet und nimmt eine zentrale Rolle im Entzündungsgeschehen ein, da es zahlreiche andere Zytokine reguliert. Eskan et al. zeigten, dass durch die Hemmung des Toll-Like-4 Rezeptors und des IL-1 β -Rezeptors die Immunantwort vermindert ausfiel und andere Zytokine, wie TNF- α , IL-6 und IL-8 weniger exprimiert wurden (Eskan et al., 2008). Dadurch ist anzunehmen, dass bei einer erhöhten Expression von IL-1 β auch andere Zytokine vermehrt auftreten (Groeger and Meyle, 2015). Neben IL-1 β spielt das Zytokin IL-6 eine wichtige Rolle im Entzündungsgeschehen der oralen Mukosa (Achazi et al., 2020, Groeger and Meyle, 2015, Irwin and Myrillas, 1998). Es spielt eine Schlüsselrolle in der T- und B-Zell-Differenzierung, sowie der Aktivierung von Akute-Phase-Proteinen (Irwin and Myrillas, 1998). Im nicht-entzündeten Zustand einer Zelle liegt IL-6 in Vesikeln verpackt vor und wird erst auf einen Stimulus hin ausgeschüttet, z.B. bei Aktivierung des Immunsystems durch IL-1 β oder TNF- α (Bartold and van Dyke, 2013, Irwin and Myrillas, 1998, Stolte et al., 2020).

Die Zytokine IL-1 β und IL-6 sind primär nachweisbar in entzündetem oralen Epithel (Groeger and Meyle, 2015, Yang et al., 2003) und wurden deshalb in der vorliegenden Arbeit verwendet, um erste Erkenntnisse hinsichtlich einer potentiellen Immunantwort auf die Inkubation der Nanocarrier zu gewinnen. Dabei konnte zudem gezeigt werden, dass beide Zytokine auch in sehr geringer Konzentration im nicht-entzündeten Zustand von oralen Epithelzellen exprimiert wurden. Dies galt vor allem für das Zytokin IL-1 β (s.u.).

Für zukünftige Untersuchungen müssen weitere Zytokinexpressionen, wie die von TNF- α , IL-8 oder die Expression des Prostaglandins E₂ validiert werden, um abschließende Erkenntnisse über eine potentielle Entzündungsreaktion zu erreichen. Die ermittelten Ergebnisse der Nanocarrier an oralen Epithelzellen

bestätigen frühere Untersuchungen bezüglich einer potentiellen Entzündungsreaktion der Zellen (Ferraro et al., 2018, Reimann et al., 2017) und könnten weiterhin auf Proteinebene mit dem ELISA-Verfahren untersucht werden (Silberreis et al., 2019b).

4.1.3 Limitationen der Methodik – MTT Assay

Der colorimetrische MTT-Assay ist ein schnelles, einfaches und präzises Verfahren, um Substanzen auf deren Zytotoxizität, Zellproliferation und Aktivierung hin zu untersuchen, indem die metabolische Aktivität von Zellen gemessen wird (Mosmann, 1983). Die Messung der mitochondrialen Aktivität bzw. der Zellviabilität nach Stimulation mit einer Substanz ist damit eine etablierte Methode für die Überprüfung der Biokompatibilität (Kumar et al., 2018, Mosmann, 1983, Suh et al., 2009). In der vorliegenden Arbeit wurde der Assay pro Nanocarrier unter Verwendung vier technischer Replikate durchgeführt. Dies lässt ausschließlich eine Tendenzaussage über die vorliegenden Ergebnisse zu und muss in weiteren Experimenten für eine abschließende statistische Aussage evaluiert werden.

Weitere Untersuchungen, die in Bezug auf eine potentielle Proliferation von oralen Epithelzellen oder Zytotoxizität durch dPGS-NC durchgeführt werden könnten, wäre der Bromdesoxyuridin-Assay oder der Lactatdehydrogenase-Assay. In dieser Arbeit wurde der MTT-Assay gewählt, da mit hoher Sensitivität eine schnelle und suffiziente erste Aussage über die Zytotoxizität der angewandten Nanocarrier dPGS und h(PG-co-PCL)S getroffen werden konnte (Kumar et al., 2018).

4.1.4 Verwendung immortalisierter Zelllinien

Für die oben genannten *in vitro*-Untersuchungen mit den Nanocarriern dPGS und h(PG-co-PCL)S, wurden immortalisierte gingivale Epithelzellen verwendet. Deren Verwendung ist aufgrund deren unbegrenzter Teilungsfähigkeit unter Erhalt der ursprünglichen Zellmorphologie ohne Anzeichen eines Alterungsvorgangs ein in der Wissenschaft etablierter Ansatz (Dickson et al.,

2000, Diebold and Calonge, 2010, Schmitz, 2020, Stolte et al., 2020, Suh et al., 2009). Dadurch kann z.B. garantiert werden, dass Versuche, die über einen langen Zeitraum durchgeführt werden, mit derselben Zelllinie etabliert werden können. Dahingegen sind Primärzellen direkt aus Spenderorganismen gewonnen und kultiviert. Diese können nur über einen begrenzten Zeitraum für Versuche verwendet werden, da deren Lebensdauer der natürlichen Anzahl an Zellteilungszyklen unterliegt. Aus diesem Grund ist deren Kultivierung für eine bestimmte Anzahl an Passagen limitiert. Im Vergleich zu immortalisierten Zellen sind primäre Zellen nicht transformiert. Deren Zellmorphologie entspricht deren im Organismus und deren Reaktion, z.B. auf eine hinzugefügte Substanz (z.B. Nanocarrier), gleicht der unter *in vivo*-Bedingungen (Schmitz, 2020). Die Ergebnisse der angewandten Versuchsaufbauten könnten dadurch von denen mit primären Zellen abweichen. Für eine erste explorative Aussage war die Versuchsdurchführung mit immortalisierten Zellen jedoch ausreichend.

4.2 Wirkungsweise der dPGS- und h(PG-co-PCL)S-NC auf oraler Mukosa und in oralen Epithelzellen

4.2.1 Unterschiede im Penetrationsverhalten

In vorherigen Studien wurde bereits gezeigt, dass dendritisches Polyglycerolsulfat (dPGS), sowie dessen Derivat, das hochverzweigte Poly(glycerol-co-caprolactone)sulfat (h(PG-co-PCL)S), ein ausreichendes Penetrationsverhalten in die Haut aufweisen (Küchler et al., 2009, Pischon et al., 2017, Radbruch et al., 2017). Eine Untersuchung der Penetrationseigenschaften von dPGS-NC auf oraler Mukosa erfolgte bisher noch nicht und wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit erstmalig durchgeführt.

Die Auswertung der Penetrationsuntersuchungen der dPGS- und h(PG-co-PCL)S-NC wiesen darauf hin, dass beide Substanzen fähig sind, das orale Epithel gesunder Mukosa zu überwinden und in geringer Konzentration in tiefere viable Epithelschichten bis ins *Stratum basale* vorzudringen. Nach der maximalen Inkubationszeit von 5 min konnten die Nanocarrier nur in geringsten Mengen in der *Lamina propria* nachgewiesen werden. Dies gab einen Hinweis

darauf, dass die Basalmembran in dieser kurzen Inkubationszeit ausreichend als Barriere wirkt. Ergebnisse aus Untersuchungen mit deutlich längeren Inkubationszeiten bestätigten diese Beobachtung auch für andere Nanocarrier-Systeme (Jager et al., 2018, Papakostas et al., 2011, Rancan et al., 2017b).

Des Weiteren adhärten beide Nanocarrier an mastikatorischer Mukosa im *Stratum corneum* und konnten nur in sehr geringem Maße in tiefere viable Epithelschichten vordringen. Beim Vergleich der beiden Nanocarrier fiel auf, dass der dPGS-NC nach 1 min Inkubationszeit in tieferen viablen Epithelschichten höher quantifiziert werden konnte als dessen Derivat. Der h(PG-co-PCL)S-NC konnte dahingegen nach 5 min besser in tieferen viablen Epithelschichten nachgewiesen werden. Demnach ist anzunehmen, dass bei der Anwendung des dPGS-NC bereits 1 min ausreicht, um in tiefere Epithelschichten der mastikatorischen Mukosa vorzudringen. Dahingegen benötigte dessen Derivat mindestens 5 min, um in tieferen viablen Epithelschichten in etwa derselben Menge nachgewiesen werden zu können.

Das *Stratum corneum* gilt als größtes Penetrationshindernis bei der topischen Applikation von Medikamenten (Bouwstra and Honeywell-Nguyen, 2002). Alnasif und Mitarbeiter erkannten, dass Lipide oder Proteine im *Stratum corneum* zu Interaktionen mit den verwendeten Core-Multishell-Nanocarriern führten und deren Eigenschaften als Medikamententransporter verändern können (Alnasif et al., 2004). Die verwendeten Nanocarrier verblieben für 6 h im *Stratum corneum* und konnten erst nach 24 h-Einwirkzeit in tieferen viablen Epithelschichten nachgewiesen werden. Daraufhin wurden Versuche mit artifiziell beschädigter Haut durchgeführt. Dort konnte gezeigt werden, dass die verwendeten Nanocarrier bereits nach einer Einwirkzeit von 6 h in tieferen viablen Epithelschichten nachgewiesen werden konnten. Dies bestätigte einerseits die hohe Effektivität des *Stratum corneum* als natürliche Barriere der Haut vor Eindringen von Fremdstoffen, andererseits aber auch die Schwierigkeit für Medikamententräger-Systeme, diese zu überwinden (Alnasif et al., 2004). Jager und Mitarbeiter zeigten allerdings, dass trotz der Barriere des *Stratum corneums* die Menge eines Medikamentes mittels Nanocarrier-vermittelter Applikation deutlich besser freigesetzt wurde als nach Applikation

des Medikamentes in einer Creme (Jager et al., 2018). Dies zeigte, dass bereits eine ausreichende Adhäsion eines Trägersystems zu verbessertem Medikamententransport führte (Kumar et al., 2014).

Der in der vorliegenden Arbeit verwendete dPGS-NC konnte sowohl auflagernd, als auch in tieferen *Strati* der oralen Mukosa nachgewiesen werden und zeigte damit ein Adhäsions- und Penetrationsverhalten. Tendenziell weist der dPGS-NC bessere Penetrationseigenschaften innerhalb kurzer Penetrationszeit bezüglich der Quantität (relative grey level) in tieferen viablen Epithelschichten auf als dessen Derivat h(PG-co-PCL)S (Tab. 1). Das Polymerisationsverfahren des h(PG-co-PCL)S-NCs (Du et al., 2016, Ferraro et al., 2018) unterscheidet sich grundsätzlich von dem des dPGS-NCs (Calderón et al., 2010, Reimann et al., 2017). Für dPGS war es möglich, ein relativ kleines Polymer mit einem Molekulargewicht von 5000 g/mol zu entwickeln. Dies war für h(PG-co-PCL)S aufgrund des eingesetzten Verfahrens nicht möglich, wodurch ein Polymer entstand, das in etwa dem dreifachen durchschnittlichen Molekulargewicht von dPGS entsprach (Calderón et al., 2010, Ferraro et al., 2018). Das Penetrationsverhalten von Nanopartikeln hängt sowohl von deren Größe, als auch von deren Oberflächeneigenschaften ab (Ai et al., 2011). Das dye-loading, also der Wert, der angibt in welchem Grad das Polymer mit Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt war, zeigte, dass das Polymer dPGS mit der dreifachen Menge an Rhodamin-B gekoppelt werden konnte im Vergleich zu dessen Derivat h(PG-co-PCL)S.

Sowohl das höhere Molekulargewicht, als auch die niedrigere Kopplung mit Fluoreszenzfarbstoff, könnten eine Erklärung für das geringere Fluoreszenzsignal der Penetrationsuntersuchung mit h(PG-co-PCL)S im *ex vivo*-Modell sein. Für weitere Experimente wäre es denkbar, ein dPGS-Polymer zu synthetisieren, das ein vergleichbares Molekulargewicht mit ähnlicher Fluoreszenzkopplung zu h(PG-co-PCL)S aufweist, um das Penetrationsverhalten der beiden Derivate noch präziser miteinander vergleichen zu können.

Die Penetrationsuntersuchung von reinem Rhodamin-B wurde im Rahmen einer anderen Dissertation aus unserer Abteilung durchgeführt und zeigte, dass der

Fluoreszenzfarbstoff in der hier angewendeten Konzentration nicht adhärierte und/oder penetrierte.

Zusammengefasst konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die Nanocarrier dPGS und h(PG-co-PCL)S in orale Mukosa penetrierten. Die Auswertung weist zusätzlich eine Tendenz auf, dass die Nanocarrier stärker in auskleidende Mukosa penetrierten. Die Nanocarrier zeigten zwar auch in mastikatorischer Mukosa ein Penetrationsverhalten, wobei jedoch der Großteil der Nanocarrier im *Stratum corneum* verblieb.

Damit konnte die Arbeitshypothese nach graphischer Darstellung und statistischer Analyse bestätigt werden.

4.2.2 Immunantwort von OKG4-Zellen auf dPGS- und h(PG-co-PCL)S-NC

Um zu überprüfen, ob die Nanocarrier dPGS und h(PG-co-PCL)S eine potentiell inflammatorische Wirkung im gesundem Gewebe zeigen, wurden orale Keratinozyten der Gingiva (OKG4) auf eine vermehrte Expression pro-inflammatorischer Mediatoren nach Nanocarrier-Inkubation untersucht. Epithelzellen der Gingiva sind in der Lage, pro-inflammatorische Zytokine zu produzieren (Dommisch et al., 2012, Dommisch et al., 2015, Eskin et al., 2008, Stolte et al., 2020).

Es wurde gezeigt, dass der dPGS-NC eine tendenzielle Reduktion von Immunzytokinen bewirkte. Dies konnte vor allem für die Zytokinexpression von IL-1 β beobachtet werden. Inkubierten die dPGS-NC für 3 h, 6 h oder 12 h in orale Epithelzellen, war die Zytokinexpression von IL-1 β für alle angewandten Konzentrationen signifikant weniger exprimiert. Dies deutete auf eine Regulation des pro-inflammatorischen Zytokins IL-1 β durch den dPGS-NC hin. Bei der Inkubation mit dem h(PG-co-PCL)S-NC war nur teilweise eine reduzierte Expression von IL-1 β zu beobachten (Tendenz zur Signifikanz).

Die Reduktion pro-inflammatorischer Zytokine durch die dPGS-NC bestätigte Ergebnisse aus vorangegangenen Versuchen mit humanem Serum, in denen eine Hemmung der Komplementaktivierung durch dPGS-NC nachgewiesen werden konnte (Ferraro et al., 2018, Reimann et al., 2015, Türk et al., 2004). Das anti-inflammatorische Potential des dPGS- und h(PG-co-PCL)S-NCs wurde

in zahlreichen Versuchen bereits untersucht (Dernedde et al., 2010, Ferraro et al., 2018, Reimann et al., 2017, Silberreis et al., 2019b, Türk et al., 2004, Weinhart et al., 2011a). Die Bindungsaffinität von dPGS-NC an positiv geladenen Proteinen wie C3, C5 oder L-/P-Selektin, führte zu einer reduzierten Immunantwort (Dernedde et al., 2010, Silberreis et al., 2019b).

Die Ergebnisse zur Expression des Zytokins IL-6 müssen kontrovers diskutiert werden. IL-6 wurde als zu untersuchendes Zytokin gewählt, da es signifikant erhöht sezerniert wird, sobald eine Entzündung provoziert wird (Groeger and Meyle, 2015, Hajishengallis, 2014, Irwin and Myrillas, 1998). Im nicht-entzündeten Zustand liegt das Zytokin in Vesikeln verpackt vor und ist nur sehr gering nachweisbar (Irwin and Myrillas, 1998). Dies konnte in der vorliegenden Arbeit anhand der sehr hohen Ct-Werte in OKG4-Zellen nachgewiesen werden. Das Zytokin IL-6 erreichte im Durchschnitt Ct-Werte von 30 oder höher.

Die scheinbar tendenziell erhöhten Zytokinexpressionen nach Nanocarrier-Inkubation müssen angesichts der sehr hohen Δ Ct-Werte diskutiert werden. Wird der Ct-Wert innerhalb der 40 durchlaufenden Zyklen der qRT-PCR (Bustin and Mueller, 2005) erst in einem späten Zyklus erreicht, zeigt dies, dass die Genexpression des untersuchten Gens sehr schwach ausgeprägt war. Dies lag daran, dass die qRT-PCR mit einer sehr geringen Menge an Template-cDNA sehr spät angelaufen war und erklärt damit die durchschnittlich hohen Schwellenwertzyklen in der Untersuchung der IL-6-Expression. Dies bedeutet, dass nur eine sehr geringe Menge an IL-6 in der untersuchten RNA vorhanden war. Dementsprechend müssten weitere Untersuchungen auf Proteinebene (ELISA) durchgeführt werden, um die erhaltenen Ergebnisse zu verifizieren. Dies wird in einer aktuell laufenden Doktorarbeit bereits evaluiert (nicht-publizierte Ergebnisse). Angesichts der vorliegenden Ergebnisse ist dennoch anzunehmen, dass die Nanocarrier dPGS und h(PG-co-PCL)S tendenziell keine pro-inflammatorische Wirkung in oralen Epithelzellen zeigten.

Obwohl es wichtig ist, eine Entzündungsantwort auf die Nanocarrier-Inkubation in oraler Mukosa wie oben beschrieben anhand weiterer Zytokinexpressionen auszuschließen, wäre es ebenfalls sinnvoll, mithilfe eines Entzündungsmodells das anti-inflammatorische Potential der dPGS-NC an oralen Epithelzellen zu

untersuchen. Ergebnisse, die in unserer Arbeitsgruppe diesbezüglich evaluiert wurden, zeigten die zum Teil anti-inflammatorische Wirkung der dPGS-NC in einer Dosisabhängigkeit (nicht-publizierte Ergebnisse).

4.2.3 Zytotoxizität der Nanocarrier *in vitro*

Der dPGS-NC und dessen Derivat h(PG-co-PCL)S zeigten in bisherigen Versuchen an epithelialen Zelllinien, keinen bis sehr geringen Einfluss auf die Zellviabilität (Ferraro et al., 2018). Im Rahmen dieser Arbeit wurden diese Untersuchungen erstmals an humanen oralen Keratinozyten der Gingiva (OKG4) durchgeführt.

Bis auf eine Ausnahme zeigten beide dPGS-Derivate keinen Einfluss auf die Zellviabilität. Nach 24 h-Inkubation mit dem h(PG-co-PCL)S-NC ($c = 50 \mu\text{g/mL}$) wurde die Zellviabilität im Vergleich zur Kontrolle ($p = 0,0052$) reduziert. Dafür gibt es zwei Erklärungsmöglichkeiten:

1) Die Teilungsrates oralen Epithelzellen ist im Vergleich zur dermalen Epidermis erhöht und weist ein hohes Regenerationspotential auf (Papagerakis et al., 2014). Es wurde angenommen, dass der h(PG-co-PCL)S-NC nach 24 h noch nicht vollkommen metabolisiert wurde und die Reduktion der Zellviabilität auf ein erhöhtes Stresslevel hinwies, dem die OKG4-Zellen unter Einfluss des h(PG-co-PCL)S-NCs ausgesetzt waren. Unter dieser Annahme wäre es nachvollziehbar, weshalb nach 48 h und 72 h keine signifikante Reduktion der Zellviabilität stattfand. Nach 48 h bzw. 72 h regenerierten genügend Zellen und konnten somit den Nanocarrier verstoffwechseln. Um dies genauer zu evaluieren, sind weitere Versuche notwendig.

2) Die Größe des Nanocarriers selbst ist entscheidend für mögliches zytotoxisches Verhalten. Der Einfluss einer Substanz auf die Viabilität von Zellen ist unter anderem abhängig von dessen Molekulargewicht, der chemischen Reaktionsfähigkeit und der Metabolisierung im applizierten Organismus (Ai et al., 2011, Ferraro et al., 2018). Der h(PG-co-PCL)S-NC wies das dreifache Molekulargewicht des dPGS-NC auf und könnte deshalb in der höchsten eingesetzten Konzentration ($c = 50 \mu\text{g/ml}$) eine reduzierte Zellviabilität bewirken.

Kumar und Mitarbeiter diskutierten, dass größere Partikel eine deutlich höhere Zytotoxizitätsrate bewirken als kleinere Partikel (Kumar et al., 2014). Die Ergebnisse mit dem dreifach größeren Nanocarrier h(PG-co-PCL)S im Vergleich zu den dPGS-NC würden diese Annahme bestätigen. Allerdings wird in vielen wissenschaftlichen Arbeiten das Gegenteil diskutiert. So erhöhte eine Reduktion der Nanopartikelgröße die Toxizität in Lungengewebe (Ai et al., 2011). Dieselben Nanopartikel wirkten weniger toxisch, wenn diese als größere Partikel synthetisiert wurden (Suh et al., 2009). Diese unterschiedlichen Annahmen gilt es in weiteren *in vitro*- Untersuchungen mit den Nanocarriern dPGS und h(PG-co-PCL)S zu evaluieren.

Eine Konzentrations-Wirkungsbeziehung ließ sich mit dem MTT-Assay demnach nicht nachweisen und die Sekundärhypothese bezüglich des Einfluss auf die Zellviabilität durch dPGS- und h(PG-co-PCL)S-NC wurde nur mit dem dPGS-NC bestätigt. Dessen Derivat h(PG-co-PCL)S reduzierte die metabolische Aktivität der Zellen nach 24 h.

4.3 Ausblick und Zusammenfassung

Ist dPGS bzw. h(PG-co-PCL)S zur Verbesserung der topischen Applikation von Medikamenten in der Zahnmedizin geeignet?

Beide Nanocarrier zeigten in vorangegangenen Studien erfolgsversprechende Eigenschaften, um als Drug-Targeting-Systeme eingesetzt zu werden (Ray et al., 2019, Rade et al., 2018, Reimann et al., 2017). Besonders wichtig für die Anwendung in der Zahnmedizin ist eine ausreichende Biokompatibilität und eine schnelle Anhaftung (Adhäsion), sowie das Überwinden der physikalischen Barriere der oralen Mukosa (Penetration). Hier stellt vor allem das rigide *Stratum corneum* der mastikatorischen Mukosa eine Herausforderung für die Entwicklung effektiver Drug-Targeting-Systeme dar.

In diversen Studien wurde bereits gezeigt, dass dPGS-NC die dermale Barriere überwinden und sich im Gewebe anreichern können (Calderón et al., 2010, Ferraro et al., 2018, Kuchler et al., 2009, Rade et al., 2018, Reimann et al., 2017). Oftmals wurden hierfür lange experimentelle Penetrationszeiten verwendet. In der vorliegenden Arbeit wurden der dPGS- und h(PG-co-PCL)S-

NC erstmals auf oraler Schleimhaut mit Versuchszeiten von maximal 5 min auf deren Penetrationsverhalten untersucht. Eine Penetration in orale porcine Mukosa konnte mithilfe des CLSM nachgewiesen werden. Des Weiteren zeigte der dPGS-NC in einem Tiermodell *ex vivo* eine hohe Sensitivität gegenüber molekularen Veränderungen (Reimann et al., 2017) und damit optimale Voraussetzungen für den Einsatz bei oralen Entzündungserkrankungen. Zukünftig müssen weitere humane Modelle, wie rekonstruierte „full-thickness“ 3D-Schleimhautmodelle, aber auch *in vivo*- Versuche durchgeführt werden, um das Penetrationsverhalten dynamisch unter Einfluss einer erhöhten Speichelfließrate oder erhöhten Sulkusfluidmengen hin zu untersuchen. Des Weiteren muss das Penetrationsverhalten auf entzündeter oder erosiv-veränderter Mukosa, wie sie z.B. beim Krankheitsbild des oralen Lichen planus oder des bullösen Schleimhautpemphigoid auftritt, untersucht werden.

Beide Nanocarrier zeigten keine Hochregulation der Zytokine IL-1 β und IL-6 in gesunden Zellen. Dahingegen konnte für den dPGS-NC eine signifikante Reduktion des Zytokins IL-1 β nachgewiesen werden.

Die Nanocarrier dPGS und h(PG-co-PCL)S sind aufgrund deren anti-inflammatorischen Potentials attraktive Kandidaten für eine Anwendung bei entzündlichen Erkrankungen in der oralen Schleimhaut. Das anti-inflammatorische Potential der verwendeten Nanocarrier beruht darauf, dass diese als L-/P-Selektin- und Zytokin-Inhibitoren wirken (Dernedde et al., 2010, Ferraro et al., 2018, Pant et al., 2015, Ray et al., 2019, Reimann et al., 2017, Silberreis et al., 2019a). Es wurde des Weiteren nachgewiesen, dass die L- und P-Selektinhemmung abhängig vom Sulfatierungsgrad des dPGS-NC war und eine dPGS-Vorstimulation von Zellen eine verminderte Immunantwort hervorrief (Dernedde et al., 2010). Um das anti-inflammatorische Potential auf orale Epithelzellen zu übertragen, sind weitere Versuche erforderlich. Dafür könnten geeignete Entzündungsmodelle der humanen oralen Schleimhaut herangezogen werden (Khandare et al., 2010).

Darüber hinaus sind weitere *in vitro*-Versuche erforderlich, um die sensitive Dynamik des Freisetzungsmechanismus von Wirkstoffen unter Bedingungen, die bei entzündlichen Erkrankungen zu finden sind, zu untersuchen. Dazu

gehören ein reduzierter pH-Wert und erhöhte Temperaturen (Achazi et al., 2020, Rancan et al., 2017b, Yamamoto et al., 2016).

Die klinische Umsetzung der Erkenntnisse aus *in vitro*-Versuchen ist bei Nanocarrier vergleichsweise langsam, da bisher einheitliche Richtlinien für Charakterisierungstechniken von Nanocarrier fehlen (Cho et al., 2013).

Die Ergebnisse der *ex vivo*- und *in vitro*-Untersuchungen zeigten, dass der Nanocarrier dPGS und dessen in der Bioabbaubarkeit verbessertes Derivat - h(PG-co-PCL)S - fähig waren, auch in sehr kurzen Zeiten in orale Schleimhaut zu penetrieren. Des Weiteren zeigten diese weder einen Einfluss auf die Regulation der pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 β und IL-6, noch reduzierten diese im gewählten Konzentrationsbereich die metabolische Aktivität oraler Epithelzellen.

Beide Nanocarrier wurden in der vorliegenden Arbeit erstmalig miteinander auf oraler Mukosa und an oralen Epithelzellen verglichen. In Anbetracht der späteren Anwendung in der Zahnmedizin sollte das geeignete Drug-Targeting-System innerhalb kürzester Zeit in orale Mukosa penetrieren. Der dPGS-Nanocarrier zeigte diesbezüglich insgesamt bessere Ergebnisse in auskleidender Mukosa und penetrierte schneller in tiefere viable Schichten der mastikatorischen Mukosa als der h(PG-co-PCL)S-NC. Des Weiteren konnte für dPGS-NC für keine der angewandten Konzentrationen eine reduzierte metabolische Aktivität im Sinne einer möglichen Zytotoxizität evaluiert werden. Ebenfalls konnte für den dPGS-NC eine signifikante Reduktion des pro-inflammatorischen Zytokins IL-1 β an oralen Epithelzellen nachgewiesen werden, was darauf hindeutet, dass der Nanocarrier zusätzlich antiinflammatorisch wirkt. Unter diesen Gesichtspunkten erschien der dPGS-NC geeigneter für eine Anwendung bei oralen Entzündungserkrankungen zu sein.

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Grundlagenexperimente erwiesen die Nanocarrier dPGS und h(PG-co-PCL)S als attraktiv, um zukünftig als Drug-Targeting-System für eine verbesserte topische Applikation von Medikamenten bei oralen Entzündungserkrankungen wie Parodontitis oder oralem Lichen planus eingesetzt zu werden. Diese stellen eine Basis für weitere zielgerichtete Entwicklungen und Verbesserungen der Nanocarrier dar.

5 Literaturverzeichnis

Uncategorized References

- ACHAZI, K., HAAG, R., BALLAUFF, M., DERNEDDE, J., KIZHAKKEDATHU, J. N., MAYSINGER, D. & MULTHAUP, G. 2020. Understanding the Interaction of Polyelectrolyte Architectures with Proteins and Biosystems. *Angew Chem Int Ed Engl*, 132, 2-27.
- AERAN, H., KUMAR, V., UNİYAL, S. & TANWER, P. 2015. Nanodentistry: Is just a fiction or future. *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research*, 5, 207-211.
- AHMED, F., PRASHANTH, S. T., SINDHU, K., NAYAK, A. & CHATURVEDI, S. 2019. Antimicrobial efficacy of nanosilver and chitosan against *Streptococcus mutans*, as an ingredient of toothpaste formulation: An in vitro study. *Journal of Indian Society of Pedodontics and Preventive Dentistry*, 37, 46-54.
- AI, J., BIAZAR, E., JAFARPOUR, M., MONTAZERI, M., MAJDI, A., AMINIFARD, S., ZAFARI, M., AKBARI, H. R. & RAD, H. G. 2011. Nanotoxicology and nanoparticle safety in biomedical designs *International Journal of Nanomedicine*, 6, 1117-1127.
- AL-HASHIMI, I., SCHIFTER, M., LOCKHART, P. B., WRAY, D., BRENNAN, M., MIGLIORATI, C. A., BRUCE, A. J., CARPENTER, W., EISENBERG, E., EPSTEIN, J. B., HOLMSTRUP, P., JONTELL, M., LOZADA-NUR, F. & NAIR, R. 2007. Oral lichen planus and oral lichenoid lesions: diagnostic and therapeutic considerations. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontics*, 103, S25.e1-S25.e12.
- AL-KHUREIF, A. A., MOHAMED, B. A., SIDDIQUI, A. Z., KHAN, A. A. & DIVAKAR, D. D. 2020. Repeated application of photodynamic and antibiotic therapy as an adjunct T to root surface debridement in patients with grade C and stage III or IV aggressive periodontitis. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 29, 1-6.
- ALBUQUERQUE, R., KHAN, Z., POVEDA, A., HIGHAM, J., RICHARDS, A., MONTEIRO, L., JANÉ-SALAS, E., LOPEZ-LOPEZ, J. & WARNAKULASURIYA, S. 2016. Management of oral Graft versus Host Disease with topical agents: A systematic review. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 21, 72-81.
- ALEXANDRIDIS, F., TSANTILA, S. & PEPELASSI, E. 2018. Smoking cessation and response to periodontal treatment. *Australian Dental Journal*, 63, 140-149.
- ALEXIEV, U., VOLZ, P., BOREHAM, A. & BRODWOLF, R. 2017. Time-resolved fluorescence microscopy (FLIM) as an analytical tool in skin nanomedicine. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 116, 111-124.
- ALNASIF, N., ZOSCHKE, C., FLEIGE, E., BRODWOLF, R., BOREHAM, A., RÜHL, E., ECKL, K.-M., MERK, H.-F., HENNIES, H. C., ALEXIEV, U., HAAG, R., KÜCHLER, S. & SCHÄFER-KORTING, M. 2004. Penetration of normal, damaged and diseased skin — An in vitro study on dendritic core–multishell nanotransporters. *J Control Release*, 185, 45-50.
- ANDREASEN, J. O. 1968. Oral lichen planus. 1. A clinical evaluation of 115 cases. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontics*, 25, 31-42.
- ARMITAGE, G. C. 1999. Development of a Classification System for Periodontal Diseases and Conditions. *Annals of periodontology*, 4, 1-6.

- AXELSSON, P. & LINDHE, J. 1981. The significance of maintenance care in the treatment of periodontal disease. *Journal of Clinical Periodontology*, 8, 281-294.
- BAE, Y. H. 2009. Drug Targeting and Tumor Heterogeneity. *J Control Release*, 133, 2-3.
- BAO, X., WIEHE, R., DOMMISCH, H. & SCHAEFER, A. S. 2020. Entamoeba gingivalis Causes Oral Inflammation and Tissue Destruction. *J Dent Res*, 99, 561-567.
- BARBER, R. D., HARMER, D. W., COLEMAN, R. A. & CLARK, B. J. 2005. GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues. *Physiol Genomics*, 21, 389-395.
- BAROLI, B. 2010. Penetration of Nanoparticles and Nanomaterials in the Skin: Fiction or Reality? *Journal of pharmaceutical Science*, 99, 21-50.
- BARROS, S. P., WILLIAMS, R., OFFENBACHER, S. & MORELLI, T. 2015. Gingival crevicular fluid as a source of biomarkers for Periodontitis. *Periodontology 2000*, 70, 53-64.
- BARTOLD, P. M. & VAN DYKE, T. E. 2013. Periodontitis: a host-mediated disruption of microbial homeostasis. Unlearning learned concepts. *Periodontology 2000*, 62, 203-217.
- BIOSYSTEMS, A. 2010. High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits Protocol. 1-18.
- BOREHAM, A., PIKKEMAAT, J., VOLZ, P., BRODWOLF, R., KUEHNE, C., LICHA, K., HAAG, R., DERNEDDE, J. & ALEXIEV, U. 2015. Detecting and Quantifying Biomolecular Interactions of a Dendritic Polyglycerol Sulfate Nanoparticle Using Fluorescence Lifetime Measurements. *Molecules*, 21, 1-13.
- BOUWSTRA, J. A. & HONEYWELL-NGUYEN, P. L. 2002. Skin structure and mode of action of vesicles. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54, 41-55.
- BUSTIN, S. A. & MUELLER, R. 2005. Real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) and its potential use in clinical diagnosis. *Clin Sci (Lond)*, 109, 365-79.
- CALDERÓN, M., QUADIR, M., SHARMA, S. K. & HAAG, R. 2010. Dendritic Polyglycerols for Biomedical Applications. *Advanced Materials*, 22, 190-218.
- CARROUEL, F., VIENNOT, S., OTTOLENGHI, L., GAILLARD, C. & BOURGEOIS, D. 2020. Nanoparticles as Anti-Microbial, Anti-Inflammatory, and Remineralizing Agents in Oral Care Cosmetics: A Review of the Current Situation. *Nanomaterials (Basel)*, 10.
- CERQUEIRA-COUTINHO, C. S., DE CAMPO, V. E. B., ROSSI, A. L., VEIGA, V. F., HOLANINO, C., FREITAS, Z. M. F., RICCI-JUNIOR, E., MANSUR, C. R. E., SANTOS, E. P. & SANTOS-OLIVEIRA, R. 2015. Comparing in vivo biodistribution with radiolabeling and Franz cell permeation assay to validate the efficacy of both methodologies in the evaluation of nanoemulsions: a safety approach. *Nanotechnology*, 27.
- CHAPPLE, I. L. C. & MATTHEWS, J. B. 2007. The role of reactive oxygen and antioxidant species in periodontal tissue destruction. *Periodontology 2000*, 43, 160-232.
- CHEN, H., CLARKSON, B. H., SUN, K. & MANSFIELD, J. F. 2005. Self-assembly of synthetic hydroxyapatite nanorods into an enamel prism-like structure. *J Colloid Interface Sci*, 288, 97-103.

- CHO, E. J., HOLBACK, H., LIU, K. C., ABOUELMAGD, S. A., PARK, J. & YEO, Y. 2013. Nanoparticle Characterization: State of the Art, Challenges, and Emerging Technologies. *Mol. Pharmaceutics*, 10, 2093-2110.
- CHOLMAKOW-BODECHTEL, C., FÜSS-GRÜNIG, E., GEYER, S., HERTRAMPF, K., HOFFMANN, T., HOLTFRETER, B., JORDAN, R., KOCHER, T., MICHEELIS, W., NITSCHKE, I., NOFFZ, S., SCHARF, L., SCHIFFNER, U., SCHÜTZHOLD, S., STARK, H. & ZIMMER, S. 2016. Fünfte Deutsche Mundgesundheitsstudie (DMS-V) Kurzfassung.
- COBB, C. M. 2002. Clinical significance of non-surgical periodontal therapy: an evidence- based perspective of scalind and root planing. *Journal of Clinical Periodontology*, 29, 6-16.
- DA COSTA, L., AMARAL, C., BARBIRATO, D. D. S., LEO, A. T. T. & FOGACCI, M. F. 2017. Chlorhexidine mouthwash as an adjunct to mechanical therapy in chronic periodontitis. *The Journal of the American Dental Association*, 148, 308-318.
- DARVEAU, R. P. 2010. Periodontitis: a polymicrobial disruption of host homeostasis. *Nature Reviews Microbiology*, 8, 481-490.
- DAWES, C. 1987. Physiological Factors Affecting Salivary Flow Rate, Oral Sugar Clearance, and the Sensation of Dry Mouth in Man. *Journal of Dental Research*, 66, 648-653.
- DERNEDDE, J., RAUSCH, A., WEINHART, M., ENDERS, S., TAUBER, R., LICHA, K., SCHIRNER, M., ZÜGEL, U., VON BONIN, A. & HAAG, R. 2010. Dendritic polyglycerol sulfates as multivalent inhibitors of inflammation. *PNAS*, 107, 19679-19684.
- DESAI, D., PRABHAKAR, N., MAMAEVA, V., KARAMAN, D. S., LÄHDENIEMI, I. A., SAHLGREN, C., ROSENHOLM, J. M. & TOIVOLA, D. M. 2016. Targeted modulation of cell differentiation in distinct regions of the gastrointestinal tract via oral administration of differently Peg-Pel functionalized mesoporous silica nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*, 11, 299-313.
- DEWHIRST, F. E., CHEN, T., IZARD, J., PASTER, B. J., TANNER, A. C. R., YU, W.-H., LAKSHMANAN, A. & WADE, W. G. 2010. The Human Oral Microbiome. *Journal of Bacteriology*, 192, 5002-5017.
- DIAS, A. P., DA SILVA SANTOS, S., DA SILVA, J. V., PARISE-FILHO, R., IGNE FERREIRA, E., SEOUD, O. E. & GIAROLLA, J. 2020. Dendrimers in the context of nanomedicine. *Int J Pharm*, 573, 118814.
- DICKSON, M. A., HAHN, W. C., INO, Y., RONFARD, V., WU, J. Y., WEINBERG, R. A., LOUIS, D. N., LI, F. P. & RHEINWALD, J. G. 2000. Human Keratinocytes That Express hTERT and Also Bypass a p16INK4a-Enforced Mechanism That Limits Life Span Become Immortal yet Retain Normal Growth and Differentiation Characteristics. *Molecular and cellular Biology*, 20, 1436-1447.
- DIEBOLD, Y. & CALONGE, M. 2010. Applications of nanoparticles in ophthalmology. *Progress in Retinal and Eye Research*, 29, 596-609.
- DOMMISCH, H., REINARTZ, M., BACKHAUS, T., DESCHNER, J., CHUNG, W. & JEPSEN, S. 2012. Antimicrobial responses of primary gingival cells to *Porphyromonas gingivalis*. *Journal of Clinical Periodontology*, 39, 913-922.

- DOMMISCH, H. & SCHMIDT-WESTHAUSEN, A. M. 2021. Systemische Erkrankungen anhand oraler Frühsymptome erkennen. *Quintessenz Deutschland*, 01/21, 7-17.
- DOMMISCH, H., STAUFENBIEL, I., SCHULZE, K., STIESCH, M., WINKEL, A., FIMMERS, R., DOMMISCH, J., JEPSEN, S., MIOSGE, N., ADAM, K. & EBERHARD, J. 2015. Expression of antimicrobial peptides and interleukin-8 during early stages of inflammation: An experimental gingivitis study. *Journal of Periodontal Research*, 50, 836-845.
- DOMMISCH, H., WALTER, C., DANNEWITZ, B. & EICKHOLZ, P. 2020. Resective surgery for the treatment of furcation involvement: A systematic review. *J Clin Periodontol*, 47.
- DU, F., HONZKE, S., NEUMANN, F., KEILITZ, J., CHEN, W., MA, N., HEDTRICH, S. & HAAG, R. 2016. Development of biodegradable hyperbranched core-multishell nanocarriers for efficient topical drug delivery. *J Control Release*, 242, 42-49.
- EICKHOLZ, P. 2010. Parodontale Therapie mit lokalen Antibiotika. *zm. Zahnmedizin*.
- EISEN, D. 2000. The clinical features, malignant potential, and systemic associations of oral lichen planus: A study of 723 patientes. *Journal of American Academy of Dermatology*, 46, 207-14.
- EL-SAYED, I. H., HUANG, X. & EL-SAYED, M. A. 2005. Surface Plasmon Resonance Scattering and Absorption of anti-EGFR Antibody Conjugated Gold Nanoparticles in Cancer Diagnostics: Applications in Oral Cancer. *Nanoletters*, 5, 829-834.
- ESKAN, M. A., BENAKANAKERE, M. R., ROSE, B. G., ZHANG, P., ZHAO, J., STATHOPOULOU, P., FUJIOKA, D. & KINANE, D. F. 2008. Interleukin-1? Modulates Proinflammatory Cytokine Production in Human Epithelial Cells. *Infection and Immunity*, 76, 2080-2089.
- FARAJI, A. H. & WIPF, P. 2009. Nanoparticles in cellular drug delivery. *Bioorganical Meical Chemistry*, 17, 2950-2962.
- FERES, M., FIGUEIREDO, L. C., SORARES, G. M. S. & FAVERI, M. 2015. Systemic antibiotics in the treatment of periodontitis *Periodontol 2000*, 67, 131-186.
- FERES, M., RETAMAL-VALDES, B., FAVERI, M., DUARTE, P., SHIBLI, J., SOARES, G. M. S., MIRANDA, T., TELES, F., GOODSON, M., HASTURK, H., VAN DYKE, T. E., EHMKE, B., EICKHOLZ, P., SCHLAGENHAUF, U., MEYLE, J., KOCH, R., KOCHER, T., HOFFMANN, T., KIM, T.-S., KANER, D., FIGUEIREDO, L. C. & DOYLE, H. 2020. Proposal of a Clinical Endpoint for Periodontal Trials- The Treat-to-Target Approach. *Journal of the International Academy of Periodontology*, 22, 41-53.
- FERRARO, M., SILBERREIS, K., MOHAMMADIFAR, E., NEUMANN, F., DERNEDDE, J. & HAAG, R. 2018. Biodegradable Polyglycerol Sulfates Exhibit Promising Features for Anti-inflammatory Applications. *Biomacromolecules*, 19, 4524-4533.
- FREITAG-WOLF, S., MUNZ, M., WIEHE, R., JUNGE, O., GRAETZ, C., JOCKEL-SCHNEIDER, Y., STAUFENBIEL, I., BRUCKMANN, C., LIEB, W., FRANKE, A., LOOS, B. G., JEPSEN, S., DOMMISCH, H. & SCHAEFER, A. S. 2019. Smoking Modifies the Genetic Risk for Early-Onset Periodontitis. *Journal of Dental Research*, 98, 1332-1339.
- FREITAS, R. A. 2000. Nanodentistry. *The Journal of the American Dental Association*, 131, 1559-1565.

- FREITAS, R. A. 2005. Nanotechnology, nanomedicine and nanosurgery. *Int J Surg*, 3, 243-246.
- FREITAS, R. A. 2006. Pharmacytes: An Ideal Vehicle for Targeted Drug Delivery. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 6, 2769-2775.
- FRIEDEWALD, V. E., KORNMANN, K. S., BECK, J. D., GENCO, R., GOLDFINE, A., LIBBY, P., OFFENBACHER, S., RIDKER, P. M., VAN DYKE, T. E. & ROBERTS, W. C. 2009. The American Journal of Cardiology and Journal of Periodontology Editor's Consensus: Periodontitis and Atherosclerotic Cardiovascular Disease. *American Journal of Cardiology*, 104, 59-68.
- GENCO, R. J. & SANZ, M. 2020. Clinical and public health implications of periodontal and systemic diseases: An overview. *Periodontol 2000*, 83, 7-13.
- GHOSH, D., UPMANYU, N., SHUKLA, T. & SHRIVASTAVA, T. P. 2019. Cell and organ drug targeting. In: GRUMEZESCU, A. M. (ed.) *Nanomaterials for Drug Delivery and Therapy*. 1 ed.
- GONZÁLES-MOLES, M. A., MORALES, P., RODRIGUEZ-ARCHILLA, A., RUIZ-ÁVILA, I. & GONZÁLES-MOLES, S. 2002. Treatment of severe chronic oral erosive lesions with clobetasol propionate in aqueous solution. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 93, 264-270.
- GONZÁLES-MOLES, M. A., RUIZ-ÁVILA, I., GONZÁLES-RUIZ, L., AYÉN, Á., GIL-MONTOYA, J. A. & RAMOS-GARCÍA, P. 2019. Malignant transformation risk of oral lichen planus: A systematic review and comprehensive meta-analysis. *Oral Oncology*, 96, 121-130.
- GONZÁLES-MOLES, M. A., WARNAKULASURIYA, S., GONZÁLES-RUIZ, I., GONZÁLES-RUIZ, L., AYÉN, Á., LENOVEL, D., RUIZ-ÁVILA, I. & RAMOS-GARCÍA, P. 2020. Worldwide prevalence of oral lichen planus: A systematic review and meta-analysis. *Oral Diseases*, 00, 1-16.
- GOODSON, M. J., HAFFAJEE, A. & SOCRANSKY, S. S. 1979. Periodontal therapy by local delivery of tetracycline. *Journal of Clinical Periodontology*, 6, 83-92.
- GRAZIANI, F., KARAPETSA, D., ALONSO, B. & HERRERA, D. 2017. Nonsurgical and surgical treatment of periodontitis: how many options for one disease? *Periodontology 2000*, 75, 152-188.
- GREENSTEIN, G. 2006. Local drug delivery in the treatment of periodontal diseases: assessing the clinical significance of the results. *J Periodontol*, 77, 565-78.
- GREENSTEIN, G. & TONETTI, M. S. 2000. The Role of Controlled Drug Delivery for Periodontitis. *Periodontology 2000*, 71, 125-140.
- GROEGER, S. E. & MEYLE, J. 2015. Epithelial barrier and oral bacterial infection. *Periodontology 2000*, 69, 46-67.
- HAFNER, A., LOVRIC, J., LAKOS, G. P. & PEPIC, I. 2014. Nanotherapeutics in the EU: an overview on current state and future directions. *International Journal of Nanomedicine*, 9, 1005-1023.
- HAIJSHENGALLIS, G. 2014. Immunomicrobial pathogenesis of periodontitis: keystones, pathobionts, and host response. *Trends Immunol*, 35, 3-11.
- HAIJSHENGALLIS, G. & KOROSTOFF, J. M. 2017. Revisiting the Page & Schroeder model: the good, the bad and the unknowns in the periodontal host response 40 years later. *Periodontology 2000*, 75, 116-151.

- HARKS, I., KOCH, R., EICKHOLZ, P., HOFFMANN, T., KIM, T.-S., KOCHER, T., MEYLE, J., KANER, D., SCHLAGENHAUF, U., DOERING, S., HOLTFRETER, B., GRAVEMEIER, M., HARMSSEN, D. & EHMKE, B. 2015. Is progression of periodontitis relevantly influenced by systemic antibiotics? A clinical randomized trial. *Journal of Clinical Periodontology*, 42, 832-842.
- HEID, C. A., STEVENS, J., LIVAK, K. J. & WILLIAMS, P. M. 1996. Real Time Quantitative PCR. *Genome Res*, 6, 986-994.
- HERRERA, D., MATESANZ, P., MARTIN, C., OUD, V., FERES, M. & THEUGHEL, W. 2020. Adjunctive effect of locally delivered antimicrobials in periodontitis therapy: A systematic review and meta-analysis. *J Clin Periodontol*, 47, 239-256.
- HOLMSTRUP, P., THORN, J., RINDUM, J. & PINDBORG, J. 1988. Malignant development of lichen planus- affected oral mucosa. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, 17, 219-225.
- HUGGETT, J., DHEDA, K., BUSTIN, S. & ZUMLA, A. 2005. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes Immun*, 6, 279-84.
- HUMPHREY, S. P. & WILLIAMSON, R. T. 2001. A review of saliva: Normal composition, flow, and function. *Journal of Prosthetic Dentistry*, 85, 162-169.
- HUSSEIN-AL-ALI, S. H., ZOWALATY, M. E. E., HUSSEIN, M. Z., GEILICH, B. M. & WEBSTER, T. J. 2014. synthesis, characterization, and antimicrobial activity of an ampicillin-conjugated magnetic nanoantibiotic for medical applications. *International Journal of Nanomedicine*, 9, 3801-3814.
- IRWIN, C. & MYRILLAS, T. 1998. The role of IL-6 in the pathogenesis of periodontal disease. *Oral Diseases*, 4, 43-47.
- ISMAIL, S. B., KUMAR, S. K. S. & ZAIN, R. B. 2007. Oral lichen planus and lichenoid reactions: etiopathogenesis, diagnosis, management and malignant transformation. *Journal of Oral Science*, 48, 89-106.
- JAGER, J., OBST, K., LOHAN, S. B., VIKTOROV, J., STAUFENBIEL, S., RENZ, H., UNBEHAUEN, M., HAAG, R., HEDTRICH, S., TEUTLOFF, C., MEINKE, M. C., DANKER, K. & DOMMISCH, H. 2018. Characterization of hyperbranched core-multishell nanocarriers as an innovative drug delivery system for the application at the oral mucosa. *Journal of Periodontal Research*, 53, 57-65.
- JAIN, A. K. & THAREJA, S. 2019. In vitro and in vivo characterization of pharmaceutical nanocarriers used for drug delivery. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 47, 524-539.
- JEPSEN, K. & JEPSEN, S. 2016. Antibiotics/antimicrobials: systemic and local administration in the therapy of mild to moderately advanced periodontitis. *Periodontology 2000*, 71, 82-112.
- JEPSEN, S., CATON, J. G., ALBANDAR, J. M., BISSADA, N. F., BOUCHARD, P., CORTELLINI, P., DEMIREL, K., DE SANCTIS, M., ERCOLI, C., FAN, J., GEURS, N. C., HUGHES, F. J., JIN, L., KANTARCI, A., LALLA, E., MADIANOS, P. N., MATTHEWS, D., MCGUIRE, M. K., MILLIS, M. P., PRESHAW, P. M., REYNOLDS, M. A., SCULEAN, A., SUSIN, C., WEST, N. X. & YAMAZAKI, K. 2017. Periodontal manifestations of systemic diseases and developmental and acquired conditions: Consensus report of workgroup 3 of the 2017 World Workshop on the Classification

- of Periodontal and Peri - Implant Diseases and Conditions. *Journal of Clinical Periodontology*, 45, 219-229.
- JOHNSON, G. K. & GUTHMILLER, J. M. 2007. The impact of cigarette smoking on periodontal disease and treatment. *Periodontology 2000*, 44, 178-194.
- KASSEBAUM, N. J., BERNABÈ, E., DAHIYA, M., BHANDARI, B., MURRAY, C. J. L. & MARCENES, W. 2014. Global burden of severe periodontitis in 1990-2010: a systematic review and meta- regression. *Journal of Dental Research* 93, 1045-1053.
- KAVOOSI, F., MODARESI, F., SANAEI, M. & REZAEI, Z. 2018. Medical and dental applications of nanomedicines. *Journal of Pathology, Microbiology and Immunology*, 126, 795-803.
- KHANDARE, J., MOHR, A., CALDERÓN, M., WELKER, P., LICHA, K. & HAAG, R. 2010. Structure-biocompatibility relationship of dendritic polyglycerol derivatives. *Biomaterials*, 31, 4268-4277.
- KRAMER, I. R., LUCAS, R. B., PINDBORG, J. & SOBIN, L. H. 1978. Definition of leukoplakia and related lesions: An aid to studies on oral precancer WHO Collaborating Centre for Oral Precancerous Lesions. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology*, 46, 518-539.
- KÜCHLER, S., RADOWSKI, M. R., BLASCHKE, T., DATHE, M., PLENDL, J., HAAG, R., SCHÄFER-KORTING, M. & KRAMER, K. D. 2009. Nanoparticles for skin penetration enhancement--a comparison of a dendritic core-multishell-nanotransporter and solid lipid nanoparticles. *Eur J Pharm Biopharm*, 71, 243-250.
- KUMAR, P., NAGARAJAN, A. & UCHIL, P. D. 2018. Analysis of Cell Viability by the MTT Assay. *Cold Spring Harbor Protocols*.
- KUMAR, S., ALNASIF, N., FLEIGE, E., KURNIASIH, I., KRAL, V., HAASE, A., LUCH, A., WEINDL, G., HAAG, R., SCHAFFER-KORTING, M. & HEDTRICH, S. 2014. Impact of structural differences in hyperbranched polyglycerol-polyethylene glycol nanoparticles on dermal drug delivery and biocompatibility. *Eur J Pharm Biopharm*, 88, 625-634.
- LEITE-SILVA, V. R., LE LAMER, M., SANCHEZ, W. Y., LIU, D. C., SANCHEZ, W. H., MORROW, I., MARTIN, D., SILVA, H. D., PROW, T. W., GRICE, J. E. & ROBERTS, M. S. 2013. The effect of formulation on the penetration of coated and uncoated zinc oxide nanoparticles into the viable epidermis of human skin in vivo. *Eur J Pharm Biopharm*, 84, 297-308.
- LIFESCIENCEGROUP 2006. Real-Time PCR Applications Guide. *Bio-Rad Laboratories, Inc.*, 1-100.
- LINDBERG, K. & RHEINWALD, J. G. 1990. Three distinct keratinocyte subtypes identified in human oral epithelium by their patterns of keratin expression in culture and in xenografts. *Differentiation*, 45, 230-241.
- LOZADA-NUR, F. & MIRANDA, C. 1997. Oral Lichen Planus. *Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery*, 16, 295-300.

- LOZADA-NUR, F., ROBINSON, J. & REGEZI, J. A. 1994. Oral hairy leukoplakia in nonimmunosuppressed patients. Report of four cases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 78, 599-602.
- MARABLE, D. R., BOWERS, L. M., STOUT, T. L., STEWART, C. M., BERG, K. M., SANKAR, V., DEROSI, S. S., THOPPAY, J. R. & BRENNAN, M. 2016. Oral candidiasis following steroid therapy for oral lichen planus. *Oral Diseases*, 22, 140-147.
- MEYLE, J. & CHAPPLE, I. L. C. 2015. Molecular aspects of the pathogenesis of periodontitis. *Periodontology 2000*, 69, 7-17.
- MOLLEN, I., HITZ LINDENMULLER, I. & LAMBRECHT, J. T. 2017. Häufige Mundschleimhauterkrankungen. *Praxis (Bern 1994)*, 106, 21-27.
- MOMBELLI, A. 2012. Antimicrobial Advances in Treating Periodontal Diseases. *Front Oral Biol.*, 15, 133-148.
- MORONI, M. M., SÄLY, C. & DREXEL, H. 2018. Assoziation zwischen Parodontitis und koronarer Herzkrankheit Eine Metaanalyse anhand verschiedener epidemiologischer Studien. *Parodontologie*, 29, 265-280.
- MOSMANN, T. 1983. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assay. *Journal of Immunological Methods*, 65, 55-63.
- MÜHLHARDT, C. 2013. *Der Experimentator Molekularbiologie Genomics*.
- NARANG, R. S. & NARANG, J. K. 2015. Nanomedicines for dental applications-scope and future perspective. *International Journal of Pharmaceutical Investigation*, 5, 121-3.
- NASCIMENTO, G. G., LEITE, F. R. M., VESTERGAARD, P., SCHEUTZ, F. & LOPEZ, R. 2018. Does diabetes increase the risk of periodontitis? A systematic review and meta-regression analysis of longitudinal prospective studies. *Acta Diabetol*, 55, 653-667.
- NEUBERGER, T., SCHÖPF, B., HOFMANN, H., HOFMANN, M. & VON RECHENBERG, B. 2005. Superparamagnetic nanoparticles for biomedical applications. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 293, 483-496.
- NOLAN, T., HANDS, R. E. & BUSTIN, S. A. 2006. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nat Protoc*, 1, 1559-82.
- NOZARI, A., AJAMI, S., RAFIEI, A. & NIAZI, E. 2017. Impact of Nano Hydroxyapatite, Nano Silver Fluoride and Sodium Fluoride Varnish on Primary Teeth Enamel Remineralization: An In Vitro Study. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 11, ZC97-ZC100.
- PANT, K., GROGER, D., BERGMANN, R., PIETZSCH, J., STEINBACH, J., GRAHAM, B., SPICCIA, L., BERTHON, F., CZARNY, B., DEVEL, L., DIVE, V., STEPHAN, H. & HAAG, R. 2015. Synthesis and biodistribution studies of (3)H- and (64)Cu-labeled dendritic polyglycerol and dendritic polyglycerol sulfate. *Bioconjugate Chemistry*, 26, 906-918.
- PANT, K., PUFE, J., ZARSCHLER, K., BERGMANN, R., STEINBACH, J., REIMANN, S., HAAG, R., PIETZSCH, J. & STEPHAN, H. 2017. Surface charge and particle size

- determine the metabolic fate of dendritic polyglycerols. *Nanoscale*, 9, 8723-8739.
- PAPAGERAKIS, S., PANNONE, G., ZHENG, L., ABOUT, I., TAQI, N., NGUYEN, N. P. T., MATOSSIAN, M., MCALPIN, B., SANTORO, A., MCHUGH, J., PRINCE, M. E. & PAPAGERAKIS, P. 2014. Oral epithelial stem cells – implications in normal development and cancer metastasis. *Exp Cell Res.*, 325, 111-129.
- PAPAKOSTAS, D., RANCAN, F., STERRY, W., BLUME-PEYTAVI, U. & VOGT, A. 2011. Nanoparticles in dermatology. *Arch Dermatol Res*, 303, 533-550.
- PAPAPANOU, P., SANZ, M., BUDUNELI, N., DIETRICH, T., FERES, M., FINE, D. H., FLEMMING, T. F., GARCIA, R., GIANNOBILE, W. V., GRAZIANI, F., GREENWELL, H., HERRERA, D., KAO, R. T., KEBSCHULL, M., KINANE, D. F., KIRKWOOD, K. L., KOCHER, T., KORNMAN, K. S., KUMAR, P., LOOS, B. G., MACHTEI, E., MENG, H., MOMBELLI, A., NEEDLEMAN, I., OFFENBACHER, S., SEYMOUR, G. J., TELES, R. & TONETTI, M. S. 2018. Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *Journal of Periodontology*, 89, 173-182.
- PARK, A. R., LA, H. O., CHO, B. S., KIM, S. J., LEE, B. K., RHIE, J. Y. & GWAK, H. S. 2013. Comparison of budesonide and dexamethasone for local treatment of oral chronic graft-versus-host disease. *Am J Health-Syst Pharm*, 70.
- PAYERAS, M. R., CHERUBINI, K., FIGUEIREDO, M. A. & SALUM, F. G. 2013. Oral lichen planus: Focus on etiopathogenesis. *Archives of Oral Biology*, 58, 1057-1069.
- PEDERSEN, A. M. L., SORENSEN, C. E., PROCTOR, G. B., CARPENTER, G. H. & EKSTRÖM, J. 2018. Salivary secretion in health and disease. *Journal of Oral Rehabilitation*, 45, 730-746.
- PISCHON, H., RADBRUCH, M., OSTROWSKI, A., VOLZ, P., GERECKE, C., UNBEHAUEN, M., HÖNZKE, S., HEDTRICH, S., FLUHR, J. W., HAAG, R., KLEUSER, B., ALEXIEV, U., GRUBER, A. D. & MUNDHENK, L. 2017. Stratum corneum targeting by dendritic core-multishell-nanocarriers in a mouse model of psoriasis. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 13, 317-327.
- POZO, J. L. D. 2018. Biofilm related disease. *Expert Review of anti-infective Therapy*, 16, 51-65.
- PRESHAW, P. M. 2018. Host modulation therapy with anti-inflammatory agents. *Periodontology 2000*, 76, 131-149.
- PRESLAND, R. B. & JUREVIC, R. J. 2002. Making Sense of the Epithelial Barrier: What Molecular Biology and Genetics Tell Us About the Functions of Oral Mucosal and Epidermal Tissues. *Journal of Dental Education*, 66.
- PRETZL, B., SÄLZER, S., EHMKE, B., SCHLAGENHAUF, U., DANNEWITZ, B., DOMMISCH, H., EICKHOLZ, P. & JOCKEL-SCHNEIDER, Y. 2019. Administration of systemic antibiotics during non-surgical periodontal therapy - a consensus report. *Clinical Oral Investigations*, 23, 3073-3085.
- PRIETTO, N. R., MARTINS, T. M., SANTINONI, C. D. S., POLA, N. M., ERVOLINO, E., BIELEMANN, A. M. & LEITE, F. R. M. 2020. Treatment of experimental periodontitis with chlorhexidine as adjuvant to scaling and root planing. *Arch Oral Biol*, 110.

- RADBRUCH, M., PISCHON, H., OSTROWSKI, A., VOLZ, P., BRODWOLF, R., NEUMANN, F., UNBEHAUEN, M., KLEUSER, B., HAAG, R., MA, N., ALEXIEV, U., MUNDHENK, L. & GRUBER, A. D. 2017. Dendritic Core-Multishell Nanocarriers in Murine Models of Healthy and Atopic Skin. *Nanoscale Research Letters*, 12, 64.
- RADE, N., LICHA, K. & HAAG, R. 2018. Dendritic Polyglycerol Sulfate for Therapy and Diagnostics. *Polymers*.
- RADLANSKI, R. J. 2001. *Curriculum Orale Struktur- und Entwicklungsbiologie*, Quintessenz Publishing.
- RAMSEIER, C. A., ANERUD, A., DULAC, M., LULIC, M., CULLINAN, M. P., SEYMOUR, G. J., FADDY, M. J., BÜRGIN, W., SCHÄTZLE, M. & LANG, N. P. 2017. Natural history of periodontitis: Disease progression and tooth loss over 40 years. *J Clin Periodontol*, 44, 1182-1191.
- RAMSEIER, C. A., NYDEGGER, M., WALTER, C., FISCHER, G., SCULEAN, A., LANG, N. P. & SALVI, G. E. 2019. Time between recall visits and residual probing depths predict long- term stability in patients enrolled in supportive periodontal therapy*. *J Clin Periodontol*, 46, 218-230.
- RAMSEIER, C. A., WOELBER, J. P., KITZMANN, J., DETZEN, L., CARRA, M. C. & BOUCHARD, P. 2020. Impact of risk factor control interventions for smoking cessation and promotion of healthy lifestyles in patients with periodontitis: A systematic review. *J Clin Periodontol*, 47, 90-106.
- RANCAN, F., GIULBUDAGAIN, M., JURISCH, J., BLUME-PEYTAVI, U., CALDERÓN, M. & VOGT, A. 2017a. Drug delivery across intact and disrupted skin barrier: Identification of cell populations interacting with penetrated thermoresponsive nanogels. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 116, 4-11.
- RANCAN, F., GIULBUDAGIAN, M., JURISCH, J., BLUME-PEYTAVI, U., CALDERON, M. & VOGT, A. 2017b. Drug delivery across intact and disrupted skin barrier: Identification of cell populations interacting with penetrated thermoresponsive nanogels. *Eur J Pharm Biopharm*, 116, 4-11.
- RAY, P., FERRARO, M., HAAG, R. & QUADIR, M. 2019. Dendritic Polyglycerol-Derived nano-Architectures as Delivery Platforms of Gemcitabine for Pancreatic Cancer. *Macromolecular Bioscience*, 19.
- REIMANN, S., GROGER, D., KUHNE, C., RIESE, S. B., DERNEDDE, J. & HAAG, R. 2015. Shell Cleavable Dendritic Polyglycerol Sulfates Show High Anti-Inflammatory Properties by Inhibiting L-Selectin Binding and Complement Activation. *Adv Healthc Mater*, 4, 2154-2162.
- REIMANN, S., SCHNEIDER, T., WELKER, P., NEUMANN, F., LICHA, K., SCHULZE-TANZIL, G., WAGERMAIER, W., FRATZL, P. & HAAG, R. 2017. Dendritic polyglycerol anions for the selective targeting of native and inflamed articular cartilage. *Journals of Materials Chemistry B*, 5, 4754-4767.
- RINGSDORF, H. 1975. Structure and Properties of pharmacologically active Polymers. *Journal of Polymeric Science*, 51, 135-153.
- ROBERTS, E. S., RICHARDS, J. H., JASKOT, R. & DREHER, K. L. 2008. Oxidative Stress Mediates Air Pollution Particle Induced Acute Lung Injury and Molecular Pathology. *Inhalation Toxicology*, 15, 1327-1346.

- ROBLEGG, E., FRÖHLICH, E., MEINDL, C., TEUBL, B., ZAVERSKY, M. & ZIMMER, A. 2012. Evaluation of a physiological in vitro system to study the transport of nanoparticles through the buccal mucosa. *Nanotoxicology*, 6, 399-413.
- SALVI, G. E., STÄHLI, A., SCHMIDT, J. C., RAMSEIER, C. A., SCULEAN, A. & WALTER, C. 2020. Adjunctive laser or antimicrobial photodynamic therapy to non- surgical mechanical instrumentation in patients with untreated periodontitis: A systematic review and meta-analysis. *J Clin Periodontol*, 47, 176-198.
- SANZ, M., BEIGHTON, D., CURTIS, M., CURY, J., DIGE, I., DOMMISCH, H., ELLYWOOD, R., GIACAMAN, R., HERRERA, D., HERZBERG, M. C., KÖNÖNEN, E., MARSH, P., MEYLE, J., MIRA, A., MOLINA, A., MOMBELLI, A., QUIRYNEN, M., REYNOLDS, E., SHAPIRA, L. & ZAURA, E. 2017. Role of microbial biofilms in the maintenance of oral health and in the development of dental caries and periodontal diseases. Consensus report of group 1 of the Joint EFP/ORCA workshop on the boundaries between caries and periodontal disease. *Journal of Clinical Periodontology*, 44, 5-11.
- SANZ, M., HERRERA, D., KEBSCHULL, M., CHAPPLE, I., JEPSEN, S., BEGLUNDH, T., SCULEAN, A. & TONETTI, M. S. 2020. Treatment of stage I–III periodontitis—The EFP S3 level clinical practice guideline. *J Clin Periodontol*, 47, 4-60.
- SCHAEFER, A. S. 2018. Genetics of periodontitis: Discovery, biology, and clinical impact. *Periodontology 2000*, 78, 162-173.
- SCHER, J. U., BRETZ, W. A. & ABRAMSON, S. B. 2014. Periodontal Disease and Subgingival Microbiota as Contributors for RA Pathogenesis: Modifiable Risk Factors? *Current Opinion in Rheumatology*, 26, 424-429.
- SCHMITTGEN, T. D. & LIVAK, K. J. 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative Ct-method. *Nature Protocols*, 3, 1101-1108.
- SCHMITZ, S. 2020. *Der Experimentator: Zellkultur*, Springer Spektrum.
- SCHREURS, O., BALTA, M. G., KARATSAIDIS, A. & SCHENCK, K. 2020. Composition of hemidesmosomes in basal keratinocytes of normal buccal mucosa and oral lichen planus. *Oral Sciences*, 128, 369-378.
- SEATON, A., MACNEE, W., DONALDSON, K. & GODDEN, D. 1995. Particulate air pollution and acute health effects. *The Lancet*, 345, 176-178.
- SHAVIT, E., KLIEB, H. & SHEAR, N. H. 2020. Oral lichen planus: a novel staging and algorithmic approach and all that is essential to know. *F1000 Research*, 9, 1-12.
- SHRESTHA, A. & KISHEN, A. 2016. Antibacterial Nanoparticles in Endodontics: A Review. *Journal of Endodontics*, 42, 1417-1426.
- SILBERREIS, K., NIESLER, N., RADES, N., HAAG, R. & DERNEDDE, J. 2019a. Sulfated Dendritic Polyglycerol Is a Potent Complement Inhibitor. *Biomacromolecules*, 20, 3809-3818.
- SILBERREIS, K., NIESLER, N., RADES, N., HAAG, R. & DERNEDDE, J. 2019b. Sulfated Dendritic Polyglycerol Is a Potent Complement Inhibitor. *Biomacromolecules*, 20, 3809-3818.
- SILVERMAN, S., GORSKY, M. & LOZADA-NUR, F. 1985. A prospective follow-up study of 570 Patients with oral lichen planus: Persistence, remission and malignant association. *Journal of Oral Pathology & Medicine*
Journal of oral Surgery, 60, 30-34.

- SINHA, N., KULSHRESHTHA, N. M., DIXIT, M., JADHAV, I., SHRIVASTAVA, D. & BISEN, P. S. 2017. Nanodentistry: novel approaches. In: ELSEVIER (ed.) *Nanostructures for Oral Medicine*.
- SOUSA-HERVES, A., WÜRFEL, P., WEGNER, N., KHANDARE, J., LICHA, K., HAAG, R., WELKER, P. & CALDERÓN, M. 2015. Dendritic polyglycerol sulfate as a novel platform for paclitaxel delivery: pitfalls of ester linkage. *Nanoscale* 7, 3923-3932.
- SQUIER, C. A. & KREMER, M. J. 2001. Biology of Oral Mucosa and Esophagus. *Journal of the National Cancer Institute Monographs*, 29.
- STOLTE, K. N., PELZ, C., YAPTO, C. V., RAGUSE, J.-D., DOMMISCH, H. & DANKER, K. 2020. IL-1 β strengthens the physical barrier in gingival epithelial cells. *Tissue Barriers*.
- SUBRAMANI, K. & AHMED, W. 2018. Nanoparticulate drug-delivery systems for oral cancer treatment. In: SUBRAMANI, K. & AHMED, W. (eds.) *Emerging Nanotechnology in Dentistry*. 2 ed.
- SUH, W. H., SUSLICK, K. S., STUCKY, G. D. & SUH, Y.-H. 2009. Nanotechnology, nanotoxicology, and neuroscience. *Progress in Neurobiology*, 87, 133-170.
- SULIJAYA, B., TAKAHASHI, N. & YAMAZAKI, K. 2019. Host modulation therapy using anti-inflammatory and antioxidant agents in periodontitis: A review to a clinical translation. *Arch Oral Biol.*, 105, 72-80.
- SUVAN, J., LEIRA, Y., SANCHO, F. M. M., GRAZIANI, F., DERKS, J. & TOMASI, C. 2020. Subgingival instrumentation for treatment of periodontitis. A systematic review. *J Clin Periodontol*, 47, 155-175.
- TONETTI, M. S., GREENWELL, H. & KORNMAN, K. S. 2018. Staging and grading of periodontitis: Framework and proposal of a new classification and case definition. *Journal of Periodontology*, 89, 159-172.
- TONETTI, M. S., LANG, N. P., CORTELLINI, P., SUVAN, J. E., EICKHOLZ, P., FOURMOUSIS, I., TOPOLL, H., VANGSTED, T. & WALLKAMM, B. 2012. Effects of a single topical doxycycline administration adjunctive to mechanical debridement in patients with persistent/recurrent periodontitis but acceptable oral hygiene during supportive periodontal therapy. *Journal of Clinical Periodontology*, 39, 475-482.
- TONETTI, M. S. & SANZ, M. 2019. Implementation of the new classification of periodontal diseases: Decision - making algorithms for clinical practice and education. *J Clin Periodontol*, 46, 398-405.
- TORCHILIN, V. P. 2000. Drug Targeting. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 11, 81-91.
- TÜRK, H., HAAG, R. & ALBAN, S. 2004. Dendritic Polyglycerol Sulfates as New Heparin Analogues and Potent Inhibitors of the Complement System. *Bioconjug Chem*, 15, 162-167.
- TUROS, E., REDDY, G. S. K., GREENHALGH, K., RAMARAJU, P., ABEYLATH, S. C., JANG, S., DICKEY, S. & LIM, D. V. 2007. Penicillin-Bound Polyacrylate Nanoparticles: Restoring the Activity of β -Lactam Antibiotics Against MRSA. *Bioorganical Meical Chemical Letters*, 17, 3468-3472.

- UNTERGASSER, A., CUTCUTACHE, I., KORESSAAR, T., YE, J., FAIRCLOTH, B. C., REMM, M. & ROZEN, S. G. 2012. Primer3--new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res*, 40, 1-12.
- VAN WINKELHOFF, A. J., HERRERA GONZALES, D., WINKEL, E. G., VANDENBROUCKE-GRAULS, C. M. J. E. & SANZ, M. 2000. Antimicrobial resistance in the subgingival microflora in patients with adult periodontitis
A comparison between The Netherlands and Spain. *Journal of Clinical Periodontology*, 27, 79-86.
- WARNAKULASURIYA, S., JOHNSON, N. W. & VAN DER WAAL, I. 2007. Nomenclature and classification of potentially malignant disorders of the oral mucosa. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, 36, 575-80.
- WEINHART, M., GRÖGER, D., ENDERS, S., DERNEDDE, J. & HAAG, R. 2011a. Synthesis of Dendritic Polyglycerol Anions and Their Efficiency Toward L-Selectin Inhibition. *Biomacromolecules*, 12, 2502-2511.
- WEINHART, M., GRÖGER, D., ENDERS, S., RIESE, S. B., DERNEDDE, J., KAINTHAN, R. K., BROOKS, D. E. & HAAG, R. 2011b. The Role of Dimension in Multivalent Binding Events: Structure–Activity Relationship of Dendritic Polyglycerol Sulfate Binding to L-Selectin in Correlation with Size and Surface Charge Density. *Macromolecular Bioscience*, 11, 1088-1098.
- WEST, N., CHAPPLE, I., CLAYDON, N., D’AIUTO, F., DONOS, N., IDE, M., NEEDLEMAN, I. & KEBSCHULL, M. 2021. BSP implementation of European S3 - level evidence-based treatment guidelines for stage I-III periodontitis in UK clinical practice. *J Dent*.
- YAMAMOTO, K., KLOSSEK, A., FLESCHE, R., OHIGASHI, T., FLEIGE, E., RANCAN, F., FROMBACH, J., VOGT, A., BLUME-PEYTAVI, U., SCHRADE, P., BACHMANN, S., HAAG, R., HEDTRICH, S., SCHAFFER-KORTING, M., KOSUGI, N. & RUHL, E. 2016. Core-multishell nanocarriers: Transport and release of dexamethasone probed by soft X-ray spectromicroscopy. *Journal of Controlled Release*, 242, 64-70.
- YANG, J., HOOPER, W. C., PHILLIPS, D. J. & TALKINGTON, D. F. 2003. Interleukin-1b responses to Mycoplasma pneumoniae infection are cell-type specific. *Microbial Pathogenesis*, 34, 17-25.
- ZADIK, Y., ELAD, S., SHAPIRA, A. & SHAPIRA, M. Y. 2017. Treatment of oral mucosal manifestations of chronic graft versus host disease: dexamethasone vs. budesonide. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 18, 235-242.
- ZASLANASKY, R., SCHRAMM, C., STEIN, C., GÜTHOFF, C. & SCHMIDT-WESTHAUSEN, A. M. 2018. Topical application of morphine for wound healing and analgesia in patients with oral lichen planus: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Clinical Oral Investigation*, 22, 305-311.
- ZHANG, M., GU, L., ZHENG, P., CHEN, Z., DOU, X., QIN, Q. & CAI, X. 2020. Improvement of cell counting method for Neubauer counting chamber. *J Clin Lab Anal*, 34, 1-6.

6 Eidesstattliche Versicherung

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Katrin Vogel, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Penetrationseigenschaften und Biokompatibilität von dPGS-Nanocarriern auf oraler Mukosa und immortalisierten Epithelzellen – eine *ex vivo* und *in vitro*-Studie / Penetration properties and biocompatibility of dPGS-nanocarriers on oral mucosa and immortalized epithelial cells - an *ex vivo* and *in vitro*-study“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

[Für den Fall, dass Sie die Forschung für Ihre Promotion ganz oder teilweise in Gruppenarbeit durchgeführt haben:] Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

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

Unterschrift, Datum und Stempel des erstbetreuenden Hochschullehrers

Unterschrift der Doktorandin

7 Lebenslauf

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

8 Publikationen

THEORIE trifft PRAXIS: "Alles klasse, oder was?" DG PARO-Frühjahrstagung. 2018 *Parodontologie*. 2,187-191. Vogel,K., Pappe, C.L., Schildhauer, K., Dommisch, H.

EuroPerio9 – ein Kongress der Superlative. 2018 *Parodontologie*. 3,293-309. Vogel,K., Pappe, C.L., Schildhauer, K., Braun, J., Geier, J., Jervøe-Storm, P-M., Kröger, A., Schütz, B., Skora, P., Wagner, G., Youssef, E.

Core-multi shell Nanocarrier (CMS) exhibit fast adherence to the Oral Mucosa, 2020 Dommisch, H., Jager,J., Vogel, K., Wiehe, R., Viktorov, J., Hedtrich, S., Unbehauen, M., Haag, R., Danker, K.

Characterization of an ester-based core-multishell (CMS) nanocarrier for the topical application at the oral mucosa Dommisch, H., Stolte, KN., Jager, J., Vogel, K., Müller, R., Hedtrich,S., Unbehauen,M., Haag, R., Danker, K.

9 Danksagung

Die Danksagung wird aus datenschutzrechtlichen Gründen nicht veröffentlicht.

