

Aus dem Institut für Biochemie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Nanocarriersysteme als neues Therapiekonzept bei entzündlichen Mundschleimhaut- und
Parodontalerkrankungen

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Juliane Vera Jäger

aus Peine

Datum der Promotion: 03.12.2021

Vorwort

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht in:

Jäger J, Obst K, Lohan SB, Viktorov J, Staufenbiel S, Renz H, Unbehauen M, Haag R, Hedtrich S, Teutloff C, Meinke MC, Danker K, Dommisch H. *Characterization of hyperbranched core-multishell nanocarriers as an innovative drug delivery system for the application at the oral mucosa*. Journal of Periodontal Research, 2018

Weitere Teilergebnisse wurden zur Veröffentlichung eingereicht beim Journal Clinical Oral Investigations (Springer Verlag), 2020.

| | |
|--|-----------|
| Inhaltsverzeichnis | |
| I Abbildungsverzeichnis | 7 |
| II Tabellenverzeichnis | 8 |
| III Abkürzungsverzeichnis | 9 |
| 1 Abstract | 11 |
| 2 Einleitung | 13 |
| 2.1 Morphologie und Struktur humaner Mundschleimhaut | 13 |
| 2.2 Ultrastruktur des Epithels: Differenzierung und epitheliale Barriere | 15 |
| 2.2.1 Keratine | 16 |
| 2.2.2 Proteine der zellulären Hornhülle | 16 |
| 2.2.3 Zell-Kontakte | 17 |
| 2.3 Strukturelle Unterschiede zwischen oraler Schleimhaut und der äußeren Haut | 17 |
| 2.4 Erkrankungen der Mundschleimhaut | 18 |
| 2.4.1 Entzündliche Mundschleimhaut und Parodontalerkrankungen | 19 |
| 2.4.2 Parodontale Erkrankungen: Ätiologie und Pathogenese | 20 |
| 2.5 Therapeutische Ansätze | 23 |
| 2.5.1 Parodontitistherapie | 23 |
| 2.5.2 Therapie von Mundschleimhauterkrankungen | 24 |
| 2.6 Neuartige Therapieansätze | 25 |
| 2.6.1 Nanotechnologie | 25 |
| 2.6.2 Core-multishell-Nanocarrier | 26 |
| 2.6.3 Nanogele | 28 |
| 2.7 Präklinische Untersuchung neuer Therapeutika | 29 |
| 2.7.1 Zellkultur | 29 |
| 2.7.2 Tiermodelle | 30 |
| 2.7.3 Dreidimensionale in vitro Schleimhautmodelle | 31 |
| 3 Zielsetzung der Arbeit | 32 |
| 4 Material | 33 |
| 4.1 Chemikalien und Lösungen | 33 |

| | |
|---|-----------|
| 4.2 Antikörper, Marker, Kits..... | 33 |
| 4.3 Eukaryontenzellen, Gewebeproben..... | 34 |
| 4.4 Nährmedien und Zusätze | 34 |
| 4.5 Sonstige Materialien und Gerätschaften | 35 |
| 5 Methoden | 36 |
| 5.1 Grundlegende Methoden der Zellkultur..... | 36 |
| 5.1.1 Kollagen-Beschichtungen von Zellkulturflaschen..... | 36 |
| 5.1.2 Auftauen von Zellen..... | 36 |
| 5.1.3 Kultivierung von immortalisierten Zelllinien..... | 36 |
| 5.1.4 Kultivierung von primären Zellen..... | 37 |
| 5.1.5 Ablösung und Passagierung von Zellen..... | 37 |
| 5.1.6 Bestimmung der Zellzahl..... | 38 |
| 5.1.7 Kryokonservierung von Zellen | 38 |
| 5.2 Weiterführende Methoden | 38 |
| 5.2.1 Isolierung von primären Keratinozyten und Fibroblasten..... | 38 |
| 5.2.2 MTT/XTT-Assay | 39 |
| 5.2.3 Sulforhodamin B-Assay..... | 40 |
| 5.2.4 Herstellung eines 3D-Modells..... | 41 |
| 5.2.5 Gewinnung von oraler Mukosa des Schweins..... | 41 |
| 5.2.6 Penetrationsversuch mittels Franz-Zelle | 41 |
| 5.2.7 Einfrieren von Gewebeproben und Anfertigung von Kryoschnitten | 44 |
| 5.2.8 Cellular Uptake-Versuch | 44 |
| 5.2.9 Auswertung mittels Laser-Scanning-Mikroskop | 44 |
| 5.2.10 Herstellung einer Vergleichsemulsion „Dontisolon“ | 44 |
| 5.2.11 Elektronenspinresonanz-Spektroskopie (ESR)..... | 45 |
| 5.3 Histochemische Färbungen..... | 46 |
| 5.3.1 Entparaffinierung von Objektträgern | 46 |
| 5.3.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H.E.) | 47 |
| 5.3.3 Indirekte Immunfluoreszenz-Analyse | 47 |

| | |
|---|-----------|
| 5.3.4 Färbung mit Wheat-Germ-Agglutinin-488-Konjugat | 48 |
| 6 Ergebnisse | 49 |
| 6.1 Isolierung von primären, humanen Keratinozyten und Fibroblasten..... | 49 |
| 6.2 Untersuchungen am Zell-Monolayer | 50 |
| 6.2.1 Einfluss der Nanocarrier auf die metabolische Aktivität und Zellproliferation oraler Keratinozyten | 50 |
| 6.2.2 Intrazelluläre Aufnahme des CMS-E-Nanocarriers in orale Keratinozyten..... | 57 |
| 6.3 Franz-Zell-Penetrationsversuche | 59 |
| 6.3.1 Struktureller Aufbau mastikatorischer und auskleidender Schleimhaut vom Schwein..... | 59 |
| 6.3.2 Untersuchungen zur Penetration fluoreszenzmarkierter Nanocarrier in auskleidende und mastikatorische Schleimhaut vom Schwein..... | 60 |
| 6.3.3 ESR-spektroskopische Untersuchungen zur Freisetzung des Modellwirkstoffs Dexamethason aus CMS-E-Nanocarriern | 64 |
| 6.4 Aufbau eines humanen dreidimensionalen (3D) „full-thickness“ oralen Schleimhautmodells..... | 66 |
| 7 Diskussion | 69 |
| 7.1 Diskussion der Methodik | 70 |
| 7.1.1 Isolierung von primären humanen oralen Keratinozyten und Fibroblasten | 70 |
| 7.1.2 Zytotoxizitäts- und Proliferationsassays | 70 |
| 7.1.3 Cellular-Uptake-Versuch | 71 |
| 7.1.4 Franz-Zell-Penetrationsstudien | 71 |
| 7.1.5 Laserkonfokalmikroskopie | 72 |
| 7.1.6 Elektronenspinresonanzspektroskopie (ESR)..... | 73 |
| 7.1.7 Aufbau eines dreidimensionalen (3D) Schleimhaut-Modells..... | 73 |
| 7.2 Diskussion der Ergebnisse | 74 |
| 7.2.1 Isolierung von primären humanen oralen Keratinozyten und Fibroblasten | 74 |
| 7.2.2 Einfluss der verschiedenen Nanocarrier-Typen auf den Zellmetabolismus und die Zellproliferation von oralen Keratinozyten | 74 |
| 7.2.3 Intrazelluläre Aufnahme des CMS-Nanocarriers in orale Keratinozyten | 76 |
| 7.2.4 Penetrationsfähigkeit der Nanocarrier-Typen in orale Epithelien vom Schwein..... | 76 |
| 7.2.5 Aufbau eines dreidimensionalen (3D) Schleimhaut-Modells..... | 79 |

| | |
|--|-----------|
| 7.3 Ausblick | 80 |
| IV Literaturverzeichnis | 82 |
| V Eidesstattliche Versicherung..... | 90 |
| VI Anteilserklärung an erfolgten Publikationen..... | 91 |
| VII Lebenslauf..... | 92 |
| VIII Publikationsliste..... | 93 |
| IX Danksagung..... | 94 |

I Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Abbildung 1: Schichtung der oralen Mukosa | 13 |
| Abbildung 2: Mundschleimhauttypen nach Lage in der Mundhöhle | 14 |
| Abbildung 3: Schematische Darstellung des keratinisierten und unverhornten, mehrschichtigen Plattenepithels der Mundhöhle..... | 15 |
| Abbildung 4: Aktuelle Klassifikation parodontaler und periimplantärer Erkrankungen und Zustände | 21 |
| Abbildung 5: Einflussfaktoren und Verlauf von parodontaler Gesundheit zu einer manifestierten Parodontitis | 22 |
| Abbildung 6: Schematische Darstellung des Parodontium in gesundem und entzündetem Zustand. | 23 |
| Abbildung 7: Schematische Darstellung eines Liposoms und des Aufbaus eines dendritischen multishell-Nanocarriers | 27 |
| Abbildung 8: Schematischer Aufbau von Amid-basierten und Ester-basierten CMS-Nanocarriern aus .. | 27 |
| Abbildung 9: Synthese des thermosensitiven PNIPMAM-(SS)-dPG Nanogels..... | 29 |
| Abbildung 10: Aufbau einer PermeGear Franz-Zelle | 43 |
| Abbildung 11: Franz-Zell-Versuchsaufbau | 43 |
| Abbildung 12: PCA Molekül | 46 |
| Abbildung 13. Primäre gingivale Keratinozyten | 49 |
| Abbildung 14: Primäre gingivale Fibroblasten kurz nach der Kultivierung..... | 50 |
| Abbildung 15: Einfluss verschiedener Konzentrationen des CMS-Nanocarriers 10-A-18-350 auf die metabolische Aktivität und Zellproliferation von IGK-Zellen | 52 |
| Abbildung 16: Ergebnisse der drei unabhängigen Versuchsdurchläufe im MTT-Assay für dem CMS-Nanocarrier 10-A-18-350..... | 53 |
| Abbildung 17: Einfluss verschiedener Konzentrationen des CMS-Nanocarriers E-15-350 auf die metabolische Aktivität und Zellproliferation von OKG4/bmi1/TERT-Zellen und IGK-Zellen..... | 55 |
| Abbildung 18: Einfluss verschiedener Konzentrationen des PNIPMAM-(S-S)-dPG-Nanogels auf die metabolische Aktivität und Zellproliferation von IGK-Zellen | 57 |
| Abbildung 19: Die zelluläre Aufnahme von CMS E-15-350-ICC | 58 |
| Abbildung 20: Histologischer Schnitt mastikatorischer Schleimhaut vom Schwein | 60 |
| Abbildung 21: Histologische Darstellung von auskleidender, oraler Schleimhaut vom Schwein. | 60 |
| Abbildung 22: Histologische Darstellung oraler Schleimhaut vom Schwein nach 6h Penetration mit CMS-A-Nanocarrier | 62 |
| Abbildung 23: Durchschnittliche Eindringtiefen des CMS-Nanocarriers 10-A-18-350 in auskleidende und mastikatorische orale Schleimhaut vom Schwein..... | 62 |
| Abbildung 24: Histologische Darstellung oraler Schleimhaut vom Schwein nach 6h Penetration mit PNIPMAM-(S-S)-dPG-Nanogel..... | 63 |

| | |
|--|----|
| Abbildung 25: Durchschnittliche Eindringtiefen des PNIPMAM-(S-S)-dPG-Nanogels in auskleidende und mastikatorische orale Mukosa vom Schwein..... | 64 |
| Abbildung 26: Ergebnisse der ESR- Untersuchungen..... | 65 |
| Abbildung 27: Versuchsablauf 3D-Modell..... | 67 |
| Abbildung 28: H.E. Färbung verschiedener 3D-Modelle..... | 68 |
| Abbildung 29: 3D-Modell mit Keratinozyten-Nestern..... | 68 |

II Tabellenverzeichnis

| | |
|---|----|
| Tabelle 1: Medienzusammensetzung OKG4/bmi1/TERT..... | 37 |
| Tabelle 2: Versuchsaufbau MTT-Assay..... | 40 |
| Tabelle 3: Versuchsaufbau SRB-Assay; Spalten: Konzentration CMS-Nanocarrier, Zeilen: Wells..... | 41 |
| Tabelle 4: Versuchsaufbau des Penetrationsversuchs an Franz-Zellen mit fluoreszenzmarkiertem CMS-A-Nanocarriern und PNIPMAM-(S-S)-dPG-Nanogel..... | 42 |
| Tabelle 5: Versuchsaufbau der Franz-Zell-Untersuchung für die ESR-Messung..... | 46 |
| Tabelle 6: Primäre und sekundäre Antikörper..... | 48 |

III Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---------|---|
| a(hfc) | Hypofeinkopplungskonstante |
| BPE | bovine pituitary extract |
| BSA | Bovines Serumalbumin |
| CHX | Chlorhexidin |
| CLSM | Konfokale Laserscanningmikroskopie |
| CMS | Core-multishell |
| DAMP | Damage-associated-molecular-pattern |
| DMEM | Dulbecco's Modified Eagle's Medium |
| DX | Dexamethason |
| dPG | Dendritisches Polyglycerin |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| EGF | epidermal growth factor |
| ESR | Elektronenspinresonanzspektroskopie |
| FCS | Fetales Kälberserum |
| fMLP | Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin |
| GAM | goat-anti-mouse |
| GAR | goat-anti-rabbit |
| GCF | gingival cervicular fluid, gingivale Sulkusflüssigkeit |
| Glc | Glucose |
| H.E. | Hämatoxylin-Eosin |
| hPG | hochverzweigtes Polyglycerin |
| HPV | humanes Papillomavirus |
| H2DCFDA | 6-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H2DCFDA) |
| H2O2 | Wasserstoffperoxid |
| ICC | Indocarbocyanine |
| IGK | Immortalisierte gingivale Keratinozyten |
| IhGF | Immortalisierte humane gingivale Fibroblasten |
| K1-20 | Keratin 1-20 |
| LPS | Lipopolysaccharide |
| Mhz | Megahertz |
| MMPs | Matrix-Metalloproteinasen |
| mPEG | Monomethylpolyethylenglycol |

| | |
|---------|--|
| MTT | 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromid |
| NaOCl | Natriumhypochlorit |
| NEA | Non-essential amino acids |
| RhB | Rhodamin B |
| ROS | reaktive Sauerstoffspezies |
| rpm | revolutions per minute, Einheit für die Drehzahl |
| PNIPMAM | poly(N-isopropylmethacrylamide) |
| PNIPAM | poly(N-isopropylacrylamid) |
| panCK | Pan-Cytokeratin |
| PBS | phosphatgepufferte Salzlösung |
| PCA | 3-carboxy-2,2,5,5-tetramethyl-1-pyrroldinyloxy |
| PFA | Paraformaldehyd |
| PMNs | Polymorphkernige neutrophile Granulozyten |
| P/S | Penicillin/Streptomycin |
| PXT | Paclitaxel |
| SPRs | prolin-reiche Proteine |
| SRB | Sulforhodamin B |
| TERT | Telomerase Reverse Transcriptase |
| XTT | Sodium 3,3'- [[(phenylamino) carbonyl]-3,4-tetrazolium]-bis(4- methoxy-6-nitro) Benzolsulfonsäurehydrat |

1 Abstract

DEUTSCH

Die Mundhöhle stellt mit ihren Eigenschaften besondere Anforderungen an die Therapie von Mundschleimhautrekrankungen. Die topische Anwendung von konventionellen Therapeutika ist aufgrund der ständigen Umspülung mit Speichel und der mechanischen Beanspruchung der Schleimhautoberfläche wenig effizient. Die im Kontrast dazu stehende, hohe Prävalenz von Erkrankungen der Mundschleimhaut erfordert deshalb eine Weiterentwicklung der Therapieansätze. Neu entwickelte Nanocarriersysteme dienen dem Transport und der Freisetzung von Wirkstoffen. Sie stellen eine vielversprechende Therapieoption dar, um die Barriere des Epithels zu überwinden. Viele dieser Systeme wurden in den vergangenen Jahren für ihren Einsatz an äußerer Haut getestet. Durch ihren strukturell ähnlichen Aufbau kommt auch die Mundschleimhaut als Zielgewebe solcher neuer Therapiestrategien in Frage. Ultrastrukturelle Unterschiede fordern jedoch eine sorgfältige Überprüfung der Effektivität und Sicherheit solcher Systeme beim Einsatz an oraler Schleimhaut. Zwei unterschiedlich aufgebaute Nanocarriersysteme sind Core-multishell-(CMS)-Nanocarrier und thermosensitive dPG-Nanogele. Die CMS-Nanocarrier 10-A-18-350 und 10-E-15-350 sowie ein thermoresponsives PNIPMAM-(S-S)-dPG-Nanogel wurden im Rahmen dieser Arbeit mittels *in vitro* Zytotoxizitäts- und Proliferationsassays auf ihre Wirkung auf immortalisierte gingivale Keratinozyten überprüft. Es ergaben sich keine zelltoxischen Effekte für die CMS Nanocarrier oder das PNIPMAM-(S-S)-dPG-Nanogel. Letzteres zeigte jedoch eine geringfügige, vorübergehende Abschwächung des Zellmetabolismus. Die Zellzahl blieb unbeeinflusst. Der CMS-Nanocarrier 10-E-15-350 erhöhte die metabolische Aktivität geringfügig. Um die Fähigkeit der genannten Systeme zur Penetration von Schleimhaut zu untersuchen, wurden Penetrationsstudien in Franz-Zellen mit fluoreszenzmarkierten Nanocarriern und -gelen durchgeführt und mittels Laserkonfokalmikroskopie analysiert. Hierbei wurden unverhornte und verhornte Schleimhautproben vom Schwein als Referenzmodell herangezogen. Alle getesteten Systeme waren in der Lage in die Schleimhaut einzudringen. Die Penetration war auf die obersten Zellschichten begrenzt und überschritt nicht das *Stratum corneum*. Mittels Elektronenspinresonanz wurde ebenfalls im Franz-Zell-Experiment die Fähigkeit des CMS 10-E-15-350-Nanocarriers zur Abgabe eines Modellwirkstoffes in die Schleimhaut untersucht. Als Wirkstoff wurde das Glukokortikoid Dexamethason gewählt. In beiden Schleimhauttypen konnte eine Freisetzung in der Epidermis nachgewiesen werden. Besonders bei verhornter Schleimhaut war eine stärkere Anreicherung des Wirkstoffs nach Applikation des Nanocarriers im Vergleich zu einer konventionellen Darreichungsform nachweisbar. Die Untersuchungen belegen, dass vor allem die eingesetzten CMS-Nanocarrier mögliche Transportvehikel für Wirkstoffe zur Therapie von Mundschleimhautrekrankungen darstellen könnten und zu diesem Zweck weiter untersucht werden sollten.

ENGLISH

The special characteristics of the oral cavity challenge the pharmaceutical treatment of inflammatory diseases of the oral mucosa. Constant salivation and mechanical load of the mucosa sites limit the substantivity and efficacy of conventional, locally applied drugs. The particularly high prevalence of oral mucosal diseases therefore requires novel therapeutical approaches. Recently developed nanoparticles can be used for drug transport and delivery. They are considered as a promising new therapeutical option to overcome the epithelial barrier. In recent years, many of them have been successfully tested on human skin. Although skin and gingiva show various structural similarities a careful evaluation of the safety and efficacy of those systems on oral mucosa is mandatory. Core-multishell (CMS) nanocarriers and thermosensitive *N*-isopropylmethacrylamide (NIPMAM) nanogels are two different examples of nanosized carriersystems which differ in architecture. In the present study the CMS nanocarriers 10-A-18-350 and 10-E-15-350 as well as a PNIPMAM-(S-S)-dPG nanogel have been characterized. For this purpose, *in vitro* toxicity and proliferation assays have been performed using immortalized gingival keratinocytes. None of the carrier systems tested showed cytotoxic effects. However, the application of CMS nanocarrier 10-E-15-350 on monolayer cultures showed a slight increase of cell metabolism, whereas the used PNIPMAM-(S-S)-dPG nanogel slightly decreased the metabolic activity of gingival keratinocytes. Cell count, however, stayed unaltered. To investigate the penetration efficacy of the nanocarrier systems into oral mucosa, Franz cell penetration studies have been performed and analyzed via confocal microscopy. As those experiments require a relatively large size of tissue samples, porcine mucosa was used. Keratinized and non-keratinized mucosa tissues have been examined. Both CMS nanocarrier types and the PNIPMAM-(S-S)-dPG nanogel were capable of penetrating each type of mucosal tissue. The penetration was limited to the upper cell layers and did not exceed *Stratum corneum*. Franz cell experiments and subsequent electron paramagnetic resonance spectroscopy (EPR) analysis were performed to examine the release of a model drug loaded to the CMS 10-E-15-350 nanocarrier. Here, the glucocorticoid dexamethasone was used. The results show the ability of CMS 10-E-15-350 to deliver dexamethasone into mucosal tissues of keratinized and non-keratinized type. The CMS-nanocarrier showed a considerably improved dexamethasone release compared to a conventional cream formulation. Taken together, nanosized carrier systems could provide a novel approach for the delivery of compounds to diseased areas of the oral mucosa. Further investigation should be conducted particularly with regard to the CMS nanocarrier 10-A-18-350 and 10-E-15-350.

2 Einleitung

2.1 Morphologie und Struktur humaner Mundschleimhaut

Die Mundhöhle ist als oberster Abschnitt der Luft- und Speisewege verschiedensten Einflüssen ausgesetzt. Dabei dient die Mundschleimhaut wie die äußere Haut als Barriere gegen chemische, physikalische und mikrobielle Reize und nimmt eine wichtige Rolle der körpereigenen Abwehr ein. Die Mundschleimhaut teilt sich je nach Region in zwei bis drei Schichten auf (Abb. 1).

Die *Epidermis* als oberflächlichste Schicht besteht fast ausschließlich aus Keratinozyten und ist avaskulär. Diese Zellschichten bilden ein mehrschichtiges Plattenepithel, welches je nach Region verhornt (keratinisiert) oder unverhornt vorliegt.

Über eine Basalmembran ist die Epidermis mit der bindegewebigen *Lamina propria* verbunden, welche neben Blutgefäßen und Drüsen auch zahlreiche Zellen der Immunabwehr enthält. In manchen Regionen folgt darauf eine bindegewebige *Submukosa*.

Die Verbindung der Epithelschicht mit dem darunterliegenden Bindegewebe ist in charakteristische Epithelzapfen (sog. Reteleisten) aufgeworfen, sodass eine Verzahnung entsteht. Dadurch resultiert eine bessere Verankerung des Epithels und eine vergrößerte Oberfläche für die Perfusion [1]. Im Bereich der mastikatorischen Mundschleimhaut fehlt die Submukosa. Hier ist die Mukosa direkt mit dem Periost verbunden. Dadurch entsteht das charakteristische, unverschiebbliche Mukoperiost der mastikatorischen Schleimhaut (auch befestigte Schleimhaut oder *attached gingiva* genannt).

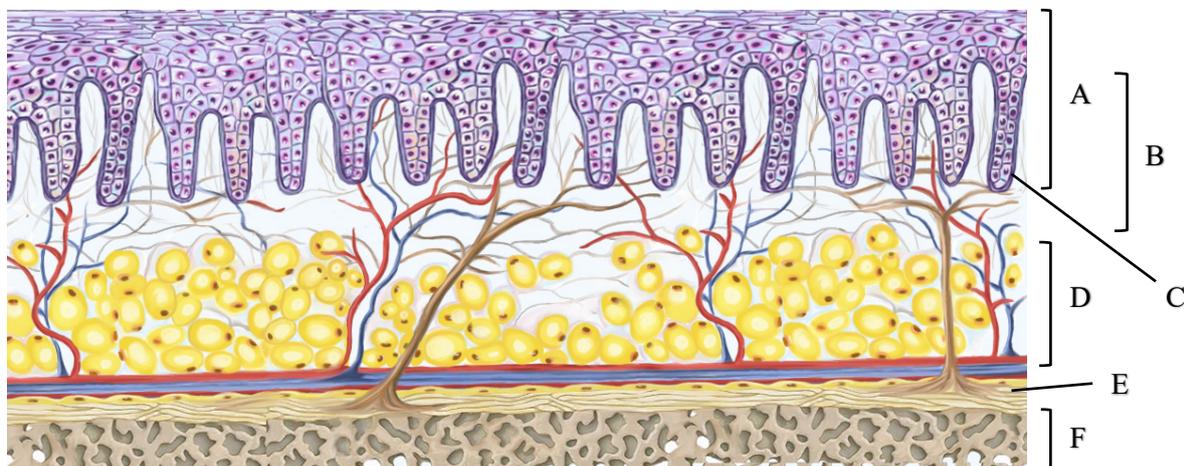


Abbildung 1: Schichtung der oralen Mukosa. A *Epidermis*; B *Lamina propria*; C Basalmembran; D *Submukosa*; E Periost, F Knochen

Durch die unterschiedliche Funktion und Beanspruchung der Mundschleimhaut, z.B. durch mechanische Reize beim Kauvorgang, können in der Mundhöhle verschiedene Schleimhaut-Typen unterschieden werden. Der Bereich des harten Gaumens und der die Zähne umgebende Anteil des Alveolarfortsatzes sind mit sogenannter mastikatorischer Schleimhaut bedeckt (Abb. 2). Diese Regionen sind keratinisiert und

machen ca. 25% der oralen Mukosa aus [2]. Die Anteile der mastikatorischen Schleimhaut, welche die Zähne umschließen, werden als Gingiva bezeichnet. Die Gingiva ist ein Teil des Zahnhalteapparates (Parodontium).

Die auskleidende Schleimhaut findet sich am intraoralen Teil der Lippen und Wangen, am Mundboden, der Unterseite der Zunge und am weichen Gaumen. Sie ist unverhornt. Zum Teil kommen parakeratinisierte Anteile vor, bei denen der Differenzierungsprozess unvollständig ist. Ca. 60% der Schleimhautoberfläche der Mundhöhle bestehen aus unverhornter Mukosa [3]. Auch die auskleidende Schleimhaut weist lokale Unterschiede auf. Bukkale Anteile bestehen aus ca. 40-50 Zellschichten, wohingegen sublingual weniger Zellschichten vorhanden sind. Die Dicke der bukkalen Schleimhaut beträgt ca. 500-800µm. Die keratinisierte Schleimhaut des Gaumens misst hingegen nur ungefähr 100-200µm [1].

Die Schleimhaut des Zungenrückens ist Teil des Geschmacksorgans und hat einen auf diese spezielle Funktion abgestimmten histologischen Aufbau. Sie wird als spezialisierte Schleimhaut bezeichnet. Da sich dieses Areal strukturell und funktionell deutlich von der mastikatorischen und auskleidenden Schleimhaut unterscheidet und häufig nicht das Ziel therapeutischer Maßnahmen ist, soll im Rahmen dieser Arbeit auf die spezialisierte Schleimhaut nicht weiter eingegangen werden.

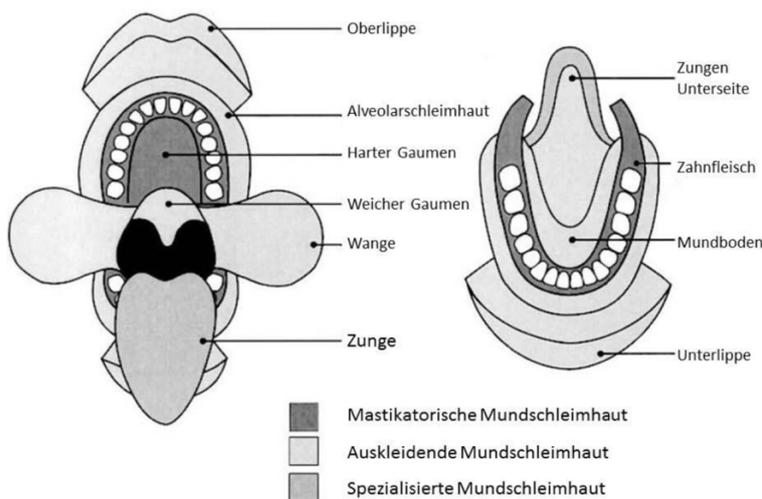


Abbildung 2: Mundschleimhauttypen nach Lage in der Mundhöhle, modifiziert nach Squier und Kremer [3]

Das mehrschichtige Plattenepithel der Mundschleimhaut ist in Schichten aufgebaut, wobei sich die Schichtung der mastikatorischen und auskleidenden Mukosa funktionsbedingt unterscheidet (Abb. 3). Die Keratinozyten der Epidermis gehen aus Stammzellen im *Stratum basale* hervor und wandern im Laufe der Zeit an die Epitheloberfläche. Der Zellersatz durch Mitosen erfolgt aus dem *Stratum basale*, welches über die Basalmembran mit der *Lamina propria* verbunden ist. Die Keratinozyten durchlaufen einen Differenzierungsprozess, welcher im oralen Epithel 14-24 Tage dauert [2]. Dieser Prozess bedingt die histologische Schichtung des Epithels, da sich die Morphologie der Zellen mit ihrer Differenzierung ändert.

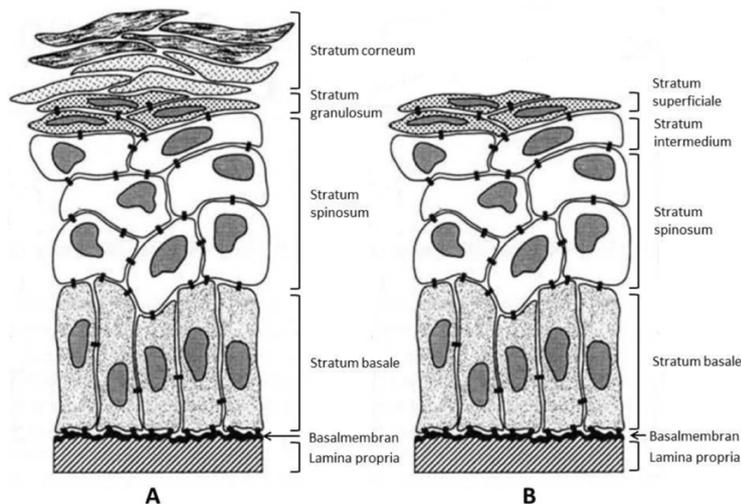


Abbildung 3: Schematische Darstellung des keratinisierten (A) und unverhornten (B), mehrschichtigen Plattenepithels der Mundhöhle, modifiziert nach Presland und Dale [4]

Sowohl in mastikatorischer (keratinisierter) als auch in auskleidender (unverhornter) Schleimhaut schließt sich an die mitotisch aktive Zelllage das sogenannte *Stratum spinosum* an.

In mechanisch stark beanspruchten Bereichen verhornt das Epithel. Diese Verhornung beginnt im *Stratum granulosum* und ist im *Stratum corneum* abgeschlossen (s. Abb. 3).

Kennzeichnend für diese histologische Schicht ist, dass die Zellen kernlos, avital und mit filamentösem, unlöslichem Keratin angereichert sind. Diese Zellen werden auch als Corneozyten bezeichnet. Keratine formen ein dreidimensionales Netzwerk innerhalb des Intrazellularraums und dienen zur Stabilisierung der Zellstruktur. Im *Stratum granulosum* beginnt die Aggregation der Zytokeratinfilamente. Lichtmikroskopisch werden hier sogenannte Keratohyalin granula sichtbar. Keratin spielt eine zentrale Rolle bei der chemischen und mechanischen Barrierefunktion des verhornten Plattenepithels. Außerdem trägt die sogenannte Hornhülle (cornified envelope) zu dieser Funktion bei. Sie ersetzt bei terminal differenzierten Keratinozyten die Plasmamembran und besteht aus vernetzten Proteinen und Lipiden [5].

Neben dem Schutz vor äußeren Reizen verhindert die Hornschicht des Epithels auch den Verlust von Wasser durch Diffusion. Hierzu werden im *Stratum granulosum* polare Lipide produziert und durch Exozytose in den Extrazellularraum freigesetzt. Zusätzlich erfolgt ein dichter Verbund der obersten Zelllagen durch sogenannte Tight Junctions. Alle beschriebenen Mechanismen erschweren oder verhindern die Diffusion insbesondere von wasserlöslichen Stoffen (z.B. Arzneimitteln) durch die Hornschicht.

2.2 Ultrastruktur des Epithels: Differenzierung und epitheliale Barriere

Die Differenzierung von Keratinozyten trägt maßgeblich zur Bildung der mechanischen und chemischen Barriere von Epithelien bei. Dieser Differenzierungsprozess unterliegt einer exakten biochemischen Regulierung. Je nach Differenzierungsgrad weisen Keratinozyten bestimmte morphologische und strukturelle Eigenschaften auf, welche sich durch die unterschiedliche Expression von Proteinen

ergeben [6]. Ein labortechnischer Nachweis bestimmter Proteine kann als Indikator für den Status der Zell-Differenzierung genutzt werden.

2.2.1 Keratine

Die mechanische Stabilität von Zellen wird durch Strukturproteine hergestellt, die ein Netzwerk im Zytoplasma der Zelle bilden und sich von der Plasma- zur Kernmembran erstrecken. Die in Keratinozyten vorherrschenden Strukturproteine sind die Zytokeratine, die zur Gruppe der Intermediärfilamente gehören [7]. Man unterscheidet zwei Keratinfamilien, die sich in ihrem chemischen Verhalten unterscheiden:

- Typ I: saure Keratine (K9-K20)
- Typ II: basische und neutrale Keratine (K1-K8)

Je nach Zellverband werden verschiedene Keratine exprimiert, die sich zu charakteristischen Heterodimeren zusammenlagern [4]. Hierbei haben Keratine nicht nur einen entscheidenden Einfluss auf die strukturelle Stabilität, sondern tragen in keratinisierten Epithelien auch entscheidend zum Aufbau der Gewebsbarriere bei. Die Keratinozyten in mehrschichtigen Plattenepithelien wandern von der basalen Zellschicht Richtung Oberfläche. Auf diesem Weg findet eine Differenzierung statt, bei der es zu einer veränderten Synthese von Keratinen und anderen Proteinen kommt. In proliferierenden Keratinozyten des *Stratum basale* dominiert die Expression von Keratin 5 und 14 sowohl in der keratinisierten als auch in der auskleidenden Mukosa. Zusätzlich lässt sich Keratin 19 in der basalen Zellschicht von auskleidender Schleimhaut nachweisen [8]. Suprabasal findet sich bei der auskleidenden Mukosa das Keratinpaar 4 und 13, während die oberen Zellschichten der verhornten oralen Schleimhaut Keratin 6 und 16, Keratin 1 und 10 und Keratin 2p aufweisen [5]. Keratin 1 und 10 werden häufig als frühe Differenzierungsmarker genutzt [9]. Im *Stratum granulosum* zeigen sich Keratohyalingranula als Organellen im Zytoplasma, welche neben Keratin das Protein Profilaggrin enthalten. Dieses ist ein Vorläuferprotein des Filaggrins, welches im *Stratum corneum* calciumabhängig an der Vernetzung von Keratin-Intermediärfilamenten beteiligt ist [4].

2.2.2 Proteine der zellulären Hornhülle

Eine zentrale Rolle der Barrierefunktion von verhornten Epithelien spielt die Hornhülle (cornified envelope) der Zellen des *Stratum corneum*.

Die Hauptkomponenten dieser Hornhülle sind Loricrin, prolin-reiche Proteine (SPRs) und Involucrin [10]. Loricrin lässt sich in keratinisierten Epithelien nachweisen, wohingegen Involucrin zum Teil auch in nicht-keratinisierten Epithelien exprimiert wird. Involucrin dient als Bestandteil der Hornhülle als Träger für Lipide (z.B. Ceramide). *In vitro* kann die Differenzierung von Keratinozyten durch Kultivierung in Medium mit erhöhter Calciumkonzentration angestoßen werden. Als Differenzierungsmarker eignen sich Loricrin, Involucrin, K1, K10 und Profilaggrin [4].

2.2.3 Zell-Kontakte

Interzelluläre Verbindungen und Zell-Matrix-Verbindungen sind zentrale strukturelle Komponenten von Zellverbänden. Sie haben drei Hauptfunktionen: zelluläre Kommunikation, Adhäsion und Aufbau einer mechanischen und chemischen Barriere. Neben ihrer Rolle in der Architektur von Geweben, haben sie auch einen entscheidenden Einfluss auf Differenzierungs- und Reparaturprozesse [11]. Für die Barrierefunktion in Epithelien sind vor allem Tight Junctions und Desmosomen von Bedeutung. Diese intrazellulären Verbindungen können vermehrt bei fortschreitender Differenzierung in verhornenden Epithelien nachgewiesen werden. Sie sind aus verschiedenen Transmembranproteinen und zytoplasmatischen Proteinen aufgebaut. Tight Junctions sind die undurchlässigsten Zellkontakte und kontrollieren insbesondere die parazelluläre Diffusion von Molekülen. Die vorherrschenden Transmembranproteine der Tight Junctions sind Occludin und Claudine. Desmocolline und Desmogleine, welche zur Superfamilie der Cadherine gehören, formen den transmembranären Anteil der Desmosomen [11].

2.3 Strukturelle Unterschiede zwischen oraler Schleimhaut und der äußeren Haut

Sowohl die beiden Schleimhauttypen der Mundhöhle als auch die Epidermis der äußeren Haut sind als mehrschichtiges Plattenepithel aufgebaut. Es existieren viele strukturelle Gemeinsamkeiten, jedoch unterscheiden sich die äußeren Einflüsse, denen die Epithelien ausgesetzt sind, deutlich. Während die äußere Haut mit wechselnder Feuchtigkeit und Temperatur in Kontakt kommt, befinden sich die oralen Schleimhäute konstant in einem feuchten Milieu mit ca. 37°C [12]. Haut und Mundschleimhaut erfüllen eine wichtige Barrierefunktion, jedoch zeigt die orale Mukosa insgesamt eine höhere Permeabilität als die äußere Haut, wobei hier zwischen auskleidender und verhornter Schleimhaut unterschieden werden muss [13]. Schon 1989 wurde die Permeabilität von humaner Haut und Mundschleimhaut gegenüber Wasser verglichen, wobei die äußere Haut signifikant weniger permeabel war. Lesch et al zeigten außerdem, dass sich die Permeabilität innerhalb der Mundhöhle deutlich unterschied. Keratinisierte Schleimhaut war am undurchlässigsten, jedoch unterschieden sich auch die auskleidenden Areale untereinander. Am durchlässigsten war die Schleimhaut des Mundbodens [14].

Sowohl in verhornter als auch in unverhornter Mundschleimhaut finden sich mehr Zellschichten mit proliferativen Zellen und erhöhter Ki-67-Expression als im Epithel der äußeren Haut [15]. Ki-67 ist ein Protein der Zellteilung, welches als Proliferationsmarker genutzt wird. Im Vergleich zur Epidermis zeichnet sich das orale Epithel somit durch einen höheren Zellturnover aus, was ein Grund für die schnellere Wundheilung in der Mundhöhle im Vergleich zur Haut ist [16].

Im Gegensatz zur äußeren Haut finden sich in der oralen Mukosa keine Anhangsgebilde wie Haarfollikel oder Schweißdrüsen. Es kommen lediglich kleine Speicheldrüsen und in geringer Zahl auch ektopische Talgdrüsen (Fordyce-Drüsen) vor [3].

Die Keratinexpression von Epidermis und keratinisierter Mundschleimhaut ähnelt sich, jedoch lässt sich Keratin 6 und 16 nur in verhornter Schleimhaut und bei der Wundheilung nachweisen [4]. Außerdem gelten

Keratin 13 und 17 als Gingiva-spezifische Keratine, welche in den suprabasalen Schichten vorkommen [17]. In allen genannten Epitheltypen finden sich Proteine, welche als Marker für Differenzierungsprozesse angesehen werden. Hierzu gehören zum Beispiel Keratin 10, Involucrin und Loricrin. In der äußeren Haut lassen sich diese Proteine hauptsächlich im *Stratum granulosum* und *spinosum* nachweisen. In Gingiva befinden sie sich suprabasal. Während in der äußeren Haut Loricrin ca. 70% des Proteinanteils der zellulären Hornhülle (cornified envelope) ausmacht, ist die Loricrin-Konzentration im Epithel des harten Gaumens auf 30-50% reduziert. In auskleidender Schleimhaut und damit unverhorntem Epithel lässt sich Loricrin physiologisch nicht nachweisen [10].

Äußere Haut und orale Schleimhäute unterscheiden sich außerdem in ihrer Expression von verschiedenen Desmoglein-Subtypen. Desmoglein ist ein Transmembranprotein, welches bei Zell-Kontakten eine wichtige Rolle spielt. In der Epidermis der äußeren Haut kann neben Desmoglein 2 und 3, vermehrt Desmoglein 1 nachgewiesen werden, wohingegen Desmoglein 3 in oraler Schleimhaut vorherrscht [18]. Dies wird insbesondere bei blasenbildenden Autoimmunerkrankungen wie *Pemphigus vulgaris* deutlich. Sind vermehrt Autoantikörper gegen Desmoglein 3 vorhanden, kommt es insbesondere zu oralen Läsionen. All die genannten Faktoren demonstrieren, dass die Epithelien der Mundschleimhaut und äußeren Haut zwar strukturell ähnlich aufgebaut sind, jedoch auch deutliche ultrastrukturelle Unterschiede bestehen, welche die medikamentöse Therapie beeinflussen können. Aus diesem Grunde ist es wichtig, vielversprechende Therapiekonzepte aus der Dermatologie auf ihre Anwendbarkeit in der Mundhöhle zu prüfen und gegebenenfalls anzupassen.

2.4 Erkrankungen der Mundschleimhaut

Krankhafte Veränderungen der Mundschleimhaut zeigen sich in verschiedensten Ausprägungen und Schweregraden. Ihre Ursachen sind vielfältig. Sie können Folge einer spezifischen Infektion, einer Autoimmunkrankheit oder Manifestation einer systemischen Erkrankung sein. Hinzu kommen Hypersensitivitätsreaktionen, sowie traumatische Läsionen und reaktive Prozesse. Auch genetische Defekte können Auslöser sein (z.B. hereditäre gingivale Fibromatose).

Als eine der häufigsten Läsionen der Mundschleimhaut gelten Aphthen. Es handelt sich um sehr schmerzhaft Ulzera mit nekrotischem Zentrum, die zumeist in periodischen Abständen bei einem Individuum auftreten und keiner anderen Erkrankung zugeordnet werden können. Schätzungsweise 20% der Allgemeinbevölkerung leiden unter wiederkehrenden Aphthen. Die Ätiologie ist ungeklärt, vieles deutet auf eine genetische Prädisposition hin [19].

Infektionen der oralen Mundschleimhaut können viralen, bakteriellen oder selten parasitären Ursprungs sein. Hinzu kommen orale Mykosen. Beispiele von Virusinfektionen mit oraler Beteiligung sind humane Herpesviren, humane Papillomaviren und Cosackieviren. Bakterielle Infektionen sind zum Beispiel

Scharlach, Lues oder auch Tuberkulose. Zu den hervorgerufenen Schleimhautveränderungen zählen schmerzhafte Ulzerationen, Papillome, Warzen und Erytheme.

Die häufigsten oralen Mykosen werden durch *Candida*-Stämme wie *Candida albicans* hervorgerufen. Hierzu zählen die Pseudomembranöse Candidiasis und die erythematöse orale Candidiasis (Prothesen-Stomatitis). *Candida*-Spezies kommen häufig als Kommensale bei gesunden Individuen vor. Bei schätzungsweise 30-55% von gesunden Erwachsenen lassen sie sich im oralen Biofilm nachweisen. Lokale und systemische Faktoren können zu einer überschießenden Vermehrung führen, die zum Beispiel in den oben genannten krankhaften Mykosen mündet [20]. Systemisch spielen angeborene oder adaptierte Immunschwächen eine Rolle. Auch temporäre Veränderungen des Biofilms durch Antibiotikagabe können ursächlich sein. Ein lokaler Faktor kann zum Beispiel prothetischer Zahnersatz sein.

Zu Mundschleimhauterkrankungen autoimmunen Ursprungs zählt der orale *Lichen planus*. Er tritt mit einer weltweiten Prävalenz von ca. 2% auf, wobei Frauen häufiger betroffen sind als Männer. Er stellt sich häufig als hyperkeratotische, weiße Streifung der Schleimhaut dar (sog. *Wickham striae*). In anderen Ausprägungen treten atrophische Läsionen oder Ulzera auf. Betroffene Patienten leiden häufig unter einem Schleimhautbrennen, Schmerzen und lokalen Schwellungen [21]. Andere Autoimmunerkrankungen mit Beteiligung der oralen Schleimhäute sind blasenbildende Erkrankungen wie *Pemphigus vulgaris* oder *Epidermolyisis bullosa*. Charakteristisch sind schmerzhafte orale Ulzera und Erosionen, die zum Teil zu Blutungen führen können [22].

Neben Infektionen und Autoimmunerkrankungen gibt es auch zahlreiche Systemerkrankungen mit oraler Manifestation. Ein Beispiel ist die sogenannte Graft-versus-Host-Reaktion. Sie gilt als die häufigste Komplikation nach allogener, hämatopoetischer Stammzelltransplantation und tritt mit einer Inzidenz von 30-50% auf [23]. Die Immunzellen des Spenders erkennen das Gewebe des Empfängers als fremd und es entsteht eine systemische Entzündungsreaktion, die zu Gewebsschädigungen insbesondere von Darm und Haut führt. In der Mundhöhle kann sich die Graft-versus-Host-Reaktion als schmerzhafte Mukositis darstellen.

Bei vielen der genannten Beispiele ist die Integrität des Epithels beeinträchtigt. Es kann zu Superinfektionen durch Bakterien des oralen Mikrobioms kommen. Zur Schmerzlinderung oder Eindämmung einer Entzündungsreaktion ist häufig eine topische, medikamentöse Therapie angezeigt.

2.4.1 Entzündliche Mundschleimhaut und Parodontalerkrankungen

Zu den häufigsten pathologischen Veränderungen in der Mundhöhle zählen Entzündungen des Zahnfleisches und des Zahnhalteapparates. So treten bei jedem Menschen mindestens zeitweise oder lokalisiert Gingivitiden auf. Auch bei diesen Erkrankungen ging man historisch von einer spezifischen Infektion mit

bestimmten pathogenen Keimen als Ursache aus. Neuere Untersuchungen haben jedoch gezeigt, dass es sich bei der Entstehung dieser entzündlichen Zustände um ein komplexes Zusammenspiel von oralen Mikroorganismen und immunologischen Faktoren des Wirts handelt. Das sogenannte orale Mikrobiom besiedelt alle Oberflächen der Mundhöhle und seine Zusammensetzung hängt von vielen lokalen und systemischen Faktoren, wie z.B. pH-Wert oder Temperatur, ab. Verschiedene Regionen der Mundhöhle zeichnen sich durch ihre unterschiedlichen physikalisch-chemischen Eigenschaften aus. Die Zahnoberfläche bietet beispielsweise völlig andere Voraussetzungen für die mikrobielle Besiedlung als die abschilfernde Schleimhaut. Aus diesem Grund ist die Zusammensetzung des Mikrobioms heterogen [24]. Die kolonisierenden Bakterien müssen sich an den spezifischen Oberflächen anheften können und gegen mechanischen Abrieb und Abspülung durch Speichel und Sulkusflüssigkeit resistent sein. Bis dato sind ca. 1000 verschieden Mikroorganismen-Spezies bekannt, die in der Lage sind die Mundhöhle zu besiedeln [25]. Die Zusammensetzung des Mikrobioms unterliegt einer komplexen Regulierung durch Signalkaskaden, die sowohl vom Wirtsorganismus als auch von äußeren Faktoren beeinflusst wird. Als Grundlage vieler Veränderungen in der Mundhöhle wird heute eine dysbiotische Verschiebung der oralen Flora angenommen. Sie gilt als auslösender Faktor für entzündliche Erkrankungen wie Gingivitis und Parodontitis und spielt darüber hinaus auch eine entscheidende Rolle bei der Kariesentstehung [26].

2.4.2 Parodontale Erkrankungen: Ätiologie und Pathogenese

Der Zahnhalteapparat (*Parodontium*) dient zur Verankerung der Zähne im Alveolarknochen. An seinem Aufbau beteiligte Strukturen sind Gingiva, alveolärer Knochen, Wurzelzement des Zahns und ein bindegewebige Faserapparat (*Desmodontium*), welcher die einzelnen Strukturen miteinander verbindet. Man unterscheidet verschiedene Erkrankungen, die das Parodontium betreffen (Abb. 4).

Die Parodontitis ist eine entzündliche Erkrankung des Parodontiums. Es handelt sich in der Regel um ein chronisches Geschehen, welches zu einer sukzessiven Zerstörung des parodontalen und gingivalen Bindegewebes sowie des Alveolarknochens führt. Die Prävalenz der Erkrankung beträgt 40-50% der Erwachsenen in milder Ausprägung [27]. Eine schwere Parodontitis betrifft 11,2% der weltweiten Bevölkerung [28]. Die Folgen sind neben Zahnverlust auch eine erhöhte Mortalität bei Komorbiditäten wie beispielsweise Herz-Kreislauf-Erkrankungen und *Diabetes mellitus* Typ 2 [27] [29].

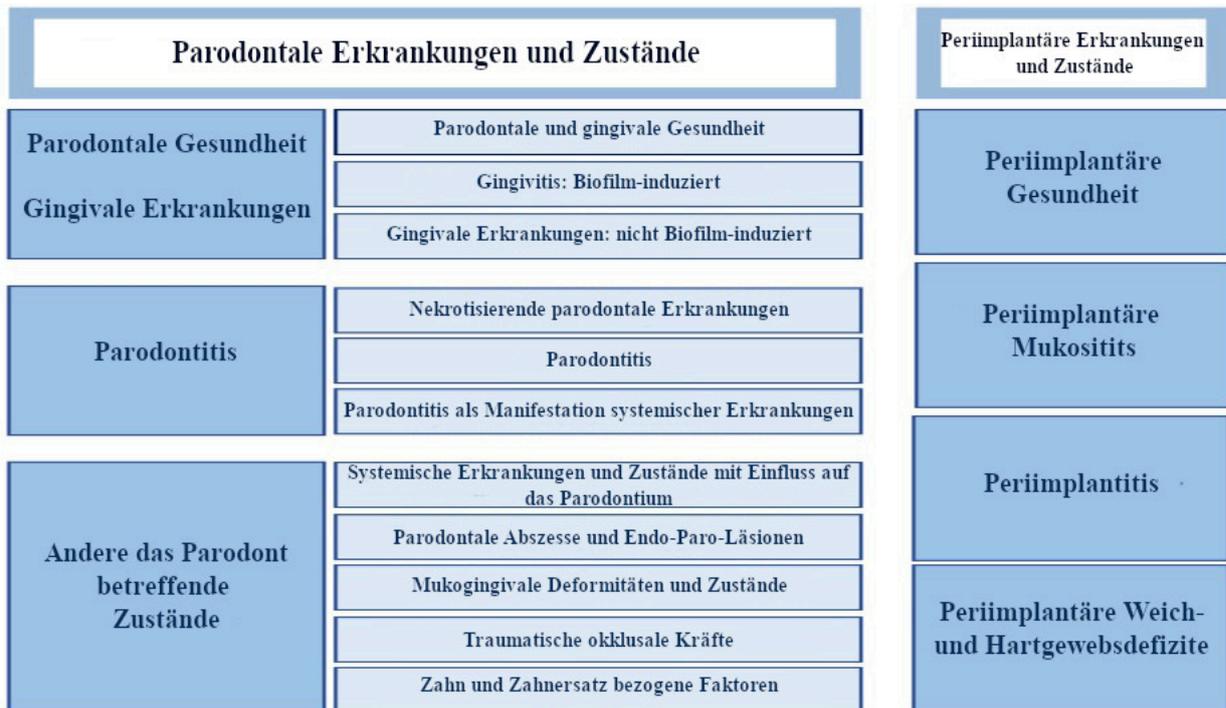


Abbildung 4: Aktuelle Klassifikation parodontaler und periimplantärer Erkrankungen und Zustände (modifiziert nach [30])

Eine Parodontitis wird initiiert durch die subgingivale Akkumulation eines pathogenen Biofilms, welcher hauptsächlich aus gramnegativen, anaeroben Bakterien besteht (Abb. 5)

Als Leitkeime gelten *Porphyromonas gingivales*, *Bacterioides forsytheis* und *Actinobacillus actinomycescomitans*. Diese sind als alleiniger Faktor jedoch nicht krankheitsauslösend [31].

Die Krankheitsentstehung ist ein komplexes Zusammenspiel von Biofilm und der inflammatorischen Immunantwort des Patienten, welche durch intrinsische und adaptierte Komponenten beeinflusst wird (Abb. 5). Es wird angenommen, dass 80% der Gewebszerstörung der patienteneigenen, überschießenden Immunreaktion zugrunde liegt [32]. Im Zustand klinischer Gesundheit herrscht ein gesundheitsfördernder Biofilm vor, welcher in einer Symbiose mit dem Wirtsorganismus organisiert ist. Zwar kommt es auch hier zu einer Aktivierung des Immunsystems, jedoch ist die Immunantwort nicht überschießend und führt zu einer Eindämmung der Entzündung (Abb. 5). Polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMNs) befinden sich auch im Gesundheitszustand in erhöhter Zahl im Gewebe. Die Bedeutung der PMNs für die Erhaltung eines symbiotischen Zustands wird deutlich, wenn es zu angeborenen Defiziten der Zahl oder der Diapedese kommt (z.B. Neutropenie). Bei diesen Patienten liegt stets eine Parodontitis vor [33].

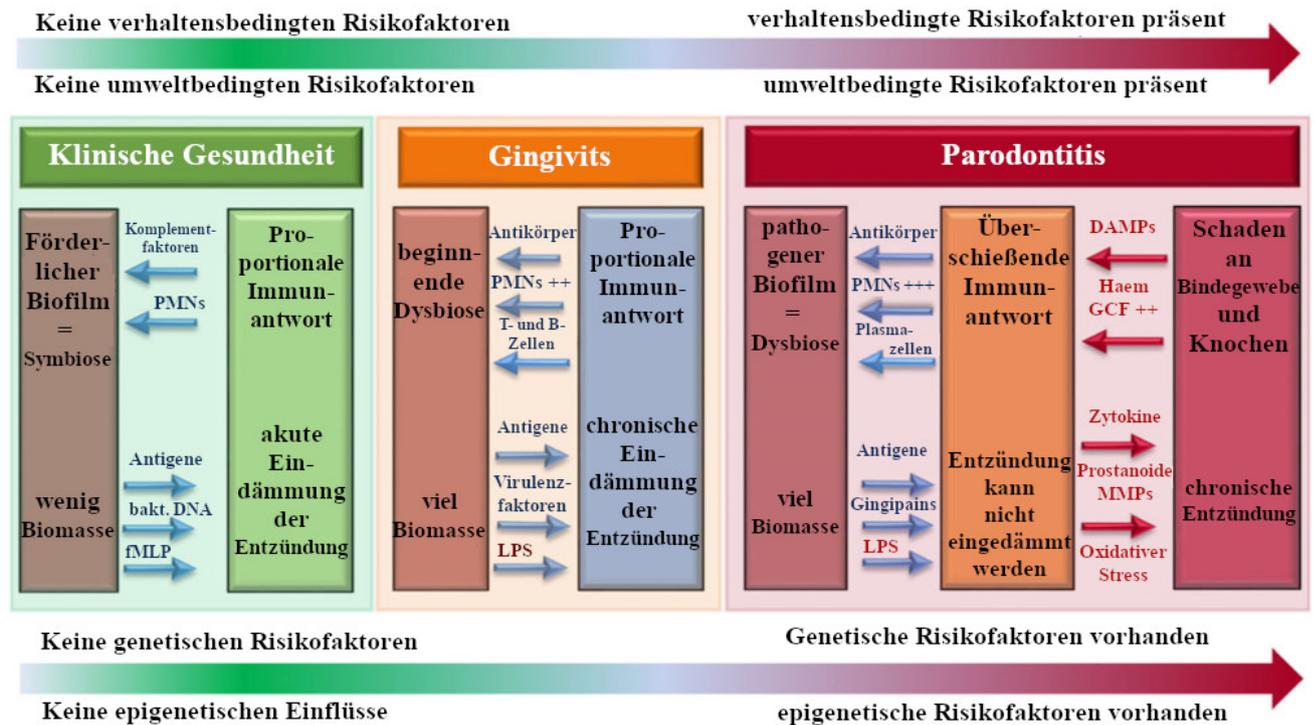


Abbildung 5: Einflussfaktoren und Verlauf von parodontaler Gesundheit zu einer manifestierten Parodontitis nach Chapple [32] (DAMP = Damage-associated-molecular-pattern; fMLP= Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin, chemotaktisches Peptid; GCF = gingival cervical fluid, gingivale Sulkusflüssigkeit; LPS = Lipopolysaccharide, Bestandteil der Zellmembran von Bakterien; Gingipains = von *Porphyromonas gingivales* produzierte Proteasen, welche die Immunantwort des Wirts komprimittieren; MMPs = Matrix-Metalloproteinasen; PMN = polymorphkerniger, neutrophiler Granulozyt; Prostanoid = Unterklasse von Entzündungsmediatoren)

Durch regelmäßige mechanische Abtragung ist die Masse des Biofilms bei parodontal gesunden Patienten in der Regel gering. Bei unzureichender Mundhygiene kommt es zu einer vermehrten Ansammlung von Biofilm. Dies führt zu einem veränderten Angebot an Nährstoffen und einem veränderten Mikromilieu, was wiederum in einer Änderung der Zusammensetzung des Biofilms mündet. Es findet eine verstärkte Proliferation von parodontal pathogenen Keimen statt. Darüber hinaus können beim gesunden Patienten als Kommensale vorkommende Bakterien-Spezies im Zustand der Dysbiose ebenfalls pathogen wirken. Die Bakterien setzen Lipopolysaccharide frei und weisen zum Teil bestimmte Virulenzfaktoren auf, was ihren Einfluss auf den Wirtsorganismus erhöht. Dieser kann verschiedentlich reagieren. Bei Patienten, die nicht für eine Parodontitis anfällig sind, kommt es zu einer Entzündungsreaktion, welche noch immer vom Immunsystem eingedämmt werden kann. Die Immunantwort ist proportional zu den auslösenden Faktoren. Dieser Zustand wird als beginnende Dysbiose bezeichnet (Abb. 5). Es liegt eine Gingivitis vor. Diese ist reversibel, sobald der Biofilm entfernt wird und eine ausreichende Mundhygiene hergestellt wird. Bei vielen Menschen besteht über Jahre hinweg eine Gingivitis, ohne dass sich daraus eine Parodontitis entwickelt. Ein bestimmter Anteil von Patienten ist jedoch durch genetische, epigenetische, Umwelt- und intrinsische Faktoren prädisponiert für die Entwicklung einer Parodontitis. Bei diesen Patienten führt die

beginnende Dysbiose zu einer exzessiven Immunantwort, welche nicht proportional zur Bakterienmasse ist und eine Zerstörung von körpereigenem Gewebe des Zahnhalteapparates zur Folge hat. Die dabei freigesetzten Botenstoffe triggern die überschießende Entzündungsreaktion weiter, sodass sich ein chronischer Prozess entwickelt (Abb. 5). Wie genau es zu einem Übergang von gesunder Homöostase zu destruktiver Dysbiose kommt, ist bisher nicht abschließend geklärt. Nach heutigem Stand der Forschung handelt es sich um ein multifaktorielles Geschehen, bei dem mikrobielle, Wirts- und Umweltfaktoren eine Rolle spielen. Bestimmte Ernährungsweisen und Rauchen können das Krankheitsbild verschlechtern. Klinisch ist die Bildung von sogenannten parodontalen Zahnfleischtaschen charakteristisch. Im gesunden Zustand bildet die Gingiva eine Furche um den Zahn, welche als gingivaler Sulkus bezeichnet wird (Abb. 6). Der Sulkus ist mit Sulkusepithel ausgekleidet und mit einem Exsudat des umliegenden Gewebes gefüllt (Sulkusfluid). Es erfüllt eine Spülfunktion und enthält Komponenten der Immunabwehr. Liegt eine Parodontitis vor, ist der Sulkus durch eine entzündliche Schwellung der Gingiva vertieft und wird als parodontale Tasche bezeichnet. Innerhalb dieser Tasche (subgingival) akkumulieren Biofilm und Zahnstein.

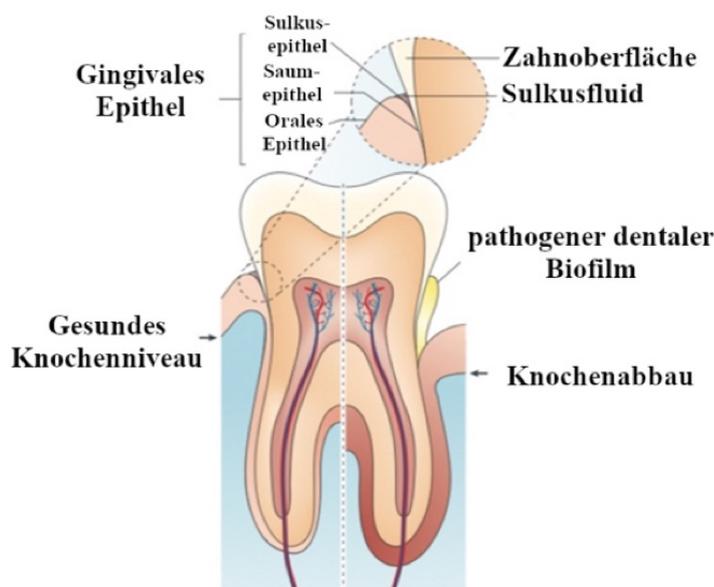


Abbildung 6: Schematische Darstellung des Parodontium in gesundem und entzündetem Zustand.

Links: Gesundes Parodontales Gewebe. Das sogenannte Saumepithel verbindet die Bindegewebsanteile des Parodontiums mit der Zahnoberfläche. Rechts: Vereinfachte Darstellung des Gewebszustandes bei Parodontitis. Das Knochenniveau ist verringert und die bindegewebige Verankerung gestört. Abbildung modifiziert nach Darveau [33]

2.5 Therapeutische Ansätze

2.5.1 Parodontitistherapie

Da die genauen Mechanismen der Krankheitsentstehung nach heutigem Forschungsstand ungeklärt sind, existiert bis dato keine kausale Therapie. Gesichert ist jedoch, dass die Menge und Qualität des Biofilms einen entscheidenden Einfluss auf die Entwicklung und das Fortschreiten der Erkrankung haben [34]. Aus diesem Grund wird zur Prävention und Therapie von Parodontalerkrankungen eine regelmäßige mechanische Entfernung der mikrobiellen Plaque empfohlen. Nach erfolgreicher Vorbehandlung durch

chirurgische und zahnerhaltende Maßnahmen (Füllungstherapie, endodontische Therapie) wird hierbei durch professionelle Zahnreinigung und individuelle Mundhygieneinstruktion zunächst eine adäquate Mundhygiene etabliert. Daran schließt sich die sogenannte geschlossene mechanische Parodontitistherapie an. Bei dieser wird subgingival liegender Biofilm und Zahnstein entfernt. Hierzu können Hand- und maschinelle Instrumente verwendet werden [35]. Im Rahmen der Parodontitistherapie werden häufig lokale Chemotherapeutika eingesetzt, um die Bakterienanzahl in der parodontalen Tasche zu verringern. Hierzu wird beispielsweise mittels stumpfer Kanüle eine Taschenspülung mit verschiedenen Antiseptika (z.B. Chlorhexidin (CHX), H₂O₂) durchgeführt. Die Wirkung ist jedoch begrenzt, da die Therapeutika durch das Sulkusfluid schnell wieder ausgespült werden. Um die limitierte Substantivität und der Verdünnung von Wirkstoffen in der Mundhöhle entgegenzuwirken, gibt es verschiedene Ansätze. So können biodegradierbare Gele oder Trägersysteme in die parodontale Tasche eingebracht werden und dort im Sinne einer kontrollierten Freigabe verschiedene Wirkstoffe wie beispielsweise CHX freisetzen [36].

Teils wird die Parodontitistherapie durch eine adjuvante systemische Antibiotikagabe unterstützt. Zusätzlich können chirurgische Maßnahmen erfolgen. Die Ziele eines therapeutischen Eingreifens liegen in der Prävention, dem Erhalt des strukturellen *Status quo* oder der Regeneration von Gewebe. Die beschriebenen Therapiemaßnahmen zielen in der Regel darauf ab, die Progression der Erkrankung aufzuhalten. Der krankheitsbedingte Knochenverlust ist nicht reversibel.

Nach heutigem Forschungsstand hat eine Parodontitistherapie auch entscheidenden Einfluss auf den allgemeinen Gesundheitszustand des Patienten. Es konnte gezeigt werden, dass die Elimination der parodontalen Entzündung einen deutlich positiven Effekt auf Komorbiditäten wie *Diabetes mellitus* (Typ 2) hat und zum Beispiel äquivalent zum Einsatz eines zweiten oralen Antidiabetikums war [37]. Aus diesem Grund ist die Weiterentwicklung und Verbesserung der parodontalen Therapie durch neue Therapieansätze von entscheidender Bedeutung.

2.5.2 Therapie von Mundschleimhauterkrankungen

Die orale Schleimhaut stand im Zusammenhang mit therapeutischen Ansätzen vor allem als alternativer Zugangsweg für die systemische Verabreichung von Medikamenten im Fokus von Untersuchungen. Im Gegensatz zur Aufnahme von Wirkstoffen über den Magen-Darm-Trakt zeigen sich verschiedene Vorteile der Applikation über die Mundschleimhaut. Sie zeichnet sich durch ihre Nicht-Invasivität aus, umgeht die Degradation des Wirkstoffs im Verdauungstrakt oder durch die Leber (First-pass-Effekt) und die Patienten-Compliance ist durch die einfache Anwendung gesteigert [38]. Somit können Wirkstoffe häufig in niedrigeren Dosen angewandt werden, wodurch auch unerwünschte Nebenwirkungen seltener oder weniger gravierend auftreten.

Ein konzeptionell anderer Ansatz ist die lokale Applikation zur Behandlung von pathologisch veränderter Mundschleimhaut. Hierbei wird nicht auf den venösen Abtransport durch die unter der Schleimhaut liegenden Gefäße abgezielt. Im Idealfall soll der Wirkstoff an der Schleimhautoberfläche anheften und in

die viablen Schichten des Epithels eindringen, seine Wirkung jedoch lokal entfalten und in möglichst geringem Maße in den systemischen Kreislauf gelangen. Je nach Krankheitsursache können unterschiedliche Therapeutika angewandt werden, wobei es sich häufig lediglich um eine symptomatische Therapie handelt. Therapieziel ist hierbei meist eine Schmerzreduktion und eine Abmilderung der lokalen Entzündung. Dies gilt zum Beispiel für die bereits beschriebenen Autoimmunerkrankungen (z.B. oraler *Lichen planus*). Es kommen Salben, Tinkturen und Mundspüllösungen zum Einsatz. Häufig werden Glukokortikoide zur Immunsuppression angewandt. Diese werden mehrmals täglich auf die betroffenen Regionen aufgetragen oder in Form einer Mundspüllösung appliziert. Durch den unterdrückenden Einfluss auf die lokale Immunreaktion des Patienten, kann als unerwünschte Nebenwirkung eine überschießende Vermehrung von *Candida*-Stämmen auftreten. Diese werden wiederum mittels Suspensionen, Salben oder Lutschtabletten lokal therapiert.

Eine zentrale Einschränkung der lokal angewendeten Therapeutika ist ihre limitierte Substantivität und ihre Verdünnung in der Mundhöhle. Die Wirkstoffe haben in der Regel nur wenige Sekunden bis Minuten Zeit die gewünschten Zellen zu erreichen. Zudem können Degradationsprozesse durch die bioaktiven Inhaltsstoffe des Speichels stattfinden.

2.6 Neuartige Therapieansätze

2.6.1 Nanotechnologie

Die topische Therapie von Mundschleimhauterkrankungen wird nicht nur durch die geringe Verweildauer der Arzneimittel eingeschränkt. Auch wirkt die orale Mukosa wie die äußere Haut als Barriere gegen äußere Einflüsse, bei welchem das Epithel nur einen hoch selektiven Transport von Partikeln zulässt. In keratinisierten Abschnitten tragen zwei Strukturen maßgeblich zur Barrierefunktion bei. Zum einen das *Stratum corneum*, bestehend aus Corneozyten, extrazellulären Lipiden, Cholesterol und Fettsäuren. Zum anderen die Tight Junctions, die unabhängig von der Keratinisierung der Schleimhaut vorkommen und je nach histologischer Schicht einen unterschiedlichen Aufbau aufweisen. Tight Junctions verschließen innerhalb des *Stratum granulosum* die Intrazellularräume [39]. Große Moleküle, hydrophile Moleküle und solche mit starker Ladung können diese äußeren Barrieren nicht durchdringen. Ein weiteres Hindernis stellt der die Schleimhaut bedeckende Mukus dar [40].

Grundsätzlich weisen viele Medikamente chemische Eigenschaften auf, durch welche sie ihr Zielgewebe nur eingeschränkt erreichen. Die Nanotechnologie befasst sich mit der Entwicklung von Systemen, welche die Limitationen konventioneller Therapiestrategien überwinden können. Hierzu zählen sogenannte Wirkstofffreigabe- oder Nanocarrier-Systeme. Nanocarrier sind Partikel, welche durch gezielte Konzipierung von Größe, Ladung und Reaktivität als Transportmittel für andere Substanzen wie Medikamente genutzt werden können. Durch spezifische Modulierung ihrer chemischen und physikalischen Eigenschaften sind bestimmte Nanocarrier so entworfen, dass sie selektiv biologische Barrieren überwinden können. Dabei kann verhindert werden, dass die therapeutische Substanz vor

Erreichen des Zielgewebes durch körpereigene Systeme degradiert oder ausgeschieden wird. Darüber hinaus kann die Dosis genauer reguliert und eine systemische Wirkung verhindert oder reduziert werden. Zudem können eventuelle Nebenwirkungen gemindert werden. Zur Anwendung am Menschen zugelassene Nanocarrier bestehen meist aus Liposomen, Micellen und anderen biodegradierbaren Polymer- und Proteinstrukturen. Ein Beispiel ist Albraxane[®], welches unter anderem zur Therapie von Mamma-Karzinomen eingesetzt wird [41]. Albraxane[®] besteht aus dem Chemotherapeutikum Paclitaxel (PTX), welches an humanes Serumalbumin gebunden ist. Durch seine schlechte Löslichkeit in wässrigen Lösungsmitteln, wird Paclitaxel konventionell in Lösung mit zahlreichen Zusatzstoffen angewendet, welche ihrerseits zu erheblichen Nebenwirkungen führen können. Diese können durch die Nanotechnologie verhindert werden [42]. Ziel jeglicher Wirkstofffreigabesysteme ist es, den Arzneistoff chemisch unverändert zum Wirkort zu transportieren.

Die meisten Nanocarrier-Systeme werden für die systemische Anwendung zur Verbesserung der Bioverfügbarkeit entwickelt und untersucht. Nur einige wenige Studien befassen sich mit oraler Mukosa, wobei hier das Erreichen des Blutkreislaufs über die Mundschleimhaut im Vordergrund steht. Die Dermatologie ist ein Fachgebiet, in dem die lokale Anwendung von Therapeutika von großem Interesse ist. Da die äußere Haut in ihrem Aufbau vor allem der keratinisierten Mundschleimhaut stark ähnelt, steht die pharmakologische Forschung denselben Herausforderungen gegenüber, wie für die Schleimhaut beschrieben. Im Feld der Nanotechnologie gibt es verschiedenste Ansätze die Barrierefunktion der Haut zu überwinden. Es werden Liposomen, Lipidnanopartikel, dendritische Carrier, Mikroemulsionen, Polymerpartikel, Dendrimere und dendritische Core-multishell-Nanocarrier untersucht [43][44]. Einige dieser neu entwickelten Wirkstofffreigabesysteme kommen auch für die Anwendung bei Mundschleimhaut- und Parodontalerkrankungen in Frage. Im Folgenden werden die im Zuge dieser Arbeit untersuchten Core-multishell-Nanocarrier und thermosensitiven Nanogele näher beschrieben.

2.6.2 Core-multishell-Nanocarrier

Core-multishell-(CMS)-Nanocarrier bestehen aus einem Polyglycerin (PG) Kern, konjugiert an eine lipophile innere Schale, an die sich wiederum eine hydrophile äußere Schale anschließt (Abb. 7b) [45]. Auf molekularer Basis ähnelt ihre Struktur der von Liposomen, welche typischerweise aus amphiphilen Molekülen wie Phospholipiden bestehen (Abb. 7a) Diese lagern sich als Doppellipidschicht an, welche einen wässrigen Kern umschließt. Der wässrige Kern ist in der Lage polare Moleküle aufzunehmen, wohingegen sich unpolare Moleküle in die Doppellipidschicht einlagern können [46].

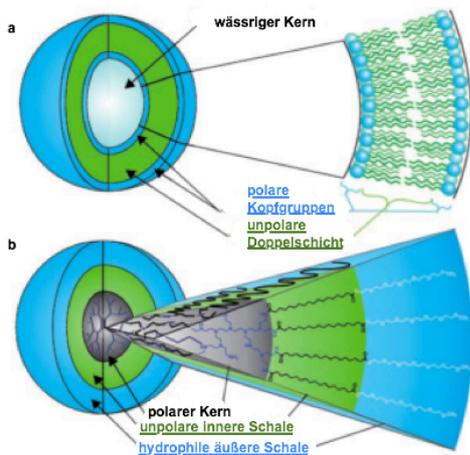


Abbildung 7: Schematische Darstellung eines Liposoms (a) und des Aufbaus eines dendritischen multishell-Nanocarrriers (b) modifiziert nach [46]

An den Polyglycerin-Kern des CMS-Nanocarrriers schließen sich eine hydrophobe innere Schale aus Alkylketten und eine hydrophile äußere Schale aus Monomethylpolyethylenglycol (mPEG) an. Durch die polare äußere Schale wird eine Löslichkeit in wässrigem Milieu ermöglicht. Durch den amphiphilen Aufbau können die Nanocarrier sowohl mit hydrophilen als auch mit lipophilen Molekülen beladen werden [47]. Zunächst wurden CMS-Nanocarrier entwickelt, deren innere Schale über Amid-Bindungen mit dem PG-Kern verbunden waren. Hier besteht jedoch das Risiko, dass bei der Biodegradation des Carriers hoch toxisches Polyglycerin-Amin entsteht. Neue CMS-Systeme enthalten aus diesem Grund eine Ester-Bindung zwischen Kern und innerer Schale [45]. Die verschiedenen Ester-CMS-Nanocarrier unterscheiden sich in der Länge ihrer Alkylketten (C12, C15, C18) [45].

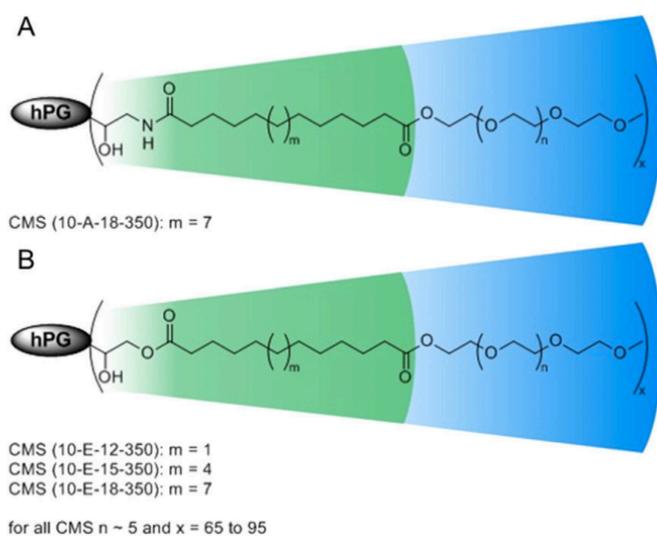


Abbildung 8: Schematischer Aufbau von (A) Amid-basierten und (B) Ester-basierten CMS Nanocarriern aus [45]

Die Größe der CMS-Nanocarrier (Ester- und Amid-Typ) wurde über die dynamische Lichtstreuung (DLS) bei 25°C auf 5.5-8.5nm bestimmt [45].

Es wurden verschiedene Untersuchungen bezüglich des Potentials von CMS-Nanocarriern als Wirkstofffreigabesystem in der lokalen Therapie von Hauterkrankungen durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass sie die Penetration von in dem Carrier transportiertem Wirkstoff sowohl in gesunder als auch in beschädigter Haut erhöht ist. Die Zytotoxizität der verschiedenen CMS-Carrier wurde ebenso untersucht. Hierbei zeigte sich die geringste Zytotoxizität der Ester-Carrier bei CMS (10-E-15-350) [45].

2.6.3 Nanogelee

Mikro- und Nanogelee sind vernetzte, hydrophile, dreidimensionale Polymerstrukturen, welche durch ihre gute chemische Stabilität und multifunktionelle Oberfläche vielfach Anwendung finden [48]. Sie können, wie die bereits beschriebenen Nanocarrier, als Wirkstofffreigabesysteme genutzt werden. Die Gele können so konzipiert sein, dass sie auf Veränderungen der Umgebung wie pH-Wert, Temperatur oder elektrische und magnetische Felder reagieren.

Eine gängige Herstellungsmethode ist die sogenannte Fällungspolymerisierung (engl. precipitation polymerisation). Hierbei kann man durch die Copolymerisation von verschiedenen Monomeren oder durch unterschiedliche Polymerisationsschritte die Polymer-Architektur und damit auch die Stimuli-responsiven Eigenschaften modifizieren. Am besten untersucht sind Stimuli-responsive Mikrogelee auf der Basis von Poly-N-isopropylacrylamid (PNIPAM) [49].

Dendritisches Polyglycerin (dPG) ist zentraler Bestandteil des im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Nanogels. dPG zeichnet sich durch ein stabiles, biokompatibles Polyethergerüst aus, welches viele funktionelle Gruppen enthält. Es hat einen kompakten Dendrimer-ähnlichen Aufbau, ist gut wasserlöslich und biokompatibel und kann zum Transport verschiedenster Wirkstoffe genutzt werden. Dendritisches Polyglycerin kann in verschiedenen Größen und mit verschiedenen chemischen Eigenschaften synthetisiert werden [48]. dPG kann mit thermosensitiven Linkern poly(N-isopropylacrylamid) (PNIPAM) oder poly(N-isopropylmethacrylamide) (PNIPMAM) versehen werden, was dazu führt, dass das Nanogel bei steigenden Temperaturen an Größe abnimmt. Die sogenannte Phasenumwandlung findet bei der unteren kritischen Lösungstemperatur statt. Diese liegt für NIPAM-Systeme bei ca. 33°C und für NIPMAM-Systeme bei ca. 48°C. Werden diese Temperaturen überschritten, schrumpft das Nanogel und es kommt zu einer Freisetzung von Wasser und Wirkstoff [50]. In Untersuchungen an humaner Haut konnte gezeigt werden, dass die Penetrationstiefe von Wirkstoffen mit Hilfe von derart aufgebauten Nanogelen im Vergleich zu konventionellen Darreichungsformen erhöht wurde [50]. In dieser Arbeit wurden ein dPG-PNIPMAM-Nanogel untersucht, welches zusätzlich mit Disulfid-Einheiten versehen wurde (Abb. 9). Disulfid-Einheiten können die Penetration an Schleimhäuten erhöhen [51]. NIPMAM gilt wie dPG als sehr biokompatibel. Die Größe des Nanogels wurde über die dynamische Lichtstreuung (DLS) auf 270nm bei 25°C und 160nm bei 50°C bestimmt. Das verwendete Nanogel wurde in Institut für Chemie der FU Berlin

hergestellt und von der AG Calderón zur Verfügung gestellt. Um die Penetration mittels Fluoreszenzmikroskopie zu analysieren, war es mit dem Farbstoff Rhodamin B markiert.

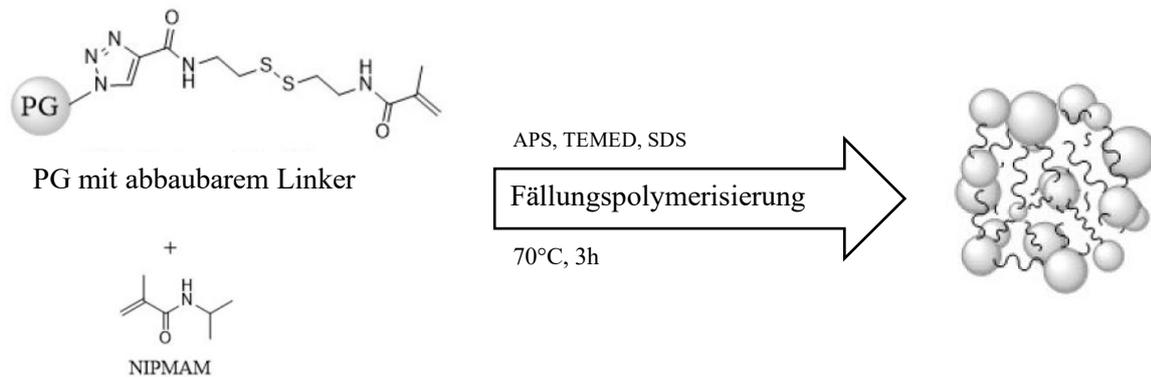


Abbildung 9: Synthese des thermosensitiven PNIPMAM-(SS)-dPG Nanogels. PG Polyglycerin; APS Ammoniumpersulfat, TEMED N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine, SDS Natriumdodecylsulfat

2.7 Präklinische Untersuchung neuer Therapeutika

Bevor Arzneimittel für klinische Untersuchungen am Menschen zugelassen werden, müssen sie zahlreiche Voruntersuchungen durchlaufen, um eine schädliche Wirkung auf den menschlichen Organismus auszuschließen. Zellkultur-Versuche, Tiermodelle und spezifische Gewebs- oder Erkrankungsmodelle können für präklinische Untersuchungen herangezogen werden.

2.7.1 Zellkultur

Die Kultivierung und Untersuchung von Zellpopulationen ist eine medizintechnische Strategie bei der Entwicklung neuer Therapeutika. Zellen können hierbei außerhalb eines Organismus auf ihre Interaktion mit Substanzen untersucht werden, wodurch die Zellkultur einen grundlegenden Teil präklinischer Forschung ausmacht. In der Zellkultur wird zwischen primären und permanenten Kulturen unterschieden. Primäre Zellen werden aus Spendergeweben isoliert und gentechnisch unverändert kultiviert. Ihre Eigenschaften entsprechen somit weitestgehend denen des Ausgangsgewebes. Ihre Lebensdauer ist limitiert, da die Zellteilungsrate kontinuierlich sinkt und schließlich sistiert. Die Zellen befinden sich dann in Seneszenz. Je nach Ursprungsgewebe gehen primäre Zellen unterschiedlich schnell in Seneszenz über und sind deswegen zum Teil nur begrenzt für Zellkultur-Studien nutzbar. Um ausgedehnte Zellkultur-Untersuchungen durchzuführen, werden deswegen oft permanente Zelllinien genutzt, welche kommerziell erworben werden können. Bei permanenten Zelllinien handelt es sich in der Regel um Tumorzelllinien oder Zelllinien, die durch einen gentechnischen Eingriff unbegrenzt teilungsfähig (immortal) sind. Sie unterscheiden sich je nach Zelllinie mehr oder weniger stark in ihrem Phänotyp von Primärzellen.

Für die Untersuchungen dieser Arbeit wurden zwei immortalisierte Zelllinien humaner gingivaler Keratinozyten (Gie-No3B11, OKG4/bmi1/TERT) und immortalisierte humane gingivale Fibroblasten (IhgF) genutzt. Bei der Zellteilung kommt es zu einer Verkürzung von Teilen der DNA, den sogenannten Telomeren. Telomerverkürzungen stehen in direktem Zusammenhang mit der Seneszenz von Zellen und werden durch das Enzym Telomerase aufgehoben. Die Immortalisierung der Fibroblasten erfolgte durch die Transfektion mit einer katalytischen Untereinheit des Enzyms Telomerase, dem Telomerase-Reverse-Transcriptase-Protein (TERT). Im Gegensatz zu malignen Zelllinien zeigten sie hinsichtlich Zytotoxizitätstests mit primären gingivalen Fibroblasten vergleichbare Ergebnisse. Sie werden für Biokompatibilitäts-Studien (z.B. dentaler Materialien) eingesetzt. Als Marker eignen sich Vimentin und Aktin [52].

Die Gie-No3B11-Keratinozyten (IGK) wurden durch eine Transfektion mit dem humanen Papillomavirus (HPV)-16 immortalisiert, wodurch sie die HPV Proteine E6/E7 aufweisen. Diese Proteine regulieren über Signalkaskaden den Zellzyklus und die Apoptoseinduktion [53]. IGK-Zellen exprimieren die Cytokeratine 2, 17 und 19, Filaggrin, Involucrin und Claudin-1. Diese Zellen werden für Untersuchungen empfohlen, bei denen die spezifischen Eigenschaften der Gingiva und insbesondere die epitheliale Barrierefunktion im Fokus stehen [54].

OKG4/bmi1/TERT-Zellen wurden im Rheinwald-Labor in Boston immortalisiert. Hierbei wurde die bereits beschriebene forcierte Expression des Proteins TERT genutzt. Diese Methode ist jedoch nicht für alle primären, humanen Zellen ausreichend, um eine unbegrenzte Teilungsfähigkeit zu induzieren. Zusätzlich wurde daher in dieser Zelllinie das Protein bmi-1 eingebracht. Dieses ist ein Antagonist des Tumorsuppressorproteins p16^{Ink4a} und verhindert so ein Eintritt der Zelle in die Seneszenz [55].

2.7.2 Tiermodelle

In präklinischen Studien werden häufig Tiermodelle verschiedener Spezies herangezogen, welche mehr oder weniger starke Einschränkungen in ihrer Übertragbarkeit auf die Anwendung am Menschen aufweisen. Die genetischen und phänotypischen Abweichungen unter den Spezies sind zum Teil tiefgreifend. Die Auswahl eines in Frage kommenden Tiermodells für die jeweilige Untersuchung ist somit essentiell. Aus Gründen der Aufzucht und Tierhaltung sind besonders Nagetiere weit verbreitet. Größere Tierspezies wie Hunde, Schweine und Affen können jedoch für bestimmte Anwendungsgebiete eine bessere Wahl sein, da sie dem Menschen hinsichtlich Physiologie und Anatomie ähnlicher sind. Schwein und Mensch haben viele Gemeinsamkeiten beispielsweise im kardiovaskulären und Zentralnervensystem. Darüber hinaus zeichnen sich beide Spezies durch ihre omnivore Ernährungsweise und dem damit einhergehenden Anpassungen des gastrointestinalen Traktes aus [56]. Untersuchungen am Tiermodell können sowohl *in vivo* als auch *ex vivo* durchgeführt werden. Bis dato gibt es sehr wenige Studien, welche die Eignung verschiedener Tiermodelle für Untersuchungen an oraler Schleimhaut analysieren. 2015 evaluierten Sa et al. die Eignung von sieben Spezies hinsichtlich morphologischer und

immunohistochemischer Aspekte. Es zeigte sich, dass Hund und Schwein die höchste histologischen Übereinstimmung mit dem Menschen aufweisen. Es bestand eine hohe Ähnlichkeit bezüglich der Keratinisierung des Epithels, Epitheldicke und der Reteleisten-Formation. Alle diese Faktoren haben einen Einfluss auf die Permeabilität der Schleimhäute [57]. Aus Gründen der Zugänglichkeit wurde im Rahmen dieser Dissertation Schweineschleimhaut genutzt, welche bei der Schlachtung für die Nahrungsmittelproduktion anfiel.

2.7.3 Dreidimensionale *in vitro* Schleimhautmodelle

In dreidimensionalen (3D) *in vitro* Modellen von Haut und Schleimhaut wird versucht den strukturellen Aufbau der Gewebe so nachzukonstruieren, dass die Modelle als Äquivalent von humanem Spendergewebe in verschiedensten Untersuchungen verwendet werden können. Dies bietet entscheidende Vorteile. In der Zellkultur sind 3D-Schleimhautäquivalente Monolayer Kulturen in vielen Aspekten überlegen, da sie strukturell der *in vivo* Situation näherkommen.

Zum einen gibt es eine bindegewebige Schicht, welche der Submukosa ähnelt. Hierdurch wird in die gegenseitige Beeinflussung von Epithel und Bindegewebe berücksichtigt. Außerdem findet sich durch den mehrschichtigen Aufbau eine hohe Zahl an Zell-Zell-Kontakten, welche zur Barrierefunktion des Epithels beitragen [58]. Durch die Weiterentwicklung von dreidimensionalen Mundschleimhautmodellen können Tierversuche reduziert werden. Zum anderen kann bei Verwendung derselben Zellen für mehrere Modelle die Spenderabhängigkeit der Reaktion vermieden werden. Dreidimensionale Schleimhautmodelle sollen somit die Versuche reproduzierbarer machen. Die zum Aufbau benötigten Keratinozyten und Fibroblasten können aus Biopsien isoliert werden. Die Verwendung von so gewonnenen primären Zellen ist jedoch limitiert, da vor allem die Keratinozyten nur begrenzt passagierbar sind, bevor sie in Seneszenz übergehen. Dieser Umstand macht große Biopsien notwendig. Diese sind im Bereich der Mundhöhle selten und aufgrund ihres Ursprungs häufig entzündlich verändert [59].

Um diese Einschränkungen zu umgehen werden häufig immortalisierte Zelllinien verwendet. Ein weiterer Ansatz ist die Gewinnung von Stammzellen, welche Vorläuferzellen von Keratinozyten sind und ein hohes proliferatives Potential aufweisen. So kann in kurzer Zeit eine große Anzahl an Zellen generiert werden [60]. Zudem sind mehrere kommerzielle dreidimensionale Modelle erhältlich, bei denen jedoch in der Regel Karzinom-Zelllinien verwendet werden oder der bindegewebige Submukosa-Anteil fehlt.

Zur labortechnischen Herstellung von *in vitro* Haut- oder Schleimhautmodelle wird zunächst ein Trägermaterial benötigt, welches die bindegewebigen Anteile enthält oder in der Lage ist Extrazellulärmatrix-produzierende Zellen aufzunehmen. Hierzu können zum Beispiel kommerziell erhältliche Filter verwendet werden. Sie werden als hängende Einsätze in Wellplatten eingebracht und bestehen aus einer bioinerten, porösen Matrix. Diese ist in der Lage Zellen aufzunehmen. Die in dieser Arbeit verwendeten Alvetex®-Filter sind aus Polystyrol aufgebaut und haben sich bei der Herstellung von 3D-Hautmodellen als funktionsfähig erwiesen [61]. Eine *in vitro* 3D-Rekonstruktion von Epidermis ist

technisch anspruchsvoll, da mehrere Zellkomponenten beteiligt sind. Zudem muss die komplexe Struktur mit Schichten unterschiedlicher Differenzierung generiert werden. Zunächst werden Fibroblasten auf den Filter aufgebracht und mehrere Tage kultiviert. Danach erfolgt die Zugabe von Keratinozyten und ein Wechsel auf Keratinozyten-Nährmedium mit geringem Calciumgehalt. Bei allen beschriebenen Kultivierungsschritten liegt der Filter komplett mit Medium bedeckt (submers). Den Anstoß zur Differenzierung gibt ein Anheben des Filters an die Mediumoberfläche (sog. Airlift) und eine Erhöhung des Calciumgehalts. Ein Anstieg der extrazellulären Calciumkonzentration wird als wesentlicher Auslöser für den Differenzierungsprozess der Epidermis angesehen [62].

3 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es neuartige, nanopartikuläre Wirkstofffreigabesysteme in Bezug auf ihren möglichen Einsatz an der Mundschleimhaut zu untersuchen. Konkret sollten präklinische Tests mit den CMS-Nanocarrier-Typen 10-A-18-350 und 10-E-15-350 sowie dem PNIPMAM-(S-S)-dPG-Nanogel durchgeführt werden. Hierbei stand im Fokus im Bereich der Dermatologie bereits publizierte Versuche auf zahnmedizinische Anwendungsgebiete zu übertragen. Durch den ähnlichen Aufbau von äußerer Haut und Mundschleimhaut und die damit verbundenen vergleichbaren Anforderungen an solche Wirkstofffreigabesysteme liegt es nahe, dass dermatologisch vielversprechende neuartige Nanocarriersysteme auch für die Mundhöhle geeignet sein könnten.

Zunächst sollte die Reaktion von Zellen der Mundschleimhaut auf die Nanocarriersysteme beurteilt werden und ein möglicher zytotoxischer oder proliferativer Einfluss auf Monolayer-Kulturen dargestellt werden. Hierzu wurden MTT- und SRB-Assays durchgeführt.

Darüber hinaus sollten in Franz-Zell-Penetrationsversuchen die Penetrationfähigkeit genannter Nanocarriersysteme untersucht werden. Aufgrund der limitierten Größe humanen Resektionsgewebes bei Operationen im Bereich der Mundhöhle sollte Schweineschleimhaut als Referenzmodell für diese Versuche verwendet werden, da sie humaner Mundschleimhaut strukturell sehr ähnelt.

Gelingt es einem Wirkstofffreigabesystem die Barriere der Haut oder Schleimhaut zu überwinden oder an ihr anzuhafte, muss im nächsten Schritt die Freigabe des Wirkstoffs im Gewebe stattfinden. Um die Freigabe eines Wirkstoffs aus dem Nanocarrier CMS 10-E-15-350 zu analysieren, wurden Franz-Zell-Penetrationsversuche mit Dexamethason beladenem CMS-Carriern durchgeführt. Das Dexamethason war für die Elektronenspinresonanzspektroskopie mit einem geeigneten Marker (PCA) gelabelt.

Parallel zu den beschriebenen Versuchen am Tiermodell sollte auf Grundlage der im Institut für Biochemie etablierten Methode für Hautzellen ein 3D-Schleimhautmodell aufgebaut werden. Hierfür sollte mit primären und immortalisierten Zelllinien gearbeitet werden.

Zielsetzung der Arbeit war es die genannten, neu entwickelten Nanocarriersysteme erstmalig an mastikatorischer und auskleidender Mundschleimhaut zu testen um somit ihren potentiellen Einsatz bei der Therapie von Mundschleimhautrekrankungen zu untersuchen.

4 Material

4.1 Chemikalien und Lösungen

| | |
|--|--|
| Accutase | Biowest, Nuaillé, FR |
| CaCl ₂ · 2 H ₂ O / M =147,02 g/mol | MERCK, Darmstadt, DE |
| Dimethylsulfoxid (DMSO) | AppliChem GmbH, Darmstadt, DE |
| DPBS | Corning / Mediatech. Inc., Manassas, USA |
| Fluoromount™ Mounting-Medium | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DE |
| Kollagen A | Biochrom GmbH, Berlin, DE |
| Kollagen I (Ratte) | Cellsystems Biotechnologie Vertrieb GmbH, Troisdorf, DE |
| Kollagen IV (humane Plazenta) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DE |
| Mayer's Hämalunlösung | Merck, Darmstadt, DE |
| PFA/Saponin | Merck, Darmstadt, DE |
| Prolong™ Gold antifade reagent | Invitrogen, Eugene, USA |
| Rhodamin B purum / C ₂₈ H ₃₁ ClN ₂ O ₃ | Fluka AG, Buchs SG, Zürich, CH |
| Roti ^R -Histokit | Carl Roth GmbH und Co Kg, Karlsruhe, DE |
| Triton™ X-100 | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DE |
| Trypan Blau Lösung | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DE |
| Tween® 20 | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DE |
| 0,25% Trypsin/ 2.21mM EDTA | Corning Mediatech. Inc., Manassas, USA |

4.2 Antikörper, Marker, Kits

| | |
|---|--|
| Alexa Fluor™ 594 Goat anti-rabbit IgG | Invitrogen, Oregon, USA |
| Anti-Cytokeratin PAN IgG (mouse) | ThermoFisher Scientific, MA, USA |
| Anti-Involucrin (rabbit) | BioLegend/Lovan, CA, USA |
| Anti-Keratin-1 (rabbit) | BioLegend/Lovan, CA, USA |
| Anti-Loricrin (rabbit) | BioLegend/Lovan, CA, USA |
| Anti-S100A4 | Acris, Herford, DE |
| Hoechst 33342 | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DE |
| Goat anti-rabbit IgG Alexa Fluor™ Plus 488 | Invitrogen, Oregon, USA |
| Goat anti-mouse IgG (H+L) Alexa Fluor™ Plus 488 | Invitrogen, Oregon, USA |
| Wheat germ agglutinin 488 conjugate | Invitrogen, Oregon, USA |
| Cell Proliferation Kit II (XTT) | Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, DE |

4.3 Eukaryontenzellen, Gewebeproben

| | |
|--|---|
| Immortalisierte, humane, gingivale Fibroblasten (IhGF) | Applied Biological Materials Inc., Richmond, BC, CAN |
| Immortalisierte, humane, gingivale Keratinozyten (IGK) / Gie-No3B11 | Applied Biological Materials Inc., Richmond, BC, CAN |
| OKG4/bmi1/TERT | Rheinwald Laboratory, Boston, USA |
| Schleimhautproben (Schwein) | |
| Humane Schleimhautproben | Institut für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde, Charité, Berlin, DE (Ethik-Antragsnummer: EA2/185/16, s. Kapitel 5.2.1) |

4.4 Nährmedien und Zusätze

| | |
|---|--|
| Amphotericin B 250 µg/ml | Biochrom GmbH, Berlin, DE |
| Bovines Serum Albumin | PAN Biotech, USA |
| Bovine Pituitarum (Protein Conc 13,5 mg/mL) | gibco by Life Technologies, Grand Island, NY, USA |
| DermalLife K Complete Medium | LifeLine Cell Technologie, MD, USA |
| DMEM 1 g/L Glucose, L-glutamine & sodium pyruvate | Corning / Mediatech. Inc., Manassas, USA |
| Epidermaler Wachstumsfaktor (human, Protein Konz. 0,0304425 µg/µl) | gibco by Life Technologies, Grand Island, NY, USA |
| Epidermal Wachstumsfaktor (Maus) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DE |
| Fötales bovines Serum (FBS) | Linaris, Wertheim-Bettingen, DE |
| Hydrocortison | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DE |
| Insulin (bovin) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DE |
| Isoproterenol Hydrochlorid | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DE |
| Keratinocyte-SFM (K-SFM) Medium | gibco by Life Technologies, NY, USA |
| Keratinozyten Supplements SFM | gibco by Life Technologies, NY, USA |
| L-Ascorbinsäure | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DE |
| L-Carnitin Hydrochlorid | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DE |
| L-Serin | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DE |
| Non-essentielle Aminosäuren (NEA) (100x) | Biochrom GmbH, Berlin, DE |
| 10000 U Penicillin/ml / 10mg Streptomycin/ml | PAN TM Biotech GmbH, DE |

4.5 Sonstige Materialien und Gerätschaften

| | |
|--|---|
| Biosphere® Filter-Pins | Sarstedt, Nürnberg, DE |
| Cell-Strainer 70µm | Corning / Mediatech. Inc., Manassas, USA |
| Cryocontainer NALGENE™ | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim DE |
| Cryovials | Nunc, NY, USA |
| Dualfilter T.I.P.S | Eppendorf, Hamburg, DE |
| E2044500TMHS Resonator | Bruker BioSpin GmbH, Karlsruhe, DE |
| Pipetten | Eppendorf, Hamburg, DE |
| Falcon Tubes | Corning / Mediatech. Inc., Manassas, USA |
| Filter: Alvetex 12-well Polystyrene Scaffold | Reinnervate, Sedgefield, UK |
| Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200 | Carl Zeiss AG, Oberkochen, DE |
| Glas-Objektträger | Lab-Tek® II Chamber Slide™ System NY, USA |
| Gefriermedium | Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, DE |
| Gefrierformen Peel-A-Way® | Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, DE |
| Kryostat Frigocut 2800N | Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, DE |
| Laserkonfokalmikroskop LSM700MAT | Zeiss, Jena, DE |
| Lichtmikroskop Diavert | Leitz, De |
| Mikrotiterplatten-Photometer Sunrise | Tecan, Gröding, AUS |
| Neubauer- Zählkammer | Paul Marienfeld GmbH&Co.KG, Lauda-Königshofen, DE |
| Orbital Incubator SI50 | Bibby Scientific™, UK |
| Parafilm | Pechiney Plastic Packaging, USA |
| Vortex | Bender und Hobein AG, Zürich, CH |
| Zellkulturflaschen (25 cm ² , 75 cm ²) (Falcon) | Corning / Mediatech. Inc., Manassas, USA |
| Zellkulturschalen | Corning / Mediatech. Inc., Manassas, USA |
| Zentrifuge Metafuge 1.0 | Heraeus, Hanau, DE |
| 96-well-Platten (Falcon) | Corning / Mediatech. Inc., Manassas, USA |

5 Methoden

5.1 Grundlegende Methoden der Zellkultur

5.1.1 Kollagen-Beschichtungen von Zellkulturflaschen

Zur Kultivierung von OKG4/bmi1/TERT Zellen wurden die genutzten Kulturflaschen, 96-well Platten und Objektträger jeweils am Tag zuvor mit 20µg/ml Kollagen IV beschichtet. Bei Kultivierung von IGK-Zellen wurde Kollagen A in gleicher Konzentration verwendet. Hierzu wurde die Lösung oberflächenbedeckend einpipettiert und über Nacht bei -4°C inkubiert. Vor Aussaat der Zellen wurde die Oberfläche einmal mit PBS gewaschen.

5.1.2 Auftauen von Zellen

Die genutzten Zelllinien wurden bei -80°C in Cryovials gelagert. Um Zellen in Kultur zu nehmen wurde die gewünschte Anzahl an Cryovials im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und sofort in Arbeitsmedium resuspendiert. Es erfolgte eine Zentrifugation bei 900rpm für 3 Minuten. Nach Entfernung des Überstandes wurden die Zellen im Arbeitsmedium resuspendiert, gezählt und in vorbereitete Zellkulturflaschen ausgesät.

5.1.3 Kultivierung von immortalisierten Zelllinien

Alle Zellen wurden in 75-cm²-Kulturflaschen kultiviert. Eine PBS-Waschung und ein Mediumswechsel erfolgten jeden zweiten Tag. Die Morphologie und Konfluenz der Zellen wurden täglich mikroskopisch beurteilt. Eine Umsetzung der Zellen erfolgte bei 60-70% Konfluenz.

Immortalisierte humane gingivale Keratinozyten (IGK)

Die IGK-Zellen wurden in DMEM (1 g/L Glc) mit 10 % fetalem Kälberserum, 1% Penicillin – Streptomycin und Keratinozyten-Supplement kultiviert. Die Kulturflaschen wurden zuvor wie beschrieben mit Kollagen IV beschichtet.

OKG4/bmi1/TERT

Diese Zell-Linie, im Folgenden als OKG4-Zellen bezeichnet, wurden nach Protokoll des Rheinwald-Labors in Boston, USA, kultiviert und passagiert. Es wurden Grundmedium (bis 30% Zellkonfluenz), Wachstumsmedium und Differenzierungsmedien nach Angaben des Protokolls hergestellt. Das Differenzierungsmedium kam nach dem Airlift zum Einsatz.

| <i>Grundmedium:</i> | <i>Wachstumsmedium:</i> | <i>Differenzierungsmedium</i> |
|---|--------------------------|-------------------------------|
| K-SFM | DMEM/Ham's F12 (3/1) | DMEM/Ham's F12 (3/1) |
| 25µg/ml bovine pituitary extract (BPE) | 5% Fetal Clone III (FCS) | 1% Fetal Clone III (FCS) |
| 0,2 ng/ml epidermal growth factor (EGF) | 1% P/S | 1% P/S |
| 0,3mM CaCl ₂ | 1 µM Hydrocortisone | 2 µM Hydrocortisone |
| | 0,1 µM Insulin | 0,1 µM Insulin |
| | 1 µM Isoproterenol | 1 µM Isoproterenol |
| | 1 ng/mL EGF | 2 ng/mL EGF |
| | | 10 µM Carnitine |
| | | 10 mM L-Serine |
| | | 0,4 mmol L-ascorbic Acid |

Tabelle 1: Medienzusammensetzung OKG4/bmi1/TERT

Parallel dazu wurden die Zellen aus dem Grundmedium auf DermaLife-Medium umgestellt. Für den Airlift wurde die Calcium-Konzentration des Mediums auf 1,4 mM erhöht.

Immortalisierte humane gingivale Fibroblasten - hTERT (IhGF)

Die IhGF Zellen wurden in DMEM (1 g/L Glc) mit 10 % fetalem Kälberserum, 1% Penicillin – Streptomycin, 1% Amphotericin B und 1% non-essential aminoacids (NEA) kultiviert.

5.1.4 Kultivierung von primären Zellen

Primäre, humane, gingivale Keratinozyten wurden in DermaLife K Medium (1% Penicillin-Streptomycin, 1% Amphotericin B) ohne Calciumzusatz kultiviert.

Primäre, humane, gingivale Fibroblasten wurden in DMEM (1 g/L Glc) mit 10 % fetalem Kälberserum, 1% Penicillin – Streptomycin, 1% Amphotericin B und 1% non-essential aminoacids (NEA) kultiviert.

5.1.5 Ablösung und Passagierung von Zellen

Zur Passagierung von Zellen wurde das Medium aus den Flaschen entfernt und es erfolgte ein Waschschrift mit 3ml sterilem PBS. Danach wurde 0,25% Trypsin/2.21mM EDTA hinzugefügt, sodass der Zell-Monolayer mit Flüssigkeit bedeckt war. Es folgte eine Inkubation im Brutschrank (37°C, 5% CO₂) für ca. 6 Minuten. Die Zellablösung erfolgte unter mikroskopischer Kontrolle. Nach erfolgreicher Ablösung wurde ca. 2-3ml des entsprechenden Nährmediums hinzugefügt. Die Suspension wurde in 25ml Falconröhrchen pipettiert und bei 900rpm für 3 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in 1ml des Nährmediums mit einer 500µl-Pipette resuspendiert. Es folgte die Zellzählung. Zur Passagierung

folgte die Aussaat der gewünschten Zellzahl. In der Regel wurden 1×10^6 Zellen in eine 75cm^2 -Flasche überführt.

5.1.6 Bestimmung der Zellzahl

Zur Zellzählung wurden $10 \mu\text{l}$ Zellsuspension mit $90 \mu\text{l}$ 0,4% Trypanblau-Lösung mit einer $10 \mu\text{l}$ -Pipette in einem 2.5ml Eppendorfgefäß suspendiert und danach in eine Neubauer-improved-Zählkammer pipettiert. Die Zellen wurden mikroskopisch in jeder Kammer gezählt und ihre Morphologie beurteilt. Die Gesamtzellzahl errechnete sich nach folgender Formel:

$$\text{Zellzahl/ml} = Z \times \text{VF} \times V \times \text{KF}$$

Z = Mittelwert der Zellzahl aus allen vier Kammern

VF = Verdünnungsfaktor

V = Resuspensionsvolumen

KF = Kammerfaktor = 10^4

5.1.7 Kryokonservierung von Zellen

Zur Lagerung wurden Zellen bei -80°C eingefroren. Hierzu wurden sie wie beschrieben abgelöst und gezählt. Pro Kryovial wurde die gewünschte Zellzahl in $900 \mu\text{l}$ fetales Kälberserum und $100 \mu\text{l}$ Dimethylsulfoxid resuspendiert und mittels Cryocontainer im Gefrierschrank gefroren. Danach erfolgte eine Lagerung in Flüssigstickstoff.

5.2 Weiterführende Methoden

5.2.1 Isolierung von primären Keratinozyten und Fibroblasten

Zur Isolierung von primären humanen Keratinozyten und Fibroblasten wurden Schleimhautproben verwendet, welche bei resektiven Eingriffen im Institut für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde der Charité Berlin anfielen. Es handelte sich um Proben der mastikatorischen Schleimhaut (Gingiva). Die Schleimhautproben wurden anonym ohne Zuordnung zum Patienten, Alter, Geschlecht, o.ä. verwendet. Die Studie wurde von der Ethikkommission der Charité-Universitätsmedizin Berlin bewilligt (Antragsnummer: EA2/185/16). Die Patienten wurden vor dem Eingriff über die weitere Verwendung des Gewebes informiert und haben schriftlich eingewilligt. Alle Experimente wurden im Rahmen der guten wissenschaftlichen Praxis und der Deklaration von Helsinki von 1964 und ihrer letzten Revision 2013 in Fortaleza durchgeführt.

Die Mundschleimhautprobe wurde direkt nach der Entnahme in Transportmedium (DMEM, 10% FCS, 1% Pen-Strep, 1% Amphotericin B, 1% NEA) gelagert und innerhalb weniger Stunden weiterverarbeitet. Die Bearbeitung des Gewebes erfolgte unter einer sterilen Werkbank. Die Probe wurde zunächst für 30 Sekunden in Ethanol gereinigt und anschließend in PBS gewaschen. Darauf folgend wurde die Probe auf

ein steriles Trägernetz aufgespannt und für 4h in Dispase eingelegt (bei 4°). Danach erfolgte die Trennung des Epithels vom Bindegewebe auf einer 30mm Zellkulturschale mit Hilfe steriler Pinzetten. Die Epidermis wurde daraufhin in 0,05 Trypsin/EDTA überführt. Es folgte eine 15-minütige Lagerung im Schüttel-Inkubator und die Zugabe von DMEM mit 5% FCS. Die Lösung wurde durch einen Cell Strainer filtriert und bei 900rpm für 4 Min zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und die Zellen in 1ml DermaLife K-Medium resuspendiert. Darauf folgten die Aussaat und die Lagerung im Brutschrank (37°C). Der subepidermale, bindegewebige Anteil der Schleimhaut wurde *in toto* und ohne vorherige enzymatische Dissoziation mittels Trypsin in unbeschichtete Flaschen mit Fibroblastenmedium gegeben und ebenfalls bei 37°C im Brutschrank kultiviert.

5.2.2 MTT/XTT-Assay

Eine gängige Methode zur Analyse von Zellviabilität und Zytotoxizität ist die Reduktion von sogenannten Tetrazolium-Salzen zu dem bläulichen, wasserunlöslichen Farbstoff Formazan. Zwei Assays die auf dieser Methode basieren sind der 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromid (MTT)-Assay und der Natrium 3,3'-[[[(phenylamino) carbonyl]-3,4-tetrazolium]-bis(4-methoxy-6-nitro) Benzolsulfonsäurehydrat (XTT)-Assay. Beide Salze zeigen in Lösung eine schwach gelbliche Färbung. In viablen Zellen sind verschiedene Dehydrogenasen und Reduktionsmittel vorhanden, welche die Tetrazolium-Salze zu bläulichen Farbstoffen der Formazan-Gruppe reduzieren [63]. Über die Menge des umgesetzten Farbstoffes, können Rückschlüsse auf die metabolische Aktivität erfolgen. Beim MTT-Assay lagert sich unlösliches Formazan intrazellulär an und muss vor der spektrometrischen Messung löslich gemacht werden. Beim XTT-Assay wird eine lösliche Formazan-Variante gebildet, weswegen dieser Schritt entfallen kann [64].

Für die Durchführung des Assays wurden 96-well-Platten mit Kollagen IV beschichtet und immortalisierte, gingivale humane Keratinozyten (Gie-No3B11) ausgesät. Die Zellzahl pro well betrug 1×10^4 für IGK-Zellen und 6×10^3 für OKG4-Zellen. Nach 24h Inkubation wurde bei einer Konfluenz von 60-70% CMS-Nanocarrier (10-A-18-350) in verschiedenen Konzentrationen hinzugegeben und die Platten wiederum 24, 48 oder 72h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert (Tabelle 2). Vor Durchführung des MTT/XTT-Assays wurde in der ersten Well-Reihe der Überstand entfernt, die Wells mit PBS gewaschen und 100µl/Well 4% Triton-X-100 in PBS hinzugefügt, um die Zellen zu lysieren (im Versuchsaufbau bezeichnet als maximale Lyse). Es erfolgte eine weitere Inkubation im Brutschrank für 20 Minuten. Nach mikroskopischer Kontrolle wurde der Überstand entfernt und 100µl des Arbeitsmediums pro Well hinzugefügt.

Danach wurde in jedes Well 10µl Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide-Powder in PBS (5mg/ml) bzw. 50 µl XTT-Lösung gegeben. Es folgte eine Inkubation über 4h bei 37°C und 5% CO₂. Der Überstand wurde entfernt. Um die Formazan-Kristalle zu lösen, wurden beim MTT-Assay 100ml Isopropanol mit 5ml 2N Salzsäure gemischt und 100µl des Gemischs pro Well hinzugefügt. Anschließend wurden die Platten für

30 min lichtgeschützt, wippend inkubiert. Danach erfolgte die Messung der optischen Dichte über ein Mikrotiterplatten-Photometer bei einer Wellenlänge von 570nm (MTT) oder 450nm (XTT).

| | max. Lyse | Kontrolle | 1 µg/mL | 10 µg/mL | 50 µg/mL | 100 µg/mL | 500 µg/mL | leer |
|---|--------------|-----------|------------|----------|----------|--------------|--------------|------|
| A | | | | | | | | |
| B | | | | | | | | |
| C | | | | | | | | |
| D | | | | | | | | |

Tabelle 2: Versuchsaufbau MTT/XTT-Assay; Spalten: Konzentration CMS-Nanocarrier, Zeilen: wells; leer: wells ohne Zellaussaat, nur Nährmedium

5.2.3 Sulforhodamin B-Assay

Der Sulforhodamin B (SRB-)Assay ist ein zellbiologischer Test zur Feststellung der Zelldichte. Sulforhodamin B ist ein pinker Aminoxanthen-Farbstoff, der mit zwei Sulfatgruppen pH-abhängig an basische Aminosäuren bindet. Die Bindung findet im leicht sauren Milieu statt. Unter basischen Bedingungen dissoziiert der Farbstoff wieder. SRB wird genutzt, um Trichloressigsäure-fixierte Zellen anzufärben. Dabei ist die Menge gebundenen Farbstoffs direkt proportional zur Zellmasse [65]. Der SRB-Assay wurde als Zytotoxizitäts- und Zellproliferationsassay angewandt und in drei gesonderten Experimenten durchgeführt. Die Protein- und damit Zellmasse wurde auch hier nach 24h, 48h und 72h beurteilt. Die Vorbereitung der 96-well-Platten erfolgte wie für den MTT-Assay geschildert. Nach Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen der CMS-Nanocarrier (Tabelle 3) im Brutschrank folgte die Zugabe von 10%iger (w / v), kalter Trichloressigsäure in jedes Well, worauf die Platten für 1h bei 4°C gelagert wurden. Danach erfolgte eine viermalige Waschung mit Leitungswasser. Anschließend wurden die Platten über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet. Pro well wurden 100µl 0,057% SRB-Lösung hinzugefügt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Platten vier Mal mit 1% Essigsäure (200µl/Well) gewaschen, um ungebundenen Farbstoff zu entfernen. Es folgte die Trocknung der Platten an der Luft über Nacht. Für die Messung der optischen Dichte wurde pro Well 200µl von 10mM Tris-Lösung (pH 10.5) hinzugefügt und die Platten für 10 Minuten wippend inkubiert. Die optische Dichte wurde über einen Mikrotiterplatten-Photometer bei einer Wellenlänge von 492nm bestimmt.

| | Kontrolle | 1 µg/mL | 10 µg/mL | 50 µg/mL | 100 µg/mL | 500 µg/mL | leer |
|---|-----------|------------|----------|----------|--------------|--------------|------|
| A | | | | | | | |
| B | | | | | | | |
| C | | | | | | | |
| D | | | | | | | |

Tabelle 3: Versuchsaufbau SRB-Assay; Spalten: Konzentration CMS-Nanocarrier, Zeilen: Wells

5.2.4 Herstellung eines 3D-Modells

Zur Herstellung von 3D-Schleimhautmodellen wurde das in der Arbeitsgruppe etablierte Protokoll für dermale Zellen herangezogen. Es wurden Alvetex 6-Well-Filter verwendet, welche zunächst durch Ethanol (70%) benetzbar gemacht wurden. Zunächst erfolgte die Ablösung der im jeweiligen Versuchsdurchlauf verwendeten Fibroblasten und eine Aussaat von 100µl Zellsuspension mit der gewünschten Zellzahl (1×10^6 /Filter) auf einen Filter. Darauf folgte eine Inkubation der Platte für 1h bei 37°C. Anschließend wurde weiteres Fibroblastenmedium hinzugegeben, sodass die Filter submers lagen. Die Platten wurden anschließend im Brutschlag gelagert und jeden Tag mikroskopisch beurteilt. Ein Mediumswechsel erfolgte jeden zweiten Tag. Nach sieben Tagen erfolgte die Zugabe von Keratinozyten (5×10^5 /Filter) und der Wechsel auf DermaLife K-Medium. Der Airlift und der Wechsel auf DermaLife K-Medium + 1,4 mM Calcium folgte drei Tage später. Danach wurden die Filter für 20-30 Tage inkubiert. Ein Mediumswechsel erfolgte jeden zweiten Tag.

Zur Fixierung der Filter wurde das Medium entfernt und PFA/Saponin über Nacht bei 4°C hinzugefügt.

5.2.5 Gewinnung von oraler Mukosa des Schweins

Die für die Experimente verwendete orale Schleimhaut vom Schwein wurde von Tieren aus der Fleischproduktion gewonnen. Unbehandelte Schweinekiefer wurden von entsprechenden Schlachtbetrieben zur Verfügung gestellt. Diese wurden wenige Stunden gekühlt in PBS gelagert, bevor die auskleidende Schleimhaut und Gingiva manuell mittels Skalpells präpariert wurde. Hierbei wurde darauf geachtet, dass die für Experimente vorgesehenen Schleimhautproben nicht durch Pinzetten oder andere mechanische Einwirkungen beschädigt wurden.

5.2.6 Penetrationsversuch mittels Franz-Zelle

Für die Penetrationsversuche wurde ein Franz-Zell-System der Firma PermeGear (Bethlehem, PA, USA) mit dem unten gezeigten Aufbau verwendet (Abb. 10). Die Penetrationsversuche wurden mit dem CMS-Nanocarrier des Amid-Typs 10-A-18-350 und dem PNIPMAM-(S-S)-dPG-Nanogel in drei gesonderten Versuchsabläufen durchgeführt. An die CMS-Nanocarrier war der Fluoreszenzfarbstoff Indocarbocyanine

(ICC) gekoppelt, an das PNIPMAM-(S-S)-dPG-Nanogel der Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin B (RhB). Beide Fluoreszenzmarker emittieren im roten Bereich. Es wurden Franz-Zellen mit einem Durchmesser der Zugabekammer von 7mm verwendet. Proben der auskleidenden und keratinisierten Schleimhaut wurden mit einem Durchmesser von ca. 2cm entnommen und diese in je eine Franz-Zelle montiert. Dabei war die epidermale Seite nach oben zur Zugabekammer gerichtet. Die *Lamina propria* berührte das in der Aufnahmekammer befindliche PBS, wobei darauf geachtet wurde, dass keine Luftblasen eingeschlossen wurden (Abb. 11).

Das Wasser des Heizsystems wurde auf 33,5°C erwärmt. Nach 30 Minuten wurden 91 µL/cm² des zu untersuchenden Nanocarriersystems in die Aufnahmekammer pipettiert. Diese wurde mit Parafilm abgedichtet, um Verdunstungsprozesse zu minimieren.

Es erfolgte eine Inkubation über 6h. Die Proben wurden danach 30 Sekunden in PBS gewaschen. Danach erfolgte eine Einbettung der Proben in Kryomedium und eine Lagerung bei - 80° C. Für die Auswertung am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop wurden 7µm dicke Kryoschnitte angefertigt. Zur Orientierung im Gewebe erfolgte eine immunhistochemische Färbung des Epithels mit einem pan-Cytokeratin-Antikörper und passendem sekundären Alexa-Fluor 488 konjugiertem Antikörper. Die durchgeführten Ansätze sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

| Franz-Zelle | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|---------------|--------|--------|--------|-------|-------|-------|
| Schleimhaut | auskl. | auskl. | auskl. | mast. | mast. | mast. |
| Medium | PBS | CMS-A | NG | | CMS-A | NG |
| Konzentration | / | 10 | 10 | / | 10 | 10 |
| | (K) | mg/ml | mg/ml | (K) | mg/ml | mg/ml |
| Menge | 50 µl | 50 µl | 50 µl | 50 µl | 50 µl | 50 µl |

Tabelle 4: Versuchsaufbau des Penetrationsversuchs an Franz-Zellen mit ICC-gelabeltem Amid-Nanocarriern (CMS-A) und Nanogel an auskleidender (auskl.) und mastikatorischer (mast.) Schweineschleimhaut. 1 und 4: als Kontrolle (K) mit PBS benetzte Schleimhautproben

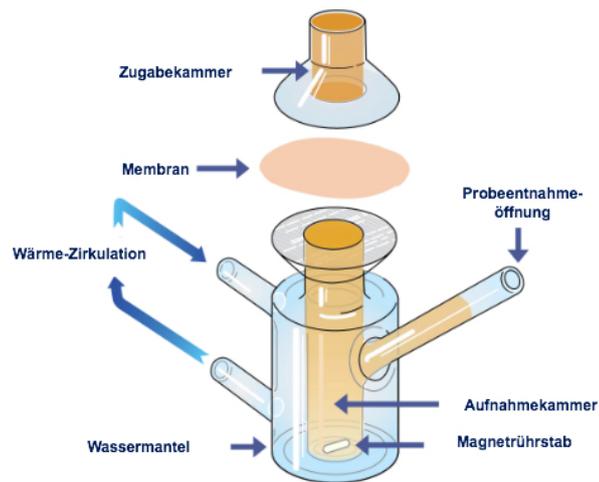


Abbildung 10: Aufbau einer PermeGear Franz-Zelle. Entnommen und modifiziert aus [93]

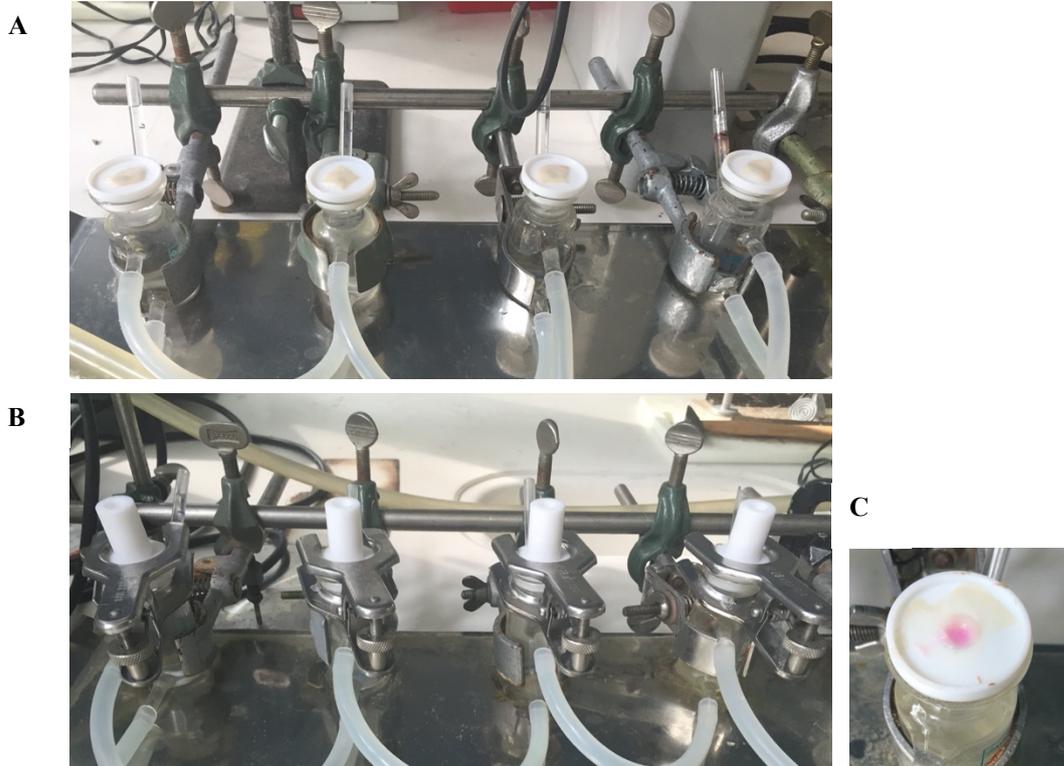


Abbildung 11: Franz-Zell-Versuchsaufbau. (A) Platzierung der Schleimhautproben mit der Epidermis nach oben weisend in die Franz-Zell-Apparatur; (B) Fixierte Zugabekammer auf der Schleimhautprobe; (C) Sehr dünne, auskleidende Schleimhaut nach 6-stündiger Einwirkzeit des ICC-markierten CMS-Carriers. Der 7mm Durchmesser der abmontierten Zugabekammer ist deutlich erkennbar.

5.2.7 Einfrieren von Gewebeproben und Anfertigung von Kryoschnitten

Bei den Penetrationsversuchen mit fluoreszenzmarkiertem Nanocarrier wurden die Gewebe nach dem Versuchsablauf schock-gefroren, um zur Auswertung am Mikroskop histologische Schnitte herzustellen. Die Gewebeproben wurden nach Durchführung der Penetrationsversuche in 9,68 cm² Gefrierformen mittels Gefriermedium eingebettet und in Flüssigstickstoff gefroren. Es erfolgte eine Lagerung bei -80°C bis zur weiteren Bearbeitung. Zur Anfertigung von Gefrierschnitten wurden die in Gefrierformen befindlichen Proben zunächst für 30 Minuten in die -20° C kalte Mikrotomkammer gelegt, bevor Schnitte von 7µm Dicke angefertigt wurden. Die Schnitte wurden auf Glasobjektträger aufgenommen und bis zur weiteren Verarbeitung dunkel bei -20°C gelagert.

5.2.8 Cellular Uptake-Versuch

OKG4/bmi1/TERT-Zellen wurden in DermaLife-K-Medium mit 1% Penicillin/Streptomycin und 1% Amphotericin B kultiviert. Für den Versuch wurden zwei 8-Kammer Glas-Objektträger mit 20µg/ml Kollagen IV beschichtet und mit einer Zellzahl von 5×10^4 c/well ausgesät, wobei ein Objektträger bei Aussaat auf DermaLife-K-Medium mit einem Calciumgehalt von 1,4 mM umgestellt wurde. Beide Objektträger wurden über Nacht bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Am nächsten Tag folgte eine mikroskopische Kontrolle. Pro Objektträger wurde in vier Kammern als Kontrolle das jeweilige Arbeitsmedium hinzugefügt. In vier weiteren Kammern wurde das Arbeitsmedium mit einem Zusatz von 100µg/ml CMS-Nanocarrier E-15-350 hinzugegeben. Es folgte eine Kultivierung im Brutschrank für 24h, wonach eine Lebendfärbung der Zellkerne mit Hilfe des Farbstoffes Hoechst 33342 (H0) durchgeführt wurde. Dazu wurde H0 in einer Verdünnung von 1:3000 im Arbeitsmedium in alle Kammern pipettiert und die Objektträger für 30 Minuten im Brutschrank inkubiert. Es folgte eine mikroskopische Kontrolle der Kernfärbung. Die Objektträger wurden 30 Minuten mit PFA bei 4°C lichtgeschützt fixiert. Zur Färbung der Zellwände wurden die Objektträger mit Wheat-Germ-Agglutinin-488-Konjugat in PBS (1:200) für 10 Minuten im Brutschrank inkubiert. Es erfolgte die Eindeckelung der Objektträger mit Fluoromount.

5.2.9 Auswertung mittels Laser-Scanning-Mikroskop

Die immunhistochemisch gefärbten Objektträger wurden an einem Laser-Scanning-Mikroskop LSM700MAT der Firma Zeiss mittels der ZEN-Software (Zeiss) ausgewertet.

5.2.10 Herstellung einer Vergleichsemulsion „Dontisolon“

Die Vergleichsemulsion wurde im Institut für Pharmazie der Freien Universität Berlin freundlicherweise durch Dr. Sven Staufenbiel hergestellt.

Zur Herstellung wurden geschmolzene Makrogole homogenisiert bis die Raumtemperatur erreicht wurde. Danach erfolgte die homogene Dispersion des Wirkstoffs mit Mörser und Pistill.

Zusammensetzung:

120 μ M Dexamethasone-PCA 3

Basis:

Macrogol (Caesar & Lorentz GmbH, Hilden, Germany)

400 (92% m/m)

1500 (4% m/m)

4000 (4% m/m)

5.2.11 Elektronenspinresonanz-Spektroskopie (ESR)

Bei der Elektronenspinresonanz (ESR)-Spektroskopie handelt es sich um eine physikalische Messmethode zur Charakterisierung von paramagnetischen Verbindungen, d.h. Verbindungen mit ungepaarten Elektronen. Die Grundlage dieser Methode besteht darin, dass jedes Elektron ein magnetisches Moment besitzt, den sogenannten Elektronenspin. Hierbei handelt es sich um einen quantenmechanischen Drehimpuls. Ohne ein von außen angelegtes Magnetfeld weisen die Spins alle die gleiche Energie auf (sog. entarteter Zustand). Wird ein elektromagnetisches Wechselfeld angelegt, kommt es zu einer Aufspaltung der Spins in unterschiedliche Energieniveaus (Zeeman-Effekt). Es kommt zu einer Resonanzabsorption von Energie durch die energetisch niederen Spins, wenn die Energie des Magnetfeldes der Differenz zu den energetisch höheren Spins entspricht. Dies hat zur Folge, dass bei Anlegen eines äußeren Magnetfelds messbare Wechselwirkungen entstehen, welche durch bestimmte Parameter beschrieben werden können. Zudem können Wechselwirkungen mit anderen magnetischen Momenten innerhalb einer Probe entstehen. Diese sind durch die ESR-Spektroskopie messbar. Einer dieser Parameter ist die Resonanzabsorption. Diese wird gemessen und in Form der ersten Ableitung im ESR-Spektrometer angezeigt. Die Resonanzfrequenz hängt von der jeweiligen Umgebung des Elektrons ab, wodurch Rückschlüsse über diese gezogen werden können. Die Hypofeinkopplungskonstante $a(hfc)$ ist eine Größe, welche die durch Wechselwirkung mit der Umgebung entstehende Signalaufspaltung charakterisiert. Eine Aufspaltung der Signale tritt auf, wenn in der direkten Umgebung des betrachteten Elektrons ein Atomkern befindlich ist, der seinerseits ebenso einen Drehimpuls (Kernspin) hat. Somit tragen alle Atomkerne in der näheren Umgebung des Elektrons zur Aufspaltung des Signals bei.

Zum Nachweis der Freisetzung eines Modell-Wirkstoffes im Epithel wurden ebenfalls Franz-Zell-Penetrationsuntersuchungen durchgeführt. Hierzu wurde der Wirkstoff Dexamethason mit dem ESR-Label 3-carboxy-2,2,5,5-tetramethyl-1-pyrroldinyloxy (PCA) gekoppelt (Abb. 12). Dieser markierte Wirkstoff war schon in vorangegangenen Studien verwendet worden [66].

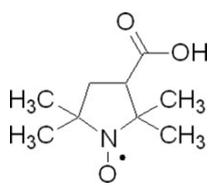


Abbildung 12: PCA Molekül. PCA dient als Spinsonde zur Markierung von nachzuweisenden Substanzen. Spinsonden weisen ein ungepaartes Elektron auf und haben aus diesem Grund mittels ESR nachweisbare paramagnetische Eigenschaften.

CMS-Nanocarrier des Ester-Typs wurde nach publizierter Vorgehensweise mit Dexamethason-PCA (DxPCA) beladen [67][66]. Eine in der Zahnmedizin häufig angewendete Therapeutikum bei der Therapie von entzündlicher Gingiva ist Dontisolon[®] D. Diese enthält das Glukokortikoid Prednisolon. Eine dieser Salbe entsprechende Vergleichsemulsion wurde nach oben beschriebenem Protokoll hergestellt. Um eine Vergleichbarkeit herzustellen wurde in der Vergleichsemulsion Prednisolon durch DxPCA ersetzt. Der Versuchsaufbau an den Franz-Zellen entsprach dem bereits in Kapitel 5.2.6 beschriebenen. Die mit DxPCA beladenen CMS-Nanocarrier und die „Dontisolon“-DxPCA-Salbe wurden in gleichen Mengen auf mastikatorische und auskleidende Schleimhaut vom Schwein aufgetragen. Nach 6h wurden die Schleimhautproben gewaschen und die ESR Messungen durchgeführt. Hierfür wurden Gewebeproben von 4mm Durchmesser durch Stanzung gewonnen und in eine ESR-Zellkammer platziert.

Es wurde ein X-Band-Spektrometer (Bruker Elexsys E500, BioSpin GmbH, Karlsruhe, Germany, $\nu = 9.5$ GHz) verwendet.

| Franz-Zelle | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|-------------------------------------|---------------------------------------|------------------|------------------|---------------------------------------|------------------|------------------|
| Schleimhaut | auskl. | auskl. | auskl. | mast. | mast. | mast. |
| Medium | Vergleichs- Emulsion Dontisolon | CMS-E (DxPCA) | CMS-E (DxPCA) | Vergleichs- Emulsion Dontisolon | CMS-E (DxPCA) | CMS-E (DxPCA) |
| Menge | 35 μ l | 35 μ l | 35 μ l | 35 μ l | 35 μ l | 35 μ l |
| Waschschritt vor ESR- Messung | ja | ja | nein | ja | ja | nein |

Tabelle 5: Versuchsaufbau der Franz-Zell-Untersuchung für die ESR-Messung

5.3 Histochemische Färbungen

5.3.1 Entparaffinierung von Objektträgern

Die Proben der dreidimensionalen Schleimhautmodelle wurden im Institut für Pathologie der Charité-Universitätsmedizin Berlin (Campus Mitte) in Paraffin eingebettet und mittels Mikrotom geschnitten. Die Dicke der Schnitte betrug 7 μ m. Die Objektträger mussten vor einer immunhistochemischen Färbung über Rotihistol entparaffiniert werden. Anschließend wurden die Objektträger über eine absteigende

Alkoholreihe in destilliertes Wasser gebracht. Zur Entmaskierung der Epitope für die anschließende Immunfluoreszenzfärbung folgte eine Lagerung in Natrium-Citrate-Puffer bei 95-100° C. Der detaillierte Ablauf der Arbeitsschritte ist im Folgenden nochmal zusammengefasst:

- 10 Min. Rotihistol
- 3 Min. 100% Ethanol
- 3 Min. 100% Ethanol
- 1 Min. 95% Ethanol
- 1 Min. 80% Ethanol
- Spülung in Aqua dest.
- 25 Min. Natrium-Citrate-Puffer bei 95-100°C
- 2 Min. PBS/0,1% Tween 20
- 2 Min. PBS/0,1% Tween 20

5.3.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H.E.)

Zur Darstellung des strukturellen Aufbaus von mastikatorischer und auskleidender Schweineschleimhaut erfolgten Hämatoxylin-Eosin-Färbungen. Hierzu wurden die Kryoschnitte mit PFA-Saponin für 30' bei 4°C fixiert. Darauf folgte eine Färbung im Färbetrog mit Mayer's Hämatoxylin für 30 Sekunden bei Raumtemperatur und eine Waschung in destilliertem Wasser. Anschließend wurde der Objektträger für 30 Sekunden in 1% Eosin-Y-Lösung geschwenkt und mit einer aufsteigenden Alkoholreihe (95%,100%) dehydriert. Der Alkohol wurde mittels Xylol extrahiert und es erfolgte eine die Deckelung des Objektträgers [68].

5.3.3 Indirekte Immunfluoreszenz-Analyse

Für die Visualisierung von Proteinen im Schleimhautepithel mittels indirekter Immunfluoreszenz mussten die Gewebe zunächst 10 Minuten mit 0,1% Triton X-100/PBS zur Permeabilisierung der Zellmembran gelagert werden. Im Anschluss erfolgte eine TBS-Waschung.

Vor der Immunfluoreszenz-Färbung mit unten aufgeführten Antikörpern erfolgte zunächst eine Blockierung mit 3% bovinem Serum-Albumin (BSA)/PBS für mindestens 30 Minuten. Die Primär-Antikörper-Lösung wurde wie unten aufgeführt im entsprechenden Puffer angesetzt und aufpipettiert. Danach erfolgte eine Inkubation über Nacht in einer feuchten Kammer bei 4°C. Am Folgetag erfolgte ein Waschschritt und die Sekundär-Antikörperlösung wurde lichtgeschützt angesetzt und aufpipettiert. Es schloss sich erneut eine lichtgeschützte Inkubation über Nacht bei 4°C an. Bei allen Färbungen wurde eine Kontrolle mitgeführt, bei welcher kein primärer Antikörper hinzugefügt wurde.

| Primärer Antikörper / Verdünnung | Blockierung | Sekundärer Antikörper / Verdünnung |
|--|--------------|--|
| 1. Pan-Cytokeratin (PanCK) (1:100) 2. S100A4 (1:50) in 3% BSA/PBS | 3% BSA / PBS | 1. GAM 488 (1:4000) + H0 2. GAR 594 (1:4000) + H0 in PBS/0,05 % Tween-20 |
| Pan-Cytokeratin (Pan-CK) (1:100) in 3% BSA/PBS | 3% BSA /PBS | GAM 488 (1:4000) + H0 in PBS/0,05 % Tween-20 |
| Wheat-Germ-Agglutinin-488-Konjugat | / | / |

Tabelle 6: Primäre und sekundäre Antikörper

5.3.4 Färbung mit Wheat-Germ-Agglutinin-488-Konjugat

Nach einer Fixierung der Zellen in 4% Formaldehyd für 15min wurde eine Permeabilisierung der Zellmembran über Triton X-100 durchgeführt. Darauf folgte die Zugabe des Wheat-Germ-Agglutinin-488-Konjugats in einer Konzentration von 5µg/ml zur Sichtbarmachung von Zellmembranen in einer Konzentration von 5µg/ml auf die Zellen. Die Visualisierung von Zellkernen erfolgte parallel durch Zugabe des Farbstoffs Hoechst 33342 (1:5000). Die Zellen wurden für 10 Minuten im Brutschrank inkubiert. Danach folgte eine mehrfache Waschung mit PBS und die anschließende Deckelung des Objektträgers

6 Ergebnisse

6.1 Isolierung von primären, humanen Keratinozyten und Fibroblasten

Die im Institut etablierte Methode zur Isolierung von dermalen Zellen aus Präputien wurde erfolgreich auf humane Mundschleimhautzellen übertragen. Es gelang die Kultivierung von humanen, gingivalen Keratinozyten und Fibroblasten. Die hierfür verwendeten Schleimhautproben waren jedoch um ein Vielfaches kleiner als die üblichen Hautproben. Im Idealfall hatten die Gewebeproben einen Durchmesser von 1cm, waren aber normalerweise kleiner.

Dies erschwerte die Präparation mittels Pinzette und Skalpell. Diese wurde unter dem Mikroskop durchgeführt, wobei die vollständige Ablösung des Epithels kaum kontrollierbar war. Die im Vergleich zur äußeren Haut deutlich dünnere Epidermis ließ sich optisch nur schwer von der darunterliegenden Bindegewebsschicht unterscheiden. Trotzdem gelang eine reproduzierbare Isolierung von primären, gingivalen Keratinozyten. Pro Probe konnten ca. 2×10^5 c/ml gewonnen werden. Eine zu dünne Aussaat von Keratinozyten führte zu einem Absterben der Zellen. Dementsprechend wurden die aus einer Probe gewonnenen Keratinozyten in eine 25cm^2 Flasche überführt. Die sich hieraus ergebende Zellzahl war häufig immer noch sehr gering (Abb. 13A), jedoch ausreichend, um die Zellen zur Proliferation anzuregen.

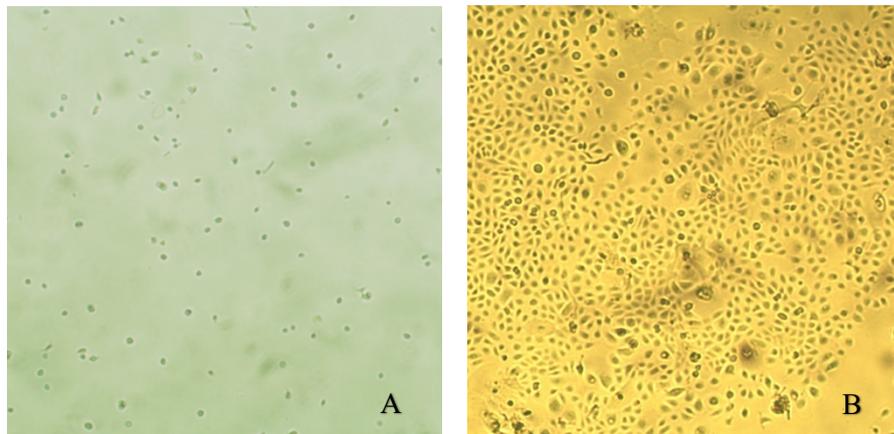


Abbildung 13. Primäre gingivale Keratinozyten kurz nach der Aussaat (A) und nach sieben Tagen (B)

Nach sieben Tagen in Kultur zeigten sich große Bereiche, in denen die Keratinozyten Zell-Zell-Kontakte ausgebildet hatten und die typische Morphologie aufwiesen. Trotzdem blieben in jeder Flasche auch Bereiche mit nur vereinzelt Zellen sichtbar (Abb. 13B). Eine Fortsetzung der Kultivierung führte jedoch nicht dazu, dass sich ein vollständig dichter Zellrasen bildete. Auch durch Ablösen und Umsetzen konnten die Zellen nicht zur weiteren Proliferation angeregt werden und nach wenigen Zellteilungen war der Zustand der Seneszenz erreicht. Dieser Umstand machte deutlich, dass sowohl für die angestrebten Monolayer-Untersuchungen als auch den Aufbau von 3D-Schleimhautmodellen entweder bedeutend

größere Schleimhautproben nötig sind oder immortalisierte Zelllinien Anwendung eingesetzt werden müssen. Eine weitere Möglichkeit kann die Gewinnung von pluripotenten, gingivalen Stammzellen sein. Zur Isolierung von gingivalen Fibroblasten aus der *Lamina propria* wurde der bindegewebige Anteil der Gewebeprobe ohne enzymatische Aufspaltung in Fibroblastenmedium kultiviert (Abb. 14A). Die Zellkulturflaschen wurden vorher nicht mit Kollagen beschichtet. Durch diese selektiven Kulturbedingungen erfolgte ein Auswachsen von Fibroblasten. Diese erreichten nach ca. 20 Tagen eine Konfluenz von ca. 80-90% (Abb. 14B)

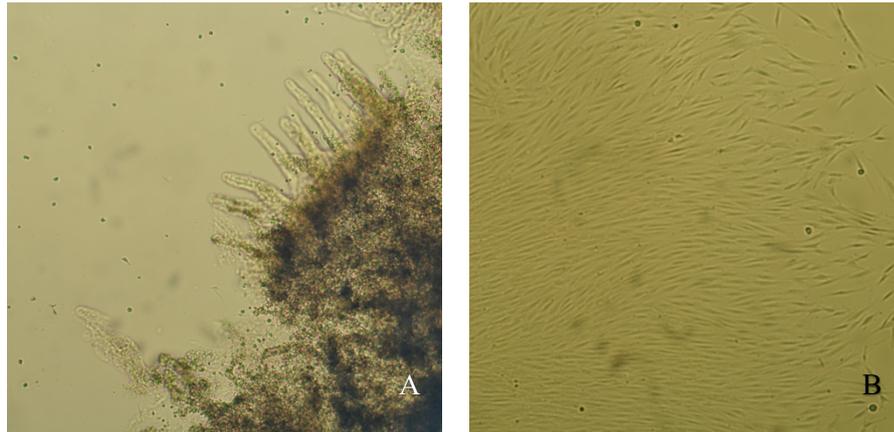


Abbildung 14: Primäre gingivale Fibroblasten kurz nach der Kultivierung (A) mit dermalen Spendergewebe im rechten Bildabschnitt. Nahezu flächendeckendes Fibroblastennetz 19 Tage nach der Kultivierung (B).

6.2 Untersuchungen am Zell-Monolayer

Um die Biokompatibilität der Wirkstofffreigabesysteme zu untersuchen, wurden Zytotoxizitäts- und Proliferationsassays durchgeführt. Da die Mundschleimhaut im Vergleich zur äußeren Haut eine schnellere Turnover-Rate hat und generell reaktiver ist, sollte untersucht werden ob die CMS-Nanocarrier oder das PNIPMAM-(S-S)-dPG-Nanogel einen zytotoxischen oder proliferativen Einfluss auf Monolayer-Kulturen von immortalisierten humanen gingivalen Keratinozyten haben. Weiterhin sollte untersucht werden, ob die Carriersysteme von den Keratinozyten aufgenommen werden und somit eine transzelluläre Penetrationsroute nach Applikation zu erwarten wäre oder nicht, was auf einen parazellulären Weg in das Schleimhautepithel hinweisen würde.

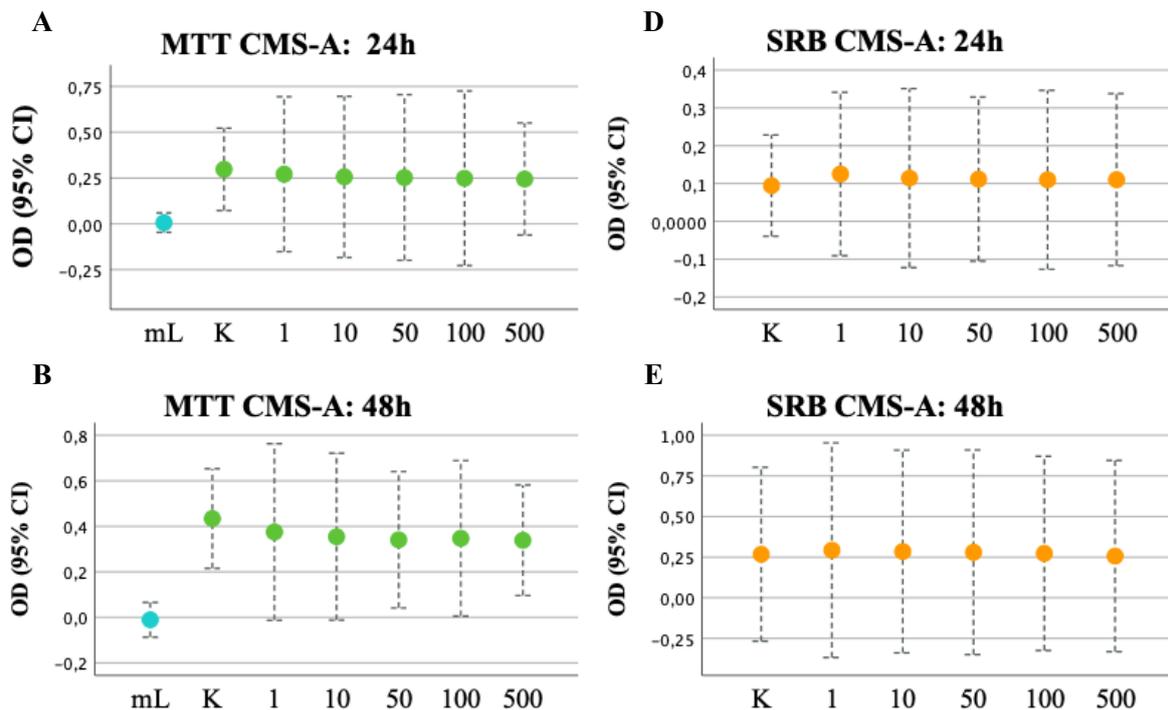
6.2.1 Einfluss der Nanocarrier auf die metabolische Aktivität und Zellproliferation oraler Keratinozyten

Hierfür wurde zum einen der MTT/XTT-Assay durchgeführt, der den Redox-Status von Zellen misst und damit Rückschlüsse auf die metabolische Aktivität zulässt. Zum anderen wurde der SRB-Assay durchgeführt, bei dem über die Menge des an Zellproteine gebundenen Farbstoffs Sulforhodamin B die Proteinmasse einer Probe photometrisch ermittelt werden kann.

Beide Assays wurden für den Amid-CMS-Nanocarrier 10-A-18-350 (CMS-A), den CMS-Nanocarrier des Ester-Typs E-15-350 (CMS-E) und das PNIPMAM-(S-S)-dPG-Nanogel (NG) durchgeführt. Alle Nanocarrier-Typen wurden unbeladen untersucht.

Zur Untersuchung des Einflusses der Nanocarrier auf die metabolische Aktivität und Zellproliferation wurden immortalisierte gingivale Keratinozyten (IGK oder OKG4/bmi1/TERT) in 96-Well-Platten ausgesät und mit unterschiedlichen Konzentrationen der Nanocarrier behandelt (s. Kapitel 5.2.2 / Tabelle 2; Kapitel 5.2.3 / Tabelle 3). Nach einer Inkubation über 24h, 48h und 72h wurde jeweils ein MTT/XTT- und SRB-Assay durchgeführt. Als Kontrolle wurde stets eine mit reinem Nährmedium versorgte Zellgruppe mitgeführt. Im MTT/XTT-Assay wurde außerdem eine als maximale Lyse bezeichnete Gruppe mitgeführt, bei der vor Zugabe des MTT/XTT-Reagenzes alle Zellen mittels 4% Triton-X-100 in PBS lysiert wurden, wodurch der Farbstoff zu keinem Zeitpunkt umgesetzt werden konnte. Diese Gruppe diente als zusätzliche Kontrolle. Für die statistische Auswertung wurden die Replikate jeder Gruppe gemittelt und der gemittelte Leer-Wert abgezogen. Es wurde ein abhängiger T-Test durchgeführt.

CMS 10-A-18-35



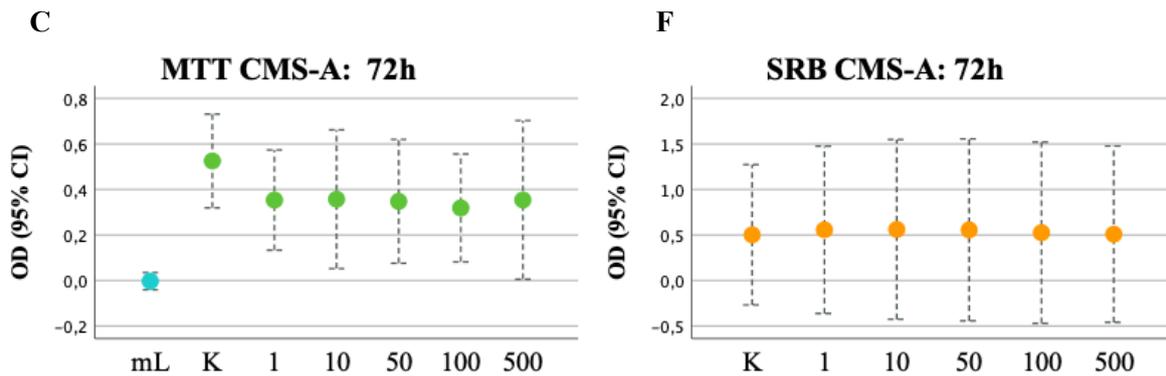


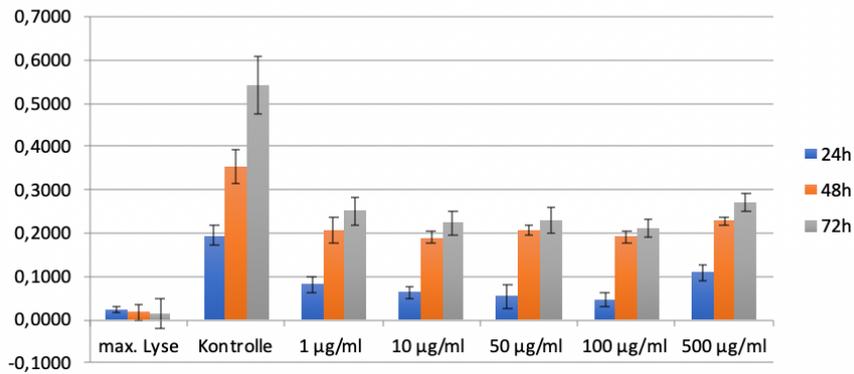
Abbildung 15: Einfluss verschiedener Konzentrationen des CMS-Nanocarriers 10-A-18-350 auf die metabolische Aktivität (A,B,C) und Zellproliferation (D,E,F) von IGK-Zellen. Untersuchungszeitpunkt jeweils nach 24h (A,D), 48h (B,E) und 72h (C,F) Inkubation. Nanocarrier-Konzentration in [$\mu\text{g/ml}$]. mL, maximale Lyse; K, unbehandelte Kontrollgruppe. (n=3)

Abbildung 15 A-C zeigt den Einfluss des CMS-A-Carriers auf die metabolische Aktivität von IGK-Zellen nach Inkubation über 24h, 48h und 72h. Für die unterschiedlichen Konzentrationen des Nanocarriers zeigte sich zwar nach 48h und 72h ein leichter Abfall der gemessenen optischen Dichte im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe, jedoch ergab sich für keinen Zeitpunkt statistisch eine signifikante Änderung der Stoffwechselaktivität (Abb. 15 B,C)

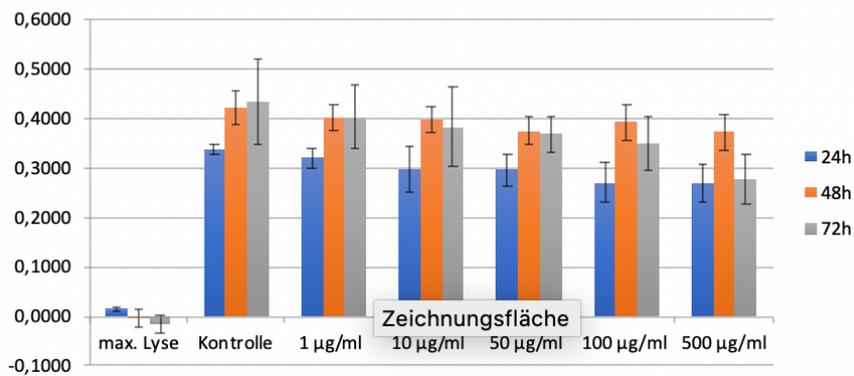
In Abbildung 15 D-F sind die Resultate des SRB-Assays für dieselben Ansätze dargestellt. Hier war die gemessene optische Dichte für alle Konzentrationen des Nanocarriers zu allen Messzeitpunkten im Vergleich zur Kontrollgruppe weitgehend unverändert. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass dieser Typ des CMS-Nanocarriers an oralen immortalisierten Zellen weder einen ausgeprägten Einfluss auf die metabolische Aktivität noch einen zytotoxischen Effekt zeigt [69]. Im Falle einer Bestätigung dieser Ergebnisse an primären Zellen könnte davon ausgegangen werden, dass der Einsatz dieses Nanocarriers für orale gingivale Keratinozyten unschädlich ist.

Abbildung 16 zeigt die graphische Darstellung der unabhängigen Versuchsdurchläufe des MTT-Assays mit IGK-Zellen. Hierbei fällt auf, dass die Standardabweichungen innerhalb der einzelnen Versuchsdurchläufe deutlich geringer war als im Gesamtergebnis (Abbildung 15 A-C). Dieses Bild zeigte sich bei allen durchgeführten Zytotoxizitäts- und Proliferationsassays.

MTT I CMS-A



MTT II CMS-A



MTT III CMS-A

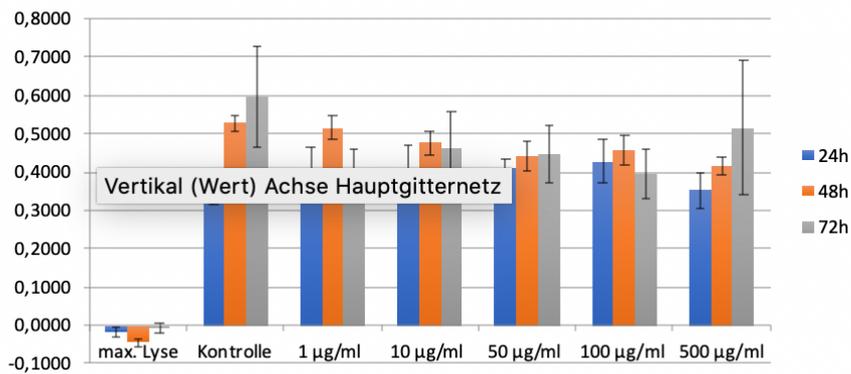
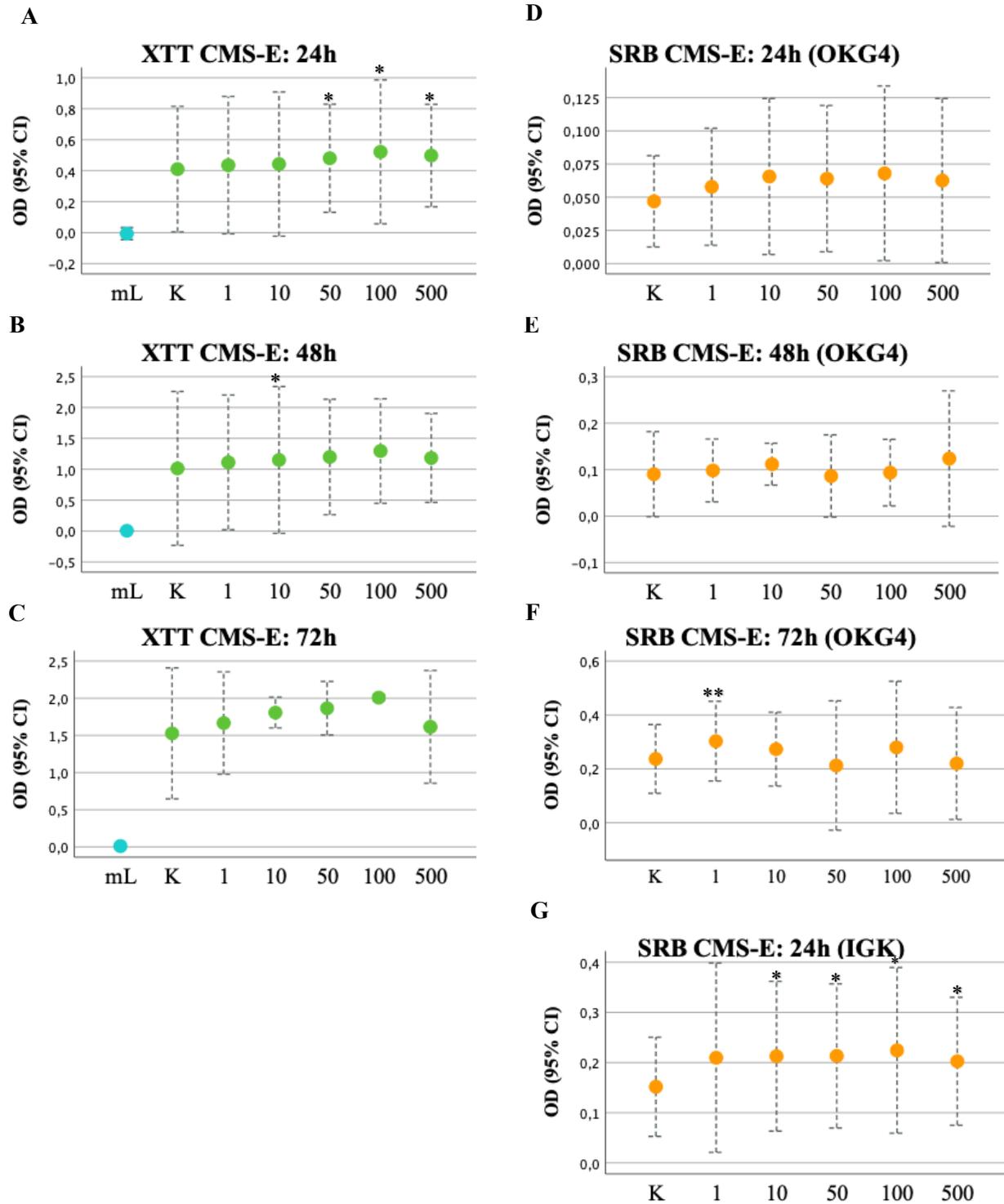


Abbildung 16: Ergebnisse der drei unabhängigen Versuchsdurchläufe im MTT-Assay für dem CMS-Nanocarrier 10-A-18-350.

CMS-E-15-350



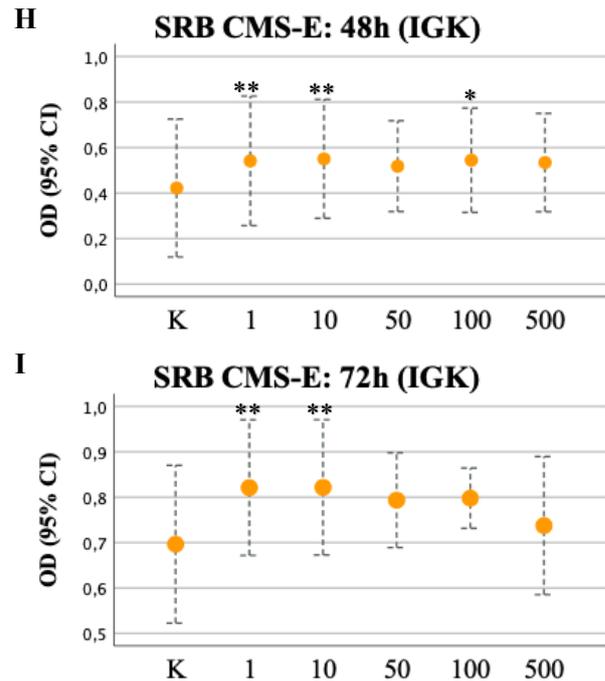


Abbildung 17: Einfluss verschiedener Konzentrationen des CMS-Nanocarriers E-15-350 auf die metabolische Aktivität (A,B,C) und Zellproliferation (D-I) von OKG4/bmi1/TERT-Zellen (A-F) und IGK-Zellen (G-I). Die Untersuchungen erfolgten jeweils nach 24h (A,D,G), 48h (B,E,H) und 72h (C,F,I) Inkubation. Konzentration in [$\mu\text{g/ml}$]. mL, maximale Lyse; K, unbehandelte Kontrollgruppe. (n=3)

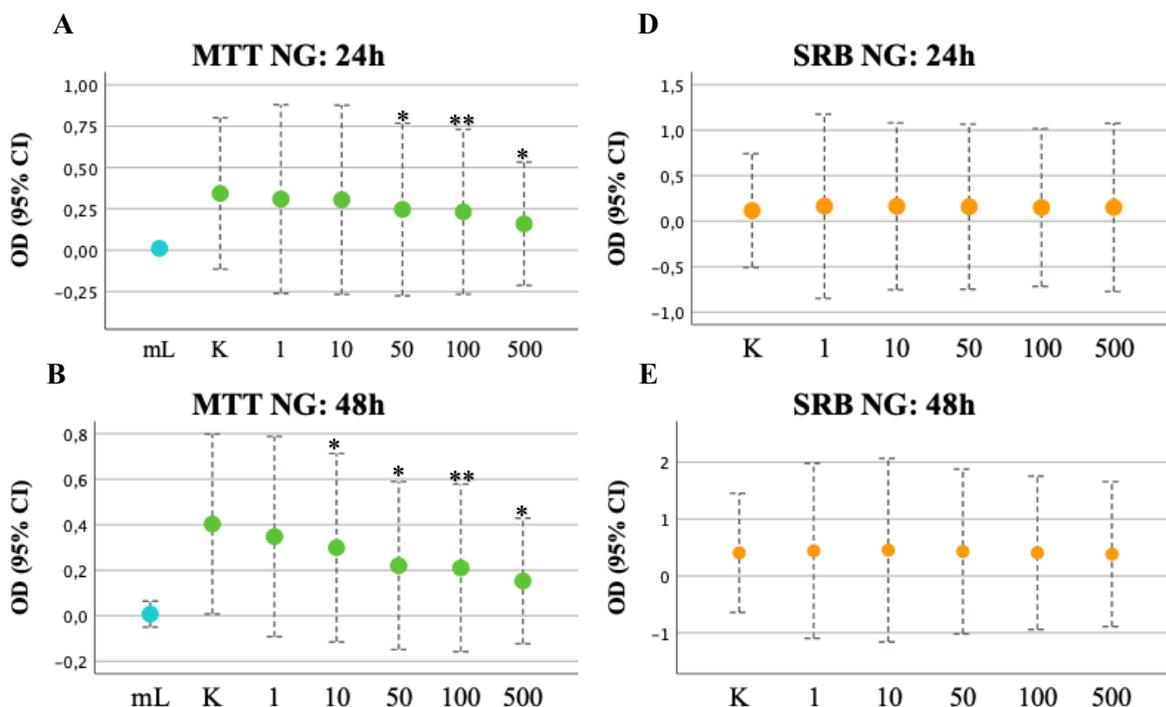
Abbildung 17 A-C zeigt die Stoffwechselaktivität der mit CMS E-15-350 behandelten gingivalen Keratinozyten (OKG4/bmi1/TERT) zu den Messzeitpunkten 24h, 48h und 72h. Analog dazu ist in der Abbildung 17 D-F die Zellmasse der gleichermaßen behandelten Zellen zu den drei Untersuchungszeitpunkten dargestellt. Abbildung 17 G-I zeigt darüber hinaus den Einfluss des Nanocarriers auf die Zellmasse von IGK-Zellen.

Insgesamt führt der Nanocarrier CMS E-15-350 bei OKG4-Keratinozyten zu einem leichten, aber signifikanten Anstieg der umgesetzten Farbstoffmenge im XTT-Assay. Nach 24h war bei 50 $\mu\text{g/ml}$ (*p=0,035), 100 $\mu\text{g/ml}$ (*p=0,016) und 500 $\mu\text{g/ml}$ (*p=0,042) ein leichter Anstieg im Vergleich zur Kontrollgruppe zu beobachten (Abb. 17 A). Nach 48h war ein leichter Anstieg bei 10 $\mu\text{g/ml}$ (*p=0,035) signifikant (Abb. 17B). Nach 72h waren keine signifikanten Unterschiede mehr messbar (Abb. 17 C). Im SRB-Assay zeigten sich nach 24h und 48h keine Unterschiede zwischen Kontrollgruppe und behandelten Gruppen (Abb. 17 D,E) Nach 72h war lediglich ein Anstieg bei einer Konzentration von 1 $\mu\text{g/ml}$ (**p=0,004) zu verzeichnen (Abb. 17 F). Insgesamt fällt jedoch auf, dass der Verlauf der Messwerte im SRB-Assay für beide Zelltypen sehr ähnlich war. Konzentrationen des CMS-Nanocarriers von 1 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$ und 100 $\mu\text{g/ml}$ führten zu einem leichten, wenn auch nicht immer signifikanten Anstieg der Proteinmasse im Vergleich zur Kontrolle. Im Vergleich zu diesen Konzentrationen war die gemessene Proteinmasse bei 50 $\mu\text{g/ml}$ und 500 $\mu\text{g/ml}$ fast durchgehend geringer.

Insgesamt deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass der CMS-Nanocarrier E-15-350 keine zytotoxischen Wirkungen auf den untersuchten Zelltyp hat. Da die im SRB-Assay untersuchte Proteinmasse kaum verändert war, sich aber signifikante Steigerungen der optischen Dichte im XTT-Assay zeigten, ist anzunehmen, dass der CMS-E-Carrier besonders innerhalb der ersten 24h zu einer Steigerung des Zellmetabolismus von OKG4/bmi1/TERT Zellen führt. Diese Steigerung verschwand jedoch im zeitlichen Verlauf wieder.

Eine zweite SRB-Versuchsreihe wurde an IGK-Zellen durchgeführt. Bei diesem Zelltyp zeigte sich zu allen drei Zeitpunkten eine Steigerung der Proteinmasse. So war nach 24h eine leichte Zunahme bei den Konzentrationen 10 µg/ml (*p=0,038), 50 µg/ml (*p=0,040), 100 µg/ml (*p=0,046) und 500 µg/ml (*p=0,030) sichtbar (Abb. 17 G). Nach 48h und 72h war dieser Effekt vor allem für die geringeren Konzentrationen deutlich. Nach 48h ergaben sich Signifikanzen bei 1 µg/ml (**p=0,002), 10µg/ml (**p=0,007) und 100 µg/ml (*p=0,02) (Abb. 17 H); nach 72h bei 1µg/ml (**p=0,004) und 10µg/ml (**p=0,002) (Abb. 17 I). Insgesamt scheint der CMS-Carrier E-15-350 einen leicht zellproliferativen Einfluss auf IGK-Zellen zu haben, was mit der ermittelten Tendenz bei den OKG4-Zellen übereinstimmt. Zusammenfassend deuten die Ergebnisse darauf hin, dass der CMS-Carrier E-15-350 keine zytotoxischen Einflüsse auf immortalisierte, gingivale Zellen hat. Jedoch gibt es Hinweise, dass er zumindest eine zellstoffwechselsteigernde und zellproliferative Wirkung zeigt, welche zukünftig weiter untersucht werden sollte.

PNIPMAM-(S-S)-dPG-Nanogel



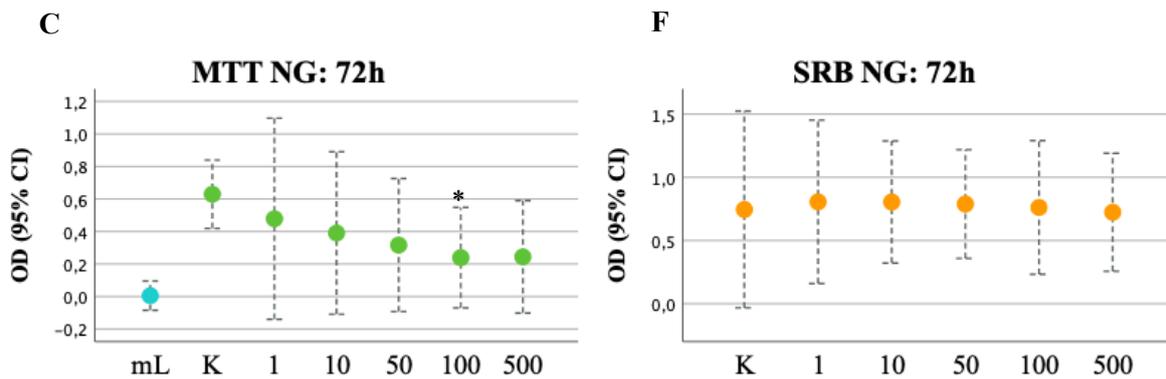


Abbildung 18: Einfluss verschiedener Konzentrationen des PNIPMAM-(S-S)-dPG-Nanogels auf die metabolische Aktivität (A,B,C) und Zellproliferation (D,E;F) von IGK-Zellen. Untersuchungszeitpunkt jeweils nach 24h (A,D), 48h (B,E) und 72h (C,G) Inkubation. Konzentration in [$\mu\text{g/ml}$]. mL, maximale Lyse; K, unbehandelte Kontrollgruppe. (MTT $n=3$, SRB $n=2$)

Abbildung 18 zeigt die MTT- und SRB-Ergebnisse des PNIPMAM-(S-S)-dPG-Nanogels. Untersucht wurde dieser an IGK-Zellen. Im MTT-Assay zeigte sich zu jedem Messzeitpunkt eine Abnahme der metabolischen Aktivität der Zellen. Nach 24h war diese bei 50 $\mu\text{g/ml}$ (* $p=0,027$), 100 $\mu\text{g/ml}$ (** $p=0,009$) und 500 $\mu\text{g/ml}$ (* $p=0,012$), nach 48h bei 10 $\mu\text{g/ml}$ (* $p=0,037$), 50 $\mu\text{g/ml}$ (* $p=0,025$), 100 $\mu\text{g/ml}$ (** $p=0,009$) und 500 $\mu\text{g/ml}$ (* $p=0,017$) und nach 72h bei 100 $\mu\text{g/ml}$ (* $p=0,039$) signifikant (Abb. 18A-C). Im SRB-Assay zeigte sich zu keinem Zeitpunkt eine Veränderung der Proteinmasse im Vergleich zur Kontrollgruppe. Hier muss allerdings darauf hingewiesen werden, dass dieser Assay nur in zwei Versuchsdurchläufen durchgeführt wurde, weswegen die Ergebnisse kritischer zu sehen sind als die aller anderen dargestellten Assays. Insgesamt führte das Nanogel zu einer Abnahme des Zellmetabolismus. Eine Minderung der Zellproliferation konnte nicht gezeigt werden.

6.2.2 Intrazelluläre Aufnahme des CMS-E-Nanocarriers in orale Keratinozyten

Ziel der Entwicklung von Nanopartikeln ist es, bestimmte Wirkstoffe und Moleküle für die Zellen des Zielgewebes verfügbar zu machen und die Anreicherung des Wirkstoffes im Zielgewebe zu erhöhen.

Die Passage von Molekülen in das Epithel kann hierbei über transzelluläre und parazelluläre Mechanismen stattfinden. Der Wirkort eines Medikaments befindet sich in der Regel im Zytoplasma der Zelle oder an Rezeptoren der Kernmembran. Um zu überprüfen, ob die selektive Barriere der Zellmembran von den Nanocarrier-Partikeln überwunden wird und somit eine transzelluläre Passage möglich ist, wurde mittels Laserkonfokalmikroskopie untersucht, ob der CMS E-15-350-Nanocarrier in OKG4/bmi1/TERT-Zellen aufgenommen wird. Für diese Untersuchung wurden die Zellen zunächst in zwei sich im Calciumgehalt unterscheidenden Medien kultiviert. Der erhöhte Calciumgehalt sollte eine Differenzierung und damit

Veränderung der Zell-Zell-Kontakte der Keratinozyten initiieren. Anschließend wurden die Zellen für 24h mit fluoreszenzmarkiertem CMS E-13-350-Nanocarrier inkubiert.

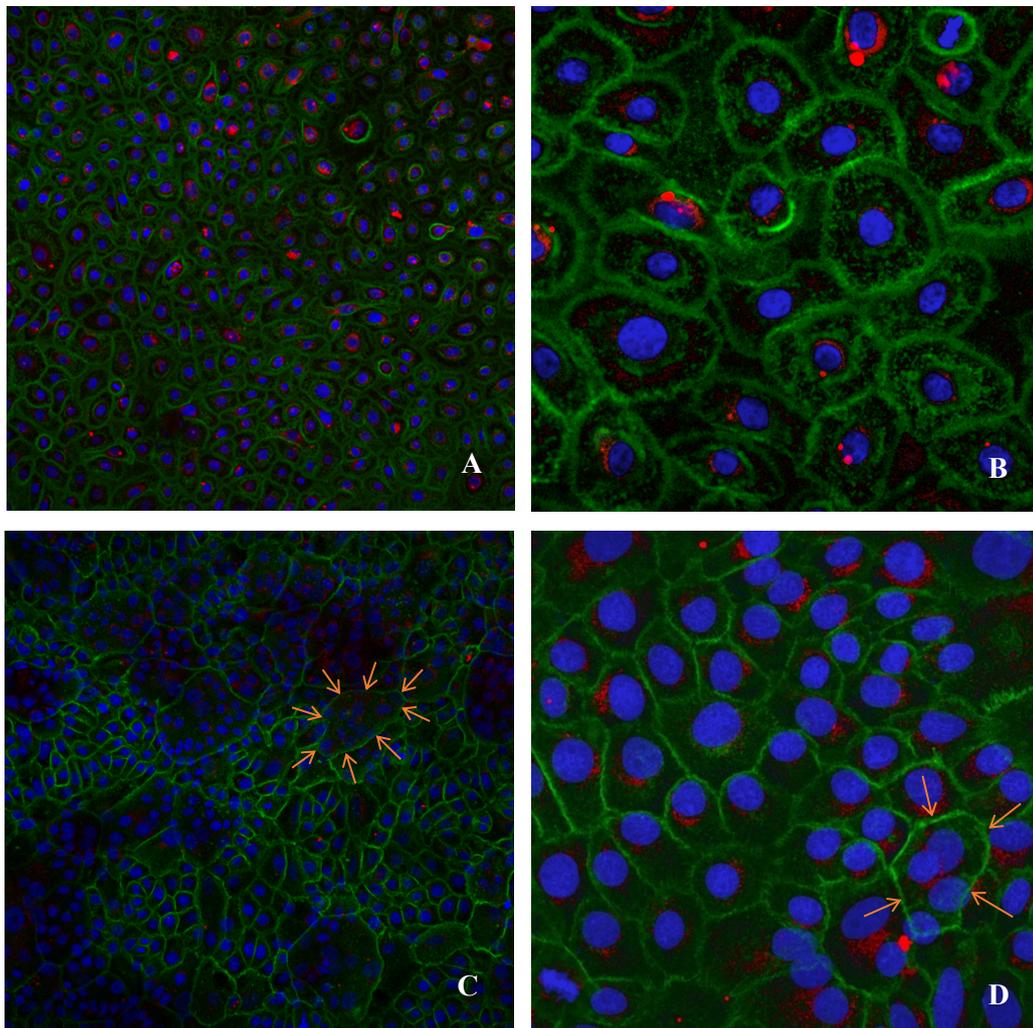


Abbildung 19: Die zelluläre Aufnahme von CMS E-15-350-ICC. Monolayer von OKG4/bmi1/TERT-Zellen in Nährmedium mit 60µM Calciumgehalt (A,B) und 1,4 mM Calciumgehalt (C,D) nach Inkubation mit CMS-Nanocarrier mit ICC-Label (rot). Darstellung der Zellmembran über Wheat-Germ-Agglutinin-488-Konjugat (grün). Kernfärbung mit Hoechst 33342 (blau). Bei erhöhtem Calciumgehalt kommt es optisch zur Verschmelzung mehrerer Zellen (Pfeilmarkierung). (A = 20-fache Vergrößerung, B = 63-fache Vergrößerung)

Mittels Immunfluoreszenz wurden die Zellmembran (grün) und der Zellkern (blau) dargestellt (Abb. 19). Der CMS-Nanocarrier war ICC-gelabelt und fluoreszierte somit im roten Bereich. Eine Erhöhung des Calciumgehalts im Medium zeigte eine deutliche Veränderung in der Struktur des Monolayers (Abb. 19 C und D) im Vergleich zu Zellen, die in Gegenwart einer niedrigen Calciumkonzentration von 60µM kultiviert wurden (Abb. 19 A und B) Bei einem geringen Calciumgehalt des Mediums von 60 µM zeigte sich ein dichter Zellrasen, jedoch wirkten die Zellen klein, abgerundet und häufig in einem lockeren Verbund. Die Kultivierung mit 1,4 mM Calcium führte optisch zu einer Verbreiterung der Zellen und zum

Teil zur Verschmelzung einzelner Zellen (Abb. 19 C und D, Pfeilmarkierung). Dies ist damit zu begründen, dass es physiologisch beim Differenzierungsprozess zu einer starken Abflachung der Zellen kommt. Liegen die Zellen knapp unter- oder überhalb der mikroskopisch dargestellten Ebene, wird die Zellmembran zu benachbarten Keratinozyten nicht sichtbar. Auch zeigt sich nach Erhöhung der Calciumkonzentration die Ausbildung von engen Zell-Zellkontakten (Abb. 19 D).

Unabhängig vom Differenzierungszustand der Zellen wurde der Fluoreszenz-gelabelte CMS-Nanocarrier von den gingivalen Keratinozyten aufgenommen. Der Nanocarrier war hier jeweils in räumlicher Nähe des Zellkerns der Keratinozyten angereichert. Ein quantitativer Vergleich kann mit dieser Methode nicht getroffen werden.

6.3 Franz-Zell-Penetrationsversuche

6.3.1 Struktureller Aufbau mastikatorischer und auskleidender Schleimhaut vom Schwein

Zur Darstellung und Kontrolle des strukturellen Aufbaus der verwendeten Mundschleimhaut vom Schwein, wurden H.E.-Färbungen der exizidierten Schleimhaut angefertigt. Hierbei wurden erwartungsgemäß strukturelle Unterschiede der beiden Schleimhauttypen sichtbar (Abb. 20 und 21)

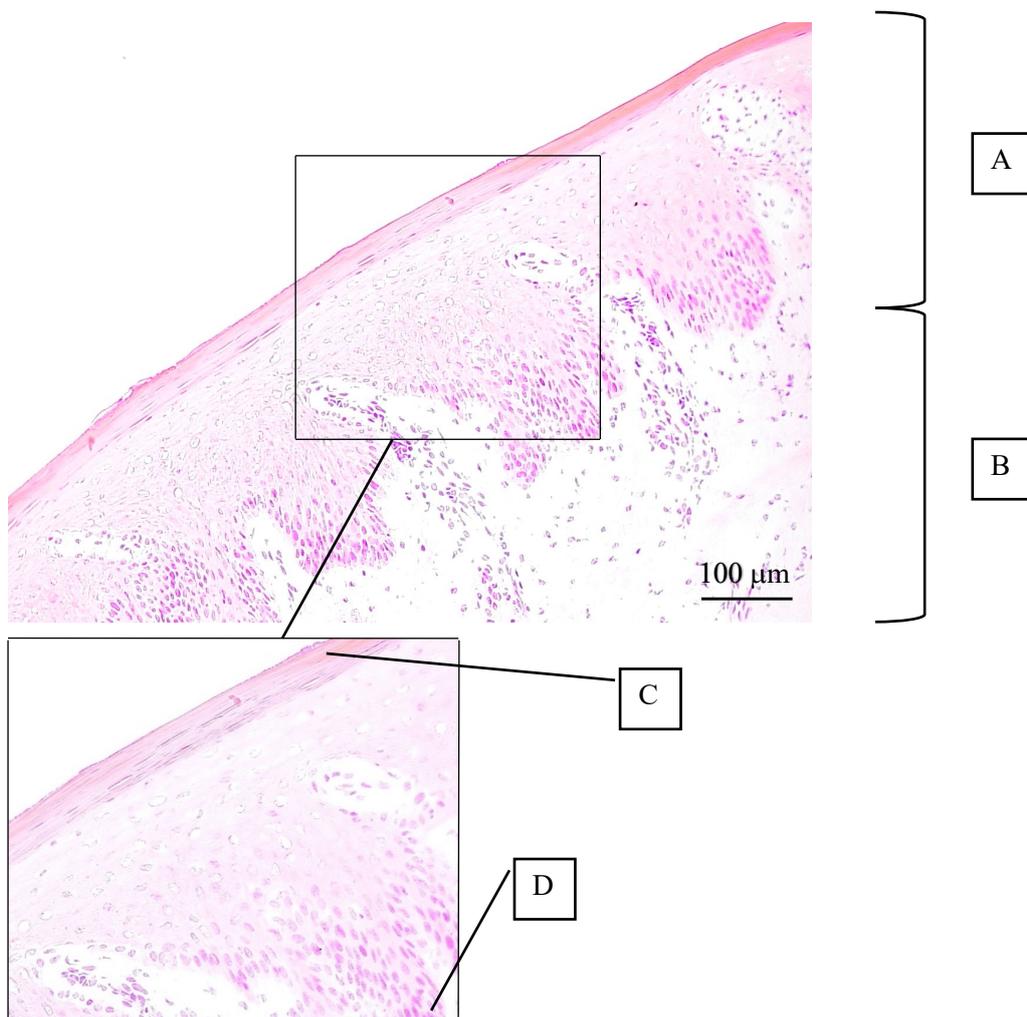


Abbildung 20: Histologischer Schnitt mastikatorischer Schleimhaut vom Schwein H.E.-Färbung. A *Epidermis*; B *Lamina propria*; C *Stratum corneum*; D *Stratum basale*

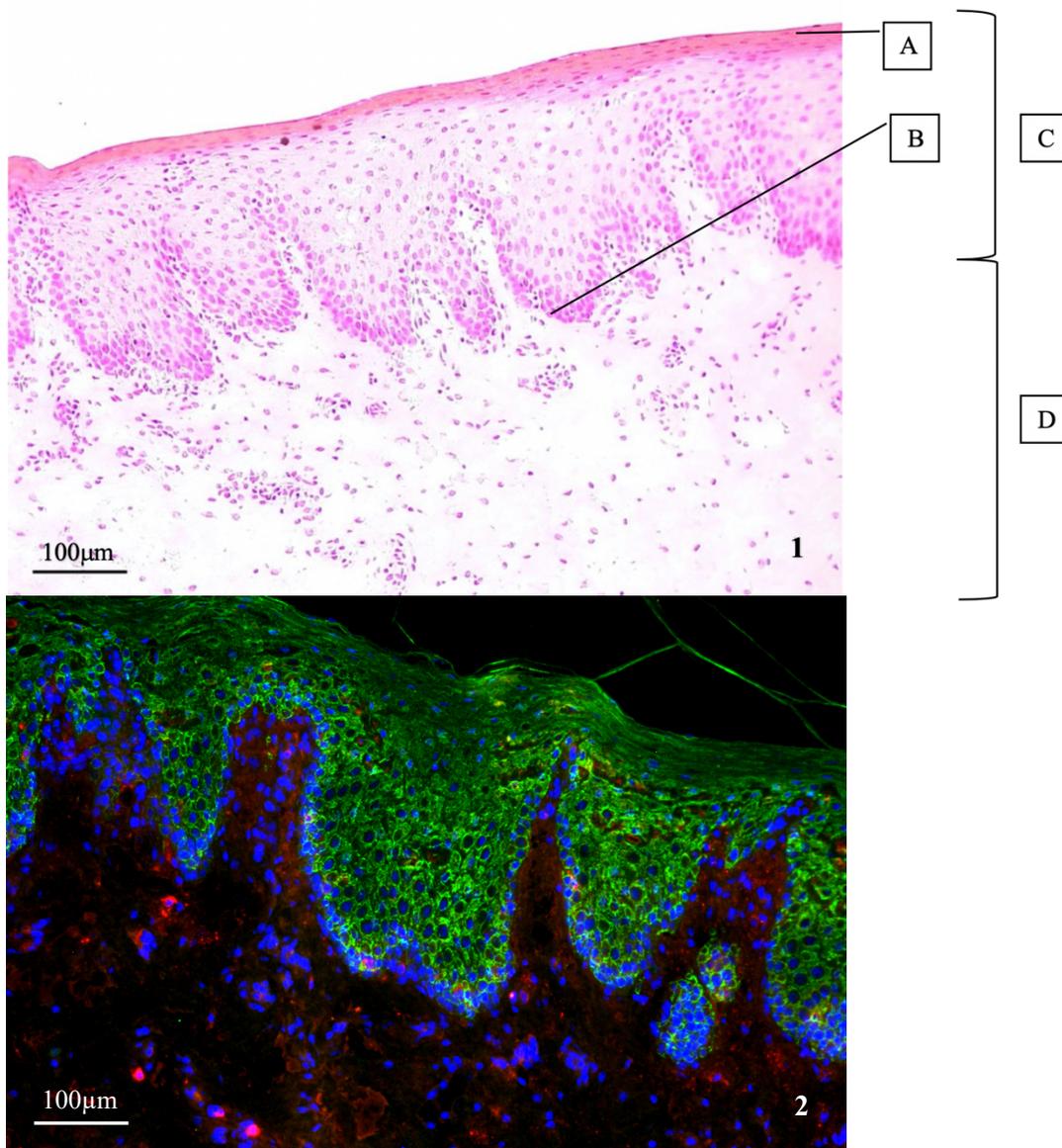


Abbildung 21: Histologische Darstellung von auskleidender, oraler Schleimhaut vom Schwein.

(1) H.E. Färbung. A parakeratinisiertes *Stratum superficiale*; B *Stratum basale*; C Epidermis; D bindegewebige *Lamina propria*. (2) Immunhistochemische Darstellung des Epithels durch Anfärbung verschiedener Cytokeratin-Isoformen mittels eines anti-PanCK-Antikörpers (grün), sowie Darstellung der Fibroblasten (rot) in der *Lamina propria* durch Färbung des Peptids S100A4, die Kernfärbung erfolgte mittels Hoechst 33342 (blau). Zellkerne sind abgeflacht bis in die oberste Zellschicht erkennbar.

6.3.2 Untersuchungen zur Penetration fluoreszenzmarkierter Nanocarrier in auskleidende und mastikatorische Schleimhaut vom Schwein

Um die Penetration vom CMS-Nanocarrier 10-A-18-350 und dem PNIPMAM-(S-S)-dPG-Nanogel zu untersuchen und die Penetrationstiefe in mastikatorische und auskleidende Schleimhaut zu erheben, wurden wie zuvor beschrieben fluoreszenzmarkierte Nanopartikel auf Schweineschleimhaut aufgetragen und die Penetration der Partikel mittels Franz-Zell-Untersuchungen ermittelt. Es wurde eine lange Einwirkzeit von 6h gewählt, um die generelle Fähigkeit zum Eindringen in Schleimhäute darzustellen. Der Versuchsaufbau orientierte sich an vorangegangenen Studien, in welchen die Penetrationsversuche an humaner Haut durchgeführt wurden [50].

Penetration des Nanocarriers CMS 10-A-18-350

Die Untersuchungen an Schweineschleimhaut ergaben, dass eine Penetration des Nanocarriers CMS 10-A-18-350 sowohl in mastikatorische als auch in auskleidende Schleimhaut möglich ist. Histologisch konnte eine Penetration des fluoreszenzmarkierten Nanocarriers in beide Schleimhauttypen mit Hilfe des Laser-Scanning-Mikroskops dargestellt werden (Abb. 22). Sie war jedoch in beiden Schleimhauttypen auf die oberen Schichten der Epidermis begrenzt, wobei die Eindringtiefe in die mastikatorische Schleimhaut geringfügig tiefer ausfiel. Sie blieb auf das *Stratum corneum* begrenzt (Abb. 22 D), umfasste jedoch mehrere Hornlamellen.

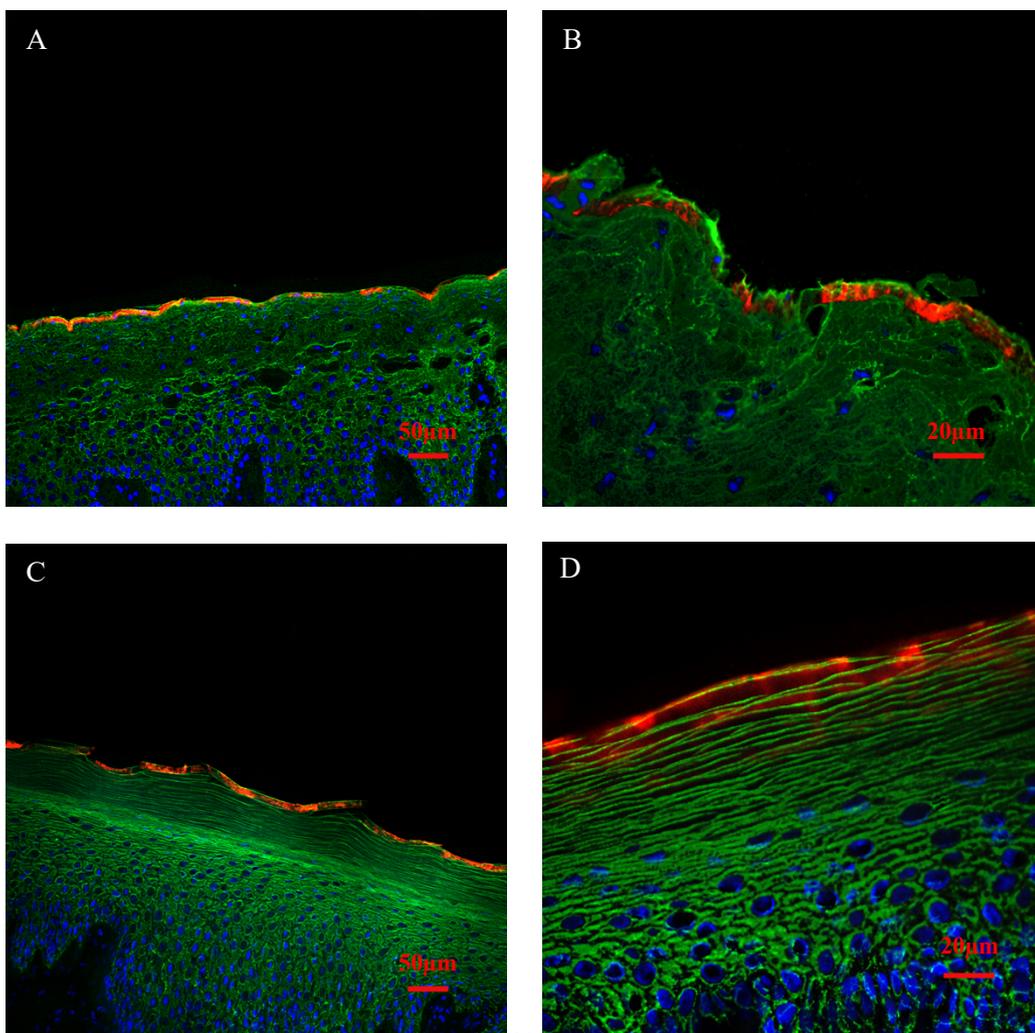


Abbildung 22: Histologische Darstellung oraler Schleimhaut vom Schwein nach 6h Penetration von CMS-A (rot). Expression von verschiedenen Cytokeratin-Isoformen in der Epidermis markiert durch anti-PanCK Antikörper (grün). Kernfärbung mittels Hoechst 33342 (blau). A und B: Penetration des Nanocarriers in auskleidende Schleimhaut. Zellkerne sind bis in die obersten Zellschichten erkennbar. C und D: Penetration in mastikatorische Schleimhaut. Vergrößerung links: x20; rechts: x63

Mittels Zen-Software wurden die Penetrationstiefen der Nanocarrier ermittelt. Hierbei wurde zwischen der Penetration der Mehrheit der Nanocarrierpartikel (Hauptpenetration) und der maximal erkennbaren Penetration vereinzelter Nanocarrierpartikel unterschieden (Abb. 23). Im Mittel lag die Penetrationstiefe in der mastikatorischen Schleimhaut bei 10 +/- 2,5 μm ; bei auskleidender Schleimhaut bei 6 +/- 1,7 μm . Vereinzelt wurden auch Partikel in tieferen Schichten sichtbar. Im Mittel lagen die tiefste erkennbare Penetration für mastikatorische Schleimhaut bei 44 +/- 28,8 μm und für auskleidende Schleimhaut bei 39 +/- 11,9 μm [69].

Insgesamt konnte der Nanocarrier CMS 10-A-18-350 etwas tiefer in die mastikatorische Schleimhaut vom Schwein eindringen.

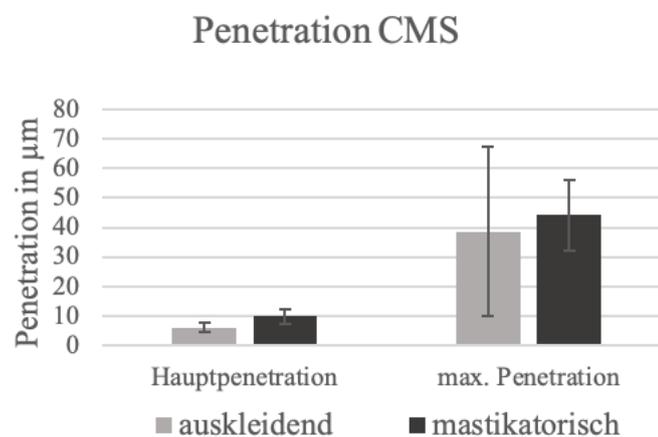


Abbildung 23: Durchschnittliche Eindringtiefen des CMS-Nanocarriers 10-A-18-350 in auskleidende und mastikatorische orale Schleimhaut vom Schwein. Penetration in [μm]. Es wurden zwei biologische Replikate (n=2) untersucht, wobei pro Spender jeweils drei technische Replikate untersucht wurden. An jedem technischen Replikat wurde die Penetration an drei verschiedenen Stellen gemessen.

Penetration des PNIPMAM-(S-S)-dPG-Nanogels

Auch die Penetrationsfähigkeit eines fluoreszenzmarkierten PNIPMAM-(S-S)-dPG-Nanogels wurde in beiden Schleimhauttypen untersucht (Abb. 24). Hier konnte ein Eindringen des Nanogels in die oberen

Schichten des Epithels mastikatorischer und auskleidender Schleimhaut beobachtet werden. Wie der CMS-Nanocarrier überschritt auch das Nanogel das *Stratum corneum* der mastikatorischen Mucosa nicht. Darüber hinaus beschränkte sich die Verteilung des Nanogels hauptsächlich auf die oberste Hornlamelle (Abb. 24 D).

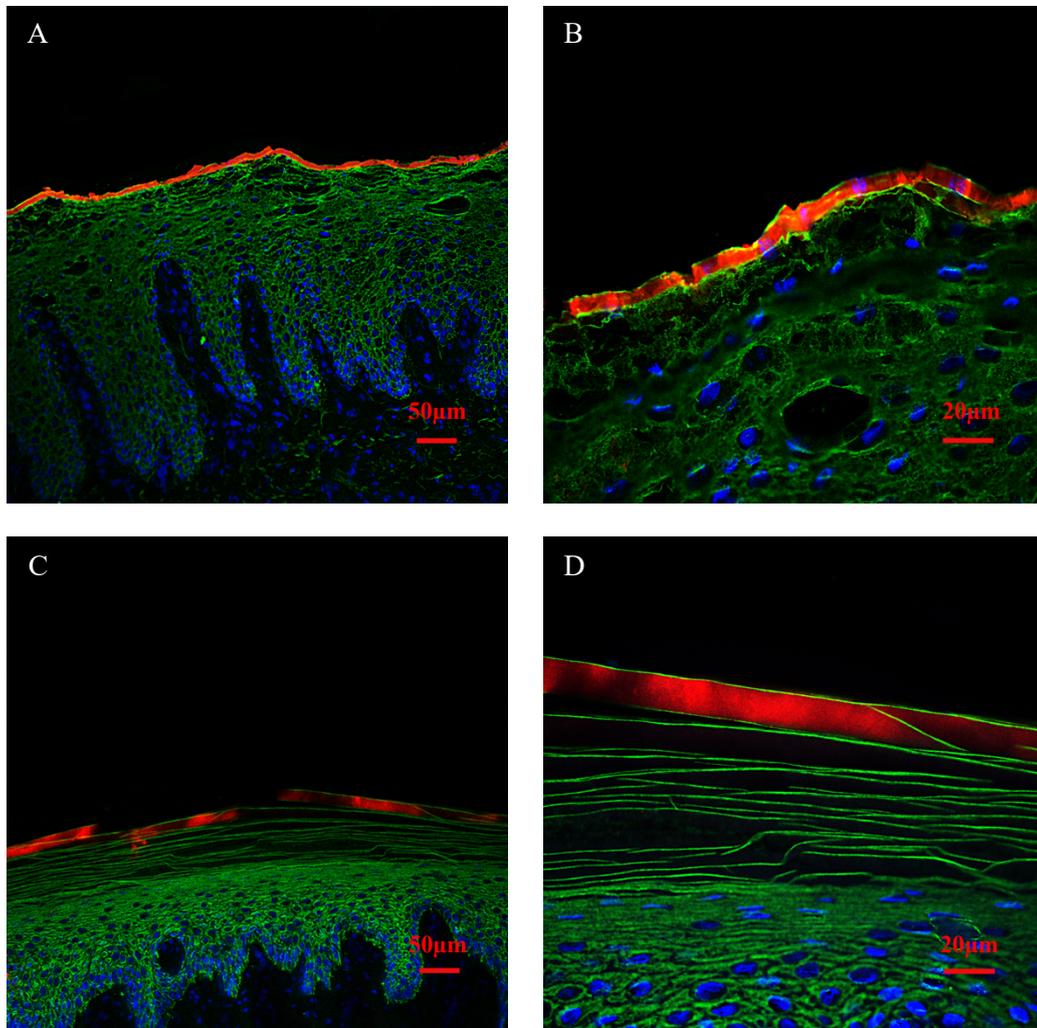


Abbildung 24: Histologische Darstellung oraler Schleimhaut vom Schwein nach 6h Penetration mit PNPAM-(S-S)-dPG-Nanogel (rot). Immunhistochemische Färbung wie zuvor beschrieben. A und B: Penetration des Carriers in auskleidende Schleimhaut. C und D: Penetration in mastikatorische Schleimhaut. Vergrößerung links: x20; rechts: x63

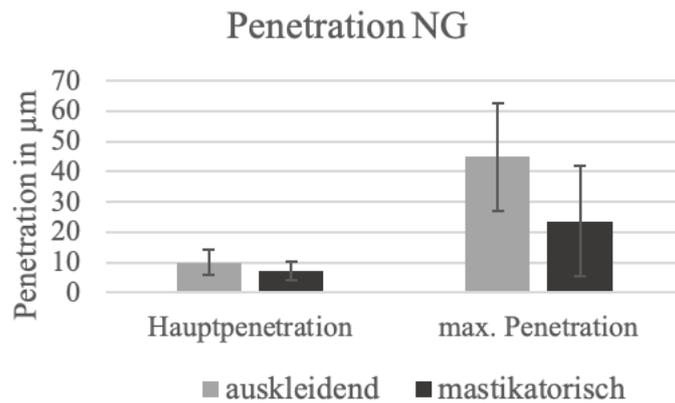


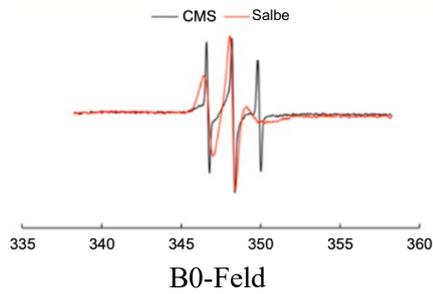
Abbildung 25: Durchschnittliche Eindringtiefen des PNIPMAM-(S-S)-dPG-Nanogels in auskleidende und mastikatorische orale Mukosa vom Schwein. Penetration in [µm] Es wurden drei biologische Replikate (n=3) untersucht, wobei pro Spender jeweils drei technische Replikate untersucht wurden. An jedem technischen Replikate wurde die Penetration an drei verschiedenen Stellen gemessen.

Im Gegensatz zu den Versuchsergebnissen mit dem CMS-Nanocarrier zeigte sich für das Nanogel insgesamt eine größere Penetrationstiefe bei auskleidender Schleimhaut (Abb. 25). Im Mittel drangen die Partikel hier $10 \pm 4,3 \mu\text{m}$ ein. Bei mastikatorischer Schleimhaut waren es $7 \pm 3,2 \mu\text{m}$. Auch der Mittelwert für die tiefste erkennbare Penetration lag mit $45 \pm 17,9 \mu\text{m}$ bei auskleidender Mucosa höher im Vergleich zu $24 \pm 18,2 \mu\text{m}$ bei mastikatorischer Schleimhaut [69].

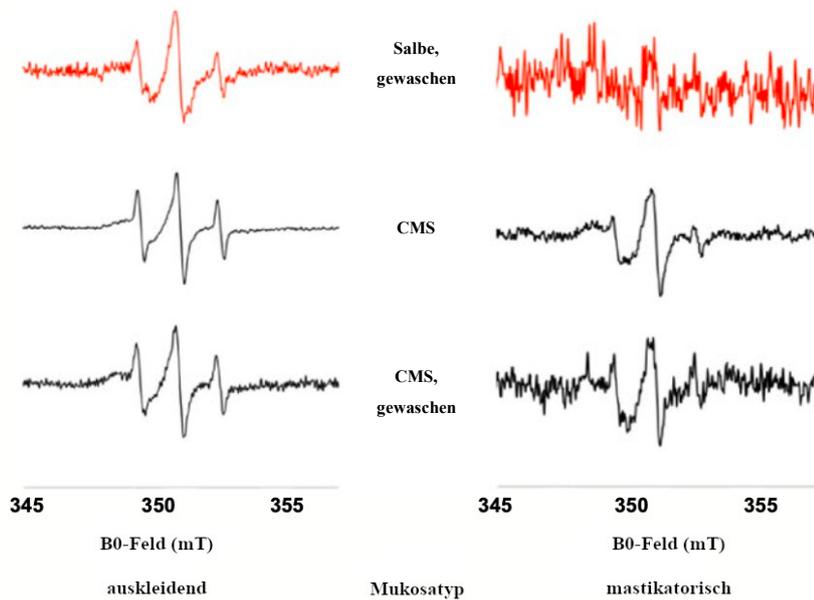
6.3.3 ESR-spektroskopische Untersuchungen zur Freisetzung des Modellwirkstoffs Dexamethason aus CMS-E-Nanocarriern

Mittels ESR-Spektroskopie wurde untersucht, ob der CMS-Nanocarrier einen hydrophoben Modellwirkstoff wie das Glukokortikoid Dexamethason im Gewebe freisetzt und möglicherweise einer konventionellen, in der Zahnmedizin gängigen Glukokortikoid-Formulierung überlegen ist. Analog zu den vorangegangenen Studien mit ICC-markierten Nanocarriern wurden dazu Franz-Zell-Versuche durchgeführt. Zur Identifizierung des Wirkstoffs wurde das Dexamethason (Dx) mit dem ESR-Label 3-carboxy-2,2,5,5-tetramethyl-1-pyrroldinyloxy (PCA) markiert (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von der Arbeitsgruppe von Professor Meinke, Institut für Dermatologie, Charité-Universitätsmedizin Berlin). Der CMS-Nanocarrier wurde von der AG Haag (Institut für Organische Chemie, FU Berlin) mit Dexamethason-PCA (DxPCA) beladen [70]. Dexamethason wurde als Modell-Medikament gewählt, da bis dato Glukokortikoide häufig als Entzündungshemmer für Mundschleimhauterkrankungen zum Einsatz kommen. Dontisolon® D ist eine häufig angewendete Salbe, welche den Wirkstoff Prednisolon enthält. Als Vergleich wurde eine DxPCA-enthaltende Salbe hergestellt, die dem Dontisolon in der Formulierung ähnlich war. DxPCA war in der Salbe und im CMS-Nanocarrier-Lösung in annähernd gleicher Konzentration enthalten und lag bei der CMS-Nanocarrier-Lösung bei $62 \pm 1 \mu\text{M}$ und bei der Vergleichsemulsion bei $62 \pm 3 \mu\text{M}$.

A



B



C

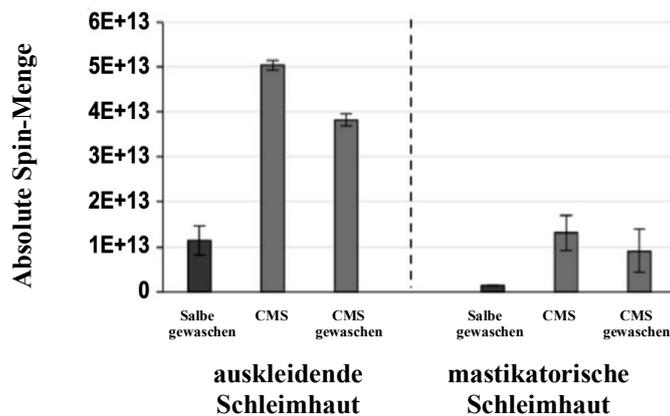


Abbildung 26: Ergebnisse der ESR- Untersuchungen. (A) X-Band-ESR-Spektren von DxPCA; (B) ESR-Spektren des DxPCAs in den Gewebeproben, (C) Absolute Spin-Menge von DxPCA in beiden Schleimhauttypen. n=3

Abbildung 26 A zeigt die X-Band ESR-Spektren von DxPCA in der Vergleichsemulsion (rot) und in der CMS-Lösung (schwarz). DxPCA wird in beide Formulierungen aufgenommen. Dies wird durch die X-Band-ESR-Spektren verdeutlicht (Abb. 26 A). In vorangegangenen Untersuchungen zeigte DxPCA in wässriger Lösung ein charakteristisches Spektrum mit drei schmalen Peaks [66]. Die abgebildeten Spektren zeigten sowohl in Salbe als auch in CMS eine Verbreiterung (Abb. 26 A), was auf eine Abnahme der Mobilität hinwies und damit eine Aufnahme des DxPCAs in beiden Formulierungen bedeutete.

Die Hyperfeinkopplungskonstante betrug a_{iso} 45,5 MHz (CMS-Lösung) bzw. 38,1 Mhz (Salbe). Dies deutet darauf, dass die Umgebung in der Salbe lipophiler war als im CMS-Carrier.

Die ESR-Spektren des DxPCAs in den Gewebeproben zeigen eine Veränderung der Mikroumgebung des DxPCAs auf (Abb. 26 B). Jedes Spektrum wurde aus drei Einzelmessungen gemittelt. Vor der Messung wurden die mit DxPCA-Salbe behandelten Gewebeproben in PBS gewaschen. Die mit CMS-DxPCA-Lösung behandelten Proben wurden sowohl vor als auch nach der PBS-Waschung einer Messung unterzogen. Die Analyse zeigte, dass sich die a_{iso} -Werte und die ESR-Spektren veränderten (Abb. 26 B).

Die a_{iso} Werte änderten sich von 45,5 Mhz für DxPCA in der CMS-Lösung zu 42,4 – 43,2 Mhz im Gewebe (a_{iso} 42, 8 – 43,2 Mhz CMS-Lösung; a_{iso} 42,4 Mhz CMS-Lösung gewaschen). Dies deutete auf eine hydrophilere Umgebung des DxPCAs nach 6-stündiger Penetration hin. Bei der Salbe änderte sich der Wert von 38,1 Mhz zu 43,0 Mhz. Das DxPCA befand sich in der Salbe in einer lipophilen Umgebung. Nach der Penetration zeigte sich eine Änderung zu einer hydrophileren Umgebung. Durch die veränderten a_{iso} -Werte konnte auf eine Freisetzung des DxPCAs in die Gewebeprobe geschlossen werden. Bei Anwendung der Salbe an mastikatorischer Schleimhaut war in der Ableitung nur noch eine schwach sichtbare Verbreiterung des mittleren Peaks erkennbar. Das DxPCA wurde durch einen PBS-Waschschritt entfernt und war kaum noch im Gewebe verfügbar. Dies entsprach auch den Ergebnissen zur absoluten Zahl an PCA-Spins in Abbildung 26 C. Diese war bei der Anwendung der Salbe bei mastikatorischer Schleimhaut sehr gering [69].

6.4 Aufbau eines humanen dreidimensionalen (3D) „full-thickness“ oralen Schleimhautmodells

Aufbau des Modells

Humane dreidimensionale „full-thickness“ Haut- oder Schleimhautmodelle sollen den Aufbau des Gewebes möglichst differenziert nachbilden, sodass sie als Äquivalent von humanem Spendergewebe in verschiedensten Untersuchungen zum Einsatz kommen können. Die Schwierigkeit im Aufbau solcher Modelle liegt in der Anzahl der beteiligten Zelltypen und der daraus resultierenden komplexen dreidimensionalen Struktur. Im Gegensatz zu Hautmodellen, die aus bindegewebiger und epithelialer Komponente bestehen, gibt es nur wenige Versuchsprotokolle für den Aufbau derartiger oraler Schleimhautmodelle. Diese unterscheiden sich deutlich in Ablauf, Trägermaterial und Medienzusammensetzung. Es gibt wenig Hinweise auf die Kultivierungsdauer der einzelnen

Komponenten. Am praktikabelsten und reproduzierbarsten erwies sich der Aufbau eines dreidimensionalen Mukosa-Äquivalents anhand des im Institut schon etablierten Modells für dermale Zellen. Hierbei wurden als Trägermaterial Alvetex®-Filter aus Polystyrol verwendet. Diese sollen durch ihre poröse Struktur die Möglichkeit bieten ein Netzwerk aus Fibroblasten und Extrazellulärmatrix einzulagern. Auf Grundlage des in der Arbeitsgruppe etablierten Protokolls für dermale Zellen, wurde eine Zellzahl von 1×10^6 Fibroblasten pro Filter gewählt. Nach sieben Tagen wurden 5×10^5 Keratinozyten pro Filter hinzugefügt. Drei Tage später erfolgte der Airlift und der Wechsel auf Medium mit hohem Calciumgehalt zur Einleitung der Differenzierung (Abb. 27)

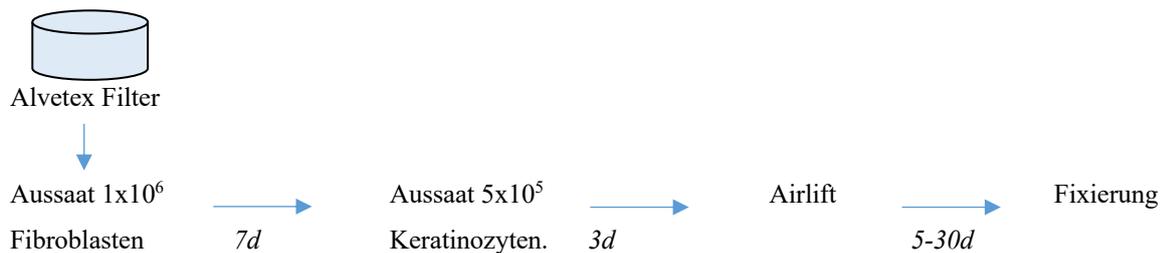


Abbildung 27: Versuchsablauf 3D-Modell

Es wurden verschiedene Versuchsdurchläufe durchgeführt, bei denen die Filter nach dem Airlift zum Teil bis zu 30 Tage in Kultur gehalten worden sind. Die kürzeste Kultivierungsdauer nach dem Airlift betrug 5 Tage. Ziel der Untersuchungen war, einen dreidimensionalen Aufbau zu erzeugen, bei dem der dermale Anteil in den Filter eingelagert ist und die Keratinozyten eine auf den Filter aufgelagerte, mehrschichtige Struktur bilden.

Für den Aufbau der *Lamina propria* wurden IhgF-Zellen verwendet. Zunächst wurden für den epidermalen Anteil aus Spendergewebe primäre Keratinozyten isoliert und direkt im 3D-Ansatz eingesetzt. Durch die eingeschränkte Teilungsfähigkeit der primären Keratinozyten kam es jedoch zu keinem zufriedenstellenden Aufbau einer epidermalen Struktur. Aus diesem Grund wurden in weiteren Versuchsdurchläufen immortalisierte, gingivale Keratinozyten (IGK) verwendet.

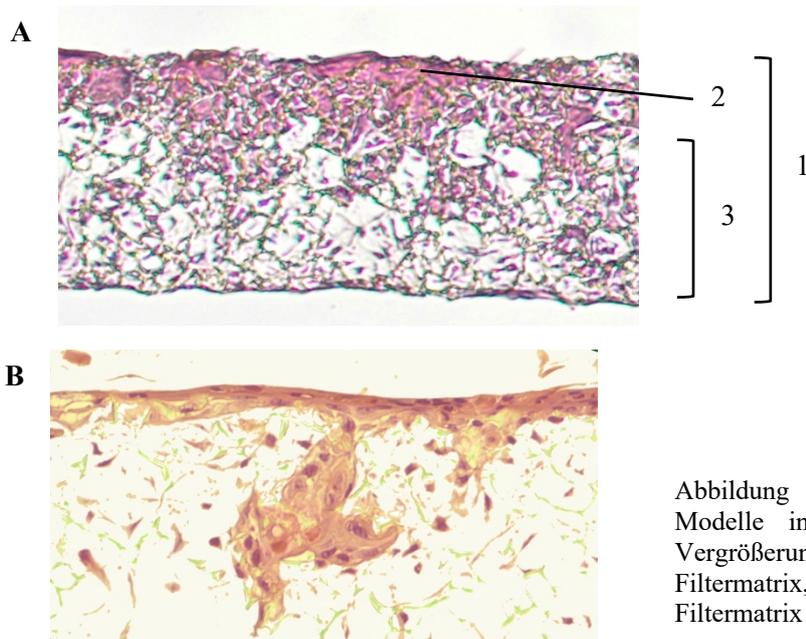


Abbildung 28: H.E. Färbung verschiedener 3D-Modelle in 10-facher (A) und 20-facher (B) Vergrößerung am Leitz-Lichtmikroskop. 1 poröse Filtermatrix, 2 Zellverbände von Keratinozyten, 3 Filtermatrix mit eingelagerten Fibroblasten

Abbildung 28 zeigt lichtmikroskopische Aufnahmen von verschiedenen 3D-Modellen. Es zeigt sich deutlich die poröse Filtermatrix und nesterartige Zellanhäufungen.

Charakterisierung des Modells

Zur weiteren Charakterisierung der Modelle wurden Immunfluoreszenzfärbungen von Dünnschnitten angefertigt. Die epitheliale Komponente wurde mit Hilfe von gegen Keratin gerichteten Antikörpern und geeigneten Fluoreszenz-markierten sekundären Antikörpern sichtbar gemacht.

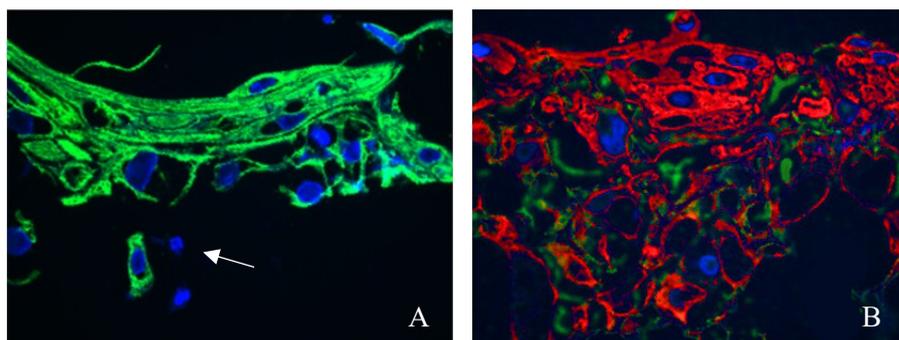


Abbildung 29: 3D-Modell mit Keratinozyten-Nestern. A zeigt eine Immunfluoreszenzfärbung mit anti-panCK (grün) und Kernfärbung mit Hoechst 33342 (blau) an Tag 7 nach dem Airlift. B zeigt eine Immunfluoreszenzfärbung mit anti-panCK (rot) und analoger Kernfärbung an Tag 9 nach dem Airlift. Grünlich zeigt sich die Eigenfluoreszenz des Filtermaterials (rechts). Der ungefärbte, untere Bereich zeigt den bindegewebigen Anteil der Modelle. Hier finden sich nur vereinzelt Zellkerne der Fibroblasten (Pfeil).

Abbildung 28 und 29 zeigen unterschiedliche 3D-Modelle. In allen Abbildungen sind in die Filtermatrix einwachsende Zellnester erkennbar. Durch die indirekte Immunfluoreszenz-Analyse konnte verifiziert werden, dass es sich um Keratin-produzierende Zellen handelt (Abb. 29 A und B). Sowohl nach sieben Tagen (Abb. 29 A), als auch nach neun Tagen (Abb. 29 B) zeigt sich eine Mehrschichtigkeit der Keratinozyten mit sichtbaren Zeichen von Differenzierung. In Abbildung 29 A ist eine beginnende Schichtung der Keratinozyten mit runden, basalen und flachen, aufliegenden Zellen erkennbar. In einem weiteren Experiment unter gleichen Versuchsbedingungen sind an Tag 9 etwas mehr Zellschichten mit nach oben abflachenden Keratinozyten sichtbar. Auch zeigt sich eine Abflachung der Zellkerne, wie sie typischerweise bei differenzierten Keratinozyten auftritt.

Obwohl versucht wurde die Versuchsbedingungen hinsichtlich Material und Ablauf konstant zu halten, war die Struktur der 3D-Modelle variierend. Lediglich die Zeit der Kultivierung nach Airlift war variabel. Nachdem bei relativen kurzer Kultivierungsdauer nach Airlift (7-10 Tage) keine durchgängige, dem Filter aufliegende epidermale Schicht entstanden war, wurden auch Versuchsdurchläufe mit langer Kultivierungsdauer (>14 Tage) durchgeführt. Dies zeigte jedoch keine strukturelle Verbesserung. Insgesamt war die Fibroblastenverteilung im Filtergerüst nicht stark ausgeprägt. Oft zeigte sich eine mehrschichtige Lage von Fibroblasten an der basalen Seite des Filters. Innerhalb der Filter konnten häufig Keratinozyten-Nester beobachtet werden, welche eine mehr oder weniger stark ausgeprägte Abflachung der oberen Zellschichten aufwiesen. Die Keratinozyten schienen in den Filter eingesackt zu sein. Dies liegt vermutlich daran, dass die Fibroblasten im Filter kein stabiles Kollagen-Netzwerk aufbauen konnten.

Die im Zuge dieser Arbeiten durchgeführten Versuche zum Aufbau eines *in vitro* 3D-Schleimhautmodells zeigen, dass die Reproduzierbarkeit unter den beschriebenen Versuchsbedingungen noch nicht gegeben ist. Der Aufbau des Modells zeigt zwar erste Ansätze einer Schichtung, jedoch bestand diese nur aus wenigen Zelllagen und konnte nicht die ganze Oberfläche eines Filters erfassen. Um ein Einsacken der Keratinozyten in den Filter zu verhindern, sollten zukünftig eine verbesserte Kollagenmatrix angestrebt werden. Hier könnten eine andere Fibroblastenzahl oder Kultivierungsdauer untersucht werden oder ein anderes Filtersystem verwendet werden.

7 Diskussion

Das Feld der Nanomedizin beschäftigt sich mit der Synthese und dem Einsatz von Nanotechnologien in der Diagnostik und Therapie von Erkrankungen. Neuartige Nanocarriersysteme sollen biologischen Barrieren überwinden und als Wirkstofffreigabesysteme fungieren. Medikamente, welchen aufgrund ihrer Größe oder ihrer chemischen Eigenschaften keine Passage möglich ist, können mit Hilfe solcher Systeme transportiert und im Zielgewebe bereitgestellt werden.

In dieser Arbeit wurden erstmals die CMS-Nanocarrier 10-A-18-350 und E-15-350 und das PNIPMAM-(S-S)-dPG-Nanogel auf ihre Penetrationsfähigkeit an oraler Schleimhaut untersucht. Die Auswahl dieser

Carriersysteme beruhte auf vorangegangenen, dermatologischen Studien. Für die Anwendung derartiger Systeme ist es wichtig, dass die Nanocarrier selbst keine negativen Effekte auf die Zellen haben. Sie sollten weder zytotoxisch wirken noch eine überschießende Zell-Proliferation zur Folge haben. Zur Charakterisierung potentieller Effekte der Carriersysteme auf gingivale Keratinozyten wurden etablierte Zytotoxizitäts- und Proliferationsassays durchgeführt. Mittels Franz-Zell-Untersuchung und Laserkonfokalmikroskopie wurde die Penetration der verschiedenen Systeme in auskleidende und mastikatorische Schleimhaut vom Schwein untersucht. Um die Effektivität der Bereitstellung eines transportierten hydrophoben Wirkstoffes zu analysieren, wurde der CMS-E-Carrier mit einem markierten Glukokortikoid beladen, das nach Penetration mittels Elektronenspinresonanz-Spektroskopie im Gewebe nachgewiesen werden konnte.

7.1 Diskussion der Methodik

7.1.1 Isolierung von primären humanen oralen Keratinozyten und Fibroblasten

Die Isolierung und Kultivierung einer Primärkultur erfordert Aufspaltung des Spendergewebes in einzelne Zellen und die Trennung von beteiligten, unterschiedlichen Zelltypen. Eine erste Aufspaltung der Gewebeanteile wurde durch die Lagerung in einer Dispase-Lösung erreicht. Danach erfolgte die mechanische Trennung von Epidermis und bindegewebiger *Lamina propria*. Die Epidermis wurde danach weiter mittels Trypsin enzymatisch aufgetrennt, wohingegen die *Lamina propria* in toto in Kultur gegeben wurde. Die Aufspaltung des Gewebsverbandes zeigte sich als wirkungsvoll. Durch die auf 15 Minuten begrenzte Lagerung der Epidermis in Trypsin, konnte ein übermäßiges Absterben der Keratinozyten verhindert werden, was sich nach der Aussaat in geringer bis mäßiger Anzahl von nicht-adhären Zellen im Überstand zeigte.

7.1.2 Zytotoxizitäts- und Proliferationsassays

Seit seiner Entwicklung im Jahr 1983 zählt der MTT-Assay zu den verbreitetsten Instrumenten zur Untersuchung von Zytotoxizität und Proliferation in Zellkulturen. Er beruht auf der Reduktion eines farblosen Tetrazoliumsalzes zu stark gefärbten Derivaten und gilt als der Goldstandard innerhalb präklinischen Untersuchungsmethoden [64]. Eine oft angeführte Kritik beinhaltet, dass über die Menge des umgesetzten Farbstoffes nur bedingt Rückschlüsse auf die Zellzahl gezogen werden kann. Aus diesem Grund wurde der Assay im Zuge dieser Arbeit zur Messung der metabolischen Aktivität genutzt und in Kombination mit dem SRB-Assay ausgewertet. Der SRB-Assay beruht auf der Bindung des Farbstoffs Sulforhodamin B an Proteine und lässt so direkte Rückschlüsse auf die Zellmasse zu. Durch seine Unabhängigkeit von metabolischen Effekten, ist er als Screening-Assay für Zellproliferation weit verbreitet [65].

In der Vergangenheit wurde gezeigt, dass verschiedene exogene und endogene Faktoren Einfluss auf die Reduktion des Tetrazoliumsalzes haben [71]. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Nanocarriersysteme selbst zu einem gewissen Maße zur Reduktion beitragen. Die gleichzeitige Untersuchung der Proteinmasse, welche nur im Falle von Proliferationshemmung oder Zelltod beeinflusst wäre, lässt insgesamt jedoch eine zuverlässigere und detailliertere Aussage über die Effekte der Nanocarriersysteme auf die untersuchten Zellen zu.

Ein Effekt, der bei Zytotoxizitäts- und Proliferationsassays häufig beobachtet wird, ist der Einfluss von Wachstumsphase und -bedingungen der Zellen [64]. Im MTT-Assay kann sich deswegen die Reduktion des Farbstoffes auch innerhalb einer Zellpopulation unterscheiden. Dies könnte auch einen Einfluss auf die Versuchsergebnisse gehabt haben. Zwar wurde versucht die Versuchsbedingungen möglichst konstant zu halten und die Zellen bei einer Konfluenz von 60-70% für die Versuche abzulösen, jedoch können minimale Abweichungen hierbei nicht ausgeschlossen werden. Somit kann es durchaus sein, dass sich die Phase des Zellzyklus der Mehrheit der Zellen innerhalb der unterschiedlichen Versuchsdurchläufe unterscheiden. Alle in dieser Arbeit präsentierten Assays beinhalten drei unabhängige Versuchsdurchläufe. Die großen Standardabweichungen (auch der Kontrollgruppe) zeigen, dass die Werte zwischen den einzelnen Durchläufen mitunter stark variierten. Die vergleichsweise geringe Schwankung innerhalb der einzelnen Versuchsdurchläufe (s. Abbildung 16, S. 53), bestätigt jedoch die Annahme, dass oben beschriebene Effekte einen Einfluss gehabt haben könnten. Außerdem fiel auf, dass bei Versuchen mit OKG4-Zellen eine größere Schwankung auftrat. Insgesamt zeigte sich diese Zelllinie als sensitiver gegenüber äußeren Einflüssen.

7.1.3 Cellular-Uptake-Versuch

Bei den durchgeführten Versuchen dieser Arbeit wurden Keratinozyten auf einen Objektträger ausgesät. Diese bildeten eine Zellschicht. Mittels Konfokalmikroskopie konnten alle Ebenen von der Zelloberfläche bis zur Adhäsionsfläche auf dem Objektträger untersucht werden. So konnte ermittelt werden, dass der CMS-Nanocarrier intrazellulär vorlag. Um die genaue Lokalisation zu bestimmen sollte zukünftig mit weiteren Immunfluoreszenzmarkierungen intrazellulärer Zellorganellen gearbeitet werden. Gerecke et al zeigten beispielsweise die räumliche Übereinstimmung von thermosensitiven Nanogelen und lysosomalen Anteilen des Intrazellularraums [72].

7.1.4 Franz-Zell-Penetrationsstudien

Franz-Zell-Untersuchungen sind in der Dermatologie und bei der Entwicklung von neuen Wirkstoffen eine dominierende Methode zur Analyse des Penetrationsverhaltens. Bei einer Validierung und korrekten Anwendung der Franz-Zell-Systeme ist eine hohe Reproduzierbarkeit der Ergebnisse gegeben [73]. Im Gegensatz zu Zellkulturmethoden sind bei der *ex vivo*-Untersuchung von Gewebe alle strukturellen Komponenten der Epidermis enthalten (somit auch Zellen des Immunsystems). Insgesamt haben alle

Penetrationsstudien dieser Art den entscheidenden Nachteil, dass Gewebe außerhalb des lebenden Organismus untersucht wird. In den durchgeführten Untersuchungen wurde das Gewebe direkt nach der Tötung des Tieres in PBS gelagert und die Exzision der Schleimhaut direkt nach dem Transport durchgeführt. Aus logistischen Gründen konnten die Franz-Zell-Versuche nicht direkt im Anschluss erfolgen, sodass eine Lagerung des Gewebes bei -80° für kurze Zeit nötig wurde. Durch die Entfernung des Gewebes aus dem lebenden Organismus und die manuelle Manipulation sowie die Lagerung, stellt sich die Frage der Lebensfähigkeit und der Integrität der Gewebe [74].

Es wurde nachgewiesen, dass sich diverse Lagerungskonditionen negativ auf die morphologische Unversehrtheit auswirken. Kulkarni et al verglichen die Permeabilität von frischer porciner Mukosa mit porciner Mukosa nach Lagerung bei -20°C . Die Permeabilität war nach der Gefrierlagerung erhöht [75]. Indessen ist eine Lagerung bei -80°C eine gängige Methode für die Aufbewahrung biologischer Proben, wie z.B. Zellen. Diese werden jedoch mit speziellen Zusätzen eingefroren, um ein Absterben der Zellen zu verhindern. Bei einem Versuchsaufbau mit deutlich verkürzter Einwirkzeit, ließe sich das Einfrieren der Gewebe vermeiden. Die Beeinträchtigung durch den Transport und die Exzision kann jedoch auch dann nicht umgangen werden. Kulkarni et al zeigten, dass eine Lagerung in PBS bei 4°C für unter 4h keinen Einfluss auf die Permeabilität von porciner Mukosa hatte, weswegen in zukünftigen Studien diese Lagerungskonditionen angestrebt werden sollten [75].

Eine Durchführung der Versuche im *in vivo*-Tierversuch stellt sich schwierig dar, da das Versuchstier für die Dauer des Versuchs narkotisiert werden müsste. Für eine Auswertung müsste im Anschluss trotzdem Gewebe exzidiert werden, wodurch sich ebenso Transport- und Manipulationseffekte ergeben. Dieser Versuchsaufbau wäre deutlich kosten- und zeitaufwändiger. Dreidimensionale *in vitro* Schleimhautmodelle können hier eine Option zur weiteren Forschung bei gleichzeitiger Reduktion von Tierversuchen darstellen.

7.1.5 Laserkonfokalmikroskopie

Die Laserkonfokalmikroskopie ist eine bewährte biomedizinischen Untersuchungsmethode. Sie findet insbesondere dann Anwendung, wenn spezifische Bereiche eines Objekts dargestellt werden sollen. Im Gegensatz zur herkömmlichen Fluoreszenzmikroskopie, bei der alle fluoreszenzmarkierten Anteile sichtbar werden, wird bei der Laserkonfokalmikroskopie das Bild einer definierten Schicht des Objektes erzeugt. Alle Informationen außerhalb der gewählten Ebene werden ausgeblendet. Somit kommt es nicht zu Überlagerungseffekten. Um ein dreidimensionales Bild des untersuchten Objektes zu erhalten, können mehrere aufeinanderfolgende optische Schnitte angefertigt werden.

So können fluoreszenzmarkierte Moleküle innerhalb eines Objektes lokalisiert werden [76]. Die Laserkonfokalmikroskopie erlaubt so die Untersuchung der Verteilung und Penetration von markierten Nanocarriern in Gewebsschnitten.

7.1.6 Elektronenspinresonanzspektroskopie (ESR)

Die Elektronenspinresonanzspektroskopie ermöglicht den Nachweis und die Quantifizierung von ungepaarten Elektronen in verschiedenen Versuchsanordnungen. Sie gilt als sensitive Methode, um die Mikroumgebung des ungepaarten Elektrons zu untersuchen [77]. In den Versuchen dieser Arbeit wurde das Glukokortikoid Dexamethason mit dem Spin-Label PCA versehen und die Penetration des Wirkstoffs in Schweineschleimhaut mittels ESR nachgewiesen. PCA zeichnet sich durch seine gute Stabilität aus und ist durch seine paramagnetischen Eigenschaften naturgemäß durch ESR nachweisbar [78]. Trotzdem kann PCA für den ESR-Nachweis inaktiviert werden. Ein natürlicher Mechanismus des Körpers zur Inaktivierung freier Radikale ist die Produktion von antioxidativen Substanzen [79]. Vorangegangene Studien haben gezeigt, dass eine solche Inaktivierung von PCA durch Gewebsmediatoren in Haut von Schweinen nicht schnell genug abläuft, um eine Charakterisierung der Mikroumgebung von PCA zu verhindern [66]. Diese Tatsache und die starke Signalintensität von PCA machen den ESR-Nachweis von PCA-gelabelten Wirkstoffen in Schweinegewebe zu einer sensitiven Untersuchungsmethode. Die Messungen und die Analyse am Elektronenspin-Resonator wurden durch die Abteilung für Dermatologie, Venerologie und Allergologie der Charité Universitätsmedizin Berlin (CCM) durchgeführt.

7.1.7 Aufbau eines dreidimensionalen (3D) Schleimhaut-Modells

Der *in vitro*-Aufbau eines dreidimensionalen Gewebsmodells ist ein komplexes Zusammenspiel vieler Faktoren. In der Literatur gibt es wenige Protokolle, welche sich speziell mit der Rekonstruktion eines oralen Schleimhautmodells befassen [58][59]. Im Gegensatz dazu sind diverse Methoden zur Herstellung von Hautmodellen beschrieben. Es kann mit verschiedenen Trägermaterialien, Medien, Medienzusätzen und Zelllinien gearbeitet werden. Grundsätzlich basieren die Methoden zur Herstellung von dreidimensionalen Haut- oder Schleimhautmodellen darauf, dass Keratinozyten auf eine Trägermatrix gegeben werden, welche als bindegewebiger Anteil fungieren soll. Hier können natürliche oder synthetische Trägermaterialien verwendet werden. Zu den natürlichen Trägermaterialien zählen deepithelialisierte humane oder tierische Dermis, natürliche Polymere (z.B. Kollagen), aber auch synthetische Polymere [80]. Da im Institut bereits ein Protokoll für primären Hautzellen etabliert war, sollte versucht werden, dieses Protokoll auf Schleimhautzellen mit den entsprechenden Medien zu übertragen. Es wurde mit den immortalisierten humanen gingivalen Fibroblasten (IhgF) und immortalisierten humanen Keratinozyten (IGK) gearbeitet. Als Trägermaterial wurden Alvetex[®]-Filter aus Polystyrol verwendet. Diese waren bei Studien mit Hautzellen erfolgreich angewandt worden [61]. Aus Spendergewebe wurden auch primäre Keratinozyten isoliert und für ein 3D-Modell mit IhgF-Zellen verwendet. Dieser Ansatz führte jedoch durch die eingeschränkte Teilungsfähigkeit nicht zum Aufbau eines mehrschichtigen Epithels.

7.2 Diskussion der Ergebnisse

7.2.1 Isolierung von primären humanen oralen Keratinozyten und Fibroblasten

Im Rahmen der durchgeführten Experimente gelang eine erfolgreiche Isolierung und Kultivierung sowohl von oralen Keratinozyten als auch von oralen Fibroblasten. Beide Zellkulturen wiesen die typischen morphologischen Charakteristika auf; es zeigte sich keine mikroskopisch sichtbare Mischung der Kulturen. Durch die geringe Größe der Gewebeproben konnte nur eine vergleichsweise geringe Anzahl an Keratinozyten gewonnen werden. Im Schnitt konnten ca. 2×10^5 /ml ausgesät werden. Bei Hautproben lag die Zahl gewonnener Zellen in der Arbeitsgruppe mit $5-7 \times 10^6$ /ml Zellen deutlich höher. Durch die bereits beschriebene eintretende Seneszenz der Keratinozyten, konnte keine Passagierung erfolgen. Die für die Experimente verwendeten Gewebeproben fielen bei Routineeingriffen an und waren nur sehr klein. Im Bereich der oralen Chirurgie gibt es generell nur sehr wenige Eingriffe, die große, wenig entzündlich veränderte Gingivaresektionen beinhalten (z.B. chirurgische Kronenverlängerung bei der Korrektur des „gummy smile“). Diese Eingriffe sind selten. Für größere Versuchsreihen und Versuchsansätze, die per se große Zellzahlen erfordern, scheinen primäre orale humane Keratinozyten somit wenig geeignet oder es ist eine sehr genaue Planung und Kooperation zwischen Chirurg*in und Labor nötig.

Eine geeignetere Herangehensweise ist die Gewinnung von gingivalen Stammzellen mit hohem Proliferationspotential über die eine größere Zellzahl generiert werden könnte. Eine einfach umsetzbare Identifikation von hoch proliferativen, oralen Keratinozyten könnte über die Affinität dieser Zellen zum Kollagen IV erreicht werden. In einer Untersuchung von Stein et al konnte über die schnelle Adhärenz in Kollagen-IV-beschichteten Zellkulturflaschen diese Zellpopulation von bereits in die Differenzierung übergegangenen Zellen separiert werden [81]. Zudem wiesen die separierten Zellen in dieser Studie eine hohe Expression des Integrins $\beta 1$ auf. Eine weitere, jedoch etwas aufwändigere Möglichkeit zur Isolierung von oralen, epidermalen Stammzellen ist das sogenannte „fluorescence-activated-cell-sorting“ (FACS), bei dem Antikörper gegen Stammzellmarker zur Isolierung dieser Zellpopulationen eingesetzt werden.

7.2.2 Einfluss der verschiedenen Nanocarrier-Typen auf den Zellmetabolismus und die Zellproliferation von oralen Keratinozyten

Die Ergebnisse der in Zuge dieser Arbeit durchgeführten Versuche deuten darauf hin, dass beide CMS-Nanocarrier-Typen nicht zelltoxisch auf orale gingivale Keratinozyten wirken. Für den CMS-E-Nanocarrier zeigte sich ein gesteigerter Zellmetabolismus bei gleichbleibender Zellmasse. Für das PNIPMAM-(S-S)-dPG-Nanogel ergab sich eine Beeinträchtigung des Zellmetabolismus bei ebenfalls gleichbleibender Zellmasse. Die Analyse der Zellmasse zeigte bei keinem untersuchten Nanocarrier-System zytotoxische Effekte. Diese Ergebnisse können als erster Anhaltspunkt betrachtet werden, dass sich die untersuchten Carriersysteme für den Einsatz in der Mundhöhle eignen, wobei der CMS-A-Nanocarrier die besten Resultate lieferte. Diese Ergebnisse gleichen sich mit denen an Keratinozyten der äußeren Haut.

Hönzke et al untersuchten den Einfluss verschiedener CMS-Nanocarrier auf den Zellmetabolismus. CMS 10-A-18-350 zeigte keine Beeinflussung nach 24h und 48h. Unter den untersuchten CMS-Ester-Carriern bewirkte CMS-E-15-350 die geringste Veränderung. Er führte zu keinem Abfall nach 24h und einem geringfügigem Abfall nach 48h. [45] Eine Toxizität konnte innerhalb der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen für keines der Nanocarriersysteme festgestellt werden. Wie zuvor bereits erwähnt, bedeutet dies jedoch lediglich, dass die Nanocarrier am untersuchten, immortalisierten Zelltyp keine Zytotoxizität zeigte. Die Experimente sollten in einem nächsten Schritt an primären gingivalen Zellen wiederholt werden. Insgesamt ist hierbei zu bedenken, dass es sich um Versuche an Monolayer-Kulturen handelt. Zu einer Degradation mit toxischen Abbauprodukten könnte es bei vorhandenen anderen Zellkomponenten der Epidermis trotzdem kommen. Hierzu wäre es sinnvoll, den weiteren Fokus auf die reproduzierbare Herstellung eines dreidimensionalen Schleimhautmodells zu richten. Hierbei sollte versucht werden möglichst viele Komponenten des humanen, oralen Epithels zu integrieren; insbesondere Zellen der Immunabwehr. Weiterhin sollten die Einflüsse des CMS-E-Nanocarriers und des Nanogels auf den Zellmetabolismus gingivaler Zellen verifiziert und bewertet werden. Eine geeignete weiterführende Methode wäre der 6-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H2DCFDA)-Assay zur Detektion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) innerhalb der Zellen. ROS sind Signalmoleküle, die bei einer erhöhten Freisetzung zu oxidativem Stress der Zelle führen. Darüber hinaus könnte mittels Comet-Assay mögliche DNA-Schäden der Zellen festgestellt werden. Beide Assays wurden sowohl für CMS-Nanocarrier als auch für dPG-pNIPAM-Nanogele mit dermalen Zellen durchgeführt. Diese Nanogele entsprechen strukturell dem dieser Arbeit untersuchten PNIPMAM-(S-S)-dPG-Nanogel und unterscheiden sich nur in einer Methylgruppe. In beiden Untersuchungen zeigte sich eine gute Biokompatibilität der Systeme [82][45].

Insgesamt ist die Entwicklung von Nanocarriersystemen zum Transport und zur Freisetzung von Wirkstoffen ein vielversprechender Ansatz, um diverse Limitationen gängiger Medikamente zu umgehen und Erkrankungen wesentlich gezielter zu therapieren. Die Ergebnisse der durchgeführten Assays geben jedoch nur einen sehr kleinen Einblick auf mögliche Reaktionen des Organismus. Da bis dato wenig über den Abbau von Nanocarriersystemen bekannt ist, liegt eine Akkumulation des Carriers in der Zelle oder in anderen Bereichen des Körpers weiterhin im Bereich des Möglichen. Hier könnten langfristig entweder innerhalb der Zelle oder in an Abbauprozessen beteiligten Organen wie Leber und Niere toxische Wirkungen aufgrund von entstehenden Abbauprodukten zum Tragen kommen. Bisher wurden nur eine begrenzte Anzahl an Nanocarrier-Systemen für den pharmazeutischen Gebrauch zugelassen, da sie häufig instabil sind und den Sicherheitsbeschränkungen für den *in vivo* Einsatz nicht entsprechen [44]. Die durchgeführten Versuche sind als erstes positives Signal bei der Untersuchung der genannten Carriersysteme zum Gebrauch in der Mundhöhle zu verstehen. MTT- und SRB-Assays sind weltweit anerkannte Methoden in der präklinischen Testung neuer Substanzen und Medikamente. Es bedarf zukünftig jedoch noch eine sehr sorgfältige weitere Überprüfung der Biokompatibilität der Systeme.

7.2.3 Intrazelluläre Aufnahme des CMS-Nanocarriers in orale Keratinozyten

Die durchgeführten Untersuchungen dieser Arbeit zeigten eine Anreicherung des fluoreszenz-markierten CMS-E-Nanocarriers in perinukleären Arealen immortalisierter gingivaler Keratinozyten (OKG4/bmi1/TERT). Dieses Bild ergab sich sowohl bei niedrigem als auch bei hohem Calciumspiegel. Ein erhöhter extrazellulärer Calciumspiegel ist ein wichtiges Differenzierungssignal. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass der CMS-Nanocarrier sowohl in den Intrazellularraum basaler (undifferenzierter) als auch suprabasaler (zunehmend differenzierter) gingivaler Keratinozyten aufgenommen werden kann. Verschiedene ähnliche Versuche sind bereits mit thermosensitiven Nanogelen und Zelllinien der äußeren Haut publiziert worden [83][72]. Charakteristisch war jeweils die Lokalisation der Nanopartikel um den Zellkern. Gerecke et. al zeigt, dass die Lage stark mit der Lokalisation von Lysosomen korrelierte [72]. Andere Studien zeigten, dass CMS-Nanocarrier dosisabhängig in antigen-präsentierende Zellen aufgenommen werden können [84]. Durch Inhibition verschiedener spezifischer Aufnahmemechanismen wurde in diesen Studien auf die Aufnahme via Endozytose geschlossen. Auch hier zeigte sich eine Koloalisation mit Lysosomen. Interessanterweise konnte über die Dokumentation des zeitlichen Verlaufs der intrazellulären Nanocarrier-Konzentration auf eine spätere Exozytose des intakten Nanocarriers geschlossen werden, nachdem eine Degradation mittels FLIM-Analyse ausgeschlossen wurde [84]. Ähnliche Untersuchungen könnten in der Zukunft auch mit oralen Keratinozyten durchgeführt werden. Ergibt sich auch hier eine zeitabhängige Exozytose des undegradierten Nanocarriers, stellt sich anschließend die Frage des weiteren Verbleibs im Organismus.

7.2.4 Penetrationsfähigkeit der Nanocarrier-Typen in orale Epithelien vom Schwein

Wie bereits eingangs erläutert, besteht eine zentrale Aufgabe von Oberflächenepithelien der Haut und des Gastrointestinaltraktes darin, den Körper vor schädlichen Umwelteinflüssen zu schützen. Aus diesem Grund ist ein Durchdringen der Haut- oder Schleimhaut nur sehr selektiv möglich. Es bestehen deutliche regionale Unterschiede. Um die reaktiven Zellen des Epithels zu erreichen, sollen bestimmte Nanocarriersysteme die Penetration von Medikamenten in die Epidermis ermöglichen. Hierbei sollen die Nanocarrier in die Schleimhaut eindringen oder an ihr anhaften und den Wirkstoff freisetzen. Mittels Franz-Zell-Penetrationsversuchen wurde in dieser Studie die Fähigkeit der unbeladenen Carriersysteme zur Überwindung der natürlichen Barriere des Schleimhautepithels untersucht. In einem zweiten Schritt wurde durch Elektronenspinresonanzspektroskopie analysiert, ob der CMS-E-Carrier einen odontologisch gängigen, antiinflammatorischen Wirkstoff in tiefere Schleimhautlagen freisetzen konnte.

Sowohl der CMS-A-Nanocarrier als auch das PNIPMAM-(S-S)-dPG-Nanogel konnten in den obersten Schichten der beiden Schleimhauttypen nachgewiesen werden. Nach der Penetration wurde stets ein 30-sekündiger Waschschritt durchgeführt. So konnten alle Partikel, die nur auf der Oberfläche aufgelagert waren, entfernt werden. Die Versuche wurden mit drei Spendern durchgeführt, da die Verfügbarkeit an Spenderschweinen begrenzt war und die Versuchsvorbereitung deswegen mit einem hohen Aufwand

verbunden war. Durch die geringe Anzahl an untersuchten Schweinen und die große Schwankung in den gemessenen Penetrationstiefen, können die ermittelten absoluten Werte jedoch nur als erster Anhaltspunkt gesehen werden. Innerhalb der CMS-A-Nanocarrier Untersuchung, konnte zudem ein Spender nicht ausgewertet werden, da die Fluoreszenz des ICC-Labels gleichmäßig in allen Schichten des Epithels verteilt war. Die Gründe hierfür waren unklar, jedoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass es sich entweder um einen technischen Fehler im Versuchsablauf oder aber eine Anomalie in der Epithelstruktur des Spenderschweins handelt. Zur Ermittlung der Penetrationstiefen wurde die Fluoreszenz des markierten Nanocarriers am Laserkonfokalmikroskop dargestellt, und die Eindringtiefe manuell gemessen. CMS-Nanocarrier und PNIPMAM-(S-S)-dPG-Nanogel zeigten hierbei entgegengesetzte Ergebnisse. Bei dem CMS-Nanocarrier lag die Penetration bei mastikatorischer Schleimhaut höher, das PNIPMAM-(S-S)-dPG-Nanogel drang tiefer in auskleidende Schleimhaut ein. In weiteren Versuchen sollte eine zusätzliche Kontrolle mit den jeweiligen Fluoreszenzmarkern (ICC und RhB) in gleicher Konzentration durchgeführt werden. Dies wurde mittlerweile in der Arbeitsgruppe umgesetzt und die Auswertung ergab keine Penetration der ungekoppelten Farbstoffe (persönliche Mitteilung: PD Dr. Kerstin Danker).

Insgesamt sollten für eine genauere Ermittlung der Penetrationsfähigkeit der Nanopartikel andere Messmethoden gewählt werden. Eine Methode, mit der das Penetrationsprofil möglicherweise genauer dargestellt werden kann, ist die Fluoreszenzlebensdauer-Mikroskopie (englisch fluorescence lifetime imaging microscopy, FLIM). Bei diesem bildgebenden Verfahren wird die Lebensdauer der Fluoreszenz eines angeregten Moleküls gemessen. Diese ist charakteristisch für jedes fluoreszierende Molekül, wird jedoch stark von der direkten Mikroumgebung des Moleküls beeinflusst. Aus diesem Grund können über die Fluoreszenzlebensdauer-Mikroskopie dreidimensionale Informationen aus den untersuchten Geweben generiert werden [85]. Eine quantitative Darstellung der Penetration von fluoreszenzmarkierten Molekülen wird somit ermöglicht. Es lassen sich wesentlich detailliertere Aussagen über die Penetrationstiefen treffen. In Zuge dieser Arbeit wurden auch diesbezüglich schon erste Untersuchungen angeregt.

Gelingt es einem wirkstoffbeladenem Nanocarrier in die Epidermis einzudringen, muss in einem zweiten Schritt gewährleistet sein, dass der Wirkstoff in das Gewebe freigesetzt wird. In den durchgeführten Untersuchungen konnte mittels Elektronenspinresonanz dargestellt werden, dass die Verfügbarkeit des Glukokortikoids Dexamethason (Dx) im Gewebe erhöht wurde, wenn dieser Wirkstoff über den CMS-E-Nanocarrier auf die Schleimhaut aufgetragen wurde. Dexamethason als solches ist nicht ESR-aktiv, kann jedoch mit dem ESR-Label PCA markiert und damit quantifizierbar gemacht werden. Als Vergleich wurde eine in der Zahnmedizin häufig angewendete Salbe hergestellt. Um die Darreichungsformen vergleichbar zu machen, wurde sichergestellt, dass die gleiche Konzentration des markierten Wirkstoffs DxPCA enthalten war. Hierfür wurden die Salbe und die CMS-Lösung vorab auf die enthaltene Anzahl an Spins untersucht. Zunächst wurde die Mobilität des PCA-gelabelten Wirkstoffs innerhalb des CMS-Nanocarriers und innerhalb der Salbe untersucht. Dies diente dem Nachweis der Aufnahme des DxPCAs in beide Darreichungsformen. Aus vorangegangenen Studien war bekannt in welcher Weise sich die

Mikroumgebung des DxPCAs ändert, wenn es sich in CMS-Nanocarriern befindet [66]. Nach der 6-stündigen Penetration in Franz-Zellen, wurde nun die Penetration des DxPCAs untersucht. Für beide Schleimhauttypen (verhornt/unverhornt) zeigte sich eine Steigerung des vorhandenen DxPCAs, wenn es mittels CMS-Lösung aufgebracht wurde. Ähnliche Untersuchungen wurden bereits an Haut von Schweineohren durchgeführt, welche ebenfalls eine gesteigerte DxPCA-Penetration bei Anwendung mittels CMS-Nanocarrier feststellten. In dieser Studie wurde in weiteren Messungen obere Hautschichten mittels „tape-stripping“ vor der ESR-Messung entfernt. So konnte hier auch eine Anreicherung des Wirkstoffs in tieferen Hautschichten nachgewiesen werden [66]. Ähnliche Ergebnisse lieferten Untersuchungen, bei denen CMS-Nanocarrier mit dem Fluoreszenzfarbstoff Nilrot als hydrophober Model-Wirkstoff beladen wurden. Die Freisetzung des Farbstoffs wurde hier anschließend mittels Laserkonfokalmikroskopie untersucht. Auch hier wurde eine verbesserte Anreicherung festgestellt, wenn der Farbstoff mittels CMS-Carrier aufgetragen wurde [86].

Sowohl die Analysen am Laserkonfokalmikroskop als auch die ESR-Untersuchungen wurden im Anschluss an die Franz-Zell-Penetration durchgeführt. Da es sich um die ersten Studien mit Mundschleimhaut handelte, wurden zunächst zur besseren Vergleichbarkeit die Versuchsbedingungen für Hautgewebe übernommen. So lag die Einwirkzeit bei 6h und die Temperatur bei 33,5°. Die Temperatur an der Körperoberfläche liegt ungefähr bei 32°C und steigt im Gewebe an. Die in vorangegangenen Studien untersuchten NIPAM-Nanogele zeichnen sich durch ihre kritische Lösungstemperatur von ca. 33°C aus. Sie erfahren hier eine Phasenumwandlung und setzen den Wirkstoff frei [87]. Somit sind sie für die Anwendung an äußerer Haut gut geeignet. Die Temperatur in der Mundhöhle liegt jedoch bei ca. 36°C. Das im Rahmen dieser Arbeit untersuchte PNIPMAM-(S-S)-dPG-Nanogel unterscheidet sich in seinen Eigenschaften von den bisher untersuchten NIPAM-Nanogelen. Seine kritische Lösungstemperatur liegt deutlich höher, bei ca. 48°C. Diese Temperaturen sind in keiner Körperregion physiologisch. Dennoch könnte eine Anwendung in Kombination mit einer Temperatursteigerung z.B. mittels photodynamischer Aktivierung untersucht werden.

Insgesamt stellt die Mundhöhle hohe Anforderungen an neu entwickelte Therapiekonzepte. Zum einen ist im Mund der schon mehrfach erwähnte Spüleffekt durch Speichel und Sulkusfluid vorhanden. Eine Einwirkzeit von 6h ist im Bereich der Mundhöhle unter natürlichen Bedingungen nicht umsetzbar. Selbst Einwirkzeiten von wenigen Minuten sind nur schwer erreichbar. Zukünftig sollte die Einwirkdauer der durchgeführten Penetrationsversuche auf 5 Minuten oder kürzer verringert werden. Sind die Wirkstofffreigabesysteme in der Lage auch schon nach kürzerer Zeit in die Schleimhautproben einzudringen, sollte man als nächsten Schritt versuchen, die Versuchsbedingungen noch weiter den *in vivo* Bedingungen anzupassen. In der Mundhöhle sind die Gewebsoberflächen ständig mit Mukus bedeckt, welcher neben der Epidermis eine zusätzliche Barriere darstellt und ein Schutzfilm für das darunterliegende Epithel bildet. Je nach Region besteht eine Variation in Dicke, pH-Wert, Turnover-Rate des Mukus und verschiedenen anderen Faktoren [88]. Für die in dieser Arbeit untersuchten Nanopartikel gilt es somit herauszufinden, ob sie in der Lage sind zusätzlich die Mukusschicht zu durchdringen. Die im PNIPMAM-

(S-S)-dPG-Nanogel enthaltenen Disulfid-Brücken sollen die Mukopenetration steigern. Um dies zu untersuchen könnte kommerziell erwerbbarer, künstlicher Speichel in die Penetrationsstudien integriert werden. Dieser müsste auf die in Franz-Zellen montierte Schleimhaut aufgetragen werden, bevor die Zugabe der zu untersuchenden Nanocarrier erfolgt. Auch hier könnte bei der Entwicklung der Nanogele versucht werden durch Modifizierung der Struktur mukoadhäsive Eigenschaften zu erreichen. Dies ist für andere Schleimhautoberflächen bereits beschrieben worden [87].

7.2.5 Aufbau eines dreidimensionalen (3D) Schleimhaut-Modells

Die Ergebnisse zum Aufbau eines dreidimensionalen Schleimhautmodells zeigen, dass die gewählten Versuchsbedingungen weiter optimiert werden müssen, um den strukturellen Aufbau des Schleimhautmodells zu verbessern. In sämtlichen Proben zeigte sich eine wenig ausgeprägte Fibroblastenverteilung im Filter und die Bildung von einzelnen Keratinozyten-Nestern anstelle eines kontinuierlich verlaufenden Epithelaufbaus oberhalb der Kollagenmatrix. Die verwendeten Zelllinien wurden erstmalig in Kombination mit Alvetex®-Filter zum Aufbau eines *in vitro*-Schleimhautmodells genutzt. Die Trägermatrix hat einen bedeutenden Einfluss bei der Herstellung eines dreidimensionalen Schleimhautmodells [80]. Alvetex®-Filter wurden speziell für die 3D-Zellkultur entwickelt und wurden im Zusammenhang mit der Entwicklung von dreidimensionalen Hautmodellen beschrieben [89]. In mehreren anderen Studien zum Aufbau von Gewebsmodellen wurde ein Kollagenetzwerk mit eingebetteten Fibroblasten als Trägermaterial verwendet [58][90]. Dies ist vor allem dann interessant, wenn das Schleimhautmodell im Rahmen der Gewebekonstruktion (engl. Tissue Engineering) als Transplantat bei Gewebsdefekten genutzt werden soll und die Trägermatrix somit bioinert und degradierbar sein muss. Bei der Verwendung von Fibroblasten-Kollagenmatrix wird eine Kultivierung der Fibroblasten von 4-7 Tagen vor Einbringung der Keratinozyten beschrieben [58]. Die beschriebene Zellzahl variierte von 1×10^5 c/ml bis 4×10^6 c/ml [58][91]. Hierbei handelte es sich zum Teil um murine T3T-Fibroblasten. Bei Kollagengelen kommt es zu einer deutlichen Kontraktion der Matrix, die schwierig reproduzierbar ist. Zudem sind sie aus tierischen Geweben gewonnen und können somit eine Variabilität innerhalb unterschiedlicher Chargen aufweisen. Die in dieser Arbeit genutzten Alvetex®-Filter haben eine feste Struktur, was die Handhabung deutlich vereinfacht. Für diese Filter wurde eine Fibroblastenzahl von 1×10^6 / Filter gewählt. Die Fibroblasten wurden sieben Tage kultiviert bevor die Keratinozyten aufgebracht wurden. Insgesamt sprechen die Ergebnisse dieser Arbeit für ein nicht ausreichend ausgeprägtes Fibroblasten-Extrazellulärmatrix-Netzwerk, da es zu einem Einsinken der Keratinozyten in die Filtermatrix kam. Ist der bindegewebige Anteil stabil, können sich die Keratinozyten auf den Filter auflegen und eine Schichtung aufbauen. Es ist bekannt, dass Zelllinien unterschiedlich auf Kultivierungsbedingungen und Trägermaterialien reagieren. Zukünftig sollte zunächst eine optimale Ausbildung des bindegewebigen Anteils des Schleimhautmodells angestrebt werden. Hierzu sollten Versuchsdurchläufe mit variierenden Fibroblastenzahlen und variierender Kultivierungsdauer durchgeführt werden. Gegebenenfalls könnten

sich auch andere Filtersysteme als für den gewählten Zelltyp (IhgF) als verträglicher erweisen.). Gelingt der Aufbau der dermalen und epidermalen Strukturen sollte eine Analyse der Modelle zu unterschiedlichen Zeitpunkten anhand von Differenzierungsmarkern stattfinden. Hierbei sollte auch ein Vergleich zu Schnitten humaner Mundschleimhaut erfolgen.

Mittlerweile konnten in der Arbeitsgruppe reproduzierbare Modelle mit einem anderen Filtersystem (ThinCert™, Greiner Bio-One International GmbH) und mit einem Kollagengel als Trägersystem hergestellt werden. Bei der Nutzung des Kollagengels scheint der pH-Wert eine wichtige Rolle zu spielen und einen Einfluss auf den Differenzierungsprozess der Epithelzellen zu haben. Für den positiven Verlauf der 3D-Zellkulturen zeigte sich ein leicht basischer pH-Wert als vorteilhaft. (persönliche Mitteilung: PD Dr. Kerstin Danker).

7.3 Ausblick

Nanocarriersysteme gelten in vielen Bereichen der Medizin als zukunftsbringender Ansatz in der Diagnostik und Therapie. Wie in dieser Arbeit verdeutlicht, könnten sie auch in der Mundhöhle einen Vorteil gegenüber konventionellen Therapieansätzen darstellen. Besonders bei Mundschleimhautrekrankungen, welche die unverhornten Schleimhautanteile betreffen (z.B. *Lichen planus*) könnten sie durch Anheftung an die Epidermis und damit verlängerte Einwirkdauer einen deutlichen Nutzen zeigen. Auch für die Therapie von Parodontitis ist eine Anwendung von Nanocarriersystemen gut vorstellbar. Zukünftig sollte neben weiterer Charakterisierung der Carrier im Einzelnen eine deutliche Unterscheidung der Behandlungsareale vorgenommen werden. Bei Erkrankungen der auskleidenden Schleimhaut ist häufig die Epithelintegrität gestört, was zu einer gesteigerten Penetration führen könnte. Die betroffenen Areale sind meist gut zugänglich, jedoch ist eine dort aufgetragene Salbe durch Speichel, Bewegungen der Gewebe und den Schluckvorgang innerhalb kürzester Zeit abgetragen. Wird eine Salbe in die parodontale Tasche eingebracht, kann die Verweildauer gegebenenfalls erhöht werden. Es zeigen sich jedoch andere Schwierigkeiten: die Mikroumgebung ist durch die Anhäufung von Mikroorganismen komplexer, der pH-Wert ist verändert, es finden sich eine Vielzahl von Entzündungsmediatoren und Immunzellen.

Es ist bekannt, dass Nanopartikel mit Proteinen in Körperflüssigkeiten (Speichel, Sulkusfluid) interagieren wodurch ihre Oberfläche verändert wird [92]. Zudem gibt es Interaktionen mit speziellen Enzymen wie Matrixmetalloproteinasen, die eine besondere Rolle bei der Gewebsdestruktion der Parodontitis spielen. Viele Teilaspekte könnten in der Untersuchung von Nanocarriersystemen gezielt adressiert werden. Auch eine chemische Modifikation der Carriersysteme speziell für die Mundhöhle ist in Zusammenarbeit mit den entwickelnden Chemikern denkbar.

Insgesamt handelt es sich bei der Mundhöhle durch das Zusammenspiel von körpereigenen, mikrobiellen und externen Faktoren um ein extrem komplexes Untersuchungsfeld. Einfluss auf

Mundschleimhauterkrankungen und ihre Therapie haben unter anderem die Abwehrlage des Patienten, die Speichelmenge- und Zusammensetzung, die individuell und lokal unterschiedliche Dicke der Schleimhaut, sowie Einflüsse durch Ernährung, Rauchen, Stoffwechsel und lokale Faktoren wie das Tragen von Prothesen oder kieferorthopädischen Apparaturen. Keine präklinische Untersuchungsmethode kann all diese Faktoren berücksichtigen. Durch eine Kombination verschiedener Techniken kann jedoch eine Annäherung an die *in vivo*-Situation ermöglicht werden. Hierbei kann die Entwicklung eines reproduzierbaren 3D-Schleimhautmodells mit humanen Zellen ein wichtiges Bindeglied zwischen Zellkultur und Tierversuch darstellen. In diese Modelle könnten erkrankungsspezifische Faktoren, wie z.B. parodontalpathogene Keime integriert werden.

Insgesamt ist es noch ein langer Weg bis Nanocarriersysteme wie die hier Untersuchten für den Einsatz am Patienten zugelassen werden können. Jede/r klinisch tätige Zahnärztin/Zahnarzt wird jedoch zustimmen, dass die bisher verfügbaren Mittel zur lokalen Therapie eher unzureichende Erfolge erzielen. Aus diesem Grund lohnt sich die Suche nach neuen Behandlungsoptionen.

Im Rahmen dieser Dissertation entstanden erstmals Forschungsk Kooperationen zwischen dem biochemischen Institut der Charité mit dem Zentrum für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde, dem Pharmazeutischen Institut der FU Berlin und dem Institut für Chemie und Biochemie der FU Berlin. Diese werden auch zukünftig zu einer Weiterführung der mit dieser Dissertation begonnenen Untersuchungen beitragen. Zudem werden sie die Integration zahnmedizinischer Aspekte bei nachfolgenden Forschungsprojekten fördern. Interdisziplinäre Kooperationen dieser Art können langfristig zu einer stärkeren Anerkennung der lange als Nischendisziplin erachteten Zahnheilkunde führen und den starken Einfluss des stomatologischen Systems auf den Gesamtorganismus weiter in den Fokus rücken.

IV Literaturverzeichnis

1. Harris D, Robinson JR (1992) Drug delivery via the mucous membranes of the oral cavity. *J Pharm Sci* 81:1–10 . doi: 10.1002/jps.2600810102
2. Papagerakis S, Pannone G, Zheng L, About I, Taqi N, Nguyen NPT, Matossian M, McAlpin B, Santoro A, McHugh J, Prince ME, Papagerakis P (2014) Oral epithelial stem cells-Implications in normal development and cancer metastasis. *Exp. Cell Res.* 325:111–129
3. Squier CA, Kremer MJ (2001) Biology of oral mucosa and esophagus. *J Natl Cancer Inst Monogr* 52242:7–15
4. Presland RB, Dale BA (2000) Epithelial Structural Proteins of the Skin and Oral Cavity: Function in Health and Disease. *Crit Rev Oral Biol Med* 11:383–408 . doi: 10.1177/10454411000110040101
5. Presland RB, Jurevic RJ (2002) Making sense of the epithelial barrier: what molecular biology and genetics tell us about the functions of oral mucosal and epidermal tissues. *J Dent Educ* 66:564–74
6. Goleva E, Berdyshev E, Leung DYM (2019) Epithelial barrier repair and prevention of allergy. *J Clin Invest* 129:1463–1474 . doi: 10.1172/JCI124608
7. Candi E, Schmidt R, Melino G (2005) The cornified envelope: A model of cell death in the skin. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:328–340 . doi: 10.1038/nrm1619
8. Valach J (2017) Phenotypic characterization of oral mucosa : what is normal ? 834–839 . doi: 10.1111/jop.12556
9. Neupane S, Adhikari N, Jung JK, An CH, Lee S, Jun JH, Kim JY, Lee Y, Sohn WJ, Kim JY (2018) Regulation of mesenchymal signaling in palatal mucosa differentiation. *Histochem Cell Biol* 149:143–152 . doi: 10.1007/s00418-017-1620-2
10. Nithya S, Radhika T, Jeddy N (2015) Loricerin - an overview. *J Oral Maxillofac Pathol* 19:64–68 . doi: 10.4103/0973-029X.157204
11. Samiei M, Ahmadian E, Eftekhari A, Eghbal MA, Rezaie F, Vinken M (2019) Cell junctions and oral health. *EXCLI J.* 18:317–330
12. Donetti E, Bedoni M, Boschini E, Dellavia C, Barajon I, Gagliano N (2005) Desmocollin 1 and desmoglein 1 expression in human epidermis and keratinizing oral mucosa: A comparative immunohistochemical and molecular study. *Arch Dermatol Res* 297:31–38 . doi: 10.1007/s00403-005-0573-9
13. Squier, Christopher A; Wertz PW,; Cox P (1991) Thin-layer chromatographic analyses of lipids in different layers of porcine epidermis and oral epithelium. *Arch Oral Biol* 36:647–653 . doi: 10.1016/0003-9969(91)90017-O
14. Lesch CA, Squier CA, Cruchley A, Williams DM, Speight P (1989) The Permeability of Human Oral Mucosa and Skin to Water. *J Dent Res* 68:1345–1349 . doi: 10.1177/00220345890680091101

15. Gibbs S, Ponc M (2000) Intrinsic regulation of differentiation markers in human epidermis, hard palate and buccal mucosa. *Arch Oral Biol* 45:149–158 . doi: 10.1016/S0003-9969(99)00116-8
16. Brand HS, Ligtenberg AJM, Veerman ECI (2014) Saliva and wound healing. *Monogr Oral Sci* 24:52–60 . doi: 10.1159/000358784
17. Vriens AP, Waaijman T, van den Hoogenband HM, de Boer EM, Scheper RJ, Gibbs S (2008) Comparison of autologous full-thickness gingiva and skin substitutes for wound healing. *Cell Transplant* 17:1199–209 . doi: 10.3727/096368908787236521
18. Shirakata Y, Amagai M, Hanakawa Y, Nishikawa T, Hashimoto K (1998) Lack of mucosal involvement in pemphigus foliaceus may be due to low expression of desmoglein 1. *J Invest Dermatol* 110:76–78 . doi: 10.1046/j.1523-1747.1998.00085.x
19. Femiano F, Lanza A, Buonaiuto C, Gombos F, Nunziata M, Piccolo S, Cirillo N (2007) Guidelines for diagnosis and management of aphthous stomatitis. *Pediatr Infect Dis J* 26:728–732 . doi: 10.1097/INF.0b013e31806215f9
20. Millsop JW, Fazel N (2016) Oral candidiasis. *Clin Dermatol* 34:487–494 . doi: 10.1016/j.clindermatol.2016.02.022
21. Giannetti L, Dello Diago AM, Spinass E (2018) Oral lichen planus. *J Biol Regul Homeost Agents* 32:391–395 . doi: 10.1016/j.clindermatol.2016.02.023
22. Santoro FA, Stoopler ET, Werth VP (2005) Pemphigus. *Dent. Clin. North Am.* 49:107–125
23. Lee SJ (2017) Classification systems for chronic graft-versus-host disease. *Blood* 129:30–37 . doi: 10.1182/blood-2016-07-686642
24. Simón-Soro Á, Tomás I, Cabrera-Rubio R, Catalan MD, Nyvad B, Mira A (2013) Microbial geography of the oral cavity. *J Dent Res* 92:616–621 . doi: 10.1177/0022034513488119
25. Lamont RJ, Koo H, Hajishengallis G (2018) The oral microbiota: dynamic communities and host interactions
26. Gao L, Xu T, Huang G, Jiang S, Gu Y, Chen F (2018) Oral microbiomes: more and more importance in oral cavity and whole body. *Protein Cell* 9:488–500 . doi: 10.1007/s13238-018-0548-1
27. Sanz M, Cieriello A, Buysschaert M, Chapple I, Demmer RT, Graziani F, Herrera D, Jepsen S, Leone L, Madianos P, Mathur M, Montanya E, Shapira L, Tonetti M, Vegh D (2017) Scientific evidence on the links between periodontal diseases and diabetes: Consensus report and guidelines of the joint workshop on periodontal diseases and diabetes by the International Diabetes Federation and the European Federation of Periodontology. *J Clin Periodontol.* doi: 10.1111/jcpe.12808
28. Kassebaum NJ, Bernabé E, Dahiya M, Bhandari B, Murray CJL, Marcenes W (2014) Global burden of severe periodontitis in 1990-2010: A systematic review and meta-regression. *J. Dent. Res.* 93:1045–1053
29. Holmlund A, Lampa E, Lind L (2017) Oral health and cardiovascular disease risk in a cohort of

- periodontitis patients. *Atherosclerosis* 262:101–106 . doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2017.05.009
30. Caton JG, Armitage G, Tonetti MS, Papapanou PN (2018) 2017 World workshop: A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions – Introduction and key changes from the 1999 classification. 89:1–8 . doi: 10.1002/JPER.18-0157
 31. Page R, Kornman K (1997) The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. *Periodontol* 2000 14:9–11 . doi: 10.1111/j.1600-0757.1997.tb00189.x
 32. Meyle J, Chapple I (2015) Molecular aspects of the pathogenesis of periodontitis. *Periodontol* 2000 69:7–17 . doi: 10.1111/prd.12104
 33. Darveau RP (2010) Periodontitis: A polymicrobial disruption of host homeostasis. *Nat. Rev. Microbiol.* 8:481–490
 34. Hajishengallis G (2014) Immunomicrobial pathogenesis of periodontitis: Keystones, pathobionts, and host response. *Trends Immunol.* 35:3–11
 35. Deas DE, Moritz AJ, Sagun RS, Gruwell SF, Powell CA (2016) Scaling and root planing vs. conservative surgery in the treatment of chronic periodontitis. *Periodontol* 2000 71:128–139 . doi: 10.1111/prd.12114
 36. Reddy MS, Jeffcoat MK, Geurs NC, Palcanis KG, Weatherford TW, Traxler BM, Finkelman RD (2003) Efficacy of controlled-release subgingival chlorhexidine to enhance periodontal regeneration. *J Periodontol* 74:411–9 . doi: 10.1902/jop.2003.74.4.411
 37. Chapple ILC, Genco R (2013) Diabetes and periodontal diseases: consensus report of the Joint EFP/AAP Workshop on Periodontitis and Systemic Diseases. *J Periodontol* 84:S106–S112 . doi: 10.1902/jop.2013.1340011
 38. Meng-Lund E, Marxen E, Pedersen AML, Müllertz A, Hyrup B, Holm R, Jacobsen J (2014) Ex vivo correlation of the permeability of metoprolol across human and porcine buccal mucosa. *J Pharm Sci* 103:2053–2061 . doi: 10.1002/jps.24010
 39. Balda MS, Matter K (2014) Tight junctions in health and disease. *Semin. Cell Dev. Biol.* 36:147–148
 40. Dünnhaupt S, Kammona O, Waldner C, Kiparissides C, Bernkop-Schnürch A (2015) Nano-carrier systems: Strategies to overcome the mucus gel barrier. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 96:447–453
 41. Ciappellano SG, Tedesco E, Venturini M, Benetti F (2016) In vitro toxicity assessment of oral nanocarriers. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 106:381–401
 42. Gurses N, Topcul M (2013) The Effect of Abraxane on Cell Kinetic Parameters of HeLa Cells. *Asian Pacific J Cancer Prev* 14:4229–4233 . doi: 10.7314/APJCP.2013.14.7.4229
 43. Korting HC, Schäfer-Korting M (2010) Carriers in the topical treatment of skin disease. *Handb. Exp. Pharmacol.* 197:435–468
 44. Alnasif N, Zoschke C, Fleige E, Brodwolf R, Boreham A, Rühl E, Eckl KM, Merk HF, Hennies HC, Alexiev U, Haag R, Küchler S, Schäfer-Korting M (2014) Penetration of normal, damaged and diseased skin - An in vitro study on dendritic core-multishell nanotransporters. *J Control*

- Release 185:45–50 . doi: 10.1016/j.jconrel.2014.04.006
45. Hönzke S, Gerecke C, Elpelt A, Zhang N, Unbehauen M, Kral V, Fleige E, Paulus F, Haag R, Schäfer-Korting M, Kleuser B, Hedtrich S (2016) Tailored dendritic core-multishell nanocarriers for efficient dermal drug delivery: A systematic top-down approach from synthesis to preclinical testing. *J Control Release* 242:50–63 . doi: 10.1016/j.jconrel.2016.06.030
 46. Radowski MR, Shukla A, Von Berlepsch H, Böttcher C, Pickaert G, Rehage H, Haag R (2007) Supramolecular aggregates of dendritic multishell architectures as universal nanocarriers. *Angew Chemie - Int Ed* 46:1265–1269 . doi: 10.1002/anie.200603801
 47. Edlich A, Volz P, Brodwolf R, Unbehauen M, Mundhenk L, Gruber AD, Hedtrich S, Haag R, Alexiev U, Kleuser B (2018) Crosstalk between core-multishell nanocarriers for cutaneous drug delivery and antigen-presenting cells of the skin. *Biomaterials*. doi: 10.1016/j.biomaterials.2018.01.058
 48. Calderón M, Quadir MA, Sharma SK, Haag R (2010) Dendritic polyglycerols for biomedical applications. *Adv. Mater.* 22:190–218
 49. Keerl M, Pedersen JS, Richtering W (2009) Temperature sensitive copolymer microgels with nanophase separated structure. *J Am Chem Soc* 131:3093–3097 . doi: 10.1021/ja807367p
 50. Witting M, Molina M, Obst K, Plank R, Eckl KM, Hennies HC, Calderón M, Frieß W, Hedtrich S (2015) Thermosensitive dendritic polyglycerol-based nanogels for cutaneous delivery of biomacromolecules. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med* 11:1179–1187 . doi: 10.1016/j.nano.2015.02.017
 51. Yin L, Ding J, He C, Cui L, Tang C, Yin C (2009) Drug permeability and mucoadhesion properties of thiolated trimethyl chitosan nanoparticles in oral insulin delivery. *Biomaterials* 30:5691–5700 . doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.06.055
 52. Kwon Y-D, Choi H, Lee H, Lee J-W, Weber H-P, Pae A (2014) Cellular viability and genetic expression of human gingival fibroblasts to zirconia with enamel matrix derivative (Emdogain®). *J Adv Prosthodont.* doi: 10.4047/jap.2014.6.5.406
 53. Westphal K (2008) Molekulare Mechanismen kutaner humaner Papillomviren (HPV) während der Hautkarzinogenese. Doktorarbeit, Humboldt-Universität zu Berlin
 54. Gröger S, Michel J, Meyle J (2008) Establishment and characterization of immortalized human gingival keratinocyte cell lines. *J Periodontal Res.* doi: 10.1111/j.1600-0765.2007.01019.x
 55. Kim RH, Lieberman MB, Lee R, Shin KH, Mehrazarin S, Oh JE, Park NH, Kang MK (2010) Bmi-1 extends the life span of normal human oral keratinocytes by inhibiting the TGF- β signaling. *Exp Cell Res* 316:2600–2608 . doi: 10.1016/j.yexcr.2010.04.013
 56. Wendler A, Wehling M (2010) The translatability of animal models for clinical development : biomarkers and disease models. *Curr Opin Pharmacol* 10:601–606 . doi: 10.1016/j.coph.2010.05.009
 57. Sa G, Xiong X, Wu T, Yang J, He S, Zhao Y (2015) Histological features of oral epithelium in

- seven animal species : As a reference for selecting animal models Histological features of oral epithelium in seven animal species : As a reference for selecting animal models. PHASCI 81:10–17 . doi: 10.1016/j.ejps.2015.09.019
58. Dongari-Bagtzoglou A, Kashleva H (2006) Development of a highly reproducible three-dimensional organotypic model of the oral mucosa. *Nat Protoc* 1:2012–2018 . doi: 10.1038/nprot.2006.323
 59. Buskermolen JK, Reijnders CMA, Spiekstra SW, Steinberg T, Kleverlaan CJ, Feilzer AJ, Bakker AD, Gibbs S (2016) Development of a Full-Thickness Human Gingiva Equivalent Constructed from Immortalized Keratinocytes and Fibroblasts. *Tissue Eng Part C Methods* 22:781–791 . doi: 10.1089/ten.tec.2016.0066
 60. Dickhuth J, Koerdt S, Kriegebaum U, Linz C, Müller-Richter UD, Ristow O, Kübler AC, Reuther T (2015) In vitro study on proliferation kinetics of oral mucosal keratinocytes. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 120:429–435 . doi: 10.1016/j.oooo.2015.06.001
 61. Chaudhari AA, Joshi S, Vig K, Sahu R, Dixit S, Baganizi R, Dennis VA, Singh SR, Pillai S (2018) A three-dimensional human skin model to evaluate the inhibition of *Staphylococcus aureus* by antimicrobial peptide-functionalized silver carbon nanotubes. *J Biomater Appl* 33:924–934 . doi: 10.1177/0885328218814984
 62. Elsholz F, Harteneck C, Muller W, Friedland K (2014) Calcium - A central regulator of keratinocyte differentiation in health and disease. *Eur J Dermatology* 24:650–661 . doi: 10.1684/ejd.2014.2452
 63. Stockert JC, Blázquez-Castro A, Cañete M, Horobin RW, Villanueva Á (2012) MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. *Acta Histochem*. doi: 10.1016/j.acthis.2012.01.006
 64. Berridge M V., Herst PM, Tan AS (2005) Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. *Biotechnol Annu Rev* 11:127–152 . doi: 10.1016/S1387-2656(05)11004-7
 65. Vichai V, Kirtikara K (2006) Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nat Protoc* 1:1112–1116 . doi: 10.1038/nprot.2006.179
 66. Saeidpour S, Lohan SB, Anske M, Unbehauen M, Fleige E, Haag R, Meinke MC, Bittl R, Teutloff C (2017) Localization of dexamethasone within dendritic core-multishell (CMS) nanoparticles and skin penetration properties studied by multi-frequency electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy. *Eur J Pharm Biopharm* 116:94–101 . doi: 10.1016/j.ejpb.2016.10.001
 67. Lohan SB, Saeidpour S, Solik A, Schanzer S, Richter H, Dong P, Darvin ME, Bodmeier R, Patzelt A, Zoubari G, Unbehauen M, Haag R, Lademann J, Teutloff C, Bittl R, Meinke MC (2017) Investigation of the cutaneous penetration behavior of dexamethasone loaded to nano-sized lipid particles by EPR spectroscopy, and confocal Raman and laser scanning microscopy. *Eur J Pharm Biopharm* 116:102–110 . doi: 10.1016/j.ejpb.2016.12.018

68. Fischer AH, Jacobson KA, Rose J, Zeller R (2008) Hematoxylin and eosin staining of tissue and cell sections. *Cold Spring Harb Protoc* 3:4986–4988 . doi: 10.1101/pdb.prot4986
69. Jager J, Obst K, Lohan SB, Viktorov J, Staufenbiel S, Renz H, Unbehauen M, Haag R, Hedtrich S, Teutloff C, Meinke MC, Danker K, Dommisch H (2018) Characterization of hyperbranched core-multishell nanocarriers as an innovative drug delivery system for the application at the oral mucosa. *J Periodontal Res* 53:57–65 . doi: 10.1111/jre.12487
70. Du F, Hönzke 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 . doi: 10.1016/j.jconrel.2016.06.048
71. Van Tonder A, Joubert AM, Cromarty AD (2015) Limitations of the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay when compared to three commonly used cell enumeration assays. *BMC Res Notes* 8:1–10 . doi: 10.1186/s13104-015-1000-8
72. Gerecke C, Edlich A, Giubudagian M, Schumacher F, Zhang N, Said A, Yealland G, Lohan SB, Neumann F, Meinke MC, Ma N, Calderón M, Hedtrich S, Schäfer-Korting M, Kleuser B (2017) Biocompatibility and characterization of polyglycerol-based thermoresponsive nanogels designed as novel drug-delivery systems and their intracellular localization in keratinocytes. *Nanotoxicology* 11:267–277 . doi: 10.1080/17435390.2017.1292371
73. Machado RM, Palmeira-de-Oliveira A, Gaspar C, Martinez-de-Oliveira J, Palmeira-de-Oliveira R (2015) Studies and methodologies on vaginal drug permeation. *Adv Drug Deliv Rev* 92:14–26 . doi: 10.1016/j.addr.2015.02.003
74. Patel VF, Liu F, Brown MB (2012) Modeling the oral cavity : In vitro and in vivo evaluations of buccal drug delivery systems. *J Control Release* 161:746–756 . doi: 10.1016/j.jconrel.2012.05.026
75. Kulkarni U, Mahalingam R, Pather I, Li X, Jasti B (2010) Porcine Buccal Mucosa as In Vitro Model : Effect of Biological and Experimental Variables. *J Am Pharm Assoc* 99:1265–1277 . doi: 10.1002/jps.21907
76. Georgakoudi I, Rice WL, Hronik-Tupaj M, Kaplan DL (2008) Optical spectroscopy and imaging for the noninvasive evaluation of engineered tissues. *Tissue Eng - Part B Rev* 14:321–340 . doi: 10.1089/ten.teb.2008.0248
77. Lohan SB, Icken N, Teutloff C, Saeidpour S, Bittl R, Lademann J, Fleige E, Haag R, Haag SF, Meinke MC (2016) Investigation of cutaneous penetration properties of stearic acid loaded to dendritic core-multi-shell (CMS) nanocarriers. *Int J Pharm* 501:271–277 . doi: 10.1016/j.ijpharm.2016.02.004
78. Albrecht S, Ahlberg S, Beckers I, Kockott D, Lademann J, Paul V, Zastrow L, Meinke MC (2016) Effects on detection of radical formation in skin due to solar irradiation measured by EPR spectroscopy. *Methods*. doi: 10.1016/j.ymeth.2016.06.005
79. Haag SF, Taskoparan B, Bittl R, Teutloff C, Wenzel R, Fahr A, Chen M, Lademann J, Schäfer-Korting M, Meinke MC (2011) Stabilization of reactive nitroxides using invasomes to allow

- prolonged electron paramagnetic resonance measurements. *Skin Pharmacol Physiol* 24:312–321 . doi: 10.1159/000330235
80. Kinikoglu B, Damour O, Hasirci V (2015) Tissue engineering of oral mucosa: a shared concept with skin. *J Artif Organs* 18:8–19 . doi: 10.1007/s10047-014-0798-5
 81. Stein E, Blaimauer K, Bauer S, Erovcic BM, Turhani D, Thurnher D (2007) High expression of integrin $\beta 1$ correlates with high proliferation capacity in oral keratinocytes. *Wien Klin Wochenschr* 119:318–322 . doi: 10.1007/s00508-007-0783-6
 82. Gerecke C, Edlich A, Giubudagian M, Schumacher F, Zhang N, Said A, Yealland G, Lohan SB, Neumann F, Meinke MC, Ma N, Calderón M, Hedtrich S, Schäfer-Korting M, Kleuser B (2017) Biocompatibility and characterization of polyglycerol-based thermoresponsive nanogels designed as novel drug-delivery systems and their intracellular localization in keratinocytes. *Nanotoxicology* 11:267–277 . doi: 10.1080/17435390.2017.1292371
 83. Rancan F, Giubudagian M, Jurisch J, Blume-Peytavi U, Calderón M, Vogt A (2017) Drug delivery across intact and disrupted skin barrier: Identification of cell populations interacting with penetrated thermoresponsive nanogels. *Eur J Pharm Biopharm* 116:4–11 . doi: 10.1016/j.ejpb.2016.11.017
 84. Edlich A, Volz P, Brodewolf R, Unbehauen M, Mundhenk L, Gruber AD, Hedtrich S, Haag R, Alexiev U, Kleuser B (2018) Crosstalk between core-multishell nanocarriers for cutaneous drug delivery and antigen-presenting cells of the skin. *Biomaterials* 162:60–70 . doi: 10.1016/j.biomaterials.2018.01.058
 85. Ebrecht R, Don Paul C, Wouters FS (2014) Fluorescence lifetime imaging microscopy in the medical sciences. *Protoplasma* 251:293–305 . doi: 10.1007/s00709-013-0598-4
 86. Kuchler S, Radowski MR, Blaschke T, Dathe M, Plendl J, Haag R, Schäfer-Korting M, Kramer KD (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 . doi: <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2008.08.019>
 87. Cuggino JC, Blanco ERO, Gugliotta LM, Alvarez Igarzabal CI, Calderón M (2019) Crossing biological barriers with nanogels to improve drug delivery performance. *J Control Release* 307:221–246 . doi: 10.1016/j.jconrel.2019.06.005
 88. Netsomboon K, Bernkop-Schnürch A (2016) Mucoadhesive vs. mucopenetrating particulate drug delivery. *Eur J Pharm Biopharm* 98:76–89 . doi: 10.1016/j.ejpb.2015.11.003
 89. Böttcher-Haberzeth S, Biedermann T (1993) SVF: Skin Tissue Engineering Methods and Protocols *Methods in Molecular Biology* 1993
 90. Kosten IJ, Buskermolen JK, Spiekstra SW, De Gruijl TD, Gibbs S (2015) Gingiva Equivalents Secrete Negligible Amounts of Key Chemokines Involved in Langerhans Cell Migration Compared to Skin Equivalents. *J Immunol Res* 2015:13–17 . doi: 10.1155/2015/627125
 91. Ouwehand K, Spiekstra SW, Waaijman T, Scheper RJ, de Gruijl TD, Gibbs S (2011) Technical

Advance: Langerhans cells derived from a human cell line in a full-thickness skin equivalent undergo allergen-induced maturation and migration. *J Leukoc Biol* 90:1027–1033 . doi: 10.1189/jlb.0610374

92. Behzadi S, Serpooshan V, Tao W, Hamaly MA, Alkawareek MY, Dreaden EC, Brown D, Alkilany AM, Farokhzad OC, Mahmoudi M (2017) Cellular uptake of nanoparticles: Journey inside the cell. *Chem. Soc. Rev.* 46:4218–4244
93. Perme gear Franc Cell. <https://perme gear.com/franz-cells/>

V Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Juliane Vera Jager, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: *Nanocarriersysteme als neues Therapiekonzept bei entzündlichen Mundschleimhaut- und Parodontalerkrankungen / Nanocarriersystems as a novel therapeutic approach for oral mucous and periodontal diseases* 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

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 mir die Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis bekannt ist und ich mich zur Einhaltung dieser Satzung 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.“

Datum

Unterschrift

VI Anteilserklärung an erfolgten Publikationen

Juliane Vera Jager hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1:

Jager J, Obst K, Lohan SB, Viktorov J, Staufenbiel S, Renz H, Unbehauen M, Haag R, Hedtrich S, Teutloff C, Meinke MC, Danker K, Dommisch H. *Characterization of hyperbranched core-multishell nanocarriers as an innovative drug delivery system for the application at the oral mucosa*. Journal of Periodontal Research, 2018

Beitrag im Einzelnen: Durchführung und Auswertung der Zytotoxizitäts- und Proliferationsassays mit den CMS-Nanocarriern 10-A-18-350 und 10-E-15-350 sowie dem thermoresponsiven PNIPMAM-(S-S)-dPG-Nanogel; Präparation des Spendergewebes vom Schwein, Durchführung aller Franz-Zell-Penetrationsversuche, Auswertung der Penetrationsversuche mittels Laserkonfokalmikroskopie, Durchführung aller histochemischen Färbungen. Anfertigung der Abbildungen 1 (a), 1 (b), 2 (a)-(d) der Publikation. Datenerhebung für die Abbildungen 2 (e), 4 und 5. Die Auswertung mittels Elektronenspinresonanzspektroskopie und die Anfertigung der Abbildung 3 erfolgte durch Dr. Silke Lohan, Postdoktorandin in der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Martina Meinke (Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie, Charité Universitätsmedizin Berlin).

Unterschrift der Doktorandin

VII Lebenslauf

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

VIII Publikationsliste

1. Jager J, Obst K, Lohan SB, Viktorov J, Staufenbiel S, Renz H, Unbehauen M, Haag R, Hedtrich S, Teutloff C, Meinke MC, Danker K, Dommisch H (2018) Characterization of hyperbranched core-multishell nanocarriers as an innovative drug delivery system for the application at the oral mucosa. *J Periodontal Res* 53:57–65 . doi: 10.1111/jre.12487

IX Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all jenen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Insbesondere danke ich:

Der Sonnenfeldstiftung für die großzügige Förderung.

PD Dr. Kerstin Danker für die gemeinsame Ausarbeitung des Themas, ihren Enthusiasmus und die hervorragende fachliche Betreuung.

Prof. Dr. Henrik Dommisch für die fachliche Unterstützung und die zur Verfügung gestellten Gewebeproben.

Frau Gudrun Mrawietz für ihre kompetente Anleitung bei der Versuchsdurchführung, die stete Hilfsbereitschaft und ihre wertvollen Anregungen, ohne welche diese Arbeit kaum möglich gewesen wäre.

Herrn Renz für seine Hilfestellung bei der Arbeit am Laserkonfokalmikroskop.

Silke Lohan für die Durchführung und Auswertung der ESR-Messungen und ihre kompetente fachliche Beratung.

Der gesamten Arbeitsgruppe für die freundschaftliche Atmosphäre.