

**Entwicklung Mukosa-selektiver PLGA-Partikel zur
antiinflammatorischen Therapie bei chronisch
entzündlichen Darmerkrankungen**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Saskia Lehmann
geboren am 28.06.1994 in Luckau

Gutachter

1. Prof. Dr. med. Andreas Stallmach, Universitätsklinikum Jena
2. Prof. Dr. med. Michael Bauer, Universitätsklinikum Jena
3. PD Dr. med. Michael Schumann, Charité - Universitätsmedizin Berlin

Tag der öffentlichen Verteidigung: 03.05.2022

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	IV
ZUSAMMENFASSUNG	V
1. EINLEITUNG	1
1.1 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen	1
1.1.1 Ätiologie und Pathogenese	1
1.1.2 Therapie und deren Prognose	7
1.2 Disease-Targeting-Strategie	9
1.2.1 Anwendung im Kontext der CED-Therapie	9
1.2.2 Disease-Targeting-Strategie basierend auf Mikropartikeln	12
PLGA als Partikelmatrix.....	13
Polymerabbau/ -erosion und Metabolisierung.....	14
Wirkstofffreisetzung	16
Biokompatibilität	17
2. ZIELE DER ARBEIT	20
3. MATERIAL UND METHODEN	22
3.1 Material	22
3.1.1 Kits	22
3.1.2 Chemikalien und Reagenzien	22
3.2 Methoden	24
3.2.1 Partikelherstellung	24
3.2.2 Partikelcharakterisierung	24
3.2.2.1 Partikelgrößenverteilung und Zetapotenzial	24
3.2.2.2 Oberflächenstruktur und -beschaffenheit	25
3.2.2.3 Verkapselungseffizienz und Gehaltsbestimmung	25
3.2.2.4 Freisetzungskinetik.....	26
3.2.2.5 Biokompatibilität nach ISO-Norm	27

3.2.3	Quantitative Analyse der Zytokine TNF-α und IL-6	30
3.2.4	Zellkultur	31
3.2.4.1	PBMC-Isolation	32
3.2.4.2	CD14 ⁺ - Positivselektion.....	32
3.2.4.3	Zellzahlbestimmung.....	33
3.2.4.4	Inkubation der Monozyten.....	33
3.2.5	Nachweis der pharmakologischen Aktivität	33
3.2.5.1	Dexamethason-Dosis-Wirkungs-Kurve	33
3.2.5.2	Untersuchung der entzündungssupprimierenden Wirkung der Partikel auf die LPS- getriggerte Entzündungsreaktion von Monozyten	34
3.2.6	Visualisierung der Partikel in der Monozytenzellkultur	34
3.2.6.1	Raman-Spektroskopie.....	34
3.2.6.2	ELYRA-Hochauflösungs-Mikroskopie (HR-SIM)	36
4.	ERGEBNISSE	37
4.1	Partikelcharakterisierung	37
4.1.1	<i>Partikelgrößenverteilung und Zetapotenzial</i>	37
4.1.2	<i>Oberflächenstruktur und -beschaffenheit</i>	38
4.1.3	<i>Verkapselungseffizienz und Gehaltsbestimmung</i>	39
4.1.4	<i>Freisetzungskinetik</i>	40
4.2	Biokompatibilität nach ISO-Norm	42
4.2.1	<i>Hämokompatibilität</i>	42
4.2.2	<i>In vitro-Zytotoxizität</i>	45
4.3	Nachweis der pharmakologischen Aktivität	48
4.3.1	<i>Dexamethason-Dosis-Wirkungs-Kurve</i>	48
4.3.2	<i>Untersuchung der pharmakologischen Aktivität der Partikel auf die LPS-induzierte Entzündungsreaktion von Monozyten</i>	50
4.4	Visualisierung der Mikropartikel in der Monozytenkultur	52
4.4.1	<i>Raman-Spektroskopie</i>	52
4.4.2	<i>ELYRA-Hochauflösungsmikroskopie (HR-SIM)</i>	56
5.	DISKUSSION	58
5.1	Physikochemische Partikelcharakterisierung	58
5.1.1	<i>Partikelgrößenverteilung und Zetapotenzial</i>	59
5.1.2	<i>Oberflächenstruktur und - beschaffenheit</i>	61

5.1.3	<i>Verkapselungseffizienz und Gehaltsbestimmung</i>	62
5.1.4	<i>Freisetzungskinetik</i>	63
5.2	Humane CD14 ⁺ -Monozyten	66
5.3	Untersuchung der Biokompatibilität nach ISO-Norm	68
5.3.1	<i>Hämokompatibilität</i>	68
5.3.2	<i>Zytotoxizität</i>	68
5.4	Nachweis der pharmakologischen Aktivität	72
5.5	Überprüfung der Internalisierungspotenz der Partikel	77
5.5.1	<i>Raman-Spektroskopie</i>	77
5.5.2	<i>ELYRA-Hochauflösungs-Mikroskopie (HR-SIM)</i>	78
6.	SCHLUSSFOLGERUNG UND AUSBLICK	81
	LITERATUR - & QUELLENVERZEICHNIS	VII
	ANHANG	XIX
	Abbildungsverzeichnis	XIX
	Tabellenverzeichnis	XXII
	Ehrenwörtliche Erklärung	XXIII
	Danksagung	XXIV

Abkürzungsverzeichnis

APC	<i>antigenpräsentierende Zellen</i>	NADP	<i>Nicotinamidadenindinukleotidphosphat</i>
ASA	<i>Aminosalicylsäure</i>	NC	<i>Negativkontrolle</i>
bPEI	<i>verzweigtes Polyethylenimin</i>	NF- κ B	<i>Nukleärer Faktor κB</i>
bspw.	<i>beispielsweise</i>	NSAIDs	<i>nicht steroidale Antiphlogistika</i>
bzgl.	<i>bezüglich</i>	PBMC	<i>mononukleären Zellen des peripheren Blutes</i>
DDS	<i>Drug Delivery System</i>	PBS	<i>phosphatgepufferte Salzlösung</i>
DEX	<i>Dexamethason</i>	PC	<i>Positivkontrolle</i>
DMSO	<i>Dimethylsulfoxid</i>	PCS	<i>Photonenkorrelationspektroskopie</i>
FCS	<i>fetales Kälberserum</i>	PDI	<i>Polydispersitätsindex</i>
FDA	<i>U.S. Food and Drug Administration</i>	PI3-K	<i>Phosphoinositid-3-Kinase</i>
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>	PLA	<i>Polylactid</i>
HPLC ...	<i>Hochleistungsflüssigkeitschromatographie</i>	PLGA	<i>Polylactid-co-Glycolid</i>
HRP	<i>Meerrettichperoxidase</i>	PRINT	<i>Particle replication in nonwetting templates</i>
HR-SIM ...	<i>hochauflösende Fluoreszenzmikroskopie mit strukturierter Beleuchtung</i>	PRR	<i>Pattern-Recognition-Rezeptor</i>
HSP	<i>Hitzeschockproteine</i>	RA	<i>Retinsäure</i>
IC ₅₀	<i>mittlere inhibitorische Konzentration</i>	REM	<i>Rasterelektronenmikroskopie</i>
IEC	<i>intestinale Epithelzelle</i>	RI	<i>Refractive Index</i>
IL	<i>Interleukin</i>	ROS	<i>reaktive Sauerstoffspezies</i>
INT	<i>Indonitrotetrazolium</i>	RT	<i>Raumtemperatur</i>
Kat.-Nr.	<i>Katalognummer</i>	SD	<i>Standardabweichung</i>
LDH	<i>Laktatdehydrogenase</i>	SEM	<i>Standardfehler des Mittelwerts</i>
LoD	<i>Limit of Detection</i>	TDDS	<i>Targeted-Drug-Delivery-System</i>
LPS	<i>Lipopolysaccharid</i>	TGF	<i>Transforming Growth Factor</i>
MACS	<i>Magnetic Activated Cell Sorting</i>	TLR	<i>Toll-like Rezeptor</i>
MAPK	<i>Mitogen-aktivierte Proteinkinase</i>	TNF- α	<i>Tumornekrosefaktor alpha</i>
MHC	<i>Haupthistokompatibilitätskomplex</i>	TSLP	<i>Thymus-Stroma-Lymphopoetin</i>
MTT	<i>3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5- diphenyltetrazoliumbromid</i>	u.a.	<i>unter anderem</i>
NAD	<i>Nicotinamidadenindinukleotid</i>	VCA	<i>vertex component analysis</i>
		z.B.	<i>zum Beispiel</i>

Zusammenfassung

Die chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (CED) bestehen zeitlebens und schränken die Lebensqualität der Patienten deutlich ein. Das Symptomspektrum ist vielseitig und komplex, aber letztlich auf die chronische Inflammation im Gastrointestinaltrakt zurückzuführen. Dank der intensiven Forschung zur mannigfaltigen Ätiologie und Pathogenese dieser Erkrankung eröffnen sich stetig neue Therapieansätze und innovative Ideen. Nach wie vor sind bei Patienten mit komplexen Verläufen bisher nur systemische Therapien etabliert, die mit vielen, daraus resultierenden Problemen (z.B. Nebenwirkungen) behaftet sind. Um die mukosale Entzündung gezielt therapieren zu können, sind Weiterentwicklungen sogenannter Mukosa-selektiver Therapeutika notwendig. Hierbei handelt es sich um *Disease-Targeting*-Strategien, die spezifisch die entzündeten Mukosabereiche adressieren, um hier einen verkapselten Wirkstoff zielgenau und dosiert freizusetzen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden PLGA-Mikropartikel hergestellt, welche mit der antiinflammatorischen Modellsubstanz Dexamethason (DEX) beladen wurden. Zunächst erfolgte eine physikochemische Charakterisierung dieser Mikropartikel. Mittels PCS-Messungen wurde die Partikelgröße (\emptyset 1,5 - 2 μm) und das Zetapotenzial bestimmt. Die Visualisierung der Oberflächenstruktur erfolgte mittels REM. Zur FITC-DEX-Gehaltsbestimmung und zur Bestimmung der *in vitro*-Freisetzungskinetik wurde die Fluorimetrie genutzt. Die antiinflammatorische Wirkung dieser Partikel wurde in humanen CD14⁺-Monozyten, die aus dem Vollblut gesunder Spender isoliert und als Primärzellen verwendet wurden, getestet. Diese und von ihnen abgeleitete mononukleäre Phagozyten stellen aufgrund ihres noch zu taxierenden Beitrages zur CED-Pathogenese einen interessanten Ansatzpunkt für die partikuläre *Disease-Targeting*-Strategie bei CED dar.

Eine vollständige Endozytose der DEX-haltigen Mikropartikel durch diese Monozyten konnte mittels der Raman-Spektroskopie und der ELYRA-Hochauflösungsmikroskopie visualisiert und bezüglich der jeweiligen Vorteile verglichen werden. Im Kontext der Richtlinien zur pharmakologischen Therapieprüfung der Partikel wurden diverse Biokompatibilitätsversuche nach DIN EN ISO 10993-durchgeführt, in denen sich die Partikel als hämokompatibel und nicht zytotoxisch präsentierten. In MTT-Assays zeigte sich eine intrinsische zellstimulierende Wirkung der Partikel, welche sich ebenfalls in den Experimenten zur konzentrationsabhängigen Wirkungsanalyse der glukokortikoidhaltigen Partikel widerspiegelte. So konnte zwar durch die DEX-haltigen Partikel eine effektive

Suppression der durch LPS getriggerten Zytokinproduktion und damit ein therapeutischer Effekt dieser nachgewiesen werden, jedoch bewirkten inerte PLGA-Partikel konzentrationsabhängig eine verstärkte Expression der proinflammatorischen Zytokine TNF- α und IL-6.

Diese aktivierende, inflammationsähnliche Wirkung der Partikel muss grundsätzlich evaluiert werden. Zunächst sollten in diesem Zusammenhang die herkömmlichen Methoden hinsichtlich der partikelbasierten Interferenzen angepasst und den neuen Anforderungen synthetischer *Drug Delivery Systeme* (DDS) entsprechend optimiert werden. Partikuläre Einflüsse auf Zellen, u.a. der Internalisierungsprozess und die intrazelluläre Dekompensation dieser, müssen grundlegend analysiert werden.

Schlussfolgernd konnte in dieser Arbeit im Sinne eines *proof of concept*-Ansatzes die Eignung von DEX-haltigen PLGA-Mikropartikel in potentiellen *Disease-Targeting*-Strategien bestätigt werden, indem sie einen Beitrag zur Inflammationsbeschränkung leisten. Dennoch müssen vor einem therapeutischen Einsatz dieser innovativen Strategie weitere Studien durchgeführt werden, die zunächst ein grundlegendes Verständnis der komplexen *in vivo*-Situation entwickeln. Durch diese Kenntnis kann eine Imitation der biologischen Charakteristika und damit eine validere Bestätigung des therapeutischen Konzeptes realisiert werden. Darauf basierend kann ein zielgenaues *Targeting* der inflammatorischen Areale gewährleistet werden, indem vor allem die physikochemischen Eigenschaften der Trägermatrizes entsprechend modifiziert werden müssen. Hier erscheint die Kombination verschiedenster therapeutischer Strategien am vielversprechendsten, um die multifaktoriellen pathologischen Konstellationen der CED-Mukosa zu instrumentalisieren.

Die Modellsubstanz DEX könnte durch effektivere und präzisere Therapeutika ersetzt werden. Das große Potenzial dieser selektiven Pharmakotherapie besteht insgesamt in der hohen lokalen Wirkstoffkonzentration, bei gleichzeitiger Reduktion der systemischen Wirkungen. Auch können prinzipiell riskante Arzneimittelinteraktionen vermindert und eine Dosisreduktion ermöglicht werden, die letztlich der Complianceförderung der CED-Patienten dient. Möglicherweise ergeben sich aus diesen Ansätzen nebenwirkungsarme Behandlungen, um Komplikationen, Rezidive, voranschreitenden Organzerstörungen, Morbidität und Mortalität zu minimieren.

1. Einleitung

1.1 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen

Die CED umfassen einen Komplex aus idiopathischen, immunvermittelten entzündlichen Veränderungen des Gastrointestinaltraktes. Es werden zwei Hauptentitäten unterschieden: der Morbus Crohn und die Colitis ulcerosa, die sich in ihren Symptomen ähneln, jedoch differierende pathologische Merkmale aufweisen. Der meist lebenslange, chronische Verlauf dieser beiden Erkrankungen zeichnet sich durch rezidivierende Krankheitschübe, begleitet von einer kontinuierlich voranschreitenden Gewebeerstörung, aus. Die Erstdiagnose erfolgt dazu meist in jungen Jahren und die Inzidenz dieser Erkrankung steigt bisher unerklärlich weiter an. Galt sie früher als Erkrankung der westlichen Welt, kann man heute eine anwachsende globale Prävalenz verzeichnen (Kaplan 2015). Hierbei können zudem ethnische Unterschiede im Phänotyp der Erkrankung und deren Verlauf festgestellt werden, die die multifaktorielle Pathogenese der CED betonen.

Das komplexe klinische Bild und die Symptomschwere variieren individuell stark. Die Erkrankungen manifestieren sich klinisch oft mit Diarrhoen, Bauchschmerzen, Tenesmen, rektalen Blut- und Schleimabgängen, Übelkeit, Inappetenz sowie Zeichen der Malabsorption (Schmidt und Stallmach 2005, Suttorp N. et al. 2016). Aber auch allgemeine Symptome, wie beispielsweise Fieber, Gewichtsverlust, Abgeschlagenheit und Anämie begleiten die Patienten häufig. Das Krankheitsbild beinhaltet meist extraintestinale Manifestationen, die sämtliche Organsysteme umfassen können. Häufig betroffen ist das muskuloskelettale, das hepato-pankreatiko-biliäre und das dermatologische System, aber auch Augen, Nieren und Lungen werden im Rahmen der Erkrankung angegriffen (Levine und Burakoff 2011). Komplikationen, wie Abszesse, Fisteln, Perforationen und Stenosen, treten mit fortschreitender Erkrankung häufiger auf. Das Risiko einer malignen Entartung und fulminante Krankheitsverläufe belasten die Patienten oft zusätzlich (Dabritz et al. 2017).

1.1.1 Ätiologie und Pathogenese

Trotz intensiver Forschung und erheblichen Fortschritten im Verständnis der zugrundeliegenden Mechanismen ist die Pathogenese der CED nicht vollständig verstanden. Es existieren viele Hypothesen, im allgemeinen Konsens jedoch wird heutzutage eine multifaktorielle Genese angenommen. Der balancierte „Supraorganismus Magen-Darm“, der

ein physiologisches Zusammenspiel von kommensalen Mikrobiota, Nahrungsbestandteilen, Epithelzellen, bindegewebigen Zellen und Immunzellen darstellt, unterliegt genetisch determinierten Faktoren und Umweltfaktoren (z.B. Ernährung, Medikamente, Pathogene, Rauchen) (Abbildung 1). Physiologisch besteht dabei ein sich selbst regulierendes Gleichgewicht zwischen den vier Hauptfaktoren: Genetik, Immunregulation, exogene Umwelteinflüsse und mikrobielle Intestinalflora. Bei suszeptiblen Personen kann diese Homöostase kumulativ und interaktiv gestört werden, sodass eine dysregulierte, sich selbst aggravierende Entzündung, die CED, resultiert. Die ätiologischen Faktoren wirken sich allerdings unterschiedlich stark auf die Entwicklung der CED aus (Suttorp N. et al. 2016).

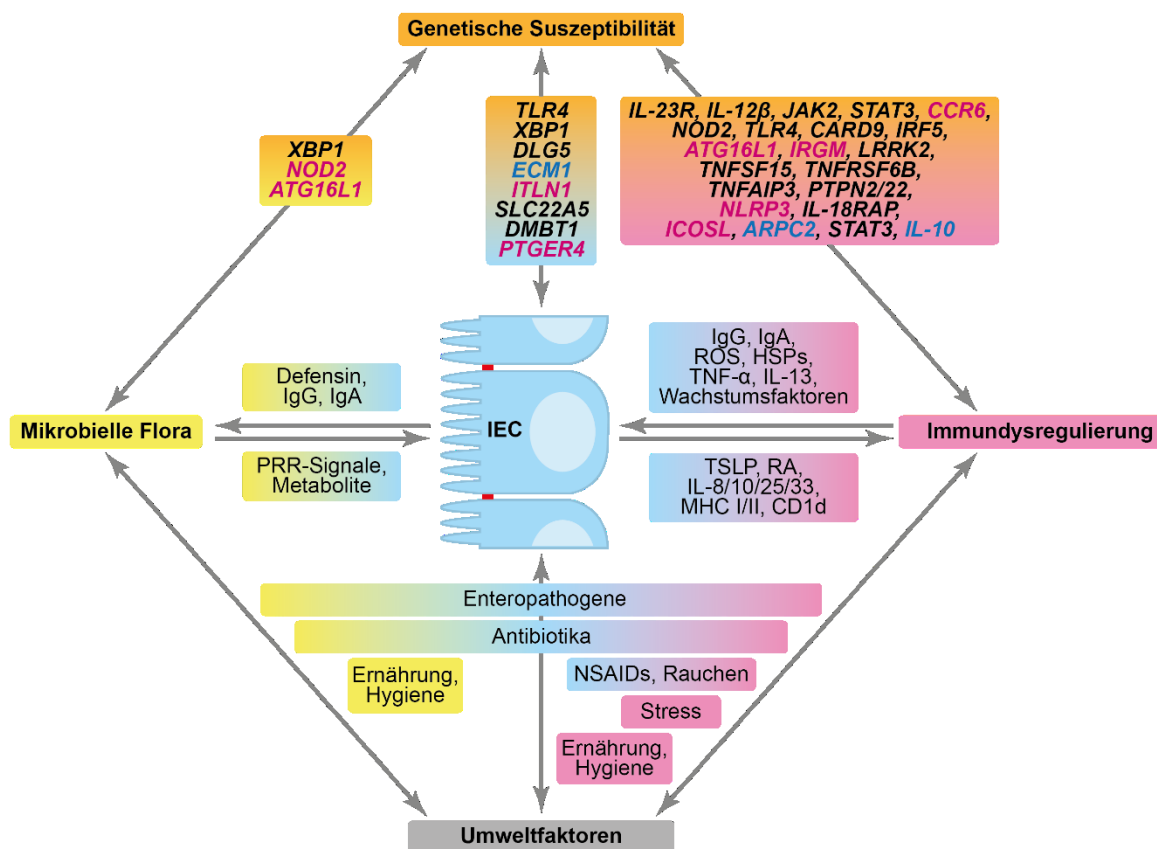


Abbildung 1: multifaktorielle Pathogenese der CED

Regulierung der Homöostase zwischen der gastrointestinalen Flora, intestinalen Epithelzellen (IEC) und dem mukosalen Immunsystem sowie deren jeweilige genetische und exogene Beeinflussung in farblicher Hervorhebung; magenta-Text: spezifische Gene für M. Crohn, blauer Text: spezifische Gene für Colitis ulcerosa, schwarzer Text: Assoziationen zu beiden Formen; Abkürzungen: HSP: Hitzeschockproteine, MHC: Haupthistokompatibilitätskomplex, NSAIDs: nicht steroidale Antiphlogistika, PRR: Pattern-Recognition-Rezeptor, RA: Retinsäure, TSLP: Thymus-Stroma-Lymphopoetin (modifiziert nach Kaser et al. (2010))

Genetische Überlegungen im Rahmen der CED-Ursachenforschung entwickelten sich aus epidemiologischen Beobachtungen, bei denen eine familiäre Häufung bei circa 10 % der Betroffenen festgestellt wurde. Genetische Syndrome (z.B. Turner-Syndrom, chronisch entzündliche Darmerkrankung mit frühem Erkrankungsbeginn) und auch Einzelgendifekte sind sehr seltene Extreme mit frühem Erkrankungsbeginn und meist schwerem therapierefraktärem Verlauf. Mehrheitlich handelt es sich jedoch bei adulten Patienten um polygene Erkrankungen. Genomweite Assoziationsstudien haben bereits 250 krankheitsassoziierte Genloci identifiziert, die das Erkrankungsrisiko unterschiedlich stark beeinflussen (Graham und Xavier 2020, Nameirakpam et al. 2020). Diese lassen sich jeweils anhand ihrer spezifischen Funktionen einteilen, woran die diversen pathophysiologischen Ansätze der Erkrankung deutlich werden. Erklärbar werden damit auch die multiplen klinischen Subtypen der beiden Hauptkrankheitsbilder. In Abbildung 1 sind beispielhaft Gene aufgeführt, die u.a. eine wichtige Rolle bei fundamentalen regulatorischen Prozessen im Rahmen der mukosalen Immunreaktion auf die kommensale Flora und Pathogene innehaben. Einige verantworten hingegen Autophagie, Apoptose, die angeborene Immunität oder die Entstehung, Unterhaltung sowie die Beendigung einer Inflammationsreaktion (Fiocchi 2009). Die Erforschung der klinischen Bedeutung dieser genetischen Risikofaktoren ist sehr dynamisch und lässt auf weitere Erkenntnisse bezüglich Diagnostik, Therapie und Prognose hoffen (Podolsky 2002).

Exogene Einflüsse scheinen die pathogenetischen Abläufe zu initiieren. Eine westlich geprägte Ernährungsweise, die als besonders fett- und zuckerhaltig, jedoch ballaststoffarm definiert ist, könnten das Risiko erhöhen (Sakamoto et al. 2005). Auch werden bspw. die Einnahme von oralen Kontrazeptiva, Antibiotikabehandlungen im 1. Lebensjahr, der Lebensstil, Übergewicht, geographische und soziale Gegebenheiten oder Rauchen als Einflussfaktoren diskutiert (Ananthakrishnan 2015, Cosnes 2010). Auch wird in diesem Zuge die „Hygiene-Hypothese“ debattiert. Diese beobachtet einen Anstieg von immunologisch bedingten Erkrankungen im Zusammenhang mit den verbesserten hygienischen Verhältnissen innerhalb der zivilisierten Gesellschaft. Durch eine geringere Antigenexposition, weniger Infektionen und parasitären Erkrankungen im Kindesalter, eine verstärkte Körperhygiene, kleinere Familien und dekontaminierte Nahrungsmittel erfolge ein ineffektiveres Training der Immunantwort und begünstige damit die Entwicklung von Ato-pien bis hin zu chronisch-entzündlichen Krankheiten (Feeney et al. 2002, Olszak et al. 2012). Auf der anderen Seite wird die Infektion mit Pathogenen aus der Umwelt als

Auslöser einer dann adäquaten intestinalen Entzündungsreaktion aufgeführt. Erwähnt wurden hier bereits Mykobakterien, Chlamydien, *Listeria monocytogenes* und *E.coli* (Palmela et al. 2018). Ein eindeutiges CED-auslösendes Pathogen wurde jedoch bisher nicht gefunden.

Das individuelle endogene gastrointestinale Mikrobiom hingegen gilt längst als wichtige Komponente der CED-Ätiologie. Diese einzigartige Zusammensetzung von Spezies (Bakterien, Viren, Protisten, Archae, Pilze, usw.) entwickelt sich dabei zunächst frühkindlich und unterliegt im Laufe des Lebens vielen Einflüssen. Physiologisch besteht zwischen dem Wirt und seinen Mikrobiota eine Symbiose, die sogar bishin zu epigenetischen Effekten mit dauerhaften Konsequenzen reicht (Wu und Wang 2018). Insgesamt ist aber die gastrointestinale Mikrobiota essentiell für die Entwicklung von immunologisch vermittelter Colitis, wie Studien an Tiermodellen beweisen konnten (Elson et al. 2005). Bei CED-Patienten unterscheidet sich wahrscheinlich ebendiese intestinale Flora von derjenigen nicht betroffener Personen. Diese Dysbiose wird in Studien durch abweichende mikrobielle Interaktionen und eine verminderte Speziesvielfalt belegt (Frank et al. 2007, Ott et al. 2004). Im Kontext dieser quantitativen bakteriellen Fehlbesiedlung sind einige präventiv auf inflammatorische Prozesse wirkende Bakterienstämme reduziert, wohingegen andere, die als Trigger fungieren dürften, verstärkt anzutreffen sind. Letztlich ist nicht geklärt, ob eine Dysbiose ursächlich für die Entstehung von CED ist oder lediglich als deren Folge auftritt (Chassaing und Darfeuille-Michaud 2011). Erwie-senermaßen können jedoch Probiotika, Antibiotika und auch Präbiotika im Rahmen der CED-Therapie einigen Patienten helfen, sodass eine Mitbeteiligung der Darmflora an der Pathogenese als bestätigt verstanden werden muss.

Grundsätzlich nimmt auch das intestinale Immunsystem in der CED-Pathogenese einen wichtigen Stellenwert ein. Dieses erfüllt die wichtige Aufgabe zwischen ungefährlichen und toxisch/ infektiösen Substanzen zu unterscheiden. Drei essentielle Mechanismen wirken hierbei zusammen: das intestinale Epithel mit seiner Muzinschicht, das angeborene und das adaptive Immunsystem. Das Epithel bildet eine kontinuierliche Barriere, welche durch die Sekretion protektiver, antiadhäsiver Substanzen im Mukus (z.B. Muzine der Becherzellen, IgA, antimikrobielle Peptide, α - und β - Defensine) verstärkt wird. Eine pathologisch veränderte Mukusschicht im Rahmen von CED beschrieb McGuckin et al. (2009). Epitheliale *Tight Junctions* verstärken die Barriere in dem sie Zellverbindungen

und - polaritäten aufrecht erhalten. Sie fungieren als Schutz vor Mikroorganismen oder einem parazellulärem Antigentransfer. Diese Barriereintegrität kann durch Umweltfaktoren (z.B. Analgetika, Nikotin) oder Infektionen beeinträchtigt werden und damit eine entzündungsauslösende mikrobielle Dislokation initiieren und die Entzündung durch einen *Circulus vitiosus* stetig unterhalten. Es ist bekannt, dass die dynamische Regulierung der *Tight Junctions* u.a. von bestimmten Zytokinen beeinflusst wird, sodass ein Zusammenhang zwischen Entzündungsreaktionen und der reduzierten Barrierefunktion des Epithels mit dem Verlust der *Tight Junction*-Proteine besteht. Eine erhöhte Durchlässigkeit der entzündeten Dickdarmschleimhaut wurde auch in Studien an CED-Darmbiopsien festgestellt (Schmitz et al. 1999).

Ein großes Spektrum an Immunzellen befindet sich im gesunden Gastrointestinaltrakt, deren Funktion durch eine Toleranz geprägt ist, sodass im Normalfall keine destruierenden Immunreaktionen gegen die kommensale Flora oder Nahrungsmittelantigene entstehen. Kommt es hingegen zu einer gastrointestinalen Infektion, wird das Immunsystem aktiviert, um die Pathogene zu eliminieren um anschließend erneut herunterreguliert zu werden, damit eine Geweberegeneration ermöglicht wird. Die zugrundeliegenden regulatorischen Mechanismen dieser Immuntoleranz gegenüber der physiologischen Flora sind jedoch noch nicht komplett verstanden (Ahluwalia et al. 2018). Vermutlich basiert sie im physiologischen Zustand u.a. auf der Anergie bzw. der Suppression antigenreaktiver T-Zellen. Eine Kommunikation zwischen Epithelzellen und T-Zellen des adaptiven Immunsystems stellen dabei antigenpräsentierende Zellen (APC) her, die dem angeborenen Immunsystem angehören. APCs präsentieren naiven CD4⁺-T-Zellen Antigene der kommensalen Flora und vermitteln dann die Differenzierung der T-Helferzellen in regulatorische T-Zellen. Diese aktivierten regulatorischen CD4⁺-T-Zellen kanalisieren eine immunologische Toleranz, da sie über die Expression des FoxP3-Transkriptionsfaktors die Sekretion von antiinflammatorischen Zytokinen (z.B. Interleukin (IL) -10, IL-35, Transforming Growth Factor (TGF) -β) und damit die Entzündungsreaktion supprimieren. Ebendiese vielschichtige Regulation der Immunantwort scheint bei CED chronisch gestört zu sein und führt zu wiederkehrenden Darmentzündungen, vermutlich auf der Grundlage einer Fehlinterpretation der kommensalen Darmflora (Suttorp N. et al. 2016).

Während das angeborene Immunsystem bei der Initiierung von Entzündungsreaktionen eine große Bedeutung besitzt, spielt das adaptive Immunsystem eine zentrale Rolle beim Fortschreiten der bei CED beobachteten, chronischen Entzündungsereignisse. Nachfolgend werden nur einige Ausgewählte der bereits identifizierten Immunopathologien erläutert. Störungen der Immunregulation könnten z.B. durch ein Ungleichgewicht zugunsten der entzündungsfördernden Immunabwehr mit pathologisch gesteigerten T-Zell-Reaktionen entstehen. Ein Überwiegen von T_H1 - oder T_H2 -Untergruppen könnte eine wichtige Rolle bei der Entwicklung und Unterhaltung der CED spielen (Ahluwalia et al. 2018). So konnte beim M. Crohn eine T_H1 - und T_H17 -Zell-Dominanz ermittelt werden, wohingegen bei der Colitis ulcerosa mehr Phänomene der T_H2 -domierten Immunantwort nachzuweisen sind. Dabei stimulieren vor allem die Zytokine der T_H1 -Zellen Makrophagen, welche nachfolgend Tumornekrosefaktor (TNF) α produzieren und sezernieren. Unter den proinflammatorischen Zytokinen ist hauptsächlich TNF als Faktor im Kontext der Pathogenese des Morbus Crohn diskutiert worden. Es wird angenommen, dass es für die Verstärkung und Aufrechterhaltung der chronischen Entzündung bei CED verantwortlich ist, indem es die Transkription anderer entzündungsfördernder Zytokine begünstigt, Adhäsionsmoleküle im Endothel hochreguliert, Gewebe-Metalloproteinasen aktiviert und die phagozytische Aktivität von Makrophagen aktiviert. Auch andere wichtige Zytokine des angeborenen Immunsystems wie IL-6, von denen berichtet wird, dass sie an der Aufrechterhaltung der T-Zell-Überlebenssignale beteiligt sind, und IL-1 β , das an der Rekrutierung von Granulozyten und der Steigerung der T_H17 -Aktivität beteiligt ist, könnten potenzielle therapeutische Ziele für die CED-Behandlung sein (Neurath 2014).

Ob die CED-typische Inflammationsreaktion nun primär eine Aberration des Mukosa-assoziierten Immunsystems darstellt oder sekundär im Rahmen einer unangemessenen, anhaltenden Stimulation (z.B. durch einen Barrieredefekt oder die Fehlreaktion auf die luminale Flora) entsteht, ist nicht ausreichend geklärt (Podolsky 2002). Um die Optionen der zukünftigen CED-Therapie zu verbessern, müssen weitere Forschungen zum Verständnis der CED-Pathogenese und den vielfältigen ätiologischen Faktoren vorangetrieben werden. Mit der Analyse der zahlreichen Risikofaktoren könnte auch die Prävention intensiviert werden.

1.1.2 Therapie und deren Prognose

Grundsätzlich ist in der Therapie zwischen den beiden Grundformen M. Crohn und Colitis ulcerosa zu unterscheiden. Auch muss zwischen der Behandlung eines akuten Schubes und der Rezidivprophylaxe unterschieden werden. Die Therapie ist abhängig von der Krankheitsaktivität, dem Ausbreitungsmuster, bestehenden Symptomen und möglichen Komplikationen sowie dem Patientenalter. Oberste Priorität in der Behandlung hat die Reduktion der Entzündung, die die Symptome auslöst. Im besten Fall kann nicht nur eine Linderung der Symptome, sondern auch eine langfristige Remission und ein verringertes Komplikationsrisiko erreicht werden. Die CED-Behandlung umfasst grundsätzlich entweder eine medikamentöse oder eine operative Therapie. Aber auch supportive Maßnahmen sind in dieses multimodale Konzept einzuschließen. Ziel ist es ebenfalls die Lebensqualität der Patienten zu verbessern und Nebenwirkungen zu minimieren sowie eine Mukosaregeneration (*mucosal healing*) zu ermöglichen.

Im Rahmen der medikamentösen Therapie werden verschiedene Wirkstoffe einem *step up* - Stufenschema folgend angewandt. Diese werden je nach Schweregrad sowie Lokalisation der Entzündung und Verträglichkeit eingesetzt. Dabei müssen unterschiedliche Wirkungsweisen und verschiedene Nebenwirkungspotentiale berücksichtigt werden. Zum Einsatz kommen: 5-Aminosalicylsäure (ASA)-Präparate (z.B. Mesalazin, Sulfasalazin), topisch und systemisch wirkende Glukokortikoide (topisch: Budesonid, systemisch: Prednisolon, Methylprednisolon), Immunsuppressiva (Azathioprin, 6-Mercaptopurin, Methotrexat, Ciclosporin, Tacrolimus) und Biologika (anti-TNF-Antikörper, anti-IL-12/IL-23-Antikörper, anti-Integrin-Antikörper) (Suttorp N. et al. 2016).

In der langfristigen Behandlung zum Remissionserhalt können diese Medikamente allerdings schwerwiegende Nebenwirkungen und Komplikationen, wie z.B. das erhöhte Risiko für Malignome oder Infektionen auslösen (Engel und Neurath 2010). Beispielhaft sollen für alle Substanzgruppen einige, für die Patienten intolerable Nebenwirkungen wie Übelkeit und Erbrechen, Gewichtszunahme, Kopfschmerzen, Agranulozytose, Leberfibrose, Pankreatitis, Osteoporose, Verminderung der Spermaqualität, Haarausfall, Nierenfunktionsstörungen, Geschmacksveränderungen, interstitielle Pneumonie, schwere Infektionskrankheiten und Neoplasien genannt werden (Suttorp N. et al. 2016). Die Liste der unerwünschten Wirkungen ist insgesamt lang; diese führen nicht selten zu einem

Therapieabbruch. Die therapeutische Einstellung der CED-Patienten bleibt damit ein Balanceakt zwischen Nutzen und Schaden.

Zudem werden in der klinischen Praxis immer noch zu häufig unvollständige oder gar fehlende Reaktionen auf die eingeleitete Therapie konstatiert. Ein monotherapeutisches Konzept wird der komplexen, multifaktoriellen Pathogenese nicht gerecht. Daher werden zunehmend synergistische Kombinationen und neuartige lokale Applikationsformen (Klysmen, Freisetzungverzögerungskapseln, Schäume, Suppositorien, Medikamente mit hohem *First-pass*-Effekt, usw.) angewandt (Engel und Neurath 2010, Klotz und Schwab 2005). Die Erfolgsraten stiegen damit in den letzten Jahren, dennoch ist der therapeutische Erfolg nicht immer gegeben und vor allem das Sicherheitsprofil hinsichtlich der Nebenwirkungen ist weiterhin nicht zufriedenstellend (Stallmach et al. 2015).

Die klassischen Therapien unterstützend werden zunehmend auch komplementär-medicinische Konzepte von Patienten gewünscht. Der supportiven Symptomkontrolle dienen u.a. Antidiarrhoika, Schmerzmittel, Antioxidantien oder auch pflanzliche Präparate wie Aloe Vera Gel oder *Boswellia serrata*. Die Ernährungstherapie hat ebenfalls einen großen Einfluss, besonders die Verwendung von Prä- und Probiotika (Pithadia und Jain 2011, Kruis 2013). Die spezifische enterale Ernährung wurde vor allem in der pädiatrischen CED-Therapiesparte erfolgreich eingesetzt. Sie verbesserte hierbei nicht nur den Ernährungszustand, sondern schließt auch die unerwünschten Nebenwirkungen, z.B. von Steroiden, aus (Cameron et al. 2013).

Ein großer Teil der Patienten muss im Krankheitsverlauf operiert werden. Gründe hierfür sind vielfältig, umfassen meistens jedoch eine Therapieresistenz oder fulminante Verläufe. Klassische Indikationen bei der Colitis ulcerosa stellen das toxische Megacolon, eine massive Blutung, Dysplasien oder Perforationen dar. Im Zuge der Crohn-Krankheit sind es häufig Obstruktionen, Strikturen, Fisteln, Abszesse und Blutungen.

In den vergangenen Jahren haben sich trotz regelmäßiger Anpassungen der Therapieschemata die Notwendigkeit für eine Hospitalisierung, die Operationsrate, die Morbidität und auch die vorzeitige Mortalität aufgrund von CED nicht signifikant verbessert (Stallmach et al. 2015). Die aktuellen Therapieoptionen müssen demnach optimiert werden. Eine der Pathogenese zugrundeliegende, kausale Therapie wäre der Idealfall, sodass weitere Forschungen diesbezüglich notwendig sind. Dass diese dann gezielt verabreicht werden kann und nicht mehr systemisch appliziert werden müsste, ist ein

vielversprechendes Zukunftsmodell für die CED-Patienten. Ob damit letztlich sogar eine Heilung der chronischen Erkrankung möglich wird bleibt abzuwarten.

1.2 Disease-Targeting-Strategie

1.2.1 Anwendung im Kontext der CED-Therapie

Um die Remissionsraten bei CED-Patienten zu potenzieren, muss zwingend eine Effektivitätssteigerung der Therapie erfolgen. Dabei müssen zusätzlich die therapieabhängigen, systemischen Nebenwirkungen minimiert werden. Die anvisierte lokale Therapie als neues Konzept zielt darauf ab die Wirkung der therapeutisch eingesetzten Substanzen auf den Ort der Entzündung zu begrenzen. Dies würde z.B. keine systemische Suppression des Immunsystem bewirken. Die gezielte Behandlung wird in dem pharmazeutischen Konzept des *Drug Delivery Systems* etabliert. Ziel ist es hierbei eine sehr hohe therapeutische Arzneimittelkonzentration spezifisch am Wirkort, d.h. am Ort der Entzündung, zu erreichen und aufrechtzuhalten. DDS zielen somit auf die Erhöhung der pharmakologischen Aktivität und der Bioverfügbarkeit sowie die Verbesserung der physikochemischen Eigenschaften und der Stabilität des Wirkstoffes ab. Sie dienen auch der Verringerung der substanzspezifischen Nebenwirkungen, Wechselwirkungen und Einnahmeintervalle (Li et al. 2019, Collnot et al. 2012). Das DDS-Konzept wird z.B. auch in der Therapie von Tumoren, Infektionen, ZNS-Störungen und anderen Autoimmunerkrankungen zielstrebig erprobt.

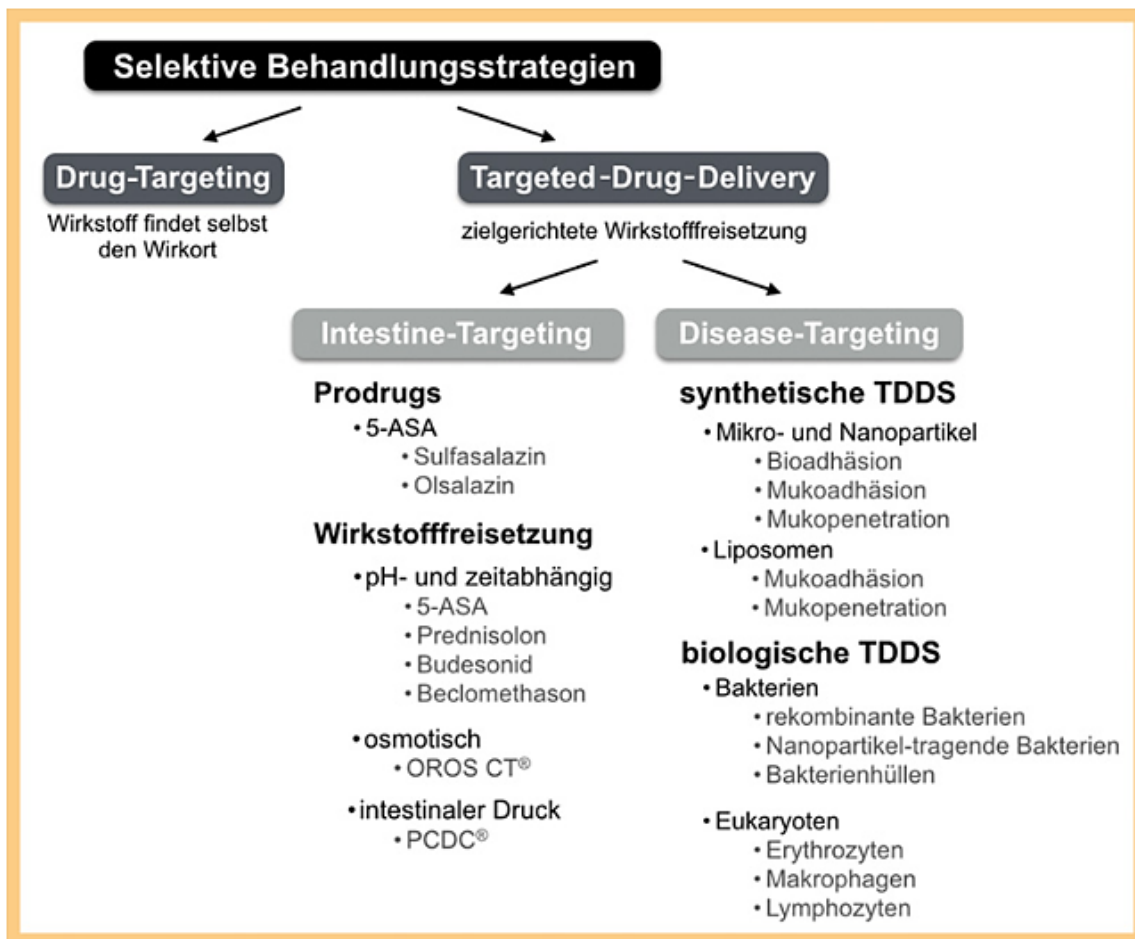


Abbildung 2: selektive Behandlungsstrategien bei CED

Darstellung der Einteilung in die allgemeinen Gruppen „Drug-Targeting“ und „Targeted-Drug-Delivery“ (TDDS) mit ihren jeweiligen Definitionen; Aufführung der verwendeten Mechanismen der gezielten Therapie, teilweise mit vorhandenen Pharmakonbeispielen oder Erwähnung der jeweiligen Technologie/Trägermatrix (übernommen von Lautenschlager et al. (2015))

Lautenschlager et al. (2015) diskutierten schon frühzeitig das Konzept der organspezifischen Therapie mit potentiellen selektiven Behandlungsstrategien bei CED (Abbildung 2). Es wurde hierbei in zwei grundlegende pharmazeutische Konzepte, das *Drug-Targeting* und das *Targeted-Drug-Delivery*, untergliedert. Beispielhaft für das *Drug-Targeting* bei CED sind therapeutische Antikörper, wie die derzeitigen Biologika (z.B. Anti-TNF-Antikörper). Im Rahmen des *Targeted-Drug-Delivery* wird der Wirkstoff durch spezielle Trägermatrizes zum spezifischen Zielort „transportiert“. Zusätzlich wird hierbei unterschieden, ob das Pharmakon gezielt in einen gewünschten Darmabschnitt befördert wird (*Intestine-Targeting*) oder ob es unabhängig von der jeweiligen intestinalen Lokalisation spezifisch in der pathologischen Entzündung freigesetzt wird (*Disease-Targeting*). Dem *Intestine-Targeting* sind topische Applikationsformen wie bspw. Schäume, Klysmen, Suppositorien und Steroide mit hohem *First-pass*-Effekt zuzuordnen, aber auch selektive

perorale Arzneiformulierungen, die erst aufgrund einer spezifischen Darmabschnitts-abhängigen, intestinalen Bedingung (z.B. pH-Wert, luminaler oder osmotischer Druck, Passagezeit, lokale Enzyme) aus der Trägermatrix freigesetzt werden (Collnot et al. 2012). Auch *Prodrugs*, die erst nach der intestinalen enzymatischen Biotransformation wirksam werden, zählen zu dieser Untergruppe.

Um die CED-typische intestinale Inflammation gesondert zu adressieren, ist vor allem die *Disease-Targeting*-Strategie geeignet. Durch diese therapeutische Form wäre theoretisch eine gezielte Wirkstofffreisetzung ohne systemische Wirkung möglich. Die neuartigen Anti-Integrin-Antikörper Vedolizumab und Etrolizumab, die spezifisch die leukozytäre Adhäsion an inflammatorische Endothelzellen nur im Darm blockieren, können u.a. dieser Strategie zugeordnet werden (Thomas und Baumgart 2012). Die biologische Variante dieser Strategie, z.B. in Form von eukaryontischen Zellen und deren Bestandteilen (wie z.B. Erythrozyten, Immunzellen, Exosomen, leere Zellmembranen), präsentiert dabei eine vielversprechende - teils noch theoretische - Option. Auch apathogene Bakterien und Viren (wie z.B. rekombinante Bakterien, bakterielle/virale Zellhüllen, Mikrobots (nanopartikeltragende Bakterien/Viren)) zählen zu den optionalen Werkzeugen dieser biotechnologischen Strategieform (Li et al. 2019, Lautenschlager et al. 2015). Regulatorische Auflagen und auch Patientenängste (bzgl. einer „Gentherapie“) begrenzen zurzeit deren Entwicklung zusätzlich.

Einen wichtigen Bereich des *Disease-Targetings* erfüllen die synthetischen Wirkstoffträger. Hierfür werden biokompatible polymere, liposomale und auch anorganische Matrices im Nano- und Mikrometerbereich verwendet, die oral oder rektal verabreicht werden können. Aufgrund spezifischer Modifikationen hinsichtlich ihrer Oberflächen- bzw. physikochemischen Eigenschaften erfolgt eine spezifische Anlagerung an das inflammatorische Darmepithel und nachfolgend eine gezielte Freisetzung und Aufnahme des Wirkstoffes am Zielort. Die Veränderungen der intestinalen, epithelialen Barriere bei CED (siehe Abschnitt 1.1.1) sowie das Vorhandensein von erosiven und ulzerösen Läsionen in der entzündeten und defekten Darmschleimhaut können diese Prozesse verstärken (Lautenschlager et al. 2015). Diese Partikel müssen bezüglich ihrer jeweiligen Eigenschaften entsprechend funktionalisiert werden. Es werden die partikulären Merkmale soweit verändert, dass die Wirkstoffträger eine spezifische Zielstruktur oder deren

individuelle Eigenschaften präzise ansteuern. Aber auch durch Einflussnahme z.B. an der Wirkstoffbeladung oder am getriggerten Freisetzungsprozess kann die Wirkung des Pharmakons gezielt verabreicht werden. Bezüglich dieser beschriebenen Eigenschaften existieren diverse Studien, dennoch sind die idealen Merkmale für ein partikuläres Trägersystem, welches selektiv die inflammatorische Mukosa erreicht, noch nicht weitreichend bekannt (Collnot et al. 2012).

Schmidt et al. (2013) konnten für inerte PLGA-Mikropartikel im Gegensatz zu Nanopartikel eine selektivere Akkumulation in den entzündlich veränderten CED-Schleimhautbereichen beim Menschen *in vivo* mittels konfokaler Laserendoskopie nachweisen, sodass diesen im Sinne des *CED-Disease-Targeting* eine hohe therapeutische Effizienz und Spezifität zugeschrieben werden könnte. Auch der gewünschte Verbleib der Partikel in der Mukosa konnte von der Arbeitsgruppe beobachtet werden. Grundsätzlich muss die Biodistribution solcher partikulären DDS gründlich kontrolliert werden.

Bezüglich spezieller Oberflächen-, Material- und Formeigenschaften oder auch der effektivsten Applikationsroute konnte bisher noch kein wirksames Konzept erstellt werden. Auch ist ein besonders geeigneter Wirkstoff, der letztlich zur CED-Behandlung beitragen soll und in der Trägermatrix verkapselt wird, noch nicht identifiziert und definiert worden. Theoretisch könnte jeder Wirkstoff, auch Biologika, Proteine, Peptide, Nukleotide oder gar innovativere Ansätze, auf diese Art gezielt transportiert werden. Optimierungen hinsichtlich der *Disease-Targeting*-Strategie, die die exakte CED-Pathogenese ausnutzen um ein sicheres und hochwirksames Therapiekonzept zu entwerfen, müssen demnach vorgenommen werden.

1.2.2 Disease-Targeting-Strategie basierend auf Mikropartikeln

Als Mikropartikel werden Teilchen mit einem Durchmesser von 1-1000 μm bezeichnet. Im medizinischen und pharmazeutischen Gebrauch werden sphärische Teilchen im unteren Mikrometerbereich verwendet. Dabei werden bioabbaubare Polymere als innovative Arzneistoffträger für *Disease-Targeting*-Strategien intensiv erforscht. Man kann dabei Mikrokapseln und Mikrosphärulen unterscheiden. Bei Mikrosphärulen ist der Arzneistoff in der Polymermatrix gelöst oder dispergiert und somit relativ homogen verteilt, wohingegen bei Mikrokapseln der Wirkstoff im zentralen, polymerummantelten Hohlraum eingeschlossen ist (Müller et al. 1998).

Bei der Auswahl eines geeigneten Trägermaterials für Mikropartikel müssen bestimmte Kriterien erfüllt werden:

1. physiologisch unbedenklich (biokompatibel),
2. bioabbaubar (resorbierbar),
3. Abbauprodukte dürfen nicht toxisch, immunogen, kanzerogen oder teratogen sein.

Ebenfalls sollte die Substanz physikochemische und mechanische Eigenschaften vorweisen, die je nach beabsichtigtem Ziel variiert werden können. Das Material darf nicht sehr kostenintensiv sein und muss leicht verarbeitet werden können. Das Polymer Poly(lactid-co-glycolid) (PLGA) ist dabei einer der attraktivsten Kandidaten für die Herstellung von *Drug-Delivery*-Systemen (Makadia und Siegel 2011). In zahlreichen Studien wurde es bereits als Trägermatrix für Medikamente, Chemotherapeutika (Mo und Lim 2005), Proteine (Gu et al. 2007), auch Impfstoffe (Cui et al. 2007) und verschiedene andere Makromoleküle wie DNA, RNA (Murata et al. 2008) und Peptide (D'Souza et al. 2004) untersucht. Dabei wurde es in die verschiedensten Formen wie z.B. Mikrosphären, Mikrokapseln, Nanopartikeln, Pellets, Implantate und Schäume gebracht und getestet. Neben PLGA werden auch andere synthetische Biopolymere (Polyester, Polyanhydride, Polyorthoester, Polyphosphazene, Polycaprolactone, Phospholipide) oder natürliche Polymere (z.B. Gelatine, Chitosan, Kollagen, Albumin) als bioabbaubare Matrizes für Arzneistoffträgersysteme untersucht (Domb et al. 1992).

PLGA als Partikelmatrix

PLGA ist ein Co-Polymer aus Milch- und Glykolsäure. Die Monomere Lactid und Glykolid werden in unterschiedlichen Verhältnissen eingesetzt und bedingen unter anderem die Eigenschaften des entstehenden Produktes. Der Einsatz von PLGA beim Menschen ist bereits ausreichend getestet und von der *U.S. Food and Drug Administration* (FDA) zugelassen. Als biokompatibles und biologisch abbaubares Polymer mit regulierbaren Eigenschaften, welches zudem zu einer Vielzahl von Formen verarbeitet werden kann, findet PLGA bereits umfangreiche biomedizinische Anwendung (z.B. in diversen Nahtmaterialien, (orthopädischen) Knochenfixiervorrichtungen, Implantaten, Gerüsten für Gewebezüchtung und Depotarzneiformen) (Jain 2000, Avgoustakis 2005). Eine systemische Toxizität oder allergische Reaktionen konnten bisher nicht beobachtet werden (Avgoustakis 2005). Es wurde jedoch gezeigt, dass die Implantation von PLGA auch eine milde entzündliche Reaktion hervorrufen kann, die als Fremdkörperreaktion

angesehen werden könnte. Diese Wirtsreaktion war polymer-, gewebe-, organ- und artenabhängig (Shive und Anderson 1997).

PLGA-Polymere können hinsichtlich ihrer Zusammensetzung (je nach Verhältnis vom Lactid- zum Glykolidanteil), ihres Molekulargewichtes und ihrer Endgruppe unterschieden werden. Findet sich ein „H“ im Handelsnamen (wie RG 502H), handelt es sich um eine hydrophilere Variante des Polymers, welches „*uncapped*“ ist, sprich am Kettenende eine freie Carboxylgruppe trägt. Ohne „H“ ist PLGA „*capped*“ und trägt einen Milchsäureethylester am Kettenende, wodurch das Polymer lipophiler wird. Mit zunehmendem Glykolidanteil kann ebenfalls die Hydrophilie des Polymers gesteigert werden, wodurch Wasser schneller eindringen kann. Der Polymer-Abbau und die damit verbundene Freisetzung werden damit beschleunigt. Ebenfalls werden der Kristallinitätsgrad und weitere Eigenschaften des Polymers über seine Monomere, insbesondere über die Lactid-Stereoisomerie bestimmt. PLGA mit L-Polylactid (PLA) ist kristallin, mit D,L-PLA amorph. D,L-PLA bewirkt dabei eine homogenere Wirkstoffverteilung in der PLGA-Matrix und wird daher bevorzugt (Jain 2000, Avgoustakis 2005).

Für diese Arbeit wurde D,L-PLGA im Verhältnis 50:50 verwendet, welches laut Miller et al. (1977) die schnellste Degradation zeigte. Es stellt in der bisherigen Forschung das am häufigsten eingesetzte Material zur kontrollierten Freisetzung dar.

Polymerabbau/ -erosion und Metabolisierung

Polymerabbau (oder auch Degradation) beschreibt den Vorgang der Spaltung von Esterbindungen im Polymerrückgrat, die chemisch, mechanisch, thermisch und auch durch Strahlung ausgelöst werden kann. Chemisch erfolgt der PLGA-Abbau durch spontane Hydrolyse der Esterbindung. Dabei kann der Abbau beschleunigt werden, wenn z.B. die Hydrophilie zunimmt, die Temperatur erhöht wird, das Molekulargewicht sinkt, sich der pH-Wert in einen sauren Bereich verschiebt oder amorphe Polymere verwendet werden. Ebenfalls entstehen bei der hydrolytischen Spaltung saure Carboxylfunktionen, die den Abbau des restlichen Polymers autokatalytisch beschleunigen. Dies führt zu einem heterogenen Matrixabbau mit einer schnelleren Degradation im Partikelinneren (Park 1995), wo sich die sauren Abbauprodukte aufgrund eines mangelndem Abtransportes ansammeln (Li und Schwendeman 2005). Dieses Phänomen ist vor allem bei steigender Partikelgröße von Bedeutung (Dunne et al. 2000, Siepmann et al. 2005).

Durch die Anwesenheit bestimmter Enzyme (z.B. Proteinase K, Bromelain) oder während der gleichzeitigen Inkubation mit Mikroorganismen konnte experimentell ebenfalls eine Degradationssteigerung durch die einsetzende enzymatische Hydrolyse bestätigt werden (Salthouse und Matlaga 1976, Hakkarainen 2002). Außerdem finden sich in der näheren Zellumgebung freie Radikale und saure Stoffwechselprodukte, die wiederum den Abbau beschleunigen. Dies ist insbesondere für die in dieser Arbeit durchgeführten *in vitro*-Experimente der pharmakologischen Aktivität von Bedeutung. Hier werden die hergestellten Partikel dem enzymhaltigen Milieu humaner Zellen ausgesetzt, vor allem wenn eine Internalisierung in die Zellen stattfindet. van Apeldoorn et al. (2004) konnten diese beschriebene Beschleunigung des PLGA-Mikropartikelabbaus durch die Phagozytose durch Makrophagen aufzeigen. In Bezug auf die Wirkstofffreisetzung werden daher Unterschiede zwischen der sterilen Freisetzungskinetik und den Freisetzungsvorgängen in der Zelle erwartet.

Bei der Hydrolyse entstehen wiederum die Monomere Milch- und Glykolsäure. Diese beiden Monomere sind Nebenprodukte verschiedener physiologischer Stoffwechselwege in Organismen (Avgoustakis 2005). D-Lactid wird unverändert renal ausgeschieden. Wohingegen L-Lactid und Glykolsäure im Citratzyklus zu CO₂ metabolisiert und pulmonal eliminiert werden (Brady et al. 1973). Da der Körper die beiden Monomere vollständig metabolisieren kann, besteht für PLGA eine hohe Biokompatibilität, die in verschiedenen Studien bewiesen wurde (Fournier et al. 2003).

Die Wirkstofffreisetzung aus Trägermatrices, die aus Makromolekülen, wie z.B. PLGA bestehen, ist eng verbunden mit dem Zerfall des Polymers. In diesem als Erosion beschriebenen Prozess findet die Entfernung von abgespaltenem, degradiertem Matrixmaterial in das Umgebungsmedium statt. Die Erosion wird also durch die Degradation initiiert (Gopferich 1996). Dabei ist dieser Vorgang deutlich komplexer und wird von vielen Faktoren, wie z.B. dem Quellverhalten des Polymers, der Diffusion von Wasser in die Matrix, der Löslichkeit und den Diffusionseigenschaften der Monomere und Oligomere, der Größe und Porosität der Matrix sowie den Veränderungen von Ultrastruktur und Kristallinität der erodierenden Polymermatrix, beeinflusst (Gopferich 1996). Die Erosion kann grundsätzlich in zwei Prinzipien eingeteilt werden: die heterogene Oberflächen- und die homogene Bulkerosion (von Burkersroda et al. 2002). Der stattfindende Prozess ist unter anderem abhängig von der Partikelgröße und der Wasserdiffusion in die Matrix. Die meisten Autoren beschrieben in früheren Arbeiten für PLGA eine Bulkerosion, bei der

das Molekulargewicht kontinuierlich abnimmt. Aktuellere Arbeiten zeigen hingegen, besonders für größere Partikel, einen heterogenen Abbauprozess aus Gründen, die bereits als autokatalytisch bedingt beschrieben wurden (Siepmann et al. 2005). Beide Prinzipien sind auch gleichzeitig möglich.

Wirkstofffreisetzung

Die Wirkstofffreisetzung aus der PLGA-Polymermatrix ist ein hochkomplexer Prozess, der bereits in zahlreichen Ansätzen erforscht und erklärt wurde. Fredenberg et al. (2011) fasste den „Weg“ der Wirkstofffreisetzung in vier mögliche Mechanismen zusammen:

- Diffusion durch wassergefüllte Poren
- Diffusion durch das Polymer
- „*Osmotic pumping*“ in nicht-quellenden Systemen (selten bei PLGA-Wirkstoffträgern, da diese bei Wasserkontakt zum Quellen neigen)
- Erosion ohne Wirkstofftransport.

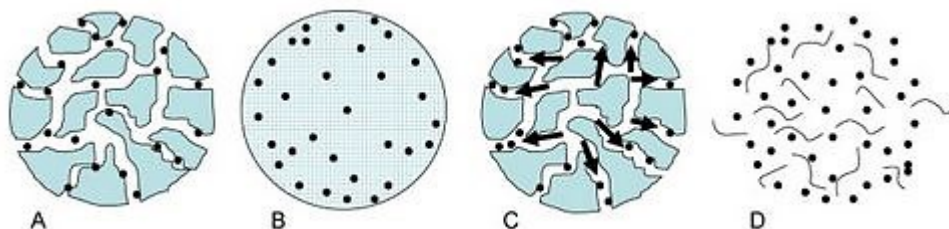


Abbildung 3: partikuläre Wirkstofffreisetzungsmechanismen

A) Diffusion durch wassergefüllte Poren, B) Diffusion durch das Polymer, C) *Osmotic pumping*, D) Erosion (übernommen von Fredenberg et al. (2011))

Diese Prozesse können auch parallel oder zeitlich gestaffelt ablaufen, wobei nicht immer klar ist, welcher Prozess der dominierende ist. Nebenher laufen zudem viele verschiedene, den Polymerabbau betreffende, geschwindigkeitsdeterminierende Mechanismen ab. Beispiele hierfür sind Polymer-Wirkstoff-Wechselwirkungen, Wirkstoff-Wirkstoff-Wechselwirkungen, Wasseraufnahme, pH-Wert-Veränderungen, Plastifizierung von PLGA durch Wasser und Porenbildung oder -verschluss (Fredenberget al. 2011, Blasi et al. 2005).

Dabei zeigt die Wirkstofffreisetzung aus PLGA-Partikel meistens einen triphasischen Verlauf (Fredenberget al. 2011). Sie kann aber auch biphasisch verlaufen (Klose et al. 2006). Phase I wird dabei als „*burst release*“ bezeichnet. Hier kommt es bei Kontakt mit dem FreisetzungsmEDIUM (Wasser) innerhalb von Minuten bis Stunden zu einer

schnellen Freisetzung von nicht verkapseltem, an der Partikeloberfläche adhätierendem Wirkstoff (Wang et al. 2002, Huang und Brazel 2001). Dieser Effekt ist dabei vom Anteil des eingebrachten Wirkstoffes abhängig und steigt mit höherem initialem Beladungsgrad (Gasmi et al. 2016). Die II. Phase beschreibt den Beginn der Degradationsprozesse. Sie ist gekennzeichnet durch eine geringe Wirkstoffabgabe. Es findet eine Hydratation der Partikel mit Aufhebung der Wasserstoffbrückenbindungen und der van der Waalschen Kräfte statt. Im Partikel laufen dadurch die hydrolytischen Spaltungen der Esterbindungen ab, die zu einer Abnahme der mittleren Molekülmasse führen (Wang et al. 1990). Der Wirkstoff diffundiert dabei entweder durch die Polymermatrix oder durch die wenigen vorhandenen Poren, die jedoch im Abbau- und Erosionsprozess zunehmen und diesen vorantreiben (Gu et al. 2016). Er kann jedoch aufgrund der noch intakten Mikrosphäre nicht oder kaum freigesetzt werden (Han et al. 2016). In der III. Phase folgt aufgrund des einsetzenden Masseverlustes der Partikel dann erneut eine schnelle Wirkstofffreigabe. Es erfolgt ein starkes Anschwellen der Partikel, deren Polymerstruktur ausreichend instabil geworden ist. Die entstandenen und weiterhin entstehenden Monomere und Oligomere des Polymers werden partiell gelöst und erodieren, sodass der Wirkstoff freigegeben wird (Gopferich 1996).

Die Kenntnis der Freisetzungsmechanismen und der physikalisch-chemischen Prozesse, die die Freisetzungsrates beeinflussen, ist für die Entwicklung von DDS mit kontrollierter Freisetzung von entscheidender Bedeutung.

Biokompatibilität

Biokompatibilität definiert die Verträglichkeit zwischen einem künstlichen und einem biologischen System. Als biokompatibel wird dabei ein Material bezeichnet, dass bei direktem Kontakt mit vitalem Gewebe keinen negativen Einfluss auf dessen Stoffwechselaktivität ausübt. Die Bioverträglichkeit eines neuen medizinischen Werkstoffes wird dabei nach der Normenreihe DIN EN ISO 10993 1-20 zertifiziert, bevor er zugelassen wird. Zusätzlich beinhaltet die Reihe physikalisch-chemische Prüfungen und Analysen von gelösten Substanzen aus dem zu untersuchenden Werkstoff.

Zellkulturen bilden dabei den Ausgangspunkt für die Beurteilung von biologischen Reaktionen auf den Fremdstoff. Diese sind vorteilhaft bei der Prüfung spezifischer Wechselwirkungen auf Zell- und Molekülebene und können unter gleichen Bedingungen in

großen Versuchsreihen durchgeführt werden. Ebenfalls zeigen sie eine hohe Empfindlichkeit gegenüber toxischen Stoffen. Allerdings werden in diesen Experimenten nicht die interzellulären Interaktionen der komplexen *in vivo*-Mechanismen widerspiegelt, da nur eine Zelllinie separat betrachtet wird. Ebenfalls fehlen den kultivierten Zellen die physiologischen Ausscheidungsprozesse um Zelldebris und Giftstoffe zu entfernen, sodass die Materialtoxizität überschätzt werden kann. Durch die begrenzte Lebensdauer der Zellkulturen kann zudem nur die akute Toxizität eruiert werden (Pizzoferrato et al. 1994, Wintermantel und Ha 2009). Die für diese Arbeit durchgeführten Zellkultur-Biokompatibilitätstests können damit nicht kritiklos auf die *in vivo*-Anwendung der Partikel übertragen werden (Kroll et al. 2009). Vor allem Tumorbildung, Sensibilisierung durch Allergene und komplexe allergische Reaktionen oder Gewebereaktionen können nicht simuliert werden.

Die Zellen für die Zellkulturexperimente sollten dabei nach der *in vivo*-Anwendung am späteren Patienten ausgesucht werden. Sinnvoll ist es möglichst die gleichen Zellen zu verwenden, die die späteren Zielstrukturen darstellen oder am ehesten Kontakt mit dem Werkstoff haben werden. Zudem kann zwischen Primärzellkulturen (frisch isolierte Zellen) und bereits bestehenden Zellkulturen ausgewählt werden (Pizzoferrato et al. 1994). Mithilfe von verschiedenen Testmethoden werden dann Änderungen der Zellstruktur und der Zellfunktion bei Kontakt mit dem Material bestimmt. Dabei werden zelltypenspezifische (basale) von zelltypspezifischen Reaktionen unterschieden.

Im Rahmen der quantitativen Biokompatibilitätsanalysen wird zwischen Toxizitätstests und Reaktionstests unterschieden. Toxizitätstests weisen aus, in welchem Maße die Zellen leben oder absterben. Mithilfe der Reaktionstests wird das Überleben der Zellen unter verschiedenen Reaktionen (z.B. Blut-, Immunreaktion, Karzinogenese) untersucht (Wintermantel und Ha 2009).

Zur Analyse der Toxizität werden der MTT-Test und der LDH-Zytotoxizitätsassay aus dem 5. Abschnitt der ISO 10993-Normenreihe: „Prüfungen auf *In vitro*-Zytotoxizität“ für diese Arbeit favorisiert und kurz erläutert.

Der MTT-Test ist ein kolorimetrischer Assay, welcher zur Bestimmung der Zellviabilität genutzt wird. Er beruht auf der Bestimmung der Enzymaktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen sowie der Nicotinamidadenindinukleotid (NAD)- und Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADP)-abhängigen Enzyme des Endoplasmatischen Retikulum (Berridge 2005). Das gelbe Tetrazoliumsalz 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-

diphenyltetrazoliumbromid (MTT) wird hierbei von lebenden, stoffwechselaktiven Zellen enzymatisch durch Ringöffnung zum violetten, wasserunlöslichen Formazan reduziert. Tote Zellen, die keine Stoffwechselaktivität vorweisen, sind dazu nicht mehr in der Lage. Zur Bestimmung der Zytotoxizität wird hier die Proportionalität der umgesetzten MTT-Menge zur Anzahl viabler Zellen ausgenutzt. Diese Methode kann allerdings durch verschiedene Einflüsse hinsichtlich ihrer Beweiskraft limitiert sein, sodass noch ein weiterer Zytotoxizitätstest durchgeführt werden sollte.

Der LDH – Assay ist ebenfalls ein kolorimetrischer Test zur Bestimmung der Membranintegrität von Zellen und damit indirekt zur Kontrolle der Zytotoxizität von Substanzen. Die Laktatdehydrogenase (LDH) ist ein ubiquitär vorkommendes, zytosolisches Enzym, welches bei Plasmamembranschäden in das Zellkulturmedium freigesetzt wird. Dort kann es mithilfe einer gekoppelten enzymatischen Reaktion nachgewiesen werden. Hierbei reduziert die freigesetzte LDH NAD^+ zu NADH und im selben Vorgang wird Lactat zu Pyruvat oxidiert. Im nächsten Schritt wird dann das zugesetzte Indonitrotetrazoliumsalz (INT) durch den Katalysator Diaphorase unter Verbrauch der Reduktionäquivalente NADH zum roten Formazan reduziert. Die Menge an entstehendem Formazan ist dabei proportional zur Menge der freigesetzten LDH, welche wiederum vermehrt bei gesteigertem Zelluntergang (z.B. durch toxische Substanzen) freigegeben wird (Francis Ka-Ming Chan 2013).

Nach oraler Aufnahme der PLGA-Mikropartikel kann eine systemische Resorption dieser nicht ausgeschlossen werden, wie Schmidt et al. (2013) mithilfe von Translokationsstudien explorierten. Sie würden dann zuerst in Kontakt mit dem Blutsystem geraten und eventuell intrakapillär und -venös transportiert werden. Die Untersuchung der Hämokompatibilität der Partikel stellt damit eine wichtige Analyse im Rahmen der Biokompatibilität dar. Die Erythrozyten nehmen einen großen Anteil der korpuskulären Blutbestandteile ein. Eine Interaktion zwischen ihnen und den Partikeln oder deren Inhaltsstoffen gehört damit zu den Ersten nach deren systemischer Resorption. Hierbei könnte eine Hämolyse oder Aggregation der empfindlichen Erythrozyten stattfinden und so zu zirkulatorischen Nebenwirkungen (z.B. Anämie, Blutviskositätserhöhung, Mikrozirkulationsstörungen) bis hin zur Letalität beitragen. Diese Wechselwirkungen werden mithilfe der Bestimmung des erythrozytenmembranzerstörenden Effekts (Hämolyse-Assay) und der Agglomerationspotenz (Erythrozytenaggregationsassay) der Partikel untersucht, die der Sparte der Reaktionstests zuzuordnen sind.

2. Ziele der Arbeit

Obwohl eine Vielzahl an neuen Wirkprinzipien und Wirkstoffen erforscht und zugelassen werden und dabei auch innovative Ansätze verfolgt werden, präsentieren sich die Ergebnisse der CED Therapie nicht immer zufriedenstellend. Nicht nur, dass die Krankheitsaktivität und ihre klinischen Symptome oft nur unzureichend reduziert werden, sondern auch, dass die Nebenwirkungen der medikamentösen Therapie die Patienten teils gravierend einschränken, macht diese (systemische) Inflammation oft zu einer komplexen und langwierigen immunologischen Erkrankung. Eine Verbesserung der CED-Therapiemöglichkeiten auf der Grundlage der erweiterten Kenntnisse zur CED-Ätiologie ist somit dringend erforderlich.

Verschiedene Studien legen nahe, dass eine Reduktion von proinflammatorischen Zytokinen eine Unterbrechung des *Circulus vitiosus* in der CED-Pathogenese bewirken könnte. Diese Mediatoren werden dabei vermehrt von aktivierten Zellen der mononukleären Phagozytenreihe produziert. In Anbetracht der anhaltenden Aktivierung des phagozytären Kompartiments und dessen Beitrag in der CED-Pathogenese scheint dort ein wichtiger Ansatzpunkt für zukunftsweisende Therapien zu liegen. Mithilfe der synthetischen *Disease-Targeting*-Strategie kann dieses mukosale, mononukleäre Zellkompartiment von CED-Patienten spezifisch adressiert werden. Deren physiologische Funktion der Endozytose dient dabei zusätzlich der planmäßigen Aufnahme der partikulären Arzneistoffträger und deren Verbleib in der Mukosa. So können immunmodulatorische Substanzen wie z.B. Glukokortikoide gezielt zu deren Wirkort transportiert werden, um dort ihren Effekt präzise zu entfalten. Aber auch andere Wirkstoffe (z.B. siRNA) könnten so befördert werden. So könnte eine hohe lokale Wirkstoffkonzentration an den entzündeten Stellen bei gleichzeitiger Reduktion der systemischen Nebenwirkungen hervorgebracht werden. Ebenfalls kann das Risiko von Arzneimittelinteraktionen gesenkt werden. Auch eine Dosisreduktion oder eine niedrige Einnahmefrequenz sind denkbar. Damit bestünde eine vielversprechende Behandlungsoption für CED.

Die Ziele der Arbeit lassen sich daher wie folgt formulieren:

1. Zunächst werden PLGA-Mikropartikel hergestellt, die sich in Vorarbeiten (Schmidt et al. 2013) als mukosaselektiv erwiesen. Zusätzlich werden antiinflammatorische Wirkstoffe in die PLGA-Matrix eingebracht. Als Modellsubstanz wird hierfür Dexamethason als gut bekanntes Steroid verwendet, welches in die

- proinflammatorische Zytokin-Entzündungskaskade eingreift und eine Remission-sinduktion bedingen kann (Ford et al. 2011).
2. Es erfolgt eine Analyse der partikulären physikochemischen Eigenschaften hinsichtlich der Größe, der Oberflächenladung und -struktur, sowie eine DEX-Gehaltsbestimmung und eine DEX-Freisetzungskinetik. Weiterhin wird im Rahmen der Partikelcharakterisierung die *in vitro*-Biokompatibilität der hergestellten Partikel an humanen Primärzellen überprüft.
 3. Zur Überprüfung der pharmakologischen antiinflammatorischen Potenz der Mikropartikel *in vitro* werden in humanen Monozyten LPS-induzierte Entzündungsreaktionen getriggert. Dadurch wird eine Zytokinproduktion induziert, welche durch die DEX-haltigen Mikropartikel supprimiert werden soll. Deren konzentrationsabhängiger, therapeutischer Effekt wird evaluiert.
 4. Ebenfalls soll die Internalisierungspotenz der Partikel bewertet werden. Eine endozytotische Aufnahme in die mononukleären Zielzellen ist für diesen innovativen Therapieansatz obligat, sodass diese für die hergestellten Partikel nachgewiesen werden muss.

Für diese Arbeit lässt sich grundsätzlich folgende Hypothese ausführen:

Glukokortikoidhaltige Mikropartikel repressieren nach deren Endozytose in den Entzündungszellen (mukosales, mononukleäres Zellkompartiment) die Genexpression proinflammatorischer Gene. Die Synthese verschiedener Mediatoren der Entzündungs- und Immunreaktionen (IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α) wird inhibiert. Damit weisen diese präparierten Partikel eine antiinflammatorische Wirkung auf die in der Mukosa der CED-Patienten typischerweise verstärkt exprimierten Entzündungsvorgänge vor. Die biologische Wirksamkeit des DEX-PLGA-Mikropartikelsystems als innovatives *Disease-Targeting*-Therapiemodell für die intestinale Inflammation kann damit bestätigt werden.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Kits

Name	Firma; Katalognummer (Kat.-Nr.)
Pierce LDH Cytotoxicity Assay Kit	Thermo Fisher Scientific; Kat.-Nr. 88954
TNF alpha Human ELISA Kit	Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific; Kat.-Nr. KHC3011
IL-6 Human ELISA Kit	Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific; Kat.-Nr. EH2IL6

3.1.2 Chemikalien und Reagenzien

Name	Firma; Katalognummer (Kat.-Nr.)
Acetonitril	Carl Roth; Kat.-Nr. 8824.2
CD14 MicroBeads, human	Miltenyi Biotech; Kat.-Nr. 130-050-201
CellMask™ Deep Red Plasma membrane stain	Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific; Kat.-Nr. C10046
ibidi Mounting Medium	Ibidi; Kat.-Nr. 50001
Dexamethasone	Sigma-Aldrich; Kat.-Nr. 31375-500MG
Dexamethasone fluorescein	Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific; Kat.-Nr. D1383
DMSO	Santa Cruz Biotechnology; Kat.-Nr. sc-359032
Dulbecco's phosphate-buffered saline (PBS)	Gibco; Kat.-Nr. 14190169
Essigsäureethylester	Carl Roth; Kat.-Nr. KK42.1
Fetal Bovine Serum (FCS)	PAN Biotech; Kat.-Nr. P30-3302

Formalin, natural buffered 10 %	Sigma-Aldrich; Kat.-Nr. HT501128
HCl	Carl Roth; Kat.-Nr. X942.2
Isopropanol	Carl Roth; Kat.-Nr. 9866.2
L-Glutamine–Penicillin–Streptomycin solution	Sigma-Aldrich; Kat.-Nr. G1146-100ML
Lympholyte-H	Cedarlane, Kat.-Nr. CL5026
Mowiol® 4-88 (PVA), $M_w \sim 31000$	Sigma-Aldrich; Kat.-Nr. 81381-250G
Poly L-Lysin	Biochrom AG; Kat.-Nr. L7240
Polyethylenimin, branched	Sigma-Aldrich; Kat.-Nr. 408727
Resomer® RG 502 H, Poly(D,L–lactide-co-glycolide), acid terminated, M_w 7000-17000, 50:50	Sigma-Aldrich; Kat.-Nr. 719897-5G
RPMI 1640 W/GlutaMAX™-I	Gibco, Thermo Fisher Scientific; Kat.-Nr. 61870044
Standard lipopolysaccharide from <i>E.coli</i> K12 strain (LPS-EK)	InvivoGen; Kat.-Nr. tlrl-eklps
Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT)	Sigma-Aldrich; Kat.-Nr. M2128
Triton™ X100	Sigma-Aldrich; Kat.-Nr. X100
Tryphan Blue solution	Sigma-Aldrich, Kat.-Nr. T8154

3.2 Methoden

3.2.1 *Partikelherstellung*

Die Herstellung der Mikropartikel basierte auf einer modifizierten Solvent-Evaporation-Methode nach Sah (1997). Zuerst wurden 50 mg Polylactid-co-Glycolid (PLGA) in Ethylacetat (5 ml) gelöst, welches die organische Öl-Phase (O) darstellte. Als wässrige Phase (W) wurde eine 1 %ige Polyvinyllösung (pH 7,4) hergestellt und davon 5 ml (steril filtriert) in ein Glas überführt. Unter Rühren auf einer Magnetrührplatte (400 rpm) wurde die Öl-Phase tropfenweise in die wässrige Phase (ca. 0,5 ml/min) überführt. Die Bildung einer grobdispersen O/W-Emulsion erfolgte unter ständigem Rühren (200 rpm) für 3 h bei Raumtemperatur (RT). Für die Herstellung von Mikropartikeln wurde die Emulsion für 15 min mit 5000 rpm homogenisiert (Ultra-Turrax T25, IKA-Werte, Staufen, DE). Die feindisperse Emulsion wurde anschließend mit 50 ml bidestilliertem Wasser gemischt und 24 h bei RT inkubiert. Hierbei evaporierte Ethylacetat aus der Emulsion, sodass sich feste Mikropartikel bildeten. Anschließend wurden die Partikel dreimal mit bidestilliertem Wasser gewaschen. Die Lyophilisierung erfolgte für zwei Tage bei 0,05 mbar und -50°C. Die gesamte Herstellung erfolgte lichtgeschützt.

Für die vorliegende Forschungsarbeit wurden drei unterschiedliche Typen von Mikropartikeln produziert. Zum einen wurden nichtmodifizierte PLGA-Mikropartikel wie oben beschrieben hergestellt. Des Weiteren wurden fluoreszierende (Fluorescein isothiocyanate (FITC)), mit Dexamethason (DEX) beladene PLGA-Mikropartikel synthetisiert (FITC-DEX-PLGA). Dazu wurden PLGA (50 mg) und FITC-Dexamethason (5 mg) in Ethylacetat (5 ml) gelöst und der Herstellungsprozess wie oben beschrieben durchgeführt. Zusätzlich erfolgte auch die Herstellung von nicht-fluoreszierenden, Dexamethason-haltigen PLGA-Mikropartikeln (DEX-PLGA). Hierfür wurden PLGA (50 mg) und Dexamethason (5 mg) in Ethylacetat (5 ml) gelöst und im selben Herstellungsprozess Mikropartikel erzeugt.

3.2.2 *Partikelcharakterisierung*

3.2.2.1 *Partikelgrößenverteilung und Zetapotenzial*

Die Bestimmung der mittleren Partikelgröße, der Größenverteilung und des Zetapotenzials erfolgte über das Messverfahren der Photonenkorrelationspektroskopie (PCS).

Für die Messungen wurde der Zetasizer Nano-ZS Nano series (Malvern Instruments, GB) verwendet. 1 mg/ml Mikropartikel wurden in bidestilliertem Wasser (steril filtriert) resuspendiert und 500 µl luftblasenfrei in eine Polystyrol-Küvette (Low Volume disposable sizing cuvette ZEN0112, Malvern Instruments, US) überführt. Der Photomultiplier wurde auf einen Messwinkel von 173° (backlight scattering) zum einfallenden Laserstrahl eingestellt. Im Zetasizer wurden die Proben auf 25°C temperiert und für 120 s equilibriert. Als Refractive Index (RI) wurde 1,59 gewählt mit einer Absorption von 0,01. Es erfolgten für jede Probe zehn Messungen (drei Wiederholungen mit je 30 s). Die selben Einstellungen unter dem Smoluchowski-Modell wurden auch zur Bestimmung des Zetapotenzials verwendet.

3.2.2.2 *Oberflächenstruktur und -beschaffenheit*

Für die visuelle Analyse der Oberflächenstruktur und Solidität der drei Partikelformulierungen wurde die Rasterelektronenmikroskopie (REM) verwendet. Die REM-Aufnahmen erfolgten in Kooperation mit Dr. rer. nat. Sarmiza Elena Stanca am Feldemissionsmikroskops JSM-6300F (JEOL, JP) am IPHT (Jena).

3.2.2.3 *Verkapselungseffizienz und Gehaltsbestimmung*

Die Bestimmung des Gehalts an Dexamethason in den Mikropartikeln erfolgte über eine fluorimetrische Analysemethode unter Verwendung von FITC-DEX-PLGA Mikropartikeln.

Zuerst wurde eine Kalibrierfunktion für das partikelfreie FITC-DEX erstellt. Hierfür wurde FITC-DEX eingewogen und mit Acetonitril gelöst, um eine Standardlösung von 1 mg/ml herzustellen. Aus drei unabhängigen Standardlösungen wurden anschließend Verdünnungsreihen hergestellt. Die verschiedenen FITC-DEX-Konzentrationen (0,003 – 5 µg/ml) wurden 1:4 mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) verdünnt in eine schwarze 96-Well-Messplatte pipettiert. Die Bestimmung der Fluoreszenzemission erfolgte mithilfe eines Mikroplattenlesers (Tecan infinite 200pro, TECAN Trading AG, CH). Folgende Einstellungen wurden am Gerät vorgenommen: Anregungswellenlänge= 485 nm, Bandbreite 9 nm; Emissionswellenlänge= 520 nm, Bandbreite 20 nm; Verstärkung 53; Anzahl der Blitze 30; Integrationszeit 40 µs; Z-Position 19132 µm.

Für die Gehaltsbestimmungen wurden FITC-DEX-PLGA-Partikel (5 mg) aus drei unterschiedlichen Herstellungsverfahren eingewogen und in Acetonitril (50 ml) für 1 h mittels Magnetührgerät aufgelöst. Davon wurden zweimal je 1 ml Probe entnommen und für 5 min bei 30.000 g zentrifugiert, sodass Reste von ungelöstem Partikelmaterial sedimentierten. Anschließend wurden 500 µl vorsichtig abpipettiert, 1:4 mit PBS verdünnt und die Fluoreszenzintensität bestimmt. Die Berechnung der Dexamethasonkonzentration aus den gemessenen Fluoreszenzintensitäten erfolgte mithilfe der oben beschriebenen Eichgerade. Die Dexamethason-Gehaltsbestimmung ergab sich nach der Formel:

$$\begin{aligned} \text{Gehaltsbestimmung (\%)} \\ = \frac{\text{Menge des gesamten eingeschlossenen FITC - DEX (\mu g/mg)}}{\text{Gesamtgewicht Mikropartikel}} \times 100\% \end{aligned}$$

Unter Einbezug des theoretisch möglichen Dexamethasongehalts erfolgt die Berechnung der Verkapselungseffizienz:

$$\text{Verkapselungseffizienz (\%)} = \frac{\text{DEX - Gehalt}}{\text{theoretischer DEX - Gehalt (9,09\%)}} \times 100\%$$

3.2.2.4 Freisetzungskinetik

Die *in vitro*-Freisetzungsversuche wurden in 37°C-vorgewärmtem PBS bei pH 7,4 durchgeführt. Die Bestimmung der Freisetzungskinetik erfolgte in einem offenen System. Die Versuche wurden mit drei verschiedenen Partikelchargen durchgeführt.

Die Quantifizierung des freigesetzten FITC-DEX erfolgte mithilfe der Fluorimetrie (siehe Abschnitt 3.2.2.3). Es wurde zunächst untersucht, wie sich die Fluoreszenz der partikel-freien FITC-DEX-Substanz über die Inkubationszeit verändert. Hierfür wurden 10 ml einer 3 µg/ml FITC-DEX-PBS-Lösung in einem 50 ml Röhrchen über den Zeitraum der Freisetzungsversuche inkubiert und eine Fluoreszenzmessung in Triplikaten zu spezifischen Messzeiten durchgeführt. Da für die Messung jeweils eine Probe von 1 ml entnommen und mit frischem PBS aufgefüllt wurde, wurde mathematisch diese Verdünnung um 10 % für den tatsächlichen Fluoreszenzwert einberechnet. Ebenfalls wurde der pH-Wert der entnommenen Probe mithilfe von Lackmuspapier auf pH-Abweichungen überprüft. Die Veränderung der Fluoreszenzintensität wurde mit einer logarithmischen Funktion via Microsoft Excel (Microsoft Office Professional Plus 2016, Version 1902, Microsoft Corporation, US) beschrieben.

Für die Freisetzungsversuche wurden 1 mg FITC-DEX-Partikel in einem 15 ml Röhrchen mit 10 ml PBS in Lösung gebracht ($\pm 0,1$ mg/ml) und vollständig resuspendiert. Anschließend wurde das verschlossene Tube lichtgeschützt in einem Inkubator bei 37°C langsam rotierend bewegt. Zu definierten Zeitpunkten wurden jeweils 1,5 ml entnommen und 8 min bei 21100 g zentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5424/R, Thermo Fisher Scientific, US), damit noch vorhandenen Partikel am Boden des Eppendorf-Tubes sedimentierten. Anschließend wurde vorsichtig 1 ml Probe abpipettiert und diese 1:4 mit PBS verdünnt im Mikroplattenleser (TECAN infinite 200pro, TECAN Trading AG, CH) hinsichtlich der Fluoreszenzemission vermessen (Messprotokoll, siehe Abschnitt 3.2.2.3). Der pH-Wert der Probe wurde ebenfalls bestimmt. Die Partikel, die sich noch am Boden des Eppendorf-Tubes befanden, wurden in den verbleibenden 500 μ l resuspendiert und zurück in das 15 ml Röhrchen gegeben. Zusätzlich wurde das Eppendorf-Tube mit 1 ml frischer PBS-Lösung gespült und ebenfalls in das Röhrchen überführt. Im 15 ml Röhrchen hatte dies eine Verdünnung von 10 % zur Folge, welche in den Freisetzungskalkulationen mathematisch ausgeglichen wurden.

Anhand der Kalibrierfunktion (aus Abschnitt 3.2.2.3) konnte über die berechneten Werte der unverfälschten Emission (ohne Verdünnung und ohne zeitabhängige Fluoreszenzminderung) die Dexamethason-Konzentration bestimmt werden. Für die graphische Darstellung der Freisetzung in Prozent vom Ausgangswert wurde der ermittelte Dexamethasongehalt der jeweiligen Charge (siehe Tabelle 1) als 100 %-Wert angenommen.

3.2.2.5 *Biokompatibilität nach ISO-Norm*

Für die Bewertung der Biokompatibilität der hergestellten Partikel wurde nach Methoden der DIN EN ISO 10993 - Normenreihe vorgegangen, die zur Beurteilung der biologischen Wirkung von Medizinprodukten dient. Hierbei wurden der Hämolyse- und Erythrozytenaggregationsassay aus den Methodenreihen von Abschnitt 4: „Auswahl von Prüfungen zur Wechselwirkung mit Blut“ ausgewählt (ASTM-F756 2008). Zur Analyse der Zytotoxizität wurden aus Abschnitt 5: „Prüfungen auf In-vitro-Zytotoxizität“ der MTT-Test und der LDH-Zytotoxizitätsassay favorisiert (2009).

Hämokompatibilität

Die Untersuchung der Hämokompatibilität der Partikel erfolgte analog zu Bauer et al. (2012). Hierfür wurde Blut von gesunden Probanden in Heparin-Monovetten

abgenommen. Zur Abtrennung des Plasmas wurden die Proben für 5 min bei 4500 g und RT zentrifugiert (Hettich Universal 30RF, Hettich, DE). Anschließend wurde das entstandene Pellet dreimal mit kaltem PBS gewaschen bis der Überstand farblos war. Das Sediment (Erythrozyten) wurde mit PBS (pH 7,4) auf das Ausgangsvolumen resuspendiert und anschließend auf die für das jeweilige Experiment notwendige Konzentration verdünnt. Dies stellte die Erythrozytenstammlösung für nachfolgende Experimente dar.

Hämolyseaktivität

Zur Analyse der hämolytischen Potenz der Partikel wurden verschiedene Partikelkonzentrationen (1 µg/ml – 1 mg/ml DEX-PLGA- & PLGA-Partikel) mit PBS (pH 7,4) hergestellt. Diese Proben wurden anschließend 1:1 mit der Erythrozyten-Stammlösung gemischt und für 1 h bei 37°C in einem Wasserbad inkubiert. Die Stammlösung wurde hierfür auf 10 % der Originalblutprobe verdünnt. Für die Negativkontrolle wurde die Erythrozyten-Stammlösung 1:1 mit PBS (pH 7,4) vereinigt und inkubiert. Die Positivkontrolle wurde ebenso mit 1 %iger Triton X-100-PBS-Lösung durchgeführt. Nach erneuter fünfminütiger Zentrifugation der Proben bei 2400 g (Microfuge 22R Centrifuge, Beckman Coulter, US) wurden 100 µl des Überstandes in eine 96-Well-Platte überführt und die Absorption bei 544 nm im Mikroplattenleser (TECAN infinite 200pro, TECAN Trading AG, CH) gemessen. Ebenfalls vermessen wurden die Leerwerte der zugefügten Medien (Partikel in PBS, 1 %ige Triton X-100-PBS-Lösung, PBS) ohne Erythrozytenstammlösung. Die Absorptionswerte dieser Leerwerte wurden von den jeweiligen Einzelmessungen subtrahiert. Die Berechnung der Hämolyse erfolgte mittels folgender Gleichung, in die die Mittelwerte der probenspezifischen Absorptionen aus drei Einzelmessungen eingesetzt wurden:

$$\text{Hämolyse (\%)} = \frac{\text{Absorption (Probe)} - \text{Absorption (Negativkontrolle)}}{\text{Absorption (Positivkontrolle)}} \times 100\%$$

Die Bestimmung der Hämolyseaktivität erfolgte mit Hilfe von drei unabhängigen Einzelversuchen.

Erythrozytenaggregation

Zur Analyse der Agglomerationspotenz der Partikel auf rote Blutzellen wurden diese in verschiedenen Konzentration (1 µg/ml – 1 mg/ml) in PBS (pH 7,4) gelöst. 100 µl der Partikelsuspensionen wurden in eine 24-Well-Platte pipettiert. Die Erythrozyten-

stammlösung wurde auf 2 % der Originalblutprobe verdünnt und jeweils 100 µl zu jedem Well hinzugefügt. Als Negativkontrolle wurde die Stammlösung 1:1 mit PBS (pH 7,4) behandelt. Für die Positivkontrolle wurde 25 kDa verzweigtes Polyethylenimin (bPEI) in einer Konzentration von 30 µg/ml verwendet, um einen positiven Rouleau-Effekt darzustellen. Die Proben wurden für 2 h inkubiert. Anschließend erfolgte die lichtmikroskopische (400x Vergrößerung, Axio Observer.Z1, Carl Zeiss, Jena, DE) Analyse der Proben hinsichtlich auftretender Aggregationen. Dieser Assay wurde einmal in Triplikaten durchgeführt.

In-Vitro-Zytotoxizität

Die *In vitro*-Zytotoxizität der Partikel (DEX-PLGA- & PLGA-Partikel) wurde mittels MTT- und LDH- Assay untersucht. Hierfür wurden nach der Isolation von Monozyten aus Blutproben von gesunden Spendern (siehe Abschnitt 3.2.4) 4×10^5 Zellen/ Well in einer 96-Well-Platte ausgesät und mit Zellkulturmedium, inklusive den darin gelösten verschiedenen Partikelkonzentrationen (1 – 500 µg/ml inerte PLGA-Partikel oder DEX-PLGA-Partikel), inkubiert. Für die Negativkontrolle wurden Monozyten mit Zellkulturmedium ohne Partikel behandelt. Als Positivkontrolle für den MTT-Test wurden die Zellen mit 1 %iger Triton X-100-PBS-Lösung behandelt. Die Platte wurde für zwei Tage bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Für den LDH-Assay wurde Zellkulturmedium mit 1 % FCS frisch hergestellt und zur zweitägigen Inkubation der Zellen genutzt. Die Bestimmung der Zytotoxizität und Zellviabilität erfolgte in drei unabhängigen Experimenten und wurde jeweils in Duplikaten gemessen. Während der Durchführungen wurde konsequent auf Lichtschutz geachtet.

Zellviabilität (MTT-Test)

Es wurde eine MTT-Stammlösung (0,5 mg/ml in Zellkulturmedium, ohne FCS) hergestellt. Das (probenhaltige) Medium wurde vorsichtig aus den Mikrotiterplatten entfernt und durch 200 µl der MTT-Lösung ersetzt. Nach einer Inkubationszeit von 2 h wurde der Überstand erneut vorsichtig abgesaugt. Pro Well wurden 200 µl des Solubilisierungspuffers (27 ml Isopropanol, 3 ml Triton X-100, 5 µl 2M HCl) pipettiert und damit die Zellen lysiert sowie die entstandenen, wasserunlöslichen MTT-Formazan-Kristalle aufgelöst. Die Absorptionsmessung erfolgte am Mikroplattenleser (TECAN infinite 200pro, TECAN Trading AG, CH) bei einer Wellenlänge von 570 nm (3 Zyklen, 15 s Schütteln vor jeder

Messung, 25°C). Zur Berechnung der Zellviabilität wurden die Mittelwerte der probenspezifischen Absorptionen bestimmt und in folgende Gleichung eingesetzt:

$$\text{Zellviabilität (\%)} = \frac{\text{Absorption (Probe)}}{\text{Absorption (Negativkontrolle)}} \times 100\%$$

Zytotoxizität (LDH-Test)

Zur Untersuchung der konzentrationsabhängigen Zytotoxizität der Partikel auf isolierte Monozyten (siehe Abschnitt 3.2.4) wurde das „Thermo Scientific Pierce LDH Cytotoxicity Assay Kit“ nach Herstellerangaben verwendet. Zusätzlich wurde die spontane LDH-Freisetzung der Monozyten unter diesen Kulturbedingungen ohne weitere Partikelbehandlung untersucht. Für die Bestimmung der maximalen LDH-Freisetzung wurden unbehandelte Monozyten wie oben beschrieben inkubiert und anschließend lysiert. Dafür wurden 22 µl (1:10 Verdünnung) des *Lysis*-Puffers nur in diese Wells pipettiert und die Zellen lysiert. Die 96-Well-Platte wurde anschließend für weitere 45 min inkubiert. 50 µl zellfreier Überstand von jeder Probe wurden in eine neue 96-Well-Platte transferiert und mit 50 µl der nach Herstellerangaben hergestellten Reaktionslösung vermischt. Die Platte wurde für 30 min lichtgeschützt bei RT inkubiert. Nachfolgend wurden 50 µl der *Stop-Solution* hinzugefügt. Die Absorptionsmessung erfolgte am Mikroplattenleser (TECAN infinite 200pro, TECAN Trading AG, CH) bei einer Wellenlänge von 490 nm. Als Referenz erfolgte die Bestimmung der Absorption bei 680 nm. Die Bestimmung der Membranintegrität erfolgte mittels folgender Gleichung:

$$\text{Zytotoxizität (\%)} = \frac{\text{LDH Freisetzung (Probe)} - \text{spontane LDH Freisetzung}}{\text{maximale LDH Freisetzung} - \text{spontane LDH Freisetzung}} \times 100\%$$

Für die Untersuchung der Interaktion der Partikel mit dem Reagenz des LDH-Assay-Kits wurden die verschiedenen Partikelkonzentrationen in Zellkulturmedium + 1 % FCS gelöst und in derselben Art und Weise wie in oben beschrieben vermessen.

3.2.3 Quantitative Analyse der Zytokine TNF-α und IL-6

Für die quantitative Analyse des Zytokingehaltes im zellfreien Überstand der Zellkultur wurden die *Sandwich-ELISA-Kits* „TNF-α Human ELISA Kit“ und „IL-6 Human ELISA Kit“ verwendet. Hierfür wurde nach Angaben des Herstellers verfahren. Zuerst wurde ein *Capture*-Antikörper gegen das zu untersuchende Molekül (TNF-α, IL-6) auf einer 96-

Well-Platte immobilisiert. Dafür wurden 100 µl einer 2 µg/ml Lösung des Antikörpers im entsprechenden *Coating*-Puffer pro Well hinzugefügt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Dieser Überstand wurde am nächsten Tag entfernt und die Platte mit 300 µl/well des Waschpuffers gewaschen. Zur Blockade unspezifischer Bindungsstellen wurden 300 µl/well des Assay-Puffers hinzugefügt und die Platte für 1 h bei RT inkubiert. Der Überstand wurde entfernt und die Platte auf absorbierendem Papier ausgeklopft. Es wurden die Standardverdünnungen des rekombinanten menschlichen Zytokins (TNF-α oder IL-6) hergestellt und die Proben 1:20 für den TNF-α-ELISA oder 1:15 für den IL-6-ELISA mit Assay-Puffer verdünnt. Jeweils 100 µl der Probe, des Standards oder der Negativkontrolle (Assay-Puffer) wurden pro Well in Duplikation zugegeben. Zusätzlich wurden pro Well 50 µl des Biotin-markierten Detektionsantikörpers, der sich ebenfalls gegen das jeweils gewünschte Zytokin richtet, hinzupipettiert und die Platte anschließend bei RT für 2 h unter kontinuierlichem Schütteln (700 rpm) inkubiert. Dann wurde die Platte fünfmal mit 300 µl Waschpuffer pro Well gewaschen und 100 µl einer Streptavidin-Meerrettichperoxidase (HRP)-Lösung pro Well hinzugefügt. Anschließend erfolgte eine Inkubation der Platte bei RT für 30 min unter kontinuierlichem Schütteln (700 rpm), sodass das HRP gekoppelte Streptavidin an den Biotin-markierten Detektionsantikörper binden konnte. Erneut erfolgte eine fünfmalige Waschung. Nun wurden 100 µl Tetramethylbenzidine (HRP-Substrat) pro Well hinzupipettiert und die Platte lichtgeschützt bei RT unter erneutem Schütteln inkubiert. Zuletzt wurden nach 30 min 100 µl der Stop-Lösung pro Well hinzugefügt und die Probe unmittelbar hinsichtlich ihrer Absorbanz bei 450 nm im Mikroplattenleser (TECAN infinite 200pro, TECAN Trading AG, CH) gemessen. Die Referenzwellenlänge betrug 650 nm.

Anhand der Standardverdünnungen konnte nun in einer Kalibrationskurve der mathematische Zusammenhang zwischen der Konzentration und der Optischen Dichte dargestellt werden, anhand dessen dann die Quantität des jeweiligen Zytokins in der Probe bestimmt wurde. Für die Bestimmung der Zytokin-Konzentration wurde ein polynomischer Graph zweiten Grades gewählt.

3.2.4 Zellkultur

Für diese Arbeit wurden humane Primärzellen verwendet. Zuerst wurde eine Isolation von mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) aus dem Vollblut gesunder Spender durchgeführt. Anschließend folgte eine CD14⁺-Positivselektion von Monozyten.

3.2.4.1 PBMC-Isolation

Die Fraktionierung des humanen Blutes erfolgte mittels der Dichtegradientenzentrifugation. Hierfür wurde Vollblut von gesunden Spendern in EDTA-Monovetten abgenommen. Anschließend wurden 15 ml Röhrchen mit je 4 ml Lympholyte[®]-H befüllt. Diese wurden mit je 8 ml des Vollblutes überschichtet. Dabei war zu beachten, dass die Vermischung der Flüssigkeiten an der Grenzschicht so gering wie möglich gehalten wurde. Es folgte eine Zentrifugation (RT, 20 min bei 800 g mit ausgeschalteter Bremsfunktion). Die mononukleären Zellen befanden sich nun in der Interphase zwischen Plasma- und Lympholyte-Fraktion. Mithilfe einer sterilen Pasteurpipette wurden die PBMCs der Zwischenschicht vorsichtig abgenommen und in einem neuen 15 ml Röhrchen ca. 1:1 mit PBS verdünnt. Es folgte eine weitere Zentrifugation für 5 min bei 800 g. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und das Zellpellet in 1 ml PBS gelöst. Die Zellzahl wurde bestimmt.

3.2.4.2 CD14⁺- Positivselektion

Für den zweiten Schritt, die CD14⁺-Positivselektion, wurde das Zelltrennsystem „MACS“ (*Magnetic Activated Cell Sorting*) (Miltenyi et al. 1990) entsprechend der Herstellerangabe für das Monozyten-Isolations-Kit verwendet. Die Monozyten wurden hierbei durch einen mit Magnetbeads gekoppelten, monoklonalen Antikörper gegen das monozyten- und makrophagenspezifische Oberflächenprotein CD14 magnetisch markiert. Beim Passieren der MACS-Säule, welche in einem Magnetfeld positioniert war, wurden die Monozyten durch die ferromagnetischen Anziehungskräfte zurückgehalten und selektiert, während die unmarkierten Zellen die Säule ungehindert durchliefen. Die Monozyten ließen sich nach der Entfernung der Säule aus dem Magnetfeld durch Ausspülen mit 5 ml MACS-Puffer eluieren. Zur Zellzahlbestimmung wurde die Zellsuspension erneut 5 min bei 800 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Zellen in 1 ml MACS-Puffer resuspendiert.

3.2.4.3 Zellzahlbestimmung

In einem Eppendorf-Tube wurde die Zellsuspension mit Tryphanblau 1:10 verdünnt und in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert. Es wurden vier große Quadranten ausgezählt und der Mittelwert bestimmt. Die Zellzahl pro ml wurde errechnet.

$$\text{Zellzahl/ml} = \text{Mittelwert} \times \text{Verdünnungsfaktor (hier 10)} \times 10^4 \text{ Zellen/ml}$$

3.2.4.4 Inkubation der Monozyten

Wenn nicht anders beschrieben wurden die isolierten Monozyten mit vorgewärmtem Zellkulturmedium kultiviert. Es enthielt nahezu endotoxinfreies RPMI 1640-Medium (suppl. mit 2,0 g/l NaHCO₃ und stabilem Glutamin). Hinzugefügt wurden 10 % hitzeinaktiviertes FCS und 1 % L-Glutamin-Penicillin-Streptomycin-Lösung (200 mM L-Glutamin, 10000 Units Penicillin und 10 mg Streptomycin/ml in 0,9 % NaCl).

Die Inkubation erfolgte in einem Inkubator bei 37°C und 5 % CO₂ mit gesättigter Luftfeuchte (100 %).

3.2.5 Nachweis der pharmakologischen Aktivität

3.2.5.1 Dexamethason-Dosis-Wirkungs-Kurve

Unmittelbar vor dem Experiment wurde eine Stammlösung von 10 mM Dexamethason in 100 % Dimethylsulfoxid (DMSO) hergestellt. Diese wurde dann auf die jeweiligen Konzentrationen mit Zellkulturmedium verdünnt. Es wurden DEX-Konzentrationen von 10⁻⁴ - 10⁻⁸ mM untersucht. Bei einer Konzentration von 10⁻⁴ mM DEX lag im Well die höchste Konzentration von 0,001 % DMSO vor, die mit zunehmender Verdünnung der DEX-Konzentration weiter abnahm. Da Dexamethason lichtempfindlich ist, wurden die Experimente lichtgeschützt durchgeführt.

In einer 96 Well-Platte wurden 4×10⁵ Monozyten pro Well ausgesät (siehe Abschnitt 3.2.4). Diese wurden mit den jeweiligen DEX-Konzentrationen in Zellkulturmedium für 24 h inkubiert. Nach 24 h wurde der Überstand der Zellkulturen vorsichtig entfernt. Es folgte eine 24-stündige Behandlung mit 10 ng/ml Lipopolysaccharid (LPS) in Zellkulturmedium, um die Monozyten zur Produktion und Freisetzung von Entzündungsmediatoren zu stimulieren. Es wurden Negativ- und Positivkontrollen mitgeführt. Für erstere wurden Zellen in dexamethasonfreiem Zellkulturmedium inkubiert, welches

ebenfalls nach 24 h erneuert wurde. Für die Positivkontrolle wurden Zellen mit dexamethasonfreiem Zellkulturmedium 24 h vorbehandelt und im Anschluss mit LPS-haltigem Medium (10 ng/ml) stimuliert.

Nach weiteren 24 h wurde der Zellkultur-Überstand vorsichtig abgenommen und bei -20°C bis zur Messung der Zytokinkonzentrationen (siehe Abschnitt 3.2.3) gelagert. Die Experimente wurden in sechs unabhängigen Versuchen jeweils in Duplikaten durchgeführt.

3.2.5.2 Untersuchung der entzündungssupprimierenden Wirkung der Partikel auf die LPS-getriggerte Entzündungsreaktion von Monozyten

Es wurden Stammlösungen von 2 mg/ml der DEX-PLGA- und PLGA-Partikelformulierungen in Zellkulturmedium hergestellt. Diese wurden genutzt, um die jeweils gewünschte Konzentrationen an Partikeln herzustellen. Konzentrationen von 1 – 500 µg/ml beider Partikelformulierungen wurden in Zellkulturmedium verdünnt.

Pro Well einer 96 Well-Mikrotiterplatte wurden 4×10^5 Monozyten (Abschnitt 3.2.4) ausgesät und mit den spezifischen Partikelkonzentrationen inkubiert. In der Negativ- und Positivkontrolle wurden die Zellen nur mit Zellkulturmedium behandelt. Nach 24 h wurde der Überstand vorsichtig entfernt und in jedes Well 200 µl 10 ng/ml LPS in Zellkulturmedium pipettiert. Für die Negativkontrolle wurde LPS-freies Zellkulturmedium verwendet. Die Zellen wurden im Anschluss für weitere 24 h inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellkulturüberstände vorsichtig abgenommen und bei -20°C bis zur Analyse der Zytokin-konzentration (siehe Abschnitt 3.2.3) gelagert. Der Versuchsablauf erfolgte lichtgeschützt. Die Versuche wurden in fünf unabhängigen Einzelexperimenten jeweils in Duplikaten wiederholt.

3.2.6 Visualisierung der Partikel in der Monozytenzellkultur

3.2.6.1 Raman-Spektroskopie

Die Ramanmessungen wurden auf CaF₂- Deckgläschen durchgeführt, um die Autofluoreszenz regulärer Glasdeckgläschen als Hintergrundsignal zu vermeiden. Damit die Zellen auf den speziellen Objektträgern anhafteten, wurden die CaF₂- Deckgläschen vorher für 30 min mit 15 µl Poly-L-Lysin beschichtet.

Sterile CaF₂-Deckgläschen wurden in 24-Well Platten eingebracht, mit 4×10^5 Monozyten (siehe Abschnitt 3.2.4) pro Well überschichtet und für 24 h in Zellkulturmedium inkubiert. Im Medium war hierbei jeweils eine Konzentration von 100 µg/ml der Partikelformulierungen (DEX-PLGA-Partikel oder PLGA-Partikel) gelöst. Als Kontrolle dienten Zellen, welche mit partikelfreiem Medium behandelt wurden. Anschließend wurden die Deckgläschen zweimal vorsichtig mit PBS gewaschen und für 20 min mit 10 %iger Formalinlösung fixiert. Es folgte ein weiterer Waschschrift mit PBS. Bis zur Messung wurden die Objektträger in PBS-Puffer bei +4 °C gelagert. Die Messung selbst erfolgte ebenfalls in PBS-Puffer, um die Zellen vor thermischen Schäden durch die hohe Laserenergie während der Messungen zu schützen.

Es wurden zunächst die Spektren von partikelfreiem Dexamethason und inerten PLGA-Partikeln in Pulverform aufgenommen. Inerte PLGA-Mikropartikel und fixierte Monozyten wurden ebenfalls in PBS bzgl. ihrer jeweiligen Spektren vermessen.

Zur Bestimmung des Dexamethasons in Partikeln wurden zunächst DEX-PLGA-Partikel auf Poly-L-Lysin-beschichteten CaF₂-Deckgläschen 24 h in Zellkulturmedium inkubiert. Anschließend wurden sie hinsichtlich zwei verschiedener Spektren (Dexamethason und PLGA-Mikropartikel) in PBS vermessen.

Die Aufnahme der Raman-Spektroskopie-Bilder erfolgte nach dem von Tolstik et al. (2014) beschriebenen Protokoll und deren Einstellungen mithilfe eines konfokalen Raman-Mikroskops, welches mit einem luftgekühlten Argonionen-Laser ausgestattet war. Die Anregungswellenlänge betrug 785 nm. Das System wurde auf die $520,7 \text{ cm}^{-1}$ -Spektrallinie von Silicium kalibriert. Die Fokussierung des Lasers auf die jeweilige Probe erfolgte mit einem 60x/ NA 1,0 Wasserimmersionsobjektiv. Die Ramanspektralbilder der Zellen und der phagozytierten Partikel wurden im Spektralbereich zwischen $200 - 4100 \text{ cm}^{-1}$ in $1 \text{ }\mu\text{m}$ -Schritten und einer Integrationszeit für jedes Spektrum von 1 s aufgenommen. Zusätzlich wurde ein Z-Stack durchgeführt.

Die Analyse der erhobenen Spektraldaten der Proben erfolgte mittels der Software-Pakete CytoSpec (CytoSpec Inc., US) und MatLab (MathWorks Inc., US) nach Tolstik et al. (2016).

Nach dem Daten-Vorverarbeitungsprozess mittels CytoSpec-Software wurde eine unüberwachte Extraktionsanalyse („vertex component analysis“ (VCA) oder „N-Finder Cluster Analysis“) mittels MathLab-Software durchgeführt.

3.2.6.2 *ELYRA-Hochauflösungs-Mikroskopie (HR-SIM)*

Für diese Methode wurden 12 mm breite, mit Poly-L-Lysin beschichtete Deckgläschen hoher optischer Qualität (VWR International, US) genutzt, um die Monozyten darauf zu inkubieren. Die Inkubation der Zellen erfolgte wie in Abschnitt 3.2.6.1. Als Partikelformulierungen wurden FITC-DEX-PLGA-Partikel verwendet, die das grünfluoreszierenden FITC ($\lambda_{\text{ex}} = 490 \text{ nm}$) enthielten. Nach der 24-stündigen Inkubation der Monozyten mit den Partikeln wurden die Überstände entfernt und anschließend die Plasmamembran der Zellen mit CellMask Deep Red ($\lambda_{\text{ex}} = 649 \text{ nm}$) nach Herstellerangaben gefärbt. Die Färbung wurde mit der Fixierung der Zellen mit 10 %igem Formaldehyd in PBS gestoppt. Die Deckgläschen wurden dreimal mit PBS gewaschen, dann in einem Einbettungsmedium (ibidi Mounting Medium) mit dem benötigten Brechungsindex eingebettet und zum Schutz der Probe vor Austrocknung versiegelt.

Die hochauflösende Fluoreszenzmikroskopie mit strukturierter Beleuchtung wurde mit einem ELYRA-S.1 optical microscopic-System (Carl Zeiss, Jena, DE) durchgeführt. Die mehrfarbig-fluoreszierenden Experimente wurden mit einer Anregungswellenlänge von 488 nm und 642 nm (Gitterperioden von 28 μm bzw. 34 μm) durchgeführt. Es wurde ein 63x/ NA 1,40 Öl-Immersionsobjekt (Carl Zeiss, Plan-Apo, Jena, DE) genutzt. Ein Z-Stack wurde ebenfalls durchgeführt. Die Bilder wurden mittels EMCCD-Array (iXon 885 from Andor, GB) aufgezeichnet und anschließend mit der ZEN 2010 Carl Zeiss-Software rekonstruiert.

4. Ergebnisse

4.1 Partikelcharakterisierung

Es wurden für diese Arbeit drei verschiedene Partikelformulierungen hergestellt: 1. PLGA-Partikel, 2. DEX-PLGA-Partikel und 3. FITC-DEX-PLGA-Partikel. Diese wurden zunächst hinsichtlich ihrer physikochemischen Eigenschaften (Größe, Ladung, Oberflächenstruktur, Beladung und Freisetzungsverhalten) charakterisiert.

4.1.1 Partikelgrößenverteilung und Zetapotenzial

Die Mittelwerte der Partikelgrößen der PCS-Messungen wurden mittels Verteilungsfunktionen in Abbildung 4 dargestellt. Bei allen drei Formulierungen lagen bimodale Größenverteilungen vor. Ebenfalls angegeben wurden die Zetapotenziale, der mittlere hydrodynamische Durchmesser (Z-Average) und die Polydispersitätsindices (PDI) der Partikelformulierungen.

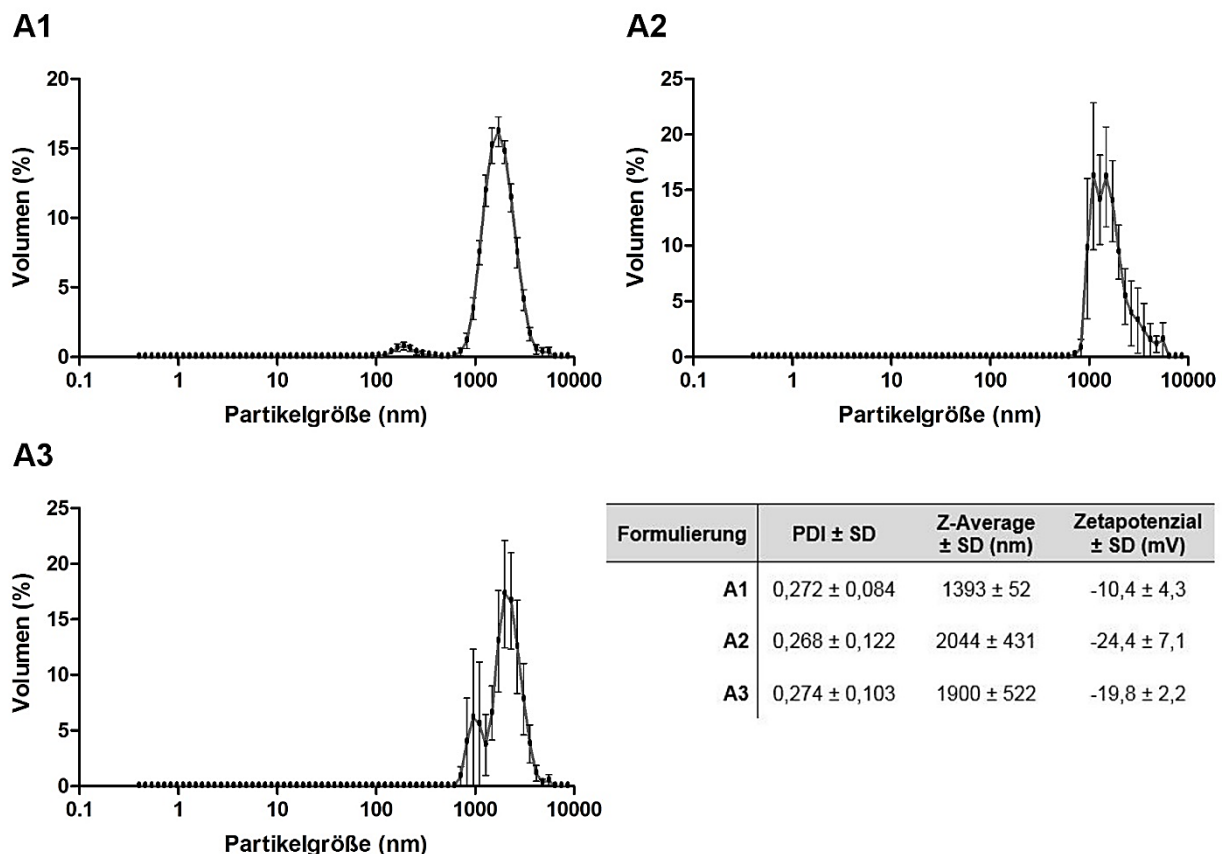


Abbildung 4: volumengewichtete Partikelgrößenverteilungen

A1) FITC-DEX-PLGA-Partikel; A2) DEX-PLGA-Partikel; A3) PLGA-Partikel; Tabelle: Mittelwerte und Standardabweichungen (SD) von PDI, Z-Average & Zetapotenzial der Partikel-Formulierungen, Mittelwerte aus n=9, Fehlerbalken zeigen den Standardfehler (SEM)

Die FITC-DEX-PLGA-Partikel wiesen den geringsten mittleren hydrodynamischen Durchmesser von $1393 \text{ nm} \pm 52$ auf. Nur für diese Formulierung wurde zusätzlich eine Partikelfraktion von kleineren Nanopartikeln um $120 - 220 \text{ nm}$ nachgewiesen. Die DEX-PLGA-Partikel stellten mit $2044 \text{ nm} \pm 431$ die größte Partikelformulierung dar. Bei allen Formulierungen handelte es sich um Mikropartikel mit einer mittleren Partikelgröße von circa $1,5 - 2 \text{ }\mu\text{m}$.

Der ähnliche Polydispersitätsindex aller drei Partikelarten korrelierte mit der nicht automatisierten Herstellungsmethode und zeigte, wie auch schon die Partikelgrößenverteilungsfunktionen, eine breitere Distribution der Partikeldurchmesser. Trotzdem bewies die Ähnlichkeit der PDI einen reproduzierbaren Herstellungsprozess.

Die Zetapotenziale aller Partikeltypen zeigten negative Ladungen, wiesen jedoch in den Messergebnissen starke Schwankungen der elektrokinetischen Potenziale auf. Für die FITC-DEX-PLGA-Partikel wurde das geringste elektrische Potenzial ($-10,4 \text{ mV} \pm 4,3$) gemessen, womit diese Partikelsorte die geringsten interpartikulären Abstoßungskräfte besaßen.

4.1.2 Oberflächenstruktur und -beschaffenheit

Die Morphologie der hergestellten Mikropartikel wurde mittels REM untersucht.

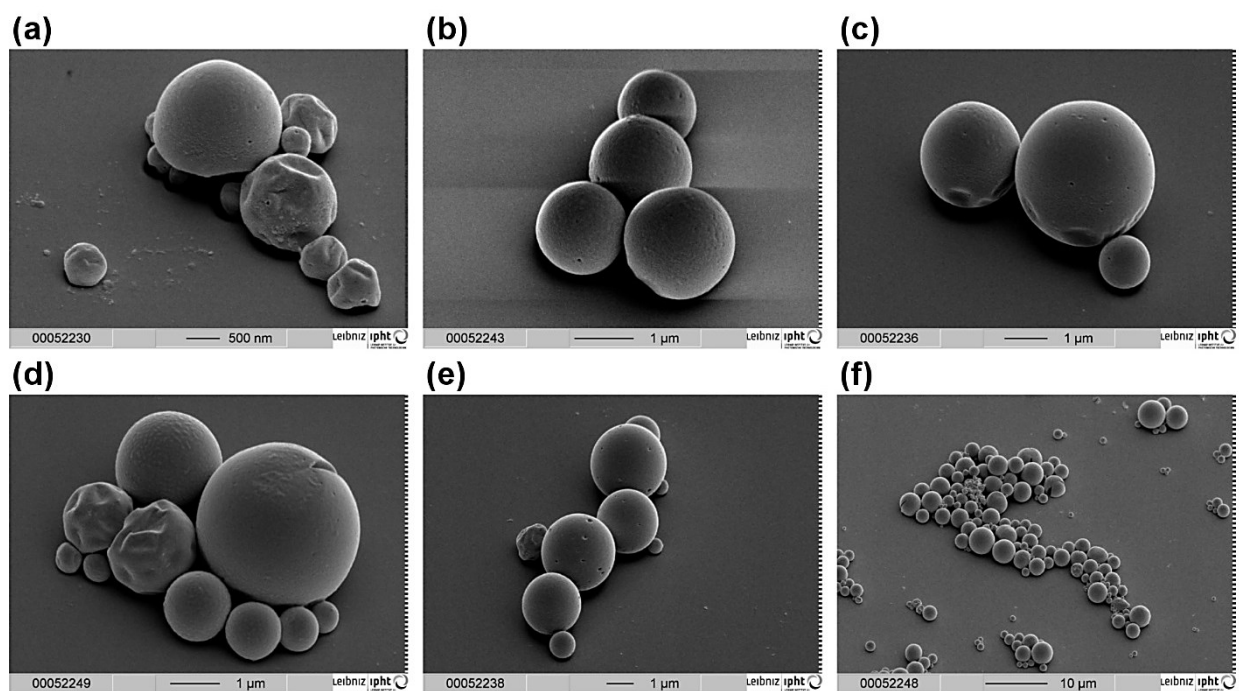


Abbildung 5: repräsentative REM-Aufnahmen verschiedener Partikelformulierungen

a) FITC-DEX-PLGA-Partikel, b) PLGA-Partikel, c-f) DEX-PLGA-Partikel, Maßstabsbalken im Bild angegeben

Die morphologischen Untersuchungen der Partikel zeigten unterschiedlich große, sphärische Partikel mit einer leicht strukturierten, homogenen und wenig porösen Oberfläche (siehe Abbildung 5). Einzelne Partikel erschienen deformiert. Wie in Abbildung 5 zu sehen, lagerten sich die Partikel häufig zu Agglomeraten zusammen. Die in der PCS-Messung nachgewiesenen heterogenen Partikelgrößen, wie auch die mittlere Partikelgröße von 1,5 - 2 μm konnten mittels der REM-Untersuchungen bestätigt werden.

Die gleichmäßige Partikelmorphologie zeigte, dass der jeweils integrierte Wirkstoff homogen im Partikel verteilt war und nicht zwei getrennte Phasen vorlagen.

Die Ähnlichkeit der Partikelstruktur der unterschiedlichen Formulierungen bewies einen reproduzierbaren Herstellungsprozess.

4.1.3 Verkapselungseffizienz und Gehaltsbestimmung

Um die Effektivität der Herstellungsmethode bzgl. der möglichst vollständigen Verkapselung des antiinflammatorischen Wirkstoffes (DEX) zu überprüfen, erfolgte die Untersuchung der Verkapselungseffizienz und des DEX-Gehaltes in den FITC-DEX-PLGA-Partikeln mithilfe der Fluorimetrie. Für die nachfolgenden Experimente konnte somit die Menge an vorhandenem Dexamethason besser abgeschätzt werden.

Um von der gemessenen Fluoreszenzintensität in der Probe auf eine spezifische Konzentration rückschließen zu können, wurde eine Kalibrierfunktion (Abbildung 6) für das partikelfreie FITC-DEX erstellt.

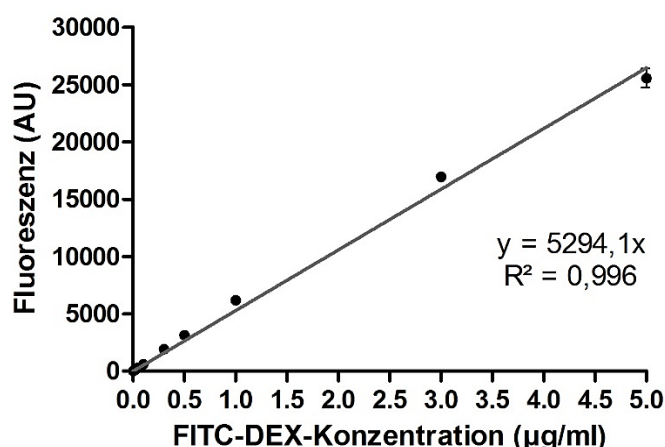


Abbildung 6: Kalibrierfunktion

Mittelwerte aus $n=3$, Fehlerbalken zeigen SEM

Anhand der linearen Kalibrierfunktion konnte für die nachfolgenden photometrischen Untersuchungen der Gehalt an FITC-DEX in der Probe berechnet werden. Die Ergebnisse

der Gehaltsbestimmung von drei FITC-DEX-Partikelchargen sind in Tabelle 1 dargestellt. Die mittels des DEX-Gehaltes errechnete Verkapselungseffizienz ist dort ebenfalls angegeben.

Tabelle 1: Ergebnisse der Gehaltsbestimmung von FITC-DEX in FITC-DEX-PLGA-Partikeln, $n=3$, DEX-Gehalt entspricht dem prozentualen Anteil an der Gesamtpartikelmasse

Partikelcharge	DEX-Gehalt (%)	Verkapselungseffizienz (%)
071116_2	6,46	71,1
201016_1	4,24	46,6
121016_2	5,96	65,6
Mittelwert \pm SD	5,56 \pm 1,17	61,1 \pm 12,8

Ein mittlerer Dexamethasongehalt von $5,56 \pm 1,17$ % in den FITC-DEX-PLGA-Partikeln konnte mit dieser Herstellungsmethode erreicht werden. Bei einem theoretisch möglichen DEX-Gehalt von 9,09 % entsprach dies einer mittleren Verkapselungsrate von $61,1 \pm 12,8$ %. Die einzelnen Partikelchargen wiesen deutliche Unterschiede bzgl. des DEX-Gehaltes und der Verkapselungseffizienz auf.

4.1.4 Freisetzungskinetik

Die *in vitro*-Freisetzungskinetik wurde im Rahmen dieser Arbeit als pharmakokinetische Qualitätskontrolle verwendet. Sie gab unter anderem für die folgenden Versuchsreihen (siehe Abschnitt 3.2.5) Aufschluss, wie viel Dexamethason voraussichtlich in das Nährmedium freigesetzt werden kann ohne Berücksichtigung des Einflusses von zellulären Degradationsprozessen.

Zunächst wurde die Fluoreszenzstabilität des partikelfreien Farbstoffs untersucht. Hierbei konnte über den Zeitraum der *in vitro*-Freisetzung von 15 Tagen eine Abnahme der Fluoreszenzintensität festgestellt werden. Diese wurde mittels der in Abbildung 7 angegebenen logarithmischen Funktion beschrieben. Über diese Funktion konnte die Fluoreszenzintensitätsreduktion in Prozent ermittelt werden, wobei 100 % dem gemessenen Fluoreszenzwert von 5 min entsprachen. Diese Prozentangaben dienten wiederum der Berechnung der freigesetzten Dexamethasonkonzentration aus den Partikeln ohne die zeitbedingte Fluoreszenzminderung.

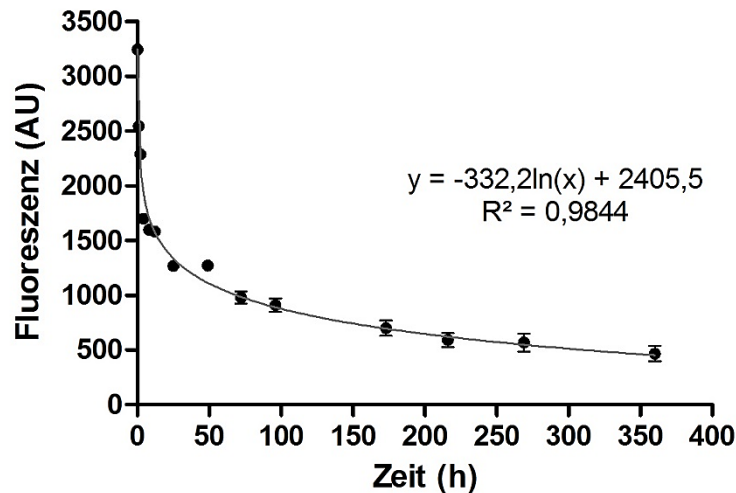


Abbildung 7: Fluoreszenzstabilitätsbestimmungen von partikelfreiem FITC-DEX
Mittelwerte aus $n=3$; Fehlerbalken zeigen den SEM

Nach Bereinigung der Ergebnisse der Freisetzungsuntersuchung vom Verdünnungseffekt (durch die Zugabe von frischem PBS) und von der zeitabhängigen Abnahme der Fluoreszenzemissionsintensität von FITC konnte für die FITC-DEX-PLGA-Partikel die in Abbildung 8 dargestellte Freisetzungskinetik ermittelt werden.

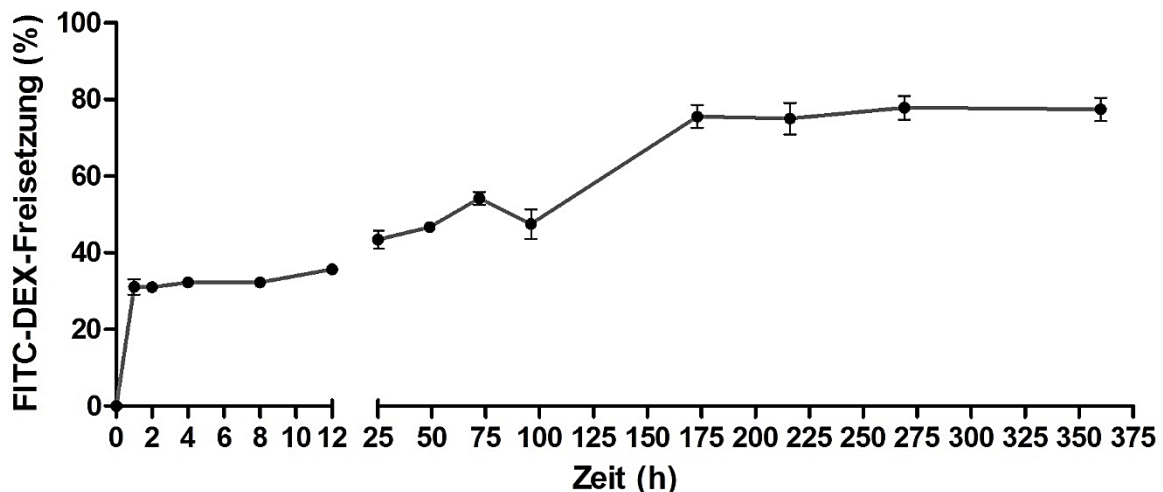


Abbildung 8: in vitro-Freisetzungskinetik von FITC-DEX-PLGA-Partikeln in PBS (pH 7,4)
Mittelwerte aus $n=3$; Fehlerbalken zeigen den SEM

Die hergestellten Partikel wiesen einen starken *Burst-Effect* auf, sodass bereits nach 1 h im Mittel 31 % des FITC-DEX aus den Partikeln freigesetzt war.

Innerhalb des darauffolgenden Zeitraums zwischen 1 h und 12 h zeigte sich eine verzögerte Abgabe, die als Plateau beschrieben werden konnte. In dieser Phase wurden lediglich weitere 4,7 % des FITC-DEX freigesetzt. Danach war ein kontinuierlicher Wirkstoffanstieg messbar (12 h – 173 h), innerhalb dessen weitere 40 % des Wirkstoffes

freigesetzt wurden. Am 3. und 4. Tag der Freisetzung konnte ein Absinken der FITC-DEX-Konzentration vermerkt werden. Nach 7 Tagen stellte sich erneut ein Plateau in der Wirkstofffreigabe ein. Nach 15 Tagen war eine mittlere Freisetzung von 77 % des enthaltenen Wirkstoffes erreicht.

Die Bestimmung der pH-Werte der tagesaktuellen Proben zeigten keinen Farbumschlag des Lackmuspapiers und damit keine Veränderungen, sodass keine Korrektur erfolgen musste.

4.2 Biokompatibilität nach ISO-Norm

4.2.1 Hämokompatibilität

Das Auftreten von Wechselwirkungen zwischen humanen Erythrozyten und Partikeln wurde anhand der Hämolyseaktivität (Hämolyse-Assay) und der Agglomerationspotenz (Erythrozytenaggregationsassay) der Partikel untersucht.

Hämolyseaktivität

Eine Hämoglobinfreisetzung von $< 2\%$ wurde als nicht hämolysierend klassifiziert. 2 - 5 % gelten als schwach hämolytisch. Von einer hämolysierenden Wirkung spricht man ab 5 % gemäß des ASTM F756-08 Standards (ASTM-F756 2008). Diese Grenzen wurden in Abbildung 9 dargestellt.

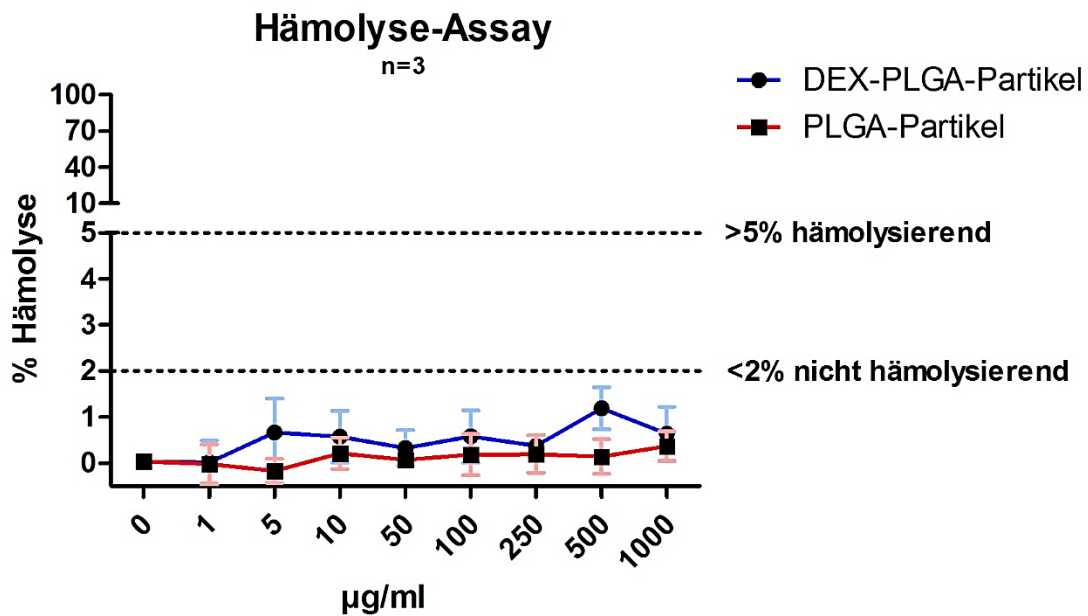


Abbildung 9: Darstellung der konzentrationsabhängigen Hämolysewirkung der Partikel (DEX-PLGA- & PLGA-Partikel im Vergleich) auf Erythrozyten; 0 µg/ml = Negativkontrolle (Behandlung mit PBS pH 7,4) \pm 0 % Hämolyse; nicht dargestellt wurde die Positivkontrolle (Behandlung mit 1 % Triton X-100) \pm 100 % Hämolyse; Markierungslinien zeigen die Grenzeinteilung für Hämolyse; Mittelwerte aus n=3; Fehlerbalken zeigen den SEM

Alle getesteten Konzentrationen von 1 µg/ml – 1 mg/ml verursachten keine Schäden an der Erythrozytenmembran, sodass kein unphysiologisch freigesetztes Hämoglobin nachzuweisen war und die in der Literatur als „nicht hämolysierend“-angegebene Grenze von < 2 % Gesamthämolyse nicht überschritten wurde. Die Hämoglobinfreisetzung der Einzelmessungen lag zwischen -0,9 % bis 2,1 % der vollständigen Freisetzung der Positivkontrolle bei Zellyse.

Die DEX-PLGA-Partikel zeigten dabei eine minimal höhere Hämolyserate als die inerten PLGA-Partikel. Die DEX-PLGA-Partikel erzielten dennoch keine unphysiologischen Wirkungen auf Erythrozyten, sodass dieser Effekt bei einer pharmakologischen Partikel-Therapie zu vernachlässigen wäre.

Mithilfe des Hämolyse-Assays konnte nachgewiesen werden, dass die Partikelformulierungen in allen getesteten Konzentrationen keine hämolytische Potenz aufwiesen.

Erythrozytenaggregation

Die konzentrationsabhängigen Einflüsse der DEX-PLGA- und PLGA-Partikel auf die Erythrozytenagglomeration gesunder Spender wurden in Abbildung 10 repräsentativ visualisiert.

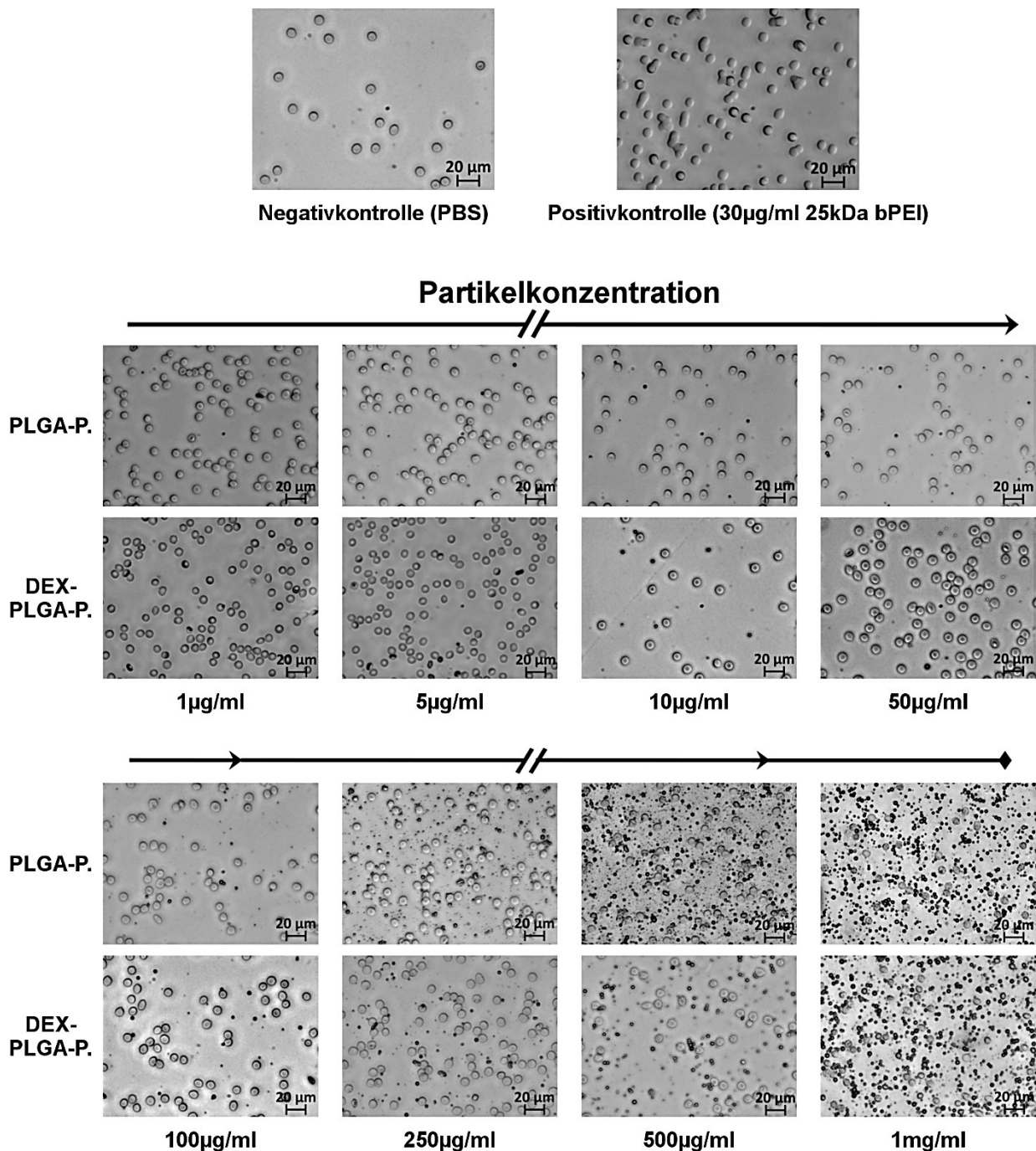


Abbildung 10: repräsentative Aufnahmen aus der Versuchsreihe der Erythrozytenaggregationsassays; oben links: Negativkontrolle (Behandlung mit PBS pH 7,4); oben rechts: Positivkontrolle (Behandlung mit 30 µg/ml 25 kDa bPEI); Darstellung der Erythrozytenaggregation unter Behandlung mit den DEX-PLGA- und PLGA-Partikelformulierungen in verschiedenen Konzentrationen (1 µg/ml – 1mg/ml)

Unter Behandlung der Erythrozyten mit PBS (Negativkontrolle) konnte keine Zellaggregation beobachtet werden. Die Behandlung mit bPEI (Positivkontrolle) führte hingegen zur Ausbildung von Erythrozytenaggregationen (Geldrollenphänomen/Rouleau-Formation siehe Abbildung 10 oben rechts). Für alle getesteten Partikelkonzentrationen konnte

keine Erythrozytenagglomeration nachgewiesen werden. Die Erythrozyten blieben alleinstehend und behielten ihre bikonkave Form. Trotz der in Abbildung 10 sichtbaren Überladung des Zellkulturgefäßes mit Partikeln bei der Behandlung mit hohen Partikelkonzentrationen (250 µg/ml – 1 mg/ml) trat keine Rouleau-Formation der Hämozyten auf. Die Partikel zeigten keine Tendenz einen Agglomerationseffekt auf Erythrozyten auszulösen.

Die Partikel können im Rahmen dieser Reaktionstests als hämokompatibel eingestuft werden.

4.2.2 *In vitro*-Zytotoxizität

Um potentielle Zellschädigung und eine damit verbundene Gefährdung von Geweben durch die in dieser Arbeit synthetisierten Mikropartikel einzuschätzen, wurden Zytotoxizitätsuntersuchungen durchgeführt. Zellkulturen reagieren sehr empfindlich auf toxische Substanzen. Dennoch können diese bisher nicht vollständig *in vivo*-Versuche ersetzen. Sie liefern jedoch erste Erkenntnisse bzgl. der biologischen Kompatibilität der hergestellten Formulierungen. Die Zellkultur wird hierbei mit den zu testenden Partikelformulierungen konfrontiert.

Für das *in vitro*-Screening der Zytotoxizität wurden isolierte humane Monozyten verwendet, da es sich bei diesen Zellen um die physiologischen Vorgängerzellen von Makrophagen handelt, die in zukünftigen Anwendungsmodalitäten die Zielzellen für diese Partikeltherapie darstellen sollen.

Zellviabilität (MTT-Test)

Der MTT-Assay misst die Zellebensfähigkeit der Zellkultur anhand der Zellaktivität. Nur lebensfähige Zellen, die keiner Schädigung durch die zweitägige Partikelbehandlung unterlagen, können diese Aktivität ausüben. Eine erhaltene metabolische Aktivität von > 70 % wurde gemäß ISO 10993-5 als nicht zytotoxisch angenommen. In Abbildung 11 wurde die metabolische Aktivität der Monozyten bei Behandlung mit den jeweiligen Partikelformulierungen in verschiedenen Konzentrationen dargestellt. In der Negativkontrolle wurde die basale Stoffwechselaktivität der Mitochondrien von unbehandelten Monozyten untersucht und als 100 % Zellviabilität festgesetzt.

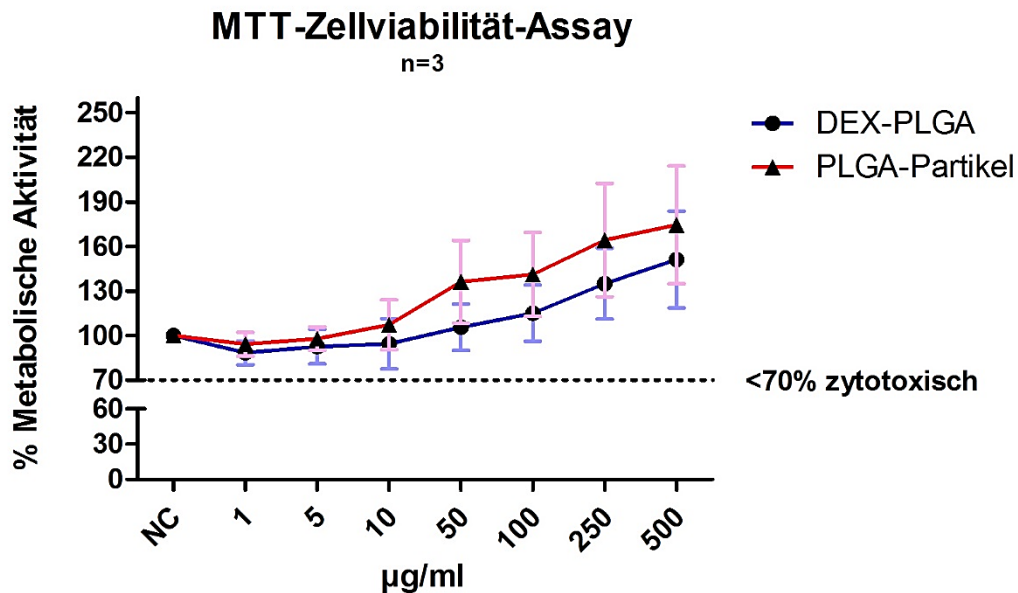


Abbildung 11: metabolische Aktivität nach Inkubation der humanen Monozyten mit verschiedenen Konzentrationen beider Partikelformulierungen (DEX-PLGA- & PLGA-Partikel im Vergleich); NC= Negativkontrolle (keine Partikelbehandlung) $\hat{=}$ 100 % Zellviabilität; Markierungslinie gilt als Zytotoxizitätsgrenze; Mittelwerte aus n=3; Fehlerbalken geben den SEM an

Für beide Partikelformulierungen (DEX-PLGA- & PLGA-Partikel) konnte in keiner Konzentration eine Unterschreitung der metabolischen Aktivität unterhalb von 70 % der Negativkontrolle festgestellt werden. Die Zellviabilität wurde durch die zweitägige Konfrontation mit den Partikeln nicht negativ beeinflusst.

Stattdessen zeigte sich mit steigender Partikelkonzentration ein Anstieg der metabolischen Aktivität der Monozyten, welcher nochmals verstärkt bei den inerten PLGA-Partikeln auftrat. Dieser Anstieg war für die PLGA-Partikel ab einer Konzentration von 10 µg/ml nachweisbar (107 %). Für die DEX-PLGA-Partikel erhöhte sich die metabolische Aktivität im Vergleich zur Negativkontrolle erst ab einer Konzentration von 50 µg/ml (105 %).

Die höchste getestete Partikelkonzentration von 500 µg/ml verursachte einen Anstieg des Zellmetabolismus auf 151 % (DEX-PLGA-Partikel) und 175 % (PLGA-Partikel) des Wertes der Negativkontrolle.

Zytotoxizität (LDH-Assay)

Die durch einen Membrandefekt bedingte, quantitative Freisetzung der LDH aus den primären Monozyten wurde mittels LDH-Zytotoxizitäts-Assay bestimmt. Dieses stabile, lösliche, intrazelluläre Enzym wird in den Extrazellularraum freigegeben, wenn die

Zellmembranintegrität auf irgendeine Weise beeinträchtigt oder geschädigt wird. Dies gilt als früher Marker für Zelltod. Untersucht wurde hierbei, ob die hergestellten Partikelformulierungen (DEX-PLGA- und PLGA-Partikel) einen zytotoxischen Effekt auf die humanen Primärzellmembranen vorweisen. Ob dieser konzentrationsabhängig ist, wurde mittels jeweils unterschiedlichen Partikelmengen im Zellkulturmedium untersucht. Die basale LDH-Freisetzung von Monozyten unter diesen zweitägigen Kulturbedingungen in Zellkulturmedium mit 1 % FCS wurde in der Negativkontrolle bestimmt. Sie wurde für die Kalkulation als vollständige Membranintegrität mit 0 % LDH-Freigabe festgesetzt. Zur Messung der maximalen LDH-Freisetzung bei vollständiger Plasmamembranzerstörung und Zellyse wurden die Monozyten wie in der Negativkontrolle behandelt, nach diesen zwei Tagen jedoch vollständig lysiert und vermessen. Dies entsprach einer 100 %igen LDH-Freisetzung. Eine LDH-Freisetzung von mehr als 10 % der maximalen LDH-Freisetzung wurde gemäß ISO 10993-5 als Grenze zur Zelltoxizität angesehen. Die Mittelwerte der jeweiligen Messbedingung wurden in Abbildung 12 dargestellt.

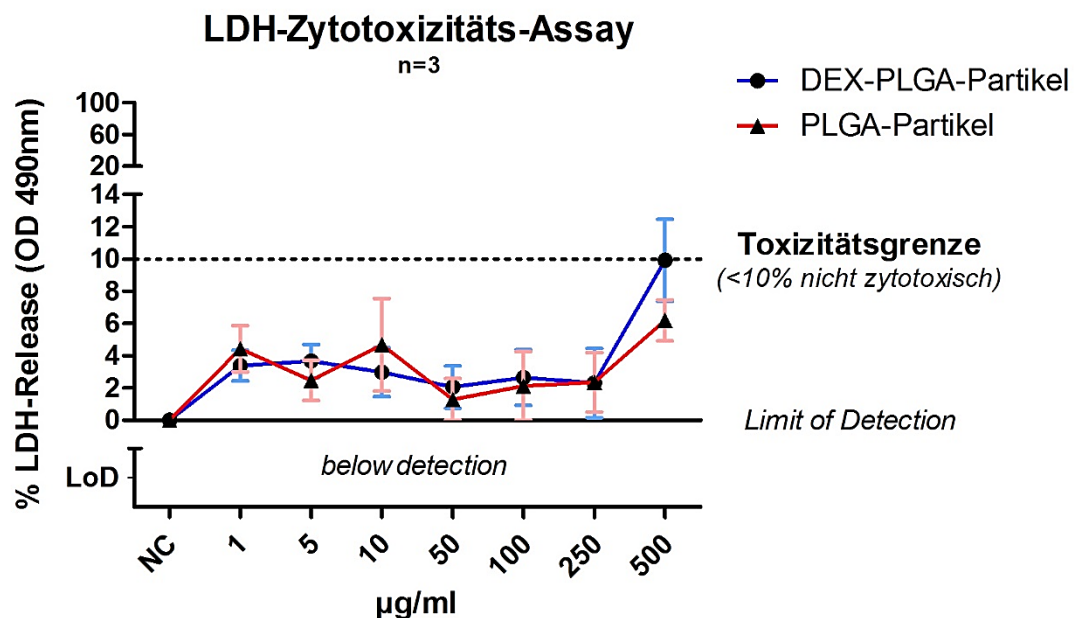


Abbildung 12: LDH-Freisetzung aus Monozyten durch die Behandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen beider Partikelformulierungen (DEX-PLGA- & PLGA-Partikel im Vergleich); NC= Negativkontrolle (keine Partikelbehandlung) \approx 0 % LDH-Freisetzung; nicht dargestellt wurde die Positivkontrolle (Zellyse) \approx 100 % LDH-Freisetzung; Markierungslinie gilt als Zytotoxizitätsgrenze; LoD (Limit of Detection)= Nachweisgrenze; Mittelwerte aus n=3; Fehlerbalken geben den SEM an

Die LDH-Freisetzung beider Partikelformulierungen befand sich nach der Behandlung mit den Partikelkonzentrationen von 1 – 250 µg/ml unterhalb der festgesetzten Grenze von 10 %. Es wurden für beide Partikelsorten mittels Berechnung negative LDH-Mengen

im Überstand bestimmt. Da dies physiologisch unrealistisch ist und auf eine rechenkalculatorische Ursache zurückzuführen ist, wurden diese Werte einer 0 %igen Freisetzung gleichgesetzt und in der graphischen Darstellung (Abbildung 12) als „unterhalb der Detektionsgrenze“ vermerkt.

Für die Partikelkonzentration von 500 µg/ml wurde für beide Formulierungen ein Anstieg der LDH-Freisetzung festgestellt. Die Messwerte der inerten PLGA-Partikel-Formulierung blieben unterhalb der Zytotoxizitätsgrenze und gelten daher als nicht zellmembranzerstörend. Auch der Mittelwert der LDH-Freisetzung nach der Behandlung mit 500 µg/ml DEX-PLGA-Partikel lag mit 9,9 % unterhalb dieser Grenze und würde als nicht zytotoxisch gelten. Eine einzelne Messung der drei unabhängigen Einzelbestimmungen für die DEX-PLGA-Partikel-Formulierung erreichte jedoch einen Wert von 14,5 % und gilt damit als zytotoxisch. Eine beginnende Zytotoxizität für Konzentrationen ab 500 µg/ml der DEX-PLGA-Partikel-Formulierung bliebe zu diskutieren.

Die Untersuchungen der Interaktion der Partikelkonzentrationen mit dem Reagenz des LDH-Assays ergaben Absorptionswerte der Proben, die in etwa den Leerwerten entsprachen. Eine Beeinflussung der Messungen durch die Anwesenheit der Partikel an sich konnte somit ausgeschlossen werden. Diese Daten wurden hier nicht aufgeführt.

4.3 Nachweis der pharmakologischen Aktivität

4.3.1 *Dexamethason-Dosis-Wirkungs-Kurve*

Der konzentrationsabhängige, entzündungssupprimierende Effekt von Dexamethason auf die LPS-getriggerte Zytokinfreisetzung (TNF- α) von Monozyten sollte getestet werden, um die halbmaximale inhibitorische Konzentration von Dexamethason zu bestimmen. Die Ergebnisse dieser Dexamethason-Dosis-Wirkungs-Kurve wurden in Abbildung 13 dargestellt.

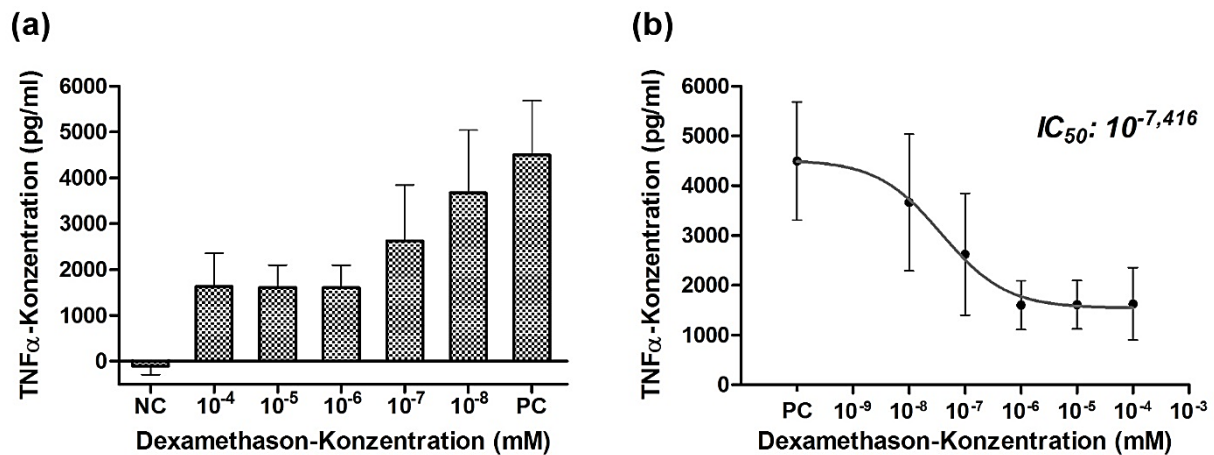


Abbildung 13: (a) dosisabhängiger Effekt von Dexamethason auf die LPS-induzierte TNF- α -Sekretion von humanen Monozyten; (b) Dosis-Wirkungs-Kurve der in (a) dargestellten Ergebnisse mit der mittleren Hemmkonzentration (IC₅₀) in mM; Mittelwerte aus n=6; Fehlerbalken geben den SEM an; NC= Negativkontrolle (Zellen kultiviert in Abwesenheit von LPS und DEX); PC= Positivkontrolle (Zellen mit 10 ng/ml LPS stimuliert ohne DEX)

Die basale TNF- α -Sekretion der Monozyten, die keine Stimulation durch LPS erhielten, war mit dem durchgeführten ELISA nicht detektierbar.

Eine inflammatorische Antwort von Monozyten konnte durch LPS hervorgerufen werden. Durch die 24-stündige Stimulation der Monozyten verschiedener Spender mit 10 ng/ml LPS konnte eine Freisetzung von Zytokinen induziert werden, die im Mittel 4499,97 \pm 1185,37 pg/ml betrug.

Ebenfalls nachweisbar war die konzentrationsabhängige Induktionshemmung dieser Freisetzung durch die prophylaktische Dexamethasongabe vor dem gesetzten LPS-Reiz. Mit den höheren Dexamethasonkonzentrationen von 10⁻⁶ - 10⁻⁴ mM konnte eine Senkung der TNF- α -Sekretion um bis zu 64 % im Vergleich zur Positivkontrolle erreicht werden. Eine Reduktion auf das basale Level der Negativkontrolle konnte mit den getesteten Konzentrationen nicht erreicht werden. Mit abnehmender Dexamethasonkonzentration war ein Anstieg der TNF- α -Freisetzung der Monozyten festzustellen. Bei der niedrigsten getesteten Dexamethasonkonzentration von 10⁻⁸ mM wurde nur noch eine Reduktion um ca. 18 % erreicht. Mithilfe der logarithmischen Dosis-Wirkungs-Kurve (Abbildung 13b) konnte die mittlere inhibitorische Konzentration von Dexamethason auf Monozyten, die 24 h mit LPS stimuliert wurden, ermittelt werden. Die IC₅₀ lag bei 10^{-7,416} mM Dexamethason. Unter Einbezug der molaren Masse von DEX ergibt sich rechnerisch eine Konzentration von circa 15,1 ng/ml.

4.3.2 *Untersuchung der pharmakologischen Aktivität der Partikel auf die LPS-induzierte Entzündungsreaktion von Monozyten*

Der inflammationssupprimierende Effekt, der bei der Behandlung mit unverkapseltem Dexamethason in Lösung nachgewiesen werden konnte, sollte in dieser Versuchsreihe für die mit Dexamethason beladenen Mikropartikel untersucht werden. Diese biologische Wirkung der antiinflammatorischen DEX-PLGA-Partikel wurde im Vergleich zu den inerten PLGA-Partikeln getestet. Hierbei wurde nicht unterschieden, ob die Substanz vom Partikel freigesetzt wurde und in Lösung auf die Zellen wirkte oder ob der ganze Partikel samt eingeschlossenem Dexamethason von den Monozyten phagozytiert wurde und dadurch seine intrazelluläre Wirkung erzielte. Für diese Experimente könnte beides der Fall sein.

Die isolierten Monozyten wurden anstelle des gelösten Dexamethason nun mit den beiden Partikelformulierungen unter denselben Versuchsbedingungen wie in Abschnitt 3.2.5.1 kultiviert: zuerst erfolgte eine 24-stündige prophylaktische Behandlung mit den zwei verschiedenen Mikropartikelsorten (DEX-PLGA- und PLGA-Partikel) in unterschiedlichen Konzentrationen, anschließend folgte die Entzündungsinduktion durch 10 ng/ml LPS für weitere 24 h. Da die Partikel mit der ersten Überstandsentsfernung nicht von den Zellen abgewaschen wurden, verblieben sie während der LPS-Behandlung in unbekannter Konzentration auf den Zellen. Die im Überstand mittels ELISA quantitativ bestimmte Konzentration der Zytokine TNF- α und IL-6 sind in Abbildung 14 dargestellt.

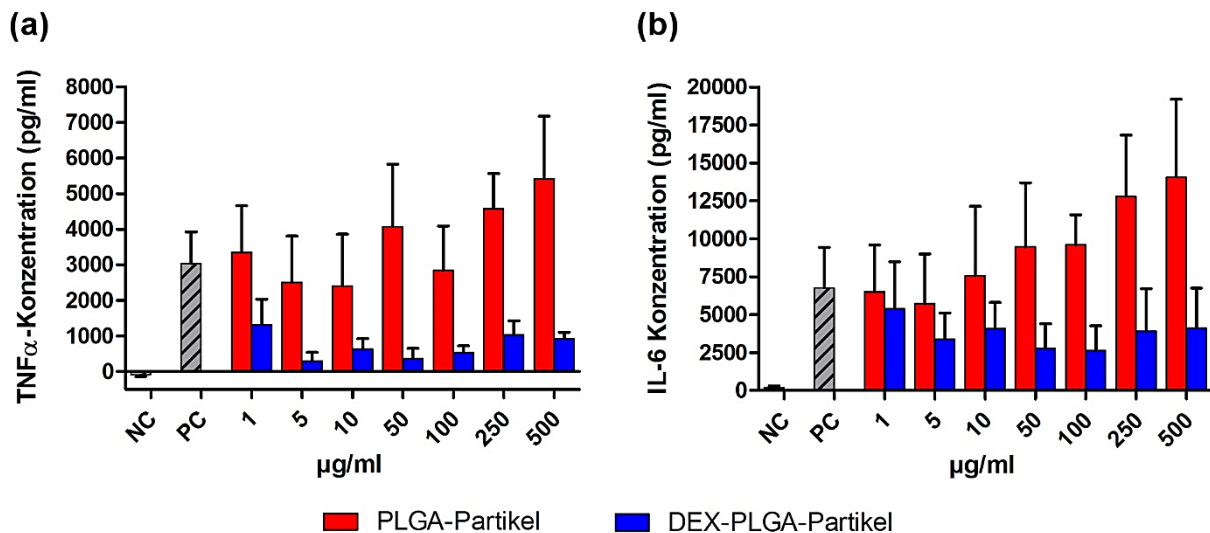


Abbildung 14: Darstellung der Wirkung unterschiedlicher Konzentrationen von PLGA-Partikel (rot) und DEX-PLGA-Partikel (blau) in $\mu\text{g/ml}$ auf die Sekretion der Zytokine (a) TNF- α und (b) IL-6 von LPS-getriggerten Monozyten; Mittelwerte aus $n=5 \pm \text{SEM}$; NC= Negativkontrolle (Zellen kultiviert in Abwesenheit von LPS und Partikel); PC= Positivkontrolle (Zellen mit 10 ng/ml LPS stimuliert ohne Partikel)

In der Negativkontrolle zeigten die Zellen keine (TNF- α) oder eine nur minimale (IL-6) basale Zytokinfreisetzung, wenn sie keine Stimulation durch LPS oder Partikel erhielten. In der Positivkontrolle konnten im Mittel Zytokinfreisetzungen von 3037 pg/ml (TNF- α) und 6767 pg/ml (IL-6) durch die LPS-Stimulation induziert werden.

Bei der Behandlung der Monozyten mit unterschiedlichen DEX-PLGA-Partikelkonzentrationen (1 – 500 $\mu\text{g/ml}$) konnte für alle getesteten Konzentrationen eine Reduktion der Zytokinfreisetzungen im Vergleich zur Positivkontrolle festgestellt werden. Dies galt für beide getesteten Zytokine (TNF- α und IL-6). Die Unterdrückung der freisetzungsauslösenden Reaktionen in der Zelle gelang hierbei für TNF- α stärker als für IL-6. So konnte für TNF- α eine Freisetzungsreduktion um bis zu 91 % bereits ab einer Partikelkonzentration von 5 $\mu\text{g/ml}$ erreicht werden. Bei IL-6 gelang eine maximale Senkung von ca. 61 %, die erst mit einer höheren Partikelkonzentration von 100 $\mu\text{g/ml}$ erreicht wurde. Eine Entzündungsinhibition, die auf den Ausgangswert der monozytären Zytokinproduktion zurückführte, konnte durch die antiinflammatorischen Partikel nicht erlangt werden. Die inerten PLGA-Partikel, die keinen antiinflammatorischen Wirkstoff enthielten, zeigten diesen entzündungshemmenden Effekt nicht. Anders als erwartet konnte sogar eine verstärkte Zytokinabgabe der Monozyten nachgewiesen werden, die mit steigender Partikelkonzentration zunahm. Dies stellte sich für beide getesteten Zytokine heraus. Bei der höchsten Partikelkonzentration von 500 $\mu\text{g/ml}$ stieg die TNF- α -Freisetzung auf 178 %

des Wertes der Positivkontrolle an. Die IL-6-Freisetzung belief sich sogar auf 208 % des Referenzwertes.

Dieser Trend der ansteigenden Zytokinabgabe konnte in stark verminderter Form auch für die DEX-PLGA-Partikel dargestellt werden. Trotz der vordergründigen Freisetzungsrückbildung konnte mit steigender Partikelkonzentration ein erneuter geringer Zytokinanstieg im Überstand detektiert werden. Obwohl mit zunehmender Partikelkonzentration auch eine erhöhte Dexamethasonkonzentration einherging, schien eine stärkere Stimulation der Monozyten aufzutreten.

4.4 Visualisierung der Mikropartikel in der Monozytenkultur

4.4.1 Raman-Spektroskopie

Um eine Internalisierung der hergestellten Partikel in die Monozyten nachzuweisen, wurde als eine Methode die Raman-Spektroskopie gewählt.

Zur Erzeugung von Referenzspektren für die spätere bildaufarbeitende Cluster-Analyse wurden zuerst die zu differenzierenden Substanzen ramanspektroskopisch vermessen. In Abbildung 15 wurden die Referenzspektren für inerte PLGA-Mikropartikel und Dexamethason (jeweils in Pulverform), welche sich nach wiederholten Messung abzeichneten, dargestellt.

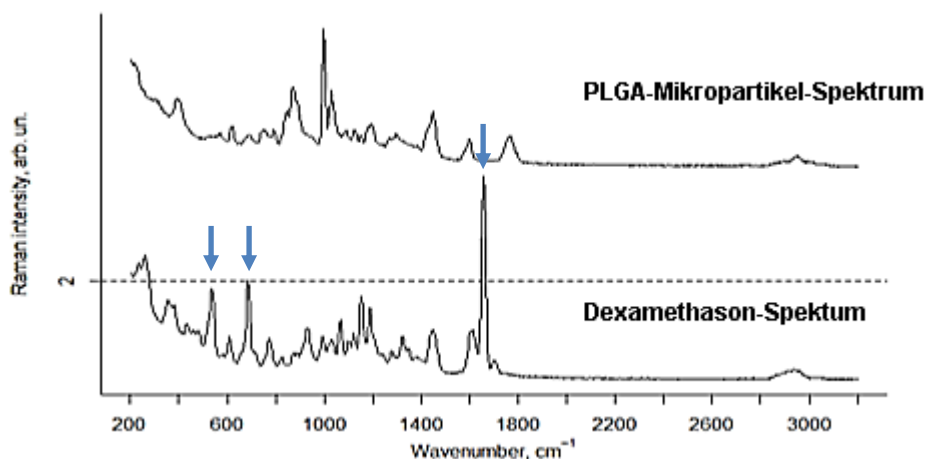


Abbildung 15: Raman-Referenzspektren der Partikelmaterialien (PLGA-Partikel & Dexamethason) in Pulverform in der Spektralregion 200 – 3100 cm^{-1} ; Pfeile zeigen typische Spektralbanden für Dexamethason

Die blauen Pfeile in Abbildung 15 zeigen die sich als charakteristisch für Dexamethason darstellenden Spektralbanden. Die Konzentration des gelösten Dexamethasons lag unterhalb der Nachweisgrenze des Raman-Spektrometers, sodass Dexamethason nicht in

Lösung vermessen werden konnte. Daher wurden diese markierten Spektralbanden genutzt, um Dexamethason im Partikel bei der Untersuchung der DEX-PLGA-Partikel in PBS ausfindig zu machen.

Auf die spezifischen Spektralbanden des PLGA-Partikels wurde in Abbildung 17e eingegangen.

Es wurde zudem untersucht, ob das im Partikel verkapselte Dexamethason ebenfalls mittels Raman-Spektroskopie darstellbar wäre. In Abbildung 16c wurden die dafür benötigten Referenzspektren der Clusteranalyse von DEX-PLGA-Partikeln nach 24-stündiger Inkubation in Lösung dargestellt. Die erfassten Spektren der gelösten Substanzen wichen von denen der Pulverform (Abbildung 15) ab. Allerdings konnten im Partikelzentrum mithilfe der Clusteranalyse eine vom restlichen PLGA-Partikel-Spektrum abweichende Substanz ausfindig gemacht werden, die in zwei spezifischen Spektralbändern mit pulverigem Dexamethason übereinstimmte (Pfeile in Abbildung 15 und 16c vergleichen) und damit als solches definiert wurde.

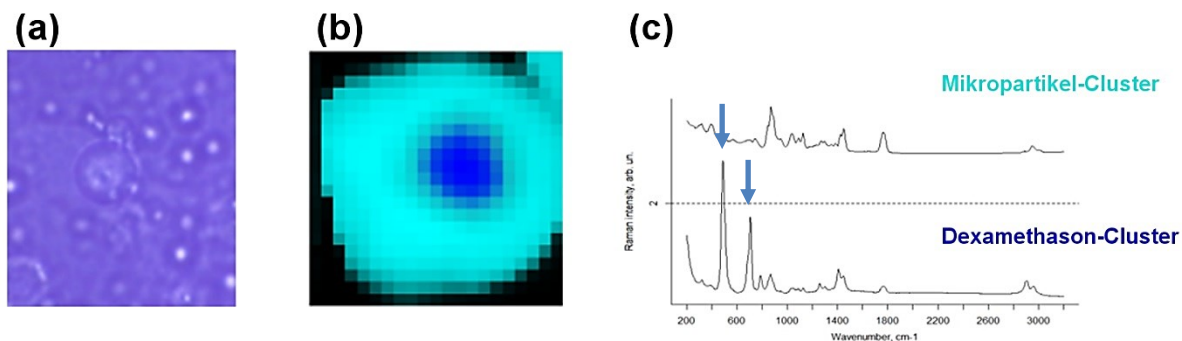


Abbildung 16: DEX-PLGA-Mikropartikel nach 24 h Inkubation in RPMI-Medium; **(a)** Lichtmikroskopbild; **(b)** N-Finder Cluster-Analyse des vermessenen DEX-PLGA-Partikels mit unterschiedlicher Farbkodierung von PLGA (hellblau) & Dexamethason (blau); **(c)** Ramanreferenzspektrum des Mikropartikel- und Dexamethason-Clusters, farbliche Markierung entsprechend Bild (b), Pfeile zeigen wiedergefundene Spektralbanden von Dexamethason aus Abbildung 15

Anhand der Clusteranalyse und der verschiedenfarbigen Kodierung konnte die in Abbildung 16b gezeigte Verteilung von Dexamethason im DEX-PLGA-Partikel detektiert werden. Dexamethason konnte nach 24-stündiger Inkubation in Zellkulturmedium nur im Zentrum des Partikels in detektierbarer Konzentration nachgewiesen werden.

Im zweiten Teil des Versuchs wurde die Penetration der Partikel in Monozyten untersucht. Es galt nachzuweisen, dass die hergestellten Mikropartikel von den isolierten Monozyten internalisiert werden. Der Ablauf dieser Datengewinnung wurde bildlich in Abbildung 17 dargestellt.

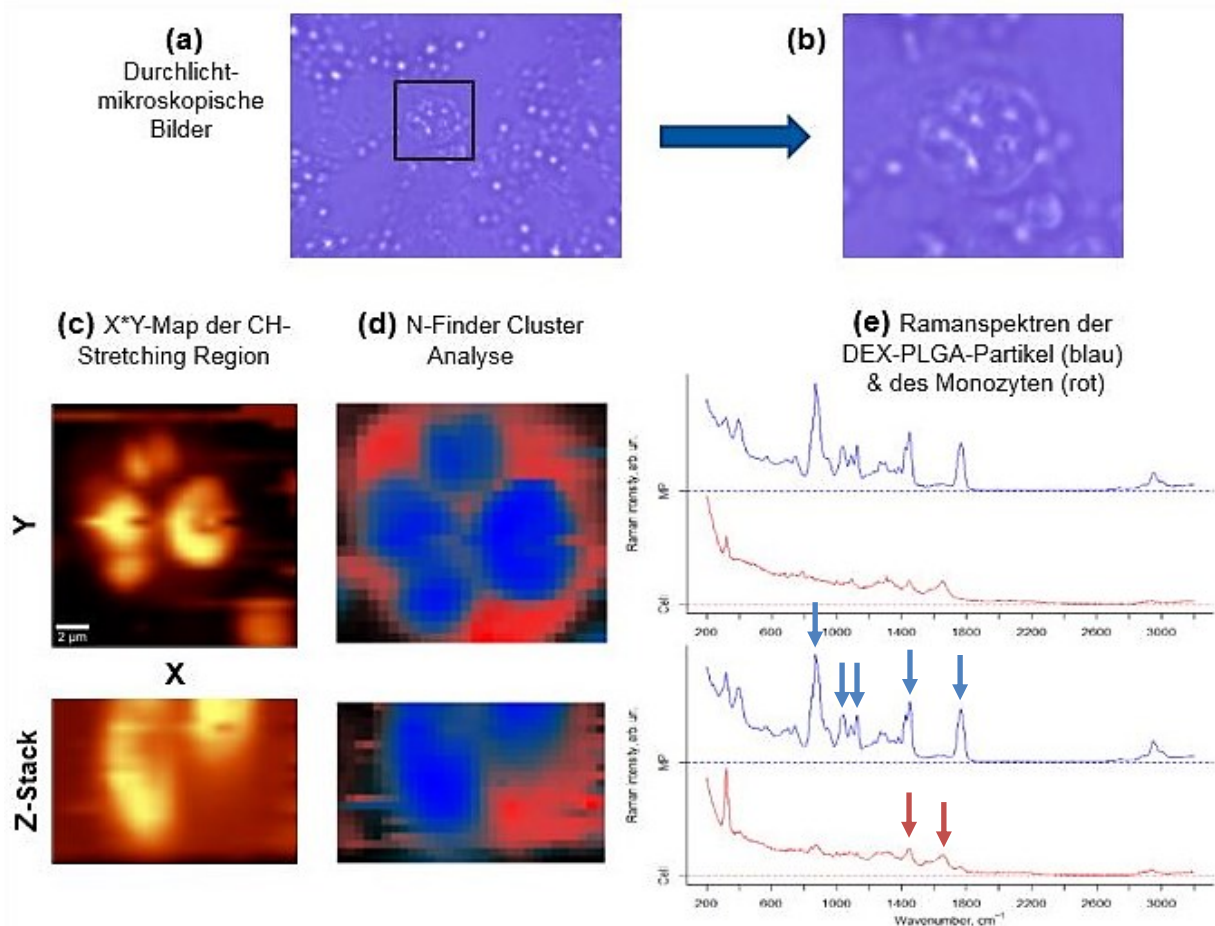


Abbildung 17: (a) durchlichtmikroskopische Aufnahme von Monozyten mit DEX-PLGA-Mikropartikel, (b) Vergrößerung einer vermessenen Zelle, Partikel sichtbar; (c) Raman-Spektroskopie-Bild der CH-Stretching-Region eines Monozyten mit Partikel in 2D (oben) und Z-Stack (unten); (d) N-Finder Cluster-Analyse des selben Ausschnittes wie (c) mit Farbkodierung von PLGA-Partikel (blau) und Zelle (rot) in 2D und Z-Stack; (e) korrespondierende Raman-Referenzspektren der Cluster aus (d) für DEX-PLGA-Partikel (blau, oben) und Monozyten (rot, unten) in der Spektralregion 200-3100 cm^{-1} , Pfeile zeigen typische Spektralbanden für PLGA-Partikel (blau) und biologische Zellen (rot)

Mithilfe der durchlichtmikroskopischen Ansicht (Abbildung 17a & b) wurden einzelne Zellen fokussiert und hinsichtlich ihrer Raman-Streuung vermessen. Dies ergab ein Bild mit der Darstellung der CH-Stretching-Region (Abbildung 17c). Daraus konnten mittels VCA-Datenanalyse im Durchschnitt zwei Cluster differenziert werden. Dabei wurde zwischen zwei Referenzspektren (Abbildung 17e) unterschieden, die sicher von den umgebenden Signalen abzugrenzen waren. In der Rekonstruktion konnten diese Cluster unterschiedlich farblich kodiert werden, sodass sich Bilder, wie z.B. das in Abbildung 17d gezeigte, ergaben.

Das eine Cluster (rot) war repräsentativ für einen Zellkörper und reflektierte die Proteinzusammensetzung von Zellen. Die entsprechenden Ramanbanden (in Abbildung 17e mit roten Pfeilen markiert) konnten den Schwingungen von Protein und ihren chemischen

Bindungen zugeordnet werden. Beispielsweise entspricht das Ramanband um 1662 cm^{-1} den C=O-Teil der Amidbindungen und das um 1440 cm^{-1} den Deformationsschwingungen von CH_2 - Gruppen.

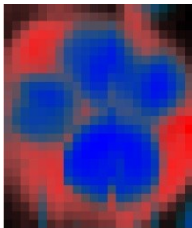
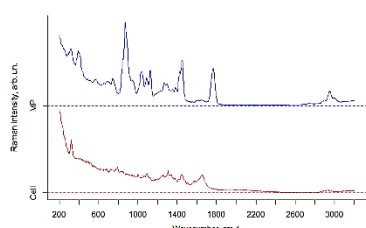
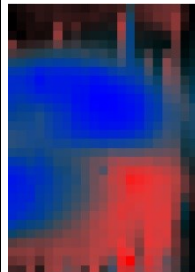
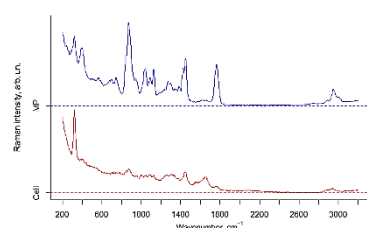
Das Signal der Mikropartikel konnte als PLGA-typisch identifiziert werden. Als starke spezifischen Ramanbanden konnten hier die Bereiche um 872 cm^{-1} als Vibration der C-COO-Verbindung der Milchsäure, um 1768 cm^{-1} als Carbonylgruppe der PLGA-Ester-Bindung, sowie zusätzlich 1046 cm^{-1} , 1129 cm^{-1} und 1453 cm^{-1} (mit blauen Pfeilen in Abbildung 17e markiert) gefunden werden (Schrader 1995).

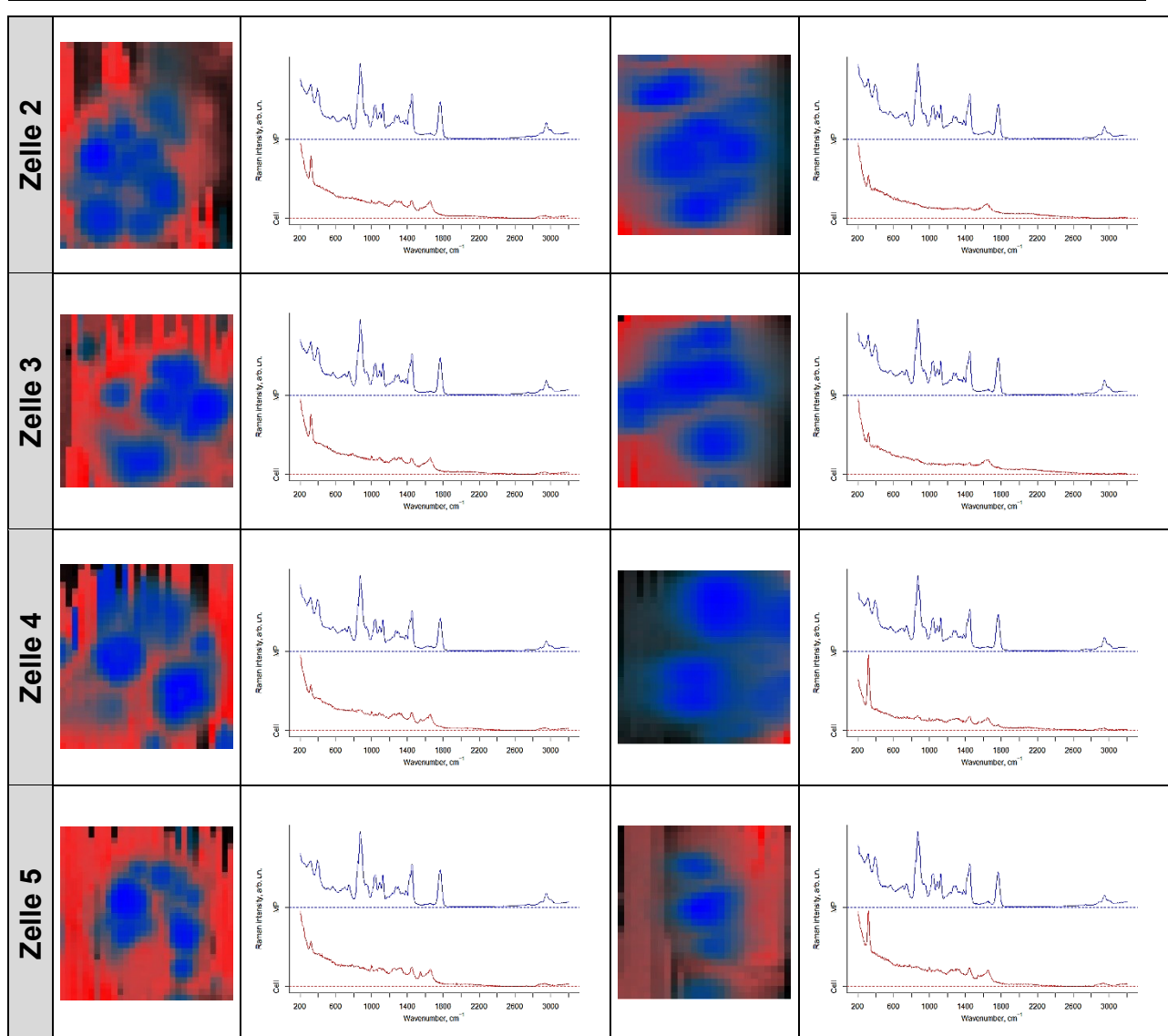
In diesen Messungen nicht detektierbar war das Referenzspektrum von Dexamethason. Dexamethason konnte damit kein Cluster bilden und in den Partikeln oder in den Zellen bildlich nicht dargestellt werden.

Anhand dieser Datenverarbeitung wurde nun ein Bild generiert, welches die Partikellokalisierung in der Zelle zeigte. Die Partikel lagerten der Zellen dabei nicht nur auf oder hafteten an der Plasmamembran. Durch die zusätzliche Darstellung der Tiefe im Z-Stack konnten die Partikel als in die Zelle integriert nachgewiesen werden. Wie beispielhaft in Abbildung 17d gezeigt, konnten meist drei oder mehr Partikel in den Monozyten nachgewiesen werden.

In Tabelle 2 wurden weitere Raman-Messungen dargestellt, die das Ergebnis untermauern.

Tabelle 2: repräsentative Darstellung von Raman-Referenzspektren und farblich kodierter N-Finder Cluster Analyse (blau= DEX-PLGA-Mikropartikel; rot= Zelle) fünf vermessener Zellen in X*Y (2D)-Darstellung und Z-Stack

	X*Y Map	X*Y Spektrum	Z-Stack-Map	Z-Stack Spektrum
Zelle 1				



4.4.2 *ELYRA-Hochauflösungsmikroskopie (HR-SIM)*

Als zweite Methode zur Visualisierung der Partikellokalisierung in Monozyten wurde die hochauflösende, strukturiert beleuchtete Fluoreszenzmikroskopie gewählt. Hierfür wurden zwei Fluoreszenzfarbstoffe ausgewählt, deren Absorption- und Emissionsspektren sich wenig überschneiden, damit eine sichere und valide Trennung der verschiedenen Organellen im Kontext der Bildverarbeitung erfolgen kann. Im Versuch wurden fluoreszierende FITC-DEX-Partikel mit Monozyten über 24 h inkubiert. Die Plasmazellmembran wurde ebenfalls mit einem fluoreszierenden Farbstoff (CellMask™ Deep Red Plasma membrane stain) gefärbt, um die Zellgrenzen sichtbar zu machen.

Repräsentative Aufnahmen in drei Ebenen (Abbildung 18) konnten die Lokalisation der Partikel im Zytoplasma nachweisen. Wie schon in Abschnitt 4.4.1 beschrieben, wurden

hier ebenfalls mehrere Partikel pro Zelle detektiert. Eine Übereinstimmung mit den erzeugten Raman-Bildern lag demnach vor.

Die Partikelmatrix (PLGA) war dabei nicht sicher zu differenzieren, da sie keine spezielle Fluoreszenz aufweist. Fluoreszierend war nur der im Partikel enthaltene Wirkstoff Dexamethason, der in Abbildung 18 grün dargestellt wurde. Die runde Form und der entsprechende Durchmesser von ca. 2 μm erlaubte die Annahme, dass es sich um Partikel handelte. Ein grünlicher Schimmer, der sonst rot dargestellten Plasmamembran zeigte das Vorhandensein von freiem, nicht partikelgebundenem Dexamethason ubiquitär auf der Zelloberfläche verteilt an.

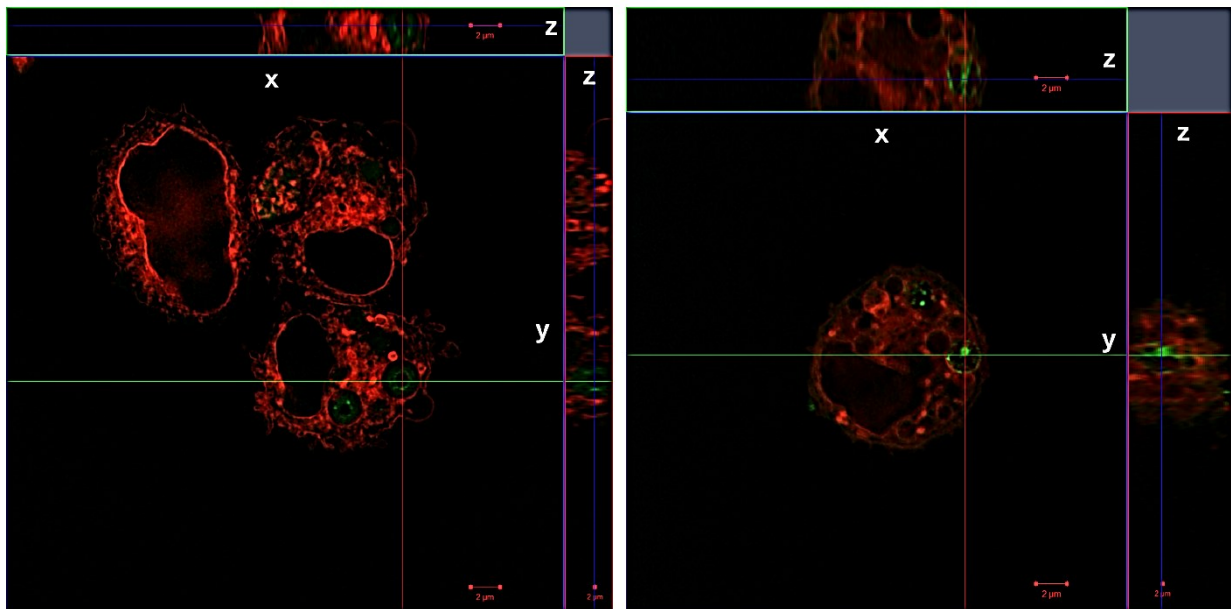


Abbildung 18: repräsentative Fluoreszenz-HR-SIM-Mikroskopbilder von Monozyten, welche 24 h mit FITC-DEX-PLGA-Partikeln inkubiert wurden; Zytoplasmamembran, gefärbt mit Cell-Mask Deep Red, wird rot dargestellt; Fluorescein-Dexamethason in den Partikeln ist grün gekennzeichnet, Z-Stack zusätzlich dargestellt; Maßstabsbalken entspricht 2 μm

5. Diskussion

Zentrales Ergebnis der Studien ist, dass DEX-haltige Mikropartikel von humanen Monozyten, die aus peripherem Blut isoliert wurden, aufgenommen werden. Eine LPS-induzierte Freisetzung der proinflammatorischen Zytokine TNF- α und IL-6 kann durch die wirkstoffhaltigen Partikel effektiv supprimiert werden. Die Partikel zeigen sich in den biologischen Experimenten jedoch nicht inert, denn in hohen Konzentrationen veranlassen sie eine Aktivierung der Monozyten.

Für diese Arbeit wurden drei unterschiedliche Mikropartikeltypen hergestellt: 1. PLGA-Partikel, 2. DEX-PLGA-Partikel und 3. FITC-DEX-PLGA-Partikel.

Die PLGA-Partikel, die nur aus dem Polymer PLGA bestanden und keinen Wirkstoff enthielten, dienten dem biologischen und morphologischen Vergleich zu den in dieser Arbeit untersuchten Partikeln. Diese wurden genutzt, um die Wirkung der verwendeten Trägermaterialien (PLGA, Lösungsmittel) auf biologische Systeme zu testen, um einen Vergleich für die Wirksamkeit der wirkstoffbeladenen Partikel zu haben und um zu testen, welche Einflüsse das Dexamethason auf die Morphologie und die Eigenschaften der Partikel hat. Die in dieser Studie zu untersuchenden Partikel waren die wirkstoffhaltigen FITC-DEX-PLGA- und DEX-PLGA-Partikel. Diese enthielten als biologisch aktive Substanz Dexamethason. Um dieses sensitiv quantifizierbar (fluorimetrische Quantifizierung) und sichtbar (HR-SIM) zu machen, wurde für die FITC-DEX-PLGA-Partikel Dexamethason verwendet, an welches FITC kovalent gebunden war. Hierbei handelt es sich um einen etablierten, standardisierten Fluorophor, welcher mit üblichen Fluoreszenzmikroskopen und Fluorimetern detektierbar ist.

5.1 Physikochemische Partikelcharakterisierung

Die physikochemischen Eigenschaften der Partikel bedingen stark die pharmakokinetische Biodistribution, die Pharmakodynamik, die Biokompatibilität und die therapeutische Effizienz. Dazu gehören Partikeleigenschaften wie Größe, Form, Oberflächenladung (Zetapotential), Oberflächenstruktur und -chemie (z.B. reaktive Gruppen, Liganden für Rezeptoren) und der Applikationsweg (Aggarwal et al. 2009). Ebenfalls bewirken sie die Adsorption von Proteinen an der Partikeloberfläche (Protein-Corona) (Cedervall et al.

2007), wobei sich diese beide Komponenten wechselseitig stark beeinflussen und weitreichende pharmakotherapeutische Bedeutung haben (Mahmoudi et al. 2011).

Es handelt sich bei den physikochemischen Eigenschaften um variierbare Kernfunktionen des *Disease-Targetings*. Eine genaue Kenntnis und eine angepasste Modifikation dieser zur Erschaffung eines optimierten, intelligenten DDS ist essentiell, um ihre Wirkungen und ihr Verhalten *in vivo* nutzbar und kontrollierbar zu machen. Dabei bleibt die Kombination der verschiedenen partikulären Merkmale als pharmazeutische Ansatzstrategien notwendig, um den Erfolg des *Disease-Targetings* mittels Dexamethason-beladener Mikropartikel im komplexen System des Magen-Darm-Traktes entscheidend zu beeinflussen und zu potenzieren.

Dafür wäre zukünftig eine präzise Partikelherstellung im großen Maßstab, wie beispielsweise die „*Particle replication in nonwetting templates*“ (PRINT)-Technologie, benötigt. Mittels dieser neuen Technik können definierte Partikelmerkmale (z.B. Größe, Form, chemische Zusammensetzung, Ladung und spezielle Oberflächenmodifikationen) für ein spezifisches *Disease-Targeting* exakt umgesetzt werden (Xu et al. 2013).

5.1.1 Partikelgrößenverteilung und Zetapotenzial

Innerhalb der *Disease-Targeting*-Strategien stellen die Partikelgröße und die Oberflächeneigenschaften, wie z.B. das Zetapotenzial, ein wichtiges Charakteristikum zur Kontrolle und Beeinflussung der Partikeltranslokation sowie der Ablagerung im Gewebe dar. In der PCS-Messung und mithilfe der REM-Bilder konnte eine mittlere Partikelgröße (*Z-Average*) von ca. 1,5-2 μm in allen drei Partikelformulierungen nachgewiesen werden. Die hergestellten Mikropartikel können somit von Zellen des angeborenen intestinalen Immunsystems (Makrophagen, Dendritische Zellen) aktiv aufgenommen werden, welche Bakterien und Partikel $\leq 4 \mu\text{m}$ phagozytieren (Collnot et al. 2012). Die Partikel wiesen damit eine geeignete Größe für die Überprüfung der Internalisierungspotenz anhand von humanen Monozyten auf (Champion et al. 2008). Die ermittelten *Z-Averages* wichen trotz identischer Herstellungsmethode zwischen den unterschiedlichen Partikelformulierungen leicht ab. Aber auch innerhalb einer Partikelformulierung zeigte sich eine polydisperse Verteilung der Partikelgrößen durch den mittleren PDI von ca. 0,27. Zurückzuführen ist dies auf den manuellen Herstellungsprozess, bei dem trotz genauester Protokolleinhaltung minimale Abweichungen z.B. bei der Einwaage der Chemikalien, Waschvorgängen, der Probenaufbereitung usw. unvermeidbar sind und daher Partikelchargen

mit variierendem *Z-Average* produziert werden. Auch die PCS-Größenanalytik weist potentielle Fehlerquellen auf, die zu einer Aggravation der Größenschwankung beitragen könnten (Müller und Schuhmann 1996). Genannt seien hier z.B. interpartikulare Wechselwirkungen oder auch eine Probeninstabilität während der Messung. Allerdings konnte mithilfe der REM-Aufnahmen die Polydispersität der Partikelformulierungen visualisiert und damit bestätigt werden. Um aber die Vergleichbarkeit der Partikeleigenschaften beizubehalten, wurden keine formulierungsindividuellen Veränderung am Herstellungsprozess vorgenommen. Perspektivisch könnte mithilfe eines automatisierten Herstellungs- und Messprozesses die Partikelgröße angeglichen und gegebenenfalls Monodispersität erreicht werden.

Das negative Zetapotenzial, welches in allen drei Partikelformulierungen gemessen wurde, könnte eine positive Eigenschaft für die selektive Anlagerung an inflammatorische Darmbereiche darstellen. Jubeh et al. (2004) zeigte ein stärkeres Anhaften von negativ geladenen Medikamententrägern an entzündetem Gewebe, in welchem inflammationsbedingt verstärkt positiv geladene Proteine wie z.B. Transferrin exprimiert werden (Tirosh et al. 2009) und vor allem eingewanderte Eosinophile vermehrt kationische Proteine freisetzen (Carlson et al. 1999, Winterkamp et al. 2000). Zudem phagozytieren Makrophagen bevorzugt negativ geladene Partikel (Sarmiento et al. 2011).

Konträr hierzu wird in der Literatur ebenso für eine positive Oberflächenladung der Wirkstoffträger (z.B. mit Chitosan) plädiert. So sollen diese vor allem mukoadhäsiv sein, was insbesondere bei der für M. Crohn typischen gesteigerten Mukusproduktion von Vorteil sein könnte (Collnot et al. 2012). Zudem kann durch die starke Adhäsion an die Mukosa eine vorzeitige Entfernung der Partikel durch die für CED typische gesteigerte Darmmotilität verhindert werden (Urayama und Chang 1997). Jedoch induzieren positiv geladenen Partikel eher Entzündungsreaktionen als negativ oder neutral geladene (Dobrovolskaia und McNeil 2007), was bezogen auf die CED-Therapiestrategie kontraproduktiv wäre.

Die Oberflächenladung der Partikel ist ein interessanter, aber noch intensiv zu erforschender Ansatzpunkt für das selektive *Targeting* von spezifischen Bereichen im Darm. Abschließend ist diesbezüglich noch nicht geklärt, welche elektrostatischen Interaktionen mit ladungstragenden Substanzen des GI-Traktes zu erwarten sind und welche Bindungen während des GI-Transits eingegangen werden (z.B. mit Gallensäuren,

Proteinen, Bakterien, Muzinen) (Lundqvist et al. 2008, Aggarwal et al. 2009). Zumal bzgl. der Substanzzusammensetzung des GI-Traktes gravierende inter-, aber auch intraindividuelle Unterschiede bestehen (Gilbert et al. 2016).

5.1.2 Oberflächenstruktur und -beschaffenheit

Ebenfalls bestimmt die Oberflächenmorphologie der Partikel unter anderem die biologischen Interaktionen der Partikel im Körper und den Internalisierungsmodus der Zellen. Zudem hat sie einen Einfluss auf die Thrombogenität und die Komplement-Aktivierungspotenz der Partikel (Dobrovolskaia et al. 2008). Zusätzlich wird das Freisetzungsverhalten von der Partikelstruktur bestimmt.

Mithilfe der REM-Aufnahmen konnte die Oberflächenbeschaffenheit der Partikel visualisiert werden. Ähnliche Partikelmorphologien sind für Dexamethason- oder FITC-Dextran beladene PLGA-Mikropartikel der gleichen Polymerzusammensetzung in der Literatur beschrieben und dargestellt (Hickey et al. 2002, Cai et al. 2009). Zudem ähnelten sich die drei unterschiedlichen Partikelformulierungen in ihrer Oberflächenstruktur und Form, sodass anzunehmen ist, dass Dexamethason oder FITC-DEX keinen großen Einfluss auf die Partikelmorphologie ausüben. Das Verhalten der verschiedenen beladenen Partikel blieb somit in den nachfolgenden Experimenten bzgl. dieser Eigenschaft vergleichbar. Die dargestellte Partikelagglomeration kann auf die hohe Oberflächenenergie des amorphen Materials zurückgeführt werden. Ebenfalls zeigte sich bei einigen Partikeln eine Deformation. Ursächlich dafür könnte eine zeitlich versetzte Verdampfung des Lösungsmittels in den verschiedenen Partikelschichten gewesen sein. Die äußere Schicht verdampfte schneller und wurde damit für die Dampfblase im Inneren undurchlässig. Bei der rapiden Abkühlung im Stickstoff und der Vakuumtrocknung am Ende des Herstellungsprozesses reduzierte sich der Dampfdruck und damit das Volumen im Inneren und der Partikel kollabierte. Die äußere Hülle schien hierbei flexibel zu bleiben, sodass keine Risse entstanden. Der Kollaps könnte auch erst während der Präparation für die Rasterelektronenmikroskopie stattgefunden haben, wie Bodmeier und McGinity (1988) vermuteten. Welchen Einfluss diese Morphologieotypen auf die Internalisierung oder Biodistribution der Partikel ausüben sollte weiterführend untersucht werden.

5.1.3 Verkapselungseffizienz und Gehaltsbestimmung

Der partikuläre Arzneistoffeinschluss und somit die Verkapselungseffizienz ist sowohl von den physikochemischen Eigenschaften des Wirkstoffs (z.B. Hydrophilie, Zetapotenzial, Löslichkeit), als auch von den Eigenschaften des Polymers (z.B. Polymerzusammensetzung, Mikropartikelgröße), aber auch von der Art der Herstellung abhängig (Li et al. 2008). Um den Erfolg des FITC-DEX-Einschlusses in die PLGA-Mikropartikel zu überprüfen, wurde zunächst eine lineare Kalibrierfunktion erstellt, die mit einem Bestimmtheitsmaß von $R^2=0,99$ geeignet erscheint, anhand dieser von einem Fluoreszenzwert auf die FITC-DEX-Konzentration zu schließen. Mithilfe der verwendeten Präparationsmethode konnte ein mittlerer, aber stark variierender Dexamethasongehalt von $5,56 \pm 1,17$ % erzielt werden. Dies entsprach einer Verkapselungsrate von $61,1 \pm 12,8$ % des eingesetzten FITC-DEX. Diese starke Variabilität könnte u.a. durch Ungenauigkeiten bei der Einwaage bedingt gewesen sein, da eine elektrostatische Aufladung der Partikel diese erschwerte. Zudem trat, wie in Abbildung 8 gezeigt, bei Kontakt mit Wasser sofort ein *Burst-Release*-Effekt des Dexamethasons auf. Ein Wirkstoff lässt sich nicht in beliebig hoher Einschussrate verkapseln – der Rest bleibt lose an der Partikeloberfläche adhäriert und wird umgehend als *Burst* freigesetzt. Eine unquantifizierte DEX-Menge wird auf diesem Weg bei den Herstellungs- und Waschvorgängen verloren gegangen sein, da sich bei den Waschschrritten ebenfalls eine Gelbfärbung des bidestilliertem Wassers zeigte. Beides erklärt ebenfalls die Abweichungen der tatsächlichen Dexamethasongehälter von dem theoretisch errechneten Werten.

Die Eignung der Herstellungsmethode zeigt sich u.a. ebenfalls an der erzielten Verkapselungsrate (Wischke und Schwendeman 2008). So wurde bereits mehrfach in vorherigen Untersuchungen gezeigt, dass sich die Solvent-Evaporation-Methode grundsätzlich zum Einschluss von Dexamethason in PLGA-Mikropartikel eignet (Thote et al. 2005). Die manuelle Herstellung erscheint jedoch aufgrund der Abweichungen des Wirkstoffgehaltes nur bedingt geeignet die Partikelproduktion im pharmazeutischen Maßstab durchzuführen, da es hierfür auf eine genaue Dosierung des Wirkstoffes ankommt.

Vom FITC-DEX-Gehalt kann aufgrund von physikochemischen Unterschieden der Substanzen (z.B. Molekulargewicht, Isoelektrischer Punkt) nicht direkt auf den Gehalt an Dexamethason in den DEX-PLGA-Partikeln geschlossen werden. Allerdings kann es als Anhaltspunkt dienen, da funktionelle Eigenschaften von DEX bei der Verkapselung nicht direkt benötigt waren. Um die genaue DEX-Konzentration zu bestimmen, sollte jedoch

beispielsweise eine Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) durchgeführt werden.

5.1.4 Freisetzungskinetik

Die *in vitro*-Freisetzungskinetik des Dexamethasons stellt einen wichtigen pharmakokinetischen Parameter für die erfolgreiche antiinflammatorische Therapie dar.

Zuerst erfolgte die Kontrolle der Fluoreszenzstabilität des FITC-DEX über den gleichen Zeitraum und unter den gleichen Bedingungen wie in den Freisetzungsversuchen. Innerhalb von 15 Tagen konnte eine Abnahme der Fluoreszenzintensität festgestellt werden, die mithilfe einer logarithmischen Funktion beschrieben werden konnte. Ursächlich dafür könnten eine Reihe von Effekten sein, die mit einer Zersetzung des Farbstoffes einhergehen. Erstens kommt es zu einem Ausbleichen von Fluorophoren durch Bestrahlung oder Lichteinwirkung. Im gesamten Herstellungs- und Verwendungsprozess wurde strikt auf die Einhaltung des Lichtschutzes geachtet, sodass dieser Effekt in diesem Fall als gering zu werten ist, jedoch nicht ausgeschlossen werden kann. Auch chemische Veränderungen des FITC-DEX sind nicht auszuschließen, wie z.B. eine Oxidation des Farbstoffes aufgrund der aeroben Umgebung. Ein weiterer Grund der Fluoreszenzabnahme könnte auch auf Phänomene der Fluoreszenzlöschung (*Quenching*) zurückgeführt werden, bei der sich der Fluorophor aber nicht zersetzt (Lakowicz 1999, Chen und Knutson 1988). Es stellt sich aufgrund dieser Effekte die Frage der Genauigkeit des ermittelten Graphen der Fluoreszenzintensitätsabnahme. Es ist nicht sicher, ob er als exakte Grundlage für die Berechnung des FITC-DEX-Gehaltes und damit der Freisetzungskinetik dienen kann.

Wie bereits in der Einleitung (Abschnitt 1.2.2) beschrieben, erfolgt die Wirkstofffreisetzung aus bioabbaubaren Polymermatrices wie PLGA durch langsame Degradation und Erosion der Mikropartikel und durch Diffusion. Häufig tritt dabei eine Freisetzung in mehreren Phasen aufgrund der heterogenen Degradation im Partikel auf. Sie wird für DEX-PLGA-Mikropartikel in drei Phasen beschrieben: 1. *Burst Effect* – eine hohe initiale Freigabe, 2. *Lag-Phase* – verringerte Freisetzungsgeschwindigkeit, 3. Rapide degradations- und erosionsbedingte Freisetzung (Gasmi et al. 2016). Der erzielte Graph der *in vitro*-Freisetzungskinetik kann hinsichtlich dieses triphasischen Verlaufes mit in der Literatur gezeigten Kinetiken für ähnliche Partikelformulierungen (gleiche Substanzen,

Partikelgröße im Mikrometerbereich) verglichen werden (Hickey et al. 2002, Gasmi et al. 2016, Dawes et al. 2009). Allerdings unterscheiden sie sich hinsichtlich der Zeitangaben für die erzielte Dexamethasonfreisetzung, was unter anderem auf die dort verwendeten, größeren Mikropartikel (11-61 μm) zurückzuführen sein kann.

Wie auch in den oben genannten Veröffentlichungen beschrieben, wurde ein initialer *Burst Effect* in der Dexamethasonfreisetzung verzeichnet. Hierbei wurde vermutlich das oberflächennah gebundene, nicht verkapselte FITC-DEX gelöst. Aus biopharmazeutischer Sicht ist es notwendig, den *Burst-Release* so weit wie möglich zu reduzieren, um eine Wirkstoffabgabe vor dem Erreichen des Ziels im inflammatorischen GI-Trakt zu verhindern. Andernfalls würde ein erheblicher Teil der Substanz vorher vom Körper abgebaut oder aufgenommen werden und damit verloren gehen oder systemisch wirken. Die gewünschte Reduktion der Nebenwirkungen oder Wechselwirkungen wäre damit nicht erreicht. Zudem würde eine geringere Konzentration des Wirkstoffes bis zur Zielstelle im distaleren GI-Abschnitt vordringen, was eine genaue Kalkulation der Dosis erschwert oder gar unmöglich macht. Es gibt diesbezüglich zahlreiche Studien und Lösungsansätze der Freisetzungskonfiguration, die jedoch noch keine vollständige Verhinderung der ungerichteten Freisetzung erzielen konnten (Huang und Brazel 2001). Dazu zählen beispielsweise die Variation der Wirkstoffverteilung im Partikel (Lee 1984), eine Veränderung der Polymerzusammensetzung und -morphologie (Cohen et al. 1991) oder eine Beschichtung der Partikeloberfläche (Lu et al. 1998).

Auf diese 1. Phase folgte die plateauartige Freisetzungsverzögerung, die den Beginn der matrixkontrollierten Freisetzung darstellt. Nach ca. 12 Stunden setzte die dritte Phase der erneut gesteigerten Freisetzung ein, die jedoch nach 7 Tagen abermals stagnierte. Das Absinken der FITC-DEX-Konzentration zwischen dem 3. und 4. Tag des Experiments erschien im Kurvenverlauf suspekt. Zu diskutieren bleiben hier erfolgte Messfehler, die zu hohe (Tag 3) oder zu niedrige (Tag 4) Werte ergaben. Auch in den beschriebenen Studien zeigen sich im Kurvenverlauf der Freisetzungskinetik abweichende Mittelwerte, die eine geringere prozentuale Wirkstofffreigabe als noch am vorherigen Messzeitpunkt darstellen. Diese Schwankungen der Messwerte werden von den Autoren jedoch nicht kritisch hinterfragt.

Nach 15 Tagen wurde das Experiment abgebrochen, da es für die nachfolgenden Experimente unerheblich war. Dabei wurde eine Freisetzung von nur 77 % des verkapselten

Dexamethasons erzielt. Interessanterweise wird in der beschriebenen Literatur ebenfalls keine Freisetzung von 100 % des Dexamethasons in der Kinetik dargestellt, auch wenn die Versuche über einen noch längeren Zeitraum (bis zu einem Monat) durchgeführt wurden und zudem andere Methoden zur Dexamethasonquantifizierung verwendet wurden (Hickey et al. 2002, Zolnik und Burgess 2008, Dawes et al. 2009).

Es bleibt auch zu diskutieren, ob eine vollständige Freisetzung des Dexamethasons mit dieser Methode der Wirkstoffquantifizierung überhaupt detektierbar wäre. Auch wenn die Fluorimetrie als hochempfindliche Messmethode eingestuft wird, unterliegt sie für die exakte Gehalts- und Freisetzungsbestimmung zu vielen, schon zuvor beschriebenen Einflüssen. So ist die Fluoreszenzintensität des FITC zusätzlich stark pH-abhängig (Smith und Pretorius 2002). Es kommt bei sinkendem pH-Wert zu einer Reduzierung der Intensität. Dies ist vor allem für die fluorimetrische Quantifizierung im Verlauf der Freisetzungstests aus den PLGA-Partikeln kritisch, da durch den Degradationsprozess des PLGA Säuren entstehen. Die Freisetzungsuntersuchungen wurden zwar in isotoner, phosphatgepufferter Salzlösung durchgeführt und der pH-Wert der entnommenen Probe auf eine etwaige Veränderung kontrolliert, dennoch kann damit nicht ausgeschlossen werden, dass es zu pH-Wert-Veränderung im Partikelinneren während des Freisetzungprozesses kam (Ding und Schwendeman 2008, Li und Schwendeman 2005). Es könnten daher Messfehler in der fluorimetrischen FITC-Intensitätsmessung stattgefunden haben, die nicht den korrekten Wert des freigesetzten FITC-DEX darstellen. Folglich müssen für weitere Untersuchungen geeignete Puffersysteme verwendet werden. Ebenfalls könnte das pH-Milieu im Partikel während der Freisetzung beobachtet werden, wie Li und Schwendeman (2005) es mit einem konfokalen *Laser-Scanning*-Mikroskop durchgeführt haben.

Weiterhin konnte von Hickey et al. (2002) eine Konzentrationsabnahme des Dexamethasons durch Zersetzungsprozesse beschrieben werden, die in den hier durchgeführten Freisetzungsuntersuchungen zusätzlich nicht berücksichtigt wurden.

Beispielsweise könnte unter Verwendung der HPLC oder der UV-Spektroskopie die Freisetzung von Dexamethason aus den DEX-PLGA-Partikeln erneut untersucht werden.

In dieser Arbeit wurden die *in vitro*- Experimente bei 37°C in isotoner PBS-Lösung bei einem pH von 7,4 durchgeführt. Sie stellen damit jedoch nur ein experimentelles Setting der Partikelfreisetzung dar, das nicht auf die sich ständig ändernden

Milieuveränderungen *in vivo* übertragen werden kann (Faisant et al. 2006). So variieren z.B. der pH-Wert, die Viskosität, die Osmolarität oder die Zusammensetzung des Darminhaltes während des GI-Transits enorm. Essentiell für die pharmakologische Anwendung der DEX-PLGA-Partikel wäre indessen die genaue Kenntnis der *in vivo*-Kinetikformation, die zukünftig untersucht werden sollte. Die Simulation der *in vivo*-Situation ist experimentell jedoch schwierig umzusetzen. So interagieren die Partikel im Darm mit den verschiedensten Substanzen (z.B. Enzyme, Proteine, natürliche Tenside, Mikroorganismen, Fette, Kohlenhydrate, Zellen), deren Zusammensetzung zum Teil nahrungsabhängig ist. Größtenteils handelt es sich jedoch um Bestandteile des individuellen, ortsabhängigen, intestinalen Mikromilieus, die ihrerseits ebenfalls einen Einfluss auf die Wirkstofffreisetzung aus den Partikeln ausüben. Genannt seien hier beispielsweise der enzymatische Abbau der Partikel sowie die Phagozytose oder auch die Proteinadsorption. Zolnik und Burgess (2008) konnten in ihren *in vivo*-Experimenten z.B. eine schnellere Dexamethasonfreisetzung feststellen, die zudem keine *Lag*-Phase zeigte.

5.2 Humane CD14⁺-Monozyten

Die Entzündung des Darmes bei CED ist u.a. durch die Infiltration mit mononukleären Phagozyten gekennzeichnet, wie die aktuelle Forschung derzeit eruiert (Podolsky 2002, Zhou et al. 2009, Wynn et al. 2013). Im Blut zirkulierende CD14⁺-Monozyten repräsentieren dabei die „klassischen Monozyten“, welche *in vivo* durch unterschiedliche chemotaktische Faktoren zu Entzündungsherden rekrutiert werden und als Vorläufer der peripheren, mononukleären Phagozyten fungieren (Ginhoux und Jung 2014). Normalerweise fehlt den geweberesidenten Phagozyten des intestinalen Kompartiments die Expression dieses CD14-Immunrezeptors, sodass sie die kommensale Flora nicht angreifen. Die erhöhte Anzahl der CD14⁺-Monozyten und von ihnen abstammende, rekrutierte Zellen scheinen demnach einen pathophysiologischen Effekt in der CED-Ätiologie innezuhaben, u.a. indem sie große Mengen an proinflammatorischem TNF- α , IL-12 und IL-23 produzieren (Kamada et al. 2008). Diesen proinflammatorischen Einfluss der Monozyten auf eine Perpetuierung der T_H1-Zell-vermittelte Kolitis bestätigten Tamoutounour et al. (2012). Damit stellt diese Zellpopulation einen interessanten innovativen Ansatzpunkt für die antiinflammatorische Therapie dar.

Für die in dieser Arbeit beschriebenen biologischen Experimente wurden humane phagozytäre Primärzellen verwendet. Wie bereits in der Einleitung erwähnt, sollten für die *in vitro*-Untersuchungen Zellen ausgewählt werden, die in der späteren *in vivo*-Anwendung mit den hergestellten Partikeln interagieren. Die hergestellten Partikel sollen perspektivisch antiinflammatorisch auf immunmodulatorische, mononukleäre Phagozyten wirken, um so die diffuse Entzündungsaktivität der Darmmukosa bei CED spezifisch zu reduzieren. Um diesen „*proof of concept*“-Ansatz zu erfüllen, erfolgte die Isolation von CD14⁺-Monozyten aus dem Vollblut gesunder Spender.

Unveränderte Primärzellen wurden verwendet, da sie dem physiologischen Original am ehesten entsprechen und nicht wie kontinuierliche Zelllinien die geno- und phänotypvariierende Tumornatur aufweisen. Ebenfalls besteht keine Gefahr der Kreuzkontamination mit Mykoplasmen oder anderen Zelllinien. Allerdings haben Primärzellen eine begrenztere Lebensdauer, sodass Langzeituntersuchungen nicht durchführbar sind (Pizzoferrato et al. 1994), was jedoch für nachfolgende Experimente (Biokompatibilität, Nachweis der pharmakologischen Aktivität, Überprüfung der Internalisierungspotenz) dieser Arbeit irrelevant war.

In der Darmmukosa, als spätere Zielstruktur der Partikel, befinden sich jedoch nicht diese zirkulierenden Blut-Monozyten. Die dort verweilenden phagozytären Zellen, die die eigentliche Zielstruktur der partikulären DDS darstellen, durchlaufen verschiedene phänotypische Veränderungen und Differenzierungsmechanismen (Ginhoux und Jung 2014). Eine direkte Übertragbarkeit der erwarteten Wirksamkeit der Partikeltherapie von den getesteten Zellen dieser Arbeit auf die angestrebten Zielzellen besteht damit nicht. Ebenfalls wird der komplexe *in vivo*-Mechanismus der Mukosa nicht dargestellt. Weiterführend könnten daher Experimente zunächst an kultivierten *ex vivo*- Gewebeproben vorgenommen werden, bevor eine Testung an Menschen erfolgt. Gegebenenfalls eignen sich Ussing-Kammern, in die Darmmukosabiopsien in simulierten physiologischen Nährlösungen eingespannt und mit Sauerstoff begast werden, für diese Studien wie es z.B. Sannino et al. (2006), Rozehnal et al. (2012) und Schmidt et al. (2013) beschrieben.

5.3 Untersuchung der Biokompatibilität nach ISO-Norm

5.3.1 Hämokompatibilität

Zunächst erfolgte die Untersuchung der Hämokompatibilität der Partikel, um Wechselwirkungen dieser mit Erythrozyten zu analysieren. Der Hämolyseassay zeigte in allen getesteten Konzentrationen keinen erythrozytenmembranzerstörenden Effekt der Partikel, sodass diese als nicht hämolysierend einzustufen sind, wie andere Studien ebenfalls demonstrierten (Fornaguera et al. 2015). Dabei zeigten die DEX-PLGA-Partikel im Vergleich zu den inerten PLGA-Partikeln eine geringfügig gesteigerte Hämolyserate. Dies könnte durch die Diffusion des freigesetzten Dexamethasons über die Zellmembran ins Zytoplasma und zurück bedingt sein, was kurzzeitige destabilisierende Membranveränderungen und Porenöffnungen hervorrufen könnte (Biagiotti et al. 2011). Glukokortikoide können Elektrolytverschiebungen verursachen und damit osmotische Drücke verändern (Kaji et al. 1981). Dies könnte auch auf erythrozytärer Ebene möglich sein und die gering erhöhte Hämolyse im Vergleich zu den nicht-wirkstoff-beladenen Partikeln erklären, was jedoch zu beweisen wäre. Eine gravierende Hämolyse, wie sie in der Positivkontrolle mit der bekannten hämolytischen Substanz Triton X-100 (Deibler et al. 1959) ausgelöst wurde, ist bei der Verwendung beider Partikelformulierungen nicht zu sehen.

Der Erythrozytenaggregationsassay zeigte keinen Agglomerationseffekt der roten Blutzellen, der durch die Partikelbehandlung ausgelöst wurde. Beide Partikelformulierungen beeinflussen damit die elektrostatischen Anziehungskräfte zwischen den Erythrozyten nicht negativ.

Die hergestellten Partikelformulierungen können somit als hämokompatibel angesehen werden. Von hämozirkulatorischen Nebenwirkungen, wie sie in der Einleitung beschrieben wurden, ist im Falle einer systemischen Resorption der Partikel nicht auszugehen.

5.3.2 Zytotoxizität

Zur Evaluation der Zytotoxizität gegenüber isolierten Monozyten wurde der MTT-Assay als Test mit akzeptabler Sensitivität und Spezifität beschrieben, der schnell und reproduzierbar umzusetzen sei (Malich et al. 1997, Ciapetti et al. 1993). Im Rahmen dieser Zellviabilitätsprüfung konnte durch die Partikeltherapie keine Unterschreitung des Grenzwertes der metabolischen Aktivität ermittelt werden. Jedoch zeigte sich mit steigender Partikelkonzentration eine Steigerung der Monozytenstoffwechselaktivität bezogen auf

den Vergleichswert der metabolischen Aktivität der Negativkontrolle. In anderen Arbeiten, wie beispielsweise von Reinbold et al. (2016), konnte ebenfalls ein steigendes MTT-Assay-Signal bei der Behandlung von anderen Zelltypen mit zunehmender inerter PLGA-Partikelkonzentration verzeichnet werden.

Die Gründe hierfür sind wahrscheinlich unterschiedlichster Natur. So wird beschrieben, dass der MTT-Assay, wie auch der LDH-Assay, von intrazellulären enzymatischen Reaktionen abhängig ist, die von den Testsubstanzen auf unterschiedlichste Art und Weise beeinflusst werden können. So könnten Bestandteile der Partikel (z.B. PLGA) die Enzymaktivität steigern und den Zellstoffwechsel erhöhen. Schon durch die Phagozytose der Partikel kann die Enzymaktivität in den entsprechenden Zellkompartimenten gesteigert sein, welche zum Abbau des phagozytierten Materials führt und folglich den Gesamtenergiemetabolismus der Zelle potenziert (Porporato et al. 2012). Ebenfalls werden im Rahmen der intrazellulären Hydrolyse (*Respiratory Burst*) von phagozytiertem Material reaktive Sauerstoffspezies (ROS) durch die Monozyten gebildet und auch extrazellulär freigesetzt. Diese könnten ebenfalls mit dem MTT reagieren und so zusätzliche Artefakte in der Zellviabilitätsmessung verursachen.

Das Auftreten von geringen inflammatorischen Reaktionen beim Kontakt von PLGA mit Leukozyten, Lymphozyten, Plasmazellen und Monozyten wurde in der Literatur beschrieben (Shive und Anderson 1997, Avgoustakis 2005). Die Phagozytose von PLGA-Mikropartikeln durch Makrophagen verursacht *in vitro* ebenfalls eine inflammatorische Antwort, wie Nicolette et al. (2011) analysierte. Diese Inflammation würde ebenfalls den Zellstoffwechsel erhöhen und zusätzlich Reduktionäquivalente freisetzen können, die zur Reduktion der MTT-Substanz beitragen würden. Da Dexamethason entzündungshemmend wirkt, wäre somit additional die niedrigere metabolische Aktivität der Monozyten mit DEX-PLGA-Partikelbehandlung im Vergleich zur inerten PLGA-Partikelbehandlung in den durchgeführten Experimenten erklärbar.

In der Literatur sind außerdem Interaktionen zwischen anderen Partikelmaterialien und Assay-Chemikalien beschrieben, die in modellierter Form ebenfalls für die in dieser Arbeit verwendeten Materialien zutreffen könnten (Wahl et al. 2008, Laaksonen et al. 2007). Wenn sie beispielsweise Reduktionsmittel darstellen, die das MTT zu Formazan reduzieren, könnte dies das steigende Signal mit zunehmender Materialmenge erklären.

Der gemessene Absorptionswert - als Marker für den Umsatz von Tetrazoliumsalz - nimmt mit steigender Partikelkonzentration zu. Dieser Zusammenhang könnte auch auf

eine physikalische Ursache der Spektrophotometrie zurückzuführen sein. Hohe Partikelkonzentrationen erhöhen den Hintergrundwert der optischen Dichte und verursachen damit größere Abweichungen im Messwert. Die registrierte Lichtabsorption übersteigt dann den Wert der Negativkontrolle (Malich et al. 1997), sodass ein fälschlicherweise erhöhter Wert gemessen wird, wie es Davis et al. (2007) bereits für Natriumtitanat-Nanopartikel zeigte.

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, sollte ein zweiter Zytotoxizitätstest veranschlagt werden, der eine andere Zellfunktion prüft, um verschiedene Mechanismen der Zellschädigung zu untersuchen. Hierfür wurde der LDH-Test erwählt, der die Membranpermeabilität und -funktion der Monozyten im Zuge der Partikelbehandlung detektiert.

Es konnten für beide Partikelformulierungen in den Konzentrationen von 1 – 250 µg/ml keine relevante Zellmembranschädigung und damit keine signifikante LDH-Freisetzung identifiziert werden. Jedoch zeigte sich mit der steigenden Partikelkonzentration eine Zunahme der LDH-Freigabe, die bei 500 µg/ml als kritisch zytotoxisch zu verzeichnen war. Als Ursache käme unter anderem eine Membranschädigung durch die gesteigerte Gewichtsbelastung bei zunehmender Partikelanzahl in Frage, die eine unphysiologische Zellquetschung mit einer Zellmembranbeeinträchtigung hervorrufen könnte. Wie in der mikroskopischen Aufnahme von Abbildung 10 erkennbar, kommt es mit ansteigender Partikelkonzentration zu einer sichtbaren Partikelüberladung im Well der Zellkulturplatte. Ebenfalls erschwert diese verdichtete Teilchendecke den Sauerstoffaustausch zwischen den Zellen und der Umgebung, sodass für den Zellstoffwechsel ein Mangel an diesem essentiellen Gas vorläge. Eine Hypoxie stört die Atmungskette und begünstigt bekanntlich eine Zellschädigung mit nachfolgender, detektierbarer LDH-Freisetzung. Andersartige Interferenzen der Partikel mit der Monozytenzellmembran könnten ebenfalls für den leicht erhöhten LDH-Anstieg verantwortlich sein.

Im Kontext der vorangehenden zweitägigen Inkubation der Monozyten mit den Wirkstoffteilchen erfolgt eine Freisetzung des DEXⁱ und eine beginnende PLGA-Auflösung. Diese Substanzen befinden sich folglich ebenfalls gelöst im Überstand. Bei der Durchführung des LDH-Assays wurde zell- und partikelfreier Überstand verwendet. Da sich jedoch ebendiese gelösten Materialien in der Mediumflüssigkeit befinden könnten, wären intermaterielle Wechselwirkungen mit den LDH-Assay-Reagenzien in unbekannter Art und Weise möglich. Eine derartige Messwertbeeinflussung durch diese Interaktionen konnte

jedoch durch vorangehende Experimente ausgeschlossen werden, bei denen die Absorptionswerte der Leerwerte mit denen der Proben nach zweitägiger, zellfreier Partikelinkubation verglichen wurden.

Weiterführend sollte die Proliferationsrate der Zellen, die mit den Partikeln in Kontakt treten werden, (z.B. *Cell-Proliferation*-ELISA BrdU) und eine Änderung dieser durch die Partikeltherapie eruiert werden. Da, wie die Ergebnisse des LDH-Assays nahelegen, keine Zytolyse durch die Partikeltherapie stattfand, jedoch aber eine Stoffwechselaktivitätsstimulation im MTT-Assay nachweisbar war, sollte ein etwaiger Einfluss auf das Zellwachstum kontrolliert werden. Sollte eine Stimulation dessen verifizierbar sein, müsste eine mögliche Kanzerogenität der Partikel überprüft werden.

Im Zusammenspiel aller Faktoren können die hergestellten Partikelchargen, hinsichtlich ihrer Biokompatibilität, im Kontext der für diese Arbeit durchgeführten Experimente als hämokompatibel und nicht zytotoxisch eingestuft werden. Partikel dieser verwendeten Herstellungsmethode gelten als gut erforschtes Biomaterial und werden bzgl. der Zellviabilität als unbedenklich eingestuft (Siegel 2011, Avgoustakis 2005). PLGA ist zudem bereits seit Jahren in der Herstellung pharmakologischer Substanzen und medizinischer Materialien für die Therapie am Menschen etabliert und hier kaum noch wegzudenken. Auch Dexamethason hat in medizinischen und wissenschaftlichen Strategien seinen festen Platz. Diese Stoffe werden in entsprechender Dosis als nicht toxisch auf Organismen angesehen. Dennoch bleibt anzumerken, dass die gewählten Untersuchungsmethoden einer dringenden Reevaluation hinsichtlich ihrer Validität und Anwendbarkeit im Rahmen der Risikobewertung von Partikeln (sowohl Nano-, als auch Mikropartikel) bedürfen. Die Verwendung von Partikeln als biomedizinische Produkte ist derzeit relativ neu, sodass noch keine allgemeingültigen, formalen Bewertungsrichtlinien zum Toxizitätsscreening festgelegt wurden. Die weiter oben beschriebenen Effekte wurden in all der Zeit der Erforschung und Nutzung von PLGA-Partikel bisher kaum betrachtet. So interferieren die Partikel durch ihre spezifischen Eigenschaften mit den Testsubstanzen in nicht exakt zu taxierendem Maße und beeinflussen so die Ergebnisse dieser herkömmlichen *in vitro*-Testmethoden, sodass die Aussagekraft ebendieser Toxizitätsscreeningmethoden begrenzt ist (Kroll et al. 2009). Eine genaue Ursachen-Wirkungsanalyse zur Erklärung der detektierten Abweichungen ist hier grundsätzlich begrenzt. Sensitivere und spezifischere

Methoden müssen zukünftig entwickelt werden, um die Sicherheit einer etwaigen Partikeltherapie am Menschen in *in vitro*-Testungen prädiktiver abschätzen zu können, bevor überhaupt Untersuchungen an Tieren oder Menschen in Erwägung gezogen werden (Kroll et al. 2009, Dobrovolskaia und McNeil 2007).

Hierbei sollten vor allem umfassendere Analysen, die die deutlich komplexeren *in vivo*-Bedingungen berücksichtigen, entwickelt werden. Eine partikuläre Beeinflussung von für die Pharmakotherapie wichtigen biologischen Vorgängen ist mit derzeitigen *in vitro*-Verfahren nicht valide abschätzbar. Beispielsweise werden die meisten Testverfahren in PBS durchgeführt. Im physiologischen Plasma - welches z.B. für diese Experimente abgetrennt wurde - finden sich neben Proteinen (vor allem Albumin und Fibrinogen), verschiedene Elektrolyte, Glucose, Lipide, Hormone, Stoffwechselabbauprodukte (z.B. Kreatinin, Harnsäure) und organische Säuren (z.B. Laktat). Der Einfluss dieser Substanzen auf die Wechselwirkung zwischen Partikeln und Zellen *in vivo* kann mithilfe der derzeitigen Tests nicht vollständig festgestellt werden (Dobrovolskaia und McNeil 2007, Aggarwal et al. 2009, Mahmoudi et al. 2011).

5.4 Nachweis der pharmakologischen Aktivität

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte eine prophylaktische Gabe von Dexamethason vor der LPS-Stimulation. Im Falle einer pharmakologischen Anwendung der Partikel z.B. bei CED würde die üblichere therapeutische Strategie gewählt werden, bei der sich die Reihenfolge umgekehrt verhalten würde: die Therapie folgt auf die symptomverursachende Entzündung. Dieser Entscheidung zu ebendieser Versuchsdurchführung liegen Überlegungen zugrunde, die unter anderem aus Ergebnissen der Experimente von Waage und Bakke (1988) resultieren. Hier wurde eine stärkere Suppression einer LPS-induzierten Zytokinproduktion durch DEX experimentell bei humanen Monozyten gezeigt, wenn die DEX-Gabe vor der LPS-Zuführung passierte im Vergleich zu einer nachträglichen DEX-Therapie.

Zellkulturen fehlen zu- und abführende Systeme die physiologisch in Organismen, z.B. im Sinne von Entgiftungswegen, zur Verfügung stehen. Die durch die LPS-Stimulation freigesetzten Zytokine würden demnach im Überstand verbleiben, da sie nicht abtransportiert und damit stets in der quantitativen Messung miterfasst würden. Selbst wenn DEX nun die induzierte Inflammation effektiv supprimieren würde, wäre durch diesen versuchsbedingten Messfehler kein Effekt dessen nachweisbar. Da die Glukokortikoid-

wirkung zudem erst verzögert eintritt und die isolierten Monozyten nur eine begrenzte Lebensdauer aufweisen, wäre der Versuchsablauf auch nicht unbegrenzt ausdehnbar.

Die isolierten Monozyten zeigten nach der Behandlung mit LPS die gewünschte Reaktion im Sinne einer inflammationsgetriggerten Zytokinproduktion und -freisetzung. Ebenfalls konnte eine konzentrationsabhängige Suppression dieser Entzündungsreaktion durch DEX erreicht werden. In den Ergebnissen fallen große Schwankungen der Mittelwerte bzgl. der gemessenen Zytokinkonzentrationen auf. Beispielsweise Waage und Bakke (1988) zeigen ähnliche TNF- α -Schwankungen in ihren Experimenten mit humanen Monozyten. Diese hohen SEM-Werte könnten ggf. auf die interindividuellen Reaktionsunterschiede der verschiedenen Spender auf Glukokortikoide und/oder auf LPS zurückzuführen sein, die unter anderem durch das Geschlecht, den Konstitutionszustand, das Alter, das Immunsystem, diverse Gene, den Zell-Rezeptorstatus usw. beeinflusst werden. Aber auch intraindividuelle Varianzen, wie beispielsweise aktuelle Lebensumstände und die zirkadiane Rhythmik, tragen zu diesen Ergebnissen bei (Hau et al. 2016, Cockrem 2013, Ter Horst et al. 2016, Freudenberg et al. 2001). Dies ist bezogen auf die Genauigkeit des Mittelwertes dieser Stichprobe als ein Nachteil der Verwendung von Primärzellen anzusehen, spiegelt aber gleichzeitig auch die Herausforderungen an die zukünftige Pharmakologie wider.

Die Dosis-Wirkungs-Kurve diente unter anderem der Bestimmung der halbmaximalen inhibitorischen Konzentration von DEX unter den hiesigen Versuchsbedingungen. Eine Konzentration von $10^{-7,416}$ mM Dexamethason ist demnach *in vitro* benötigt um 50 % der maximal möglichen Zytokinfreisetzung der Monozyten zu hemmen. Franchimont et al. (1999) oder auch Joyce et al. (1997) bestimmen keinen konkreten IC₅₀-Wert, verglichen mit deren Diagrammen werden jedoch deutlich niedrigere DEX-Konzentrationen (etwa 10^{-8} bis 10^{-9} M) angegeben, um die LPS-getriggerte Zytokinproduktion zu senken. Aufgrund der differierenden Versuchsabläufe und -bedingungen und vermutlich auch wegen der erwähnten inter- und intraindividuellen Unterschiede zwischen den humanen PBMC-Populationen scheint es unrealistisch einen einheitlichen Richtwert experimentell zu generieren.

Die Prüfung der pharmakologischen Potenz der DEX-haltigen Partikel in variierenden Konzentrationen konnte ebenfalls eine antiinflammatorische Wirkung des verkapselten DEX herausstellen. Für TNF- α konnte mit allen Partikel-Konzentrationen eine Produktionsunterdrückung unter 50 % bezüglich des Wertes der PC erzielt werden. Mit der geringsten Partikelkonzentration von 1 $\mu\text{g/ml}$ konnte eine Hemmung der TNF- α -Freisetzung auf 43 % des PC-Wertes festgestellt werden, sodass davon ausgegangen werden kann, dass pro Milliliter dieser Partikellösung mehr als 15,1 ng DEX (IC_{50}) in den Partikeln enthalten waren. Die ermittelte Gehaltsbestimmung von 5,56 % (siehe Abschnitt 4.1.3) entspräche dem in etwa, da hier ein DEX-Gehalt von 55,6 ng/ml in 1 $\mu\text{g/ml}$ Partikel-Lösung bestimmt wurde. Allerdings kann hier kein direkter Vergleich zwischen den Experimenten erfolgen, da im Rahmen dieses Versuchsablaufes zum Beispiel nicht eruiert wurde, wie viel DEX tatsächlich aus den Partikeln freigesetzt wurde, ob das DEX in schon gelöster und/oder nur in verkapselter Form auf die Zellen einwirkte oder ob durch die Phagozytose der glukokortikoidhaltigen Partikel die Dexamethasonwirkung verzögert, abgeschwächt oder anderweitig verändert eintrat. Es bleibt zu erwähnen, dass die IL-6-Zytokinsuppression der kortikosteroidhaltigen Partikel hingegen deutlich geringer ausfiel. Eine Reduktion der Entzündungsreaktion auf die Zytokinkonzentrationen der jeweiligen Negativkontrollen, quasi auf den basalen Wert, konnte dabei mit den wirkstoffhaltigen Partikeln für beide Zytokinproteine nicht erreicht werden. Die unstimulierten Ausgangswerte von TNF- α wurden jedoch auch in den Experimenten mit reinem Dexamethason nicht herbeigeführt. Gleiches gilt für die Ergebnisse in der dafür zitierten Literatur im oberen Teil. Eine Restreaktion der Zellen auf den LPS-Stimulus bestand weiterhin. Ursächlich hierfür könnten die zeitlich verzögerten, biologischen Vorgänge in den Monozyten sein. LPS wirkt beständig über den CD14-Membranrezeptor und den Nukleären Faktor κB (NF- κB) transkriptionsstimulierend u.a. für die mRNA von TNF- α (Wright et al. 1990). Dexamethason inhibiert hierbei nicht direkt den Wirkungsmechanismus von LPS, sodass dieses nicht direkt seinen Effekt auf die Zellen verliert. Vielmehr greift DEX unter anderem direkt oder indirekt in die Gentranskription und -translation ein, dessen maximale Wirksamkeit erst nach sieben bis acht Stunden bis hin zu zwei Wochen erreicht werden kann (Bousquet et al. 2008, Grzanka et al. 2011). Über diese genomischen Effekte wird dann z.B. die Zytokinproduktion der Zelle unterdrückt und damit die Entzündungsreaktion abgeschwächt.

Weiterhin konnte ein Anstieg der gemessenen TNF- α - und IL-6-Konzentrationen mit steigender inerter PLGA-Partikelkonzentration registriert werden, der jeweils mit der höchsten Partikelkonzentration (500 $\mu\text{g/ml}$) etwa die doppelte PC-Zytokinkonzentration erreichte. Diese zusätzliche Entzündungsmediatorenfreisetzung konnte dabei aber mit den DEX-haltigen Partikeln verhindert werden. Indem sie diesen zusätzlichen Stimulus ausgleichen können und die Zytokinkonzentrationen noch unter den Wert der PC reduzieren, zeigen die Ergebnisse der Untersuchungen insgesamt, dass die DEX-haltigen Partikel eine pharmakologische Aktivität vorweisen können.

Wie auch in den Abschnitten zuvor muss ebenfalls an eine mögliche Interaktion mit den Testmaterialien gedacht werden, um den „Mehranstieg“ der Entzündungsmediatoren erklären zu können. Kroll et al. (2009) fasste u.a. solche optionalen Störungen der ELISA-Ergebnisse in der Testung von Nanopartikeln anderer Materialien zusammen, welche eventuell in anderer Form auf die hergestellten Mikropartikel übertragbar sind.

Diese Ergebnisse zeigen, dass inerte Partikel einen eigenen Einfluss auf die Monozyten ausüben. Gegebenenfalls bedingen die Partikel einen inflammatorischen Prozess in den leukozytären Zellen. Nicolette et al. (2011) untersuchten eben diese, durch Phagozytose ausgelöste, Entzündungsreaktion von Makrophagen. Für Mikropartikel stellten sie u.a. ebenfalls eine signifikante Zunahme der TNF- α -Konzentration fest, die anscheinend auf einer Stimulation des NF- κ B-Signalweges beruht. Zugleich nehmen sie an, dass die Partikel physikalische Störungen in der Zellmembranintegrität verursachen, welche über unbekannte Mechanismen diese Inflammationsreaktion fördern. Dabei scheint auch die Art des Internalisierungsmechanismus entscheidend, ob in der Zelle eine Immunantwort ausgelöst wird oder nicht (Dobrovolskaia und McNeil 2007). Beispielhaft werden hier diverse Studien genannt, die diese Theorie belegen: Partikel könnten im Rahmen ihrer Phagozytose über eine Vernetzung der zellmembranständigen Fc γ -Rezeptoren eine Signalkaskade initiieren, welche die Freisetzung von proinflammatorischen Mediatoren aus den Monozyten bedingt, vermerken Hirota und Hiroshi (2012). Eine Aktivierung des NALP3-Inflammasoms postulieren z.B. Sharp et al. (2009) durch die Partikelaufnahme in dendritische Zellen. Die adjuvante „Erkennung“ der Mikropartikel über Toll-like Rezeptoren (TLR) auf der Monozytenoberfläche wäre auch denkbar, die zur Initiierung von angeborenen Immunantworten und damit zur Sekretion von Zytokinen führen würde (Turabekova et al. 2014, Dobrovolskaia und McNeil 2007). Um jene Thesen zu stützen

und auch um nachfolgend der auftretenden Entzündungsreaktion durch Partikelmodifikation entgegenzuwirken, müssen zunächst genaue Erkenntnisse über die Partikelen-dozytose erlangt werden.

Bisher konnte für Nanopartikel als Hauptursache der festgestellten Nanotoxizität eine Induktion von ROS in den Zellen bestätigt werden, sodass die Zellen oxidativem Stress ausgesetzt werden und zelluläre Makromoleküle wie z.B. Proteine, Lipide und DNA geschädigt werden (Khanna et al. 2015). Oxidativer Stress führt additional zur Freisetzung von Entzündungsmediatoren über die Kaskaden von NF- κ B, Mitogen-aktivierter Proteinkinase (MAPK) und Phosphoinositid-3-Kinase (PI3-K) (Khanna et al. 2015). Bei starker Zellschädigung löst er Apoptose oder Nekrose aus und bedingt damit einen Zelluntergang. Auch für Mikropartikel wären diese zellulären Einflüsse durch eine ROS-Produktion oder Signalkaskadenaktivierung denkbar.

Die große Oberfläche der Partikel pro Masseneinheit verursacht eine erhöhte biologische Reaktivität (Khanna et al. 2015). Da die Partikel nicht unter sterilen Bedingungen hergestellt wurden, könnten sich aufgrund dieser reaktiven Oberfläche beispielsweise Bakterien, Endotoxine oder andere Pathogene anheften und bei Zellkontakt ebenjene inflammatorische Reaktion auslösen bzw. begünstigen. Um diesem denkbaren Stimulanz vorzubeugen, sollte die Herstellung steril erfolgen oder eine etwaige Verunreinigung nach der Herstellung beseitigt werden.

Alle der eben aufgeführten Mechanismen könnten grundsätzlich in diesen Experimenten einen Beitrag zu dem verzeichneten Zytokinanstieg geleistet haben. Möglicherweise fungieren die hergestellten Teilchen auch anderweitig als „Stressoren“ auf die Zellen. Eine bestimmte zellstimulierende Wirkung der Partikel ist in Anbetracht der Ergebnisse des MTT-Assays, welche bereits in Abschnitt 5.3.2 analysiert wurden, belegbar. Bisher gibt es jedoch wenige Daten und Studien zu diesen Phänomenen der Zell-Polymer-Partikel-Interaktion. Zur weiteren Entwicklung und Verbesserung dieser Materialien oder auch der gesamten partikulären Therapiestrategie muss ein grundlegendes Verständnis über die molekularen Mechanismen erforscht und etabliert werden.

Gegebenenfalls kann dieser zytokinstimulierende Einfluss der Partikel auch therapeutisch sinnvoll genutzt werden, wie Tsianakas et al. (2012) durch die Kombination von Glukokortikoid und den Zytokinen IL-4, IL-6 und IL-10 spekulierten. In der aktuellen Forschung wird zurzeit das Konzept verfolgt, eine Entzündung zunehmend als eine

Komponente zur Beeinflussung der Regeneration zu betrachten. So könnte die Entwicklung der biokompatiblen, immunsupprimierenden Biomaterialien (wie z.B. in dieser Arbeit untersucht) in Richtung „immuninteraktiver“ Materialien modernisiert werden, um die bestenfalls positiven Effekte der Entzündungsreaktion durch eine Modulation der physiologischen Zellantwort hinwärts zu Heilung und Regeneration zu lenken (Vishwakarma et al. 2016).

5.5 Überprüfung der Internalisierungspotenz der Partikel

Es ist sinnvoll zu prüfen, ob die hergestellten Partikel von Phagozyten internalisiert werden können. Werden sie nicht von Makrophagen phagozytiert, akkumulieren sie mit hoher Wahrscheinlichkeit im Interstitium. Dies beinhaltet ein großes Risiko eine Gewebereizung mit nachfolgender Entzündung zu verursachen. Diese Entzündung könnte sowohl das Krankheitsbild im Allgemeinen verschlechtern, als auch im Rahmen einer Entzündungschronifizierung zu einer Entartung des angrenzenden Gewebes (Tumorbildung) beitragen (Wintermantel und Ha 2009).

5.5.1 Raman-Spektroskopie

Es zeigten sich zunächst unterschiedliche Spektren bei der Messung von pulvrigem DEX im Vergleich zu dem in RPMI-Medium gelösten DEX in den DEX-PLGA-Partikeln. Obwohl es sich um die gleiche Substanz handelt, stimmten in der Auswertung nur zwei spezifische Spektralbänder überein. Ursächlich sind hier u.a. die variierenden Schwingungen der Moleküle und ihrer Bindungen im trockenen Aggregatzustand im Vergleich zum „gelösten“ Zustand. Diese Vibrationsveränderung kann als Nachteil des Raman-Verfahrens angesehen werden. Einen großen Vorteil bietet die Raman-Spektroskopie, indem mit ihr Zellen quasi zerstörungsfrei und nicht invasiv zu beurteilen sind. Die Zellen befinden sich in ihrer Zellkultur und werden direkt vermessen, ohne z.B. vorher mehreren Färbeverfahren ausgesetzt werden zu müssen. Damit hat diese Möglichkeit der Visualisierung auch *in vivo*-Potenzial oder z.B., im Falle von Biopsien, die Option einer unveränderten Darstellung dieser ohne Auswaschung der Partikel. Eine kontinuierliche Bildgebung und Verfolgung ist mit dieser Methode ebenfalls realisierbar, da im Vergleich zur Fluoreszenzmikroskopie nicht der niedrige Kontrast, die Autofluoreszenz oder die Photobleichung der Probe die Messung stören (Chernenko et al. 2009). Allerdings gestaltet

sich die Datenakquirierung komplizierter, da sie zeitintensiv ist und hinterher einer umfangreichen mathematischen Auswertung bedarf. Ein Algorithmus unterscheidet dann aus allen spektralen Datensätzen die, die sich am unähnlichsten sind und teilt alle Spektren des Datensatzes nun diesen definierten Clustern zu. Anhand der Analyse des Durchschnittsspektrums jedes Clusters im Vergleich mit den im Vorhinein akquirierten Referenzspektren können nun Partikel, DEX, Zelle und Umgebung identifiziert und mit unterschiedlichen Farben optisch dargestellt werden. Die Lokalisation der Partikel in der Zelle konnte somit sichtbar gemacht werden, wobei lediglich das PLGA-Grundgerüst der Partikel in den Monozyten als internalisiert nachweisbar war. Es konnte allerdings kein gesondertes DEX-Spektrum im Zuge dieser Internalisierungsexperimente identifiziert werden. Mit der aktuellen Raman-Technik sind Spektren einzelner Moleküle in niedrigen Konzentrationen nicht detektierbar, da die Raman-Streuung von Molekülen einen zu kleinen Streuquerschnitt besitzt (Hellerer 2004). Vermutlich war die Konzentration des Glukokortikoids zu gering, um eine Eigenvibration der DEX-Moleküle durch das Spektrometer wahrzunehmen. Aussagen über die Verteilung von Dexamethason im Partikel oder auch in und auf der Zelle sind somit nicht möglich. Allerdings ist ebendiese Information für die Evaluierung dieser *Targeting*-Therapiestrategie notwendig, um den Erfolg der partikulären Wirkstoffträger als selektive „Arzneistoffboten“ zu prüfen und zu bestätigen. Daher ist besonders die Kontrolle des Verbleibes von Dexamethason obligat, welches sich vorzugsweise mithilfe der partikulären Vehikel nur intrazellulär in den Phagozyten anreichern und wirken sollte. Gegebenenfalls können die Ramanauflösung und die Versuchsbedingungen soweit verbessert werden, dass DEX in derart niedrigen Konzentrationen in den Zellkulturen nachweisbar wird.

5.5.2 EL YRA-Hochauflösungs-Mikroskopie (HR-SIM)

Das eingekapselte, fluoreszenzmarkierte Kortikosteroid war ebenfalls mithilfe der durchgeführten Hochauflösungs-Fluoreszenzmikroskopie darstellbar. Das Glukokortikoid konnte hierbei sowohl in den endozytierten Partikeln illustriert werden, als auch omnipräsent auf der Zellmembran verteilt. Die Partikel befanden sich zum Zeitpunkt der Bildfassung bereits 24 h im RPMI-Medium der Zellkultur. Den Ergebnissen der Freisetzungskinetik (Abschnitt 5.1.4) zugrundeliegend kann wegen der vorzeitigen DEX-Freisetzung (*Burst release*) davon ausgegangen werden, dass auch gelöstes Dexamethason auf die Monozyten in der Kultur einwirkte. Dies ist u.a. für die Versuchsreihe der

pharmakologischen Aktivität (Abschnitt 5.4) relevant. Grundsätzlich ist die Methode der Fluoreszenzmikroskopie demnach für eine exakte quantitative Darstellung der Partikel samt DEX attraktiv. Dennoch sind wiederholte Aufnahmen oder gar Langzeitaufnahmen aufgrund der Photobleichung des Fluoreszenzfarbstoffes mithilfe der HR-SIM nicht möglich oder mit einer Abnahme der Bildschärfe verbunden. Zudem muss der Wirkstoff und das Trägermaterial dabei mit einem Fluorochrom gekoppelt werden, sodass es sich um einen chemisch veränderten Stoff handelt. Als Modellsubstanz zur weiteren Kontrolle der partikulären Systeme ist es indes geeignet. Für die Überprüfung in der *in vivo*-Anwendung sollten auch wegen der Autofluoreszenz des Gewebes andere Verfahren fokussiert werden (Orzekowsky-Schroeder et al. 2011).

Mithilfe der beiden unterschiedlichen Methoden konnte zusammenfassend eine Aufnahme der Partikel in die isolierten Monozyten bestätigt werden. Dabei zeigte sich in den dreidimensionalen Aufnahmen beider Methoden, dass sich mehrere Partikel in einer Zelle befinden. Die runde Partikelform schien dabei stets erhalten zu bleiben, sodass davon ausgegangen werden kann, dass die Partikel vollständig internalisiert werden, ohne vorher einer holotischen Strukturzerstörung zu erliegen. Die Option der phagozytenspezifischen *Targeting*-Therapie besteht damit grundsätzlich.

Da es sich bei den Darstellungen beider Methoden um Erfassungen des Ist-Zustandes und nicht um kontinuierliche Messungen handelt, kann nicht direkt auf den Internalisierungsmodus geschlossen werden. Die genaue Interaktion zwischen Phagozyten und PLGA-Mikropartikeln ist grundsätzlich noch nicht vollständig geklärt. Nach Rabinovitch (1995) gibt es zahlreiche Studien zum Verlauf der Phagozytose von z.B. opsonierten Erythrozyten, Bakterien oder Latexkügelchen, aus denen eine allgemeine Erklärung des Ablaufes hervorging. Indessen sind die genauen Vorgänge die letztlich die PLGA-Phagozytose initiieren weiterhin hypothetisch. Auch ist strittig welchen Einfluss das Partikelmaterial oder sich daran anlagernde Opsonine grundsätzlich ausüben. Da der *Uptake*-Mechanismus auch ursächlich für die in Abschnitt 5.3 und 5.4 diskutierte Inflamationsreaktion der Zellen sein kann, wie Dobrovolskaia und McNeil (2007) referieren, sollte dieser zukünftig experimentell erforscht werden. Eine dynamische Echtzeit-Messung mithilfe der Raman-Spektroskopie, wie es Chernenko et al. (2009) für PLGA-Nanopartikel

beschrieben, wäre dafür durchaus vorstellbar. Alternativen, wie z.B. die Immunfluoreszenz, bieten dazu spezifische Optionen der Visualisierung.

Auch intrazelluläre Veränderungen der Mikropartikel wurde in diesen Experimenten nicht erfasst. Der Degradationsprozess stellt jedoch einen essentiellen Aspekt für das Wirkungsausmaß dieser neuartigen Therapieform dar und wird daher intensiv erforscht (z.B. das terminale Phagozytenkompartiment). Anhand der Esterbindungsbande konnte bereits mittels der Raman-Methode der zellvermittelte Abbauprozess von inerten PLGA-Mikropartikel nach deren Phagozytose durch Makrophagen gezeigt werden (van Apeldoorn et al. 2004). Diesen Prozess beschrieben ebenfalls Tabata und Ikada (1988), die zusätzlich eine kontinuierliche, intrazelluläre Freisetzung eines Farbstoffes aus diesen phagozytierten Partikeln beobachteten, sodass sie PLGA-Partikel aufgrund ihrer biologischen Abbaubarkeit als Wirkstoffträger bestätigten. Welche intrazellulären Kompartimente nach der Internalisierung der Mikropartikel an der Dekomposition beteiligt sind, könnte ebenfalls entscheidend für deren antiinflammatorische Effektivität sein. Cartiera et al. (2009) konnten bereits für Nanopartikel ein solches Modell mithilfe von Immunfluoreszenz und konfokaler Mikroskopie generieren, welches jedoch aufgrund der Größenunterschiede nicht ohne Weiteres auf Mikropartikel übertragbar ist. Für diesen Versuchsablauf sollte eine Fluorochromierung weiterer Zellbestandteile erwogen werden. Auf diesem Wege konnten etwa PLGA-Mikropartikel z.B. in Lysosomen detektiert werden (Nicolette et al. 2011). In dieser Arbeit wurden aber zunächst nur zwei Fluorochrome verwendet, die keine speziellen Zellorganellen färbten, da vorab überprüft werden sollte, ob die Partikel von den Monozyten internalisiert werden können oder lediglich an der Zellmembran haften.

6. Schlussfolgerung und Ausblick

Viele der gegenwärtig eingesetzten CED-Therapeutika weisen verschiedene Limitationen durch pharmakokinetische Eigenschaften, deren Dosierungsschemata und unerwünschten Nebenwirkungen in der bisherigen Darreichungsform auf. Die Entwicklung neuartiger DDS im Sinne von Mukosa-selektiven antiinflammatorischen Wirkstoffabgabesystemen stellt dabei einen potenziell vielversprechenden Ansatz zur Erhöhung der therapeutischen Effektivität und zur Verringerung von Nebenwirkungen dar.

Die Hypothese, die Bedeutung von DEX-haltigen PLGA-Mikropartikeln für das innovative *CED-Disease-Targeting* zu bestätigen, konnte in dieser Arbeit als „*proof of concept*“ umgesetzt werden: Die präparierten Partikel zeigten demnach eine geeignete Größe, um von den isolierten, humanen Monozyten phagozytiert werden zu können und eine ausreichende DEX-Verkapselungsrate. Sie erwiesen sich bzgl. der getesteten Hämokompatibilität und Zytotoxizität als biokompatibel. Ebenfalls konnten sie eine LPS-getriggerte inflammatorische Zytokinsynthese (TNF- α und IL-6) effektiv supprimieren.

Dennoch zeigten sich einige zu kontrollierende partikuläre Eigenschaften, wie bspw. eine aktivierende, zellstimulierende Wirkung auf Monozyten. Es muss überprüft werden, ob die Partikel letztlich sogar eine Aggravation der CED verursachen könnten, wenn sie auf noch unbekannt Art und Weise proinflammatorische Zytokine induzieren (Podolsky 2002). Hierfür müssen vor allem herkömmliche Methoden für partikuläre Biokompatibilitäts- und Immunotoxizitätsassays validiert und angepasst werden, da diverse - noch zu identifizierende - Interferenzen auftreten (Kroll et al. 2009). Dobrovolskaia und McNeil (2007) resümierten hierfür bereits einige präklinische Testvarianten, die u.a. zur erweiterten Bewertung der Sicherheit dieser DDS durchgeführt werden sollten.

Derzeit laufen viele Studien, die für neuartige DDS große Fortschritte bzgl. der Abgabestrategien, der Herstellungsverfahren und potenzieller Materialien zur Verbesserung der Bioverfügbarkeit, der Biokompatibilität und des therapeutischen Index' von Wirkstoffen erzielen (Li et al. 2019). Dafür müssen die Interaktionen und die strategische Nutzbarkeit der physikochemischen Charakteristika der partikulären Systeme, die essentielle chemisch-physikalische und biologische Vorgänge bedingen, umfangreicher analysiert und erforscht werden. Durch die Optimierung der neuen Trägermatrizes hinsichtlich solcher intelligenten Eigenschaften kann letztlich eine Überlegenheit gegenüber den

bestehenden CED-Therapieansätzen erlangt werden. Dafür müssen auch Merkmale wie die Stabilität während der GI-Traktpassage (Youshia und Lamprecht 2016) und das gezielte *Targeting* der entzündeten Mukosa auf der Grundlage von Kenntnissen zu biologischen *in vivo*-Gegebenheiten und deren pathologischen Abweichungen angepasst werden. Zur Evaluation sollte ein Modell verwendet werden, was die komplexen humanen *in vivo*-Gegebenheiten realitätsgetreuer abbildet als derzeitige Zellkulturen. Ussing-Kammern eignen sich hierfür besonders, in denen vergleichend sowohl von gesunden Probanden, als auch von Patienten mit CED entzündlich veränderte *ex vivo*-Mukosamakrobiopsien untersucht und durch die Simulation der physiologischen Bedingungen länger vital erhalten werden können (Rozehnal et al. 2012). Damit könnte nicht nur der partikuläre Translokationsweg beobachtet, sondern auch die Spezifität für inflammatorische Mukosabereiche und der Verbleib der Partikel beschrieben werden. Ob im Gewebe tatsächlich eine Internalisierung durch phagozytierende Zellen stattfindet, die als Zielstrukturen dieses innovativen Ansatzes gelten, könnte somit präziser untersucht werden. Dafür könnten sich z.B. visualisierende Methoden wie die Raman-Spektroskopie eignen.

Weiterhin sollte in pharmakologischen Studien die therapeutische Partikelwirkung untersucht werden. In dieser Arbeit blieb zunächst unklar, ob die eingetretene Entzündungsreduktion durch vorher freigesetztes DEX oder durch die internalisierten DEX-Partikel initiiert wurde. Auch der Internalisierungsmodus und die intrazelluläre Dekomposition der Partikel, die ebenfalls die Wirksamkeit beeinflussen, müssen erforscht werden. Speziell für diese Arbeit wäre die Kontrolle einer erwünschten, retardierten DEX-Wirkung durch die Partikel im Vergleich zum gelösten DEX perspektivisch sinnvoll, die zunächst in Zellkulturexperimenten analysiert werden kann.

DEX muss im Sinne der Entwicklung einer CED-DDS nur als Modellsubstanz verstanden werden. Grundsätzlich würden sich andere Wirkstoffe, verkapselt in den partikulären Vehikeln, ebenfalls für die gezielte CED-Therapie eignen. Dabei sollten vor allem basierend auf der mannigfaltigen CED-Pathogenese andere Wirkprinzipien bedacht und evaluiert werden.

Letztlich sind in der Erforschung innovativer, mukosaselektiver Wirkstoffträger zur gezielten CED-Therapie noch vielfältige Herausforderungen zu verstehen und zu bewältigen, um das Potenzial der partikulären Intervention fortwährend zu perfektionieren.

Literatur - & Quellenverzeichnis

2009. ISO 10993-5: Biological evaluation of medical devices Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity Geneva, Switzerland:
- Aggarwal P, Hall JB, McLeland CB, Dobrovolskaia MA, McNeil SE. 2009. Nanoparticle interaction with plasma proteins as it relates to particle biodistribution, biocompatibility and therapeutic efficacy. *Advanced drug delivery reviews*, 61 (6):428-437.
- Ahluwalia B, Moraes L, Magnusson MK, Ohman L. 2018. Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease and mechanisms of biological therapies. *Scand J Gastroenterol*, 53 (4):379-389.
- Ananthakrishnan AN. 2015. Epidemiology and risk factors for IBD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 12 (4):205-217.
- ASTM-F756. 2008. Standard Practice for Assessment of Hemolytic Properties of Materials. *Annual Book of ASTM Standards*, 13.01.
- Avgoustakis K. 2005. Polylactic-Co-Glycolic Acid (PLGA). In: *Engineering EoBaB*, Hrsg.
- Bauer M, Lautenschlaeger C, Kempe K, Tauhardt L, Schubert US, Fischer D. 2012. Poly(2-ethyl-2-oxazoline) as alternative for the stealth polymer poly(ethylene glycol): comparison of in vitro cytotoxicity and hemocompatibility. *Macromolecular bioscience*, 12 (7):986-998.
- Berridge MV, Herst, P. M., Tan, A. S. 2005. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. *Biotechnology Annual Review*, 11:127-152.
- Biagiotti S, Paoletti MF, Fraternali A, Rossi L, Magnani M. 2011. Drug delivery by red blood cells. *IUBMB Life*, 63 (8):621-631.
- Blasi P, D'Souza SS, Selmin F, DeLuca PP. 2005. Plasticizing effect of water on poly(lactide-co-glycolide). *J Control Release*, 108 (1):1-9.
- Bodmeier R, McGinity JW. 1988. Polylactic acid microspheres containing quinidine base and quinidine sulphate prepared by the solvent evaporation method. III. Morphology of the microspheres during dissolution studies. *Journal of microencapsulation*, 5 (4):325-330.
- Bousquet J, Khaltayev N, Cruz AA, Denburg J, Fokkens WJ, Togias A, Zuberbier T, Baena-Cagnani CE, Canonica GW, van Weel C, Agache I, Ait-Khaled N, Bachert C, Blaiss MS, Bonini S, Boulet LP, Bousquet PJ, Camargos P, Carlsen KH, Chen Y, Custovic A, Dahl R, Demoly P, Douagui H, Durham SR, van Wijk RG, Kalayci O, Kaliner MA, Kim YY, Kowalski ML, Kuna P, Le LT, Lemiere C, Li J, Lockey RF, Mavale-Manuel S, Meltzer EO, Mohammad Y, Mullol J, Naclerio R, O'Hehir RE, Ohta K, Ouedraogo S, Palkonen S, Papadopoulos N, Passalacqua G, Pawankar R, Popov TA, Rabe KF, Rosado-Pinto J, Scadding GK, Simons FE, Toskala E, Valovirta E, van Cauwenberge P, Wang DY, Wickman M, Yawn BP, Yorgancioglu A, Yusuf OM, Zar H, Annesi-Maesano I, Bateman ED, Ben Kheder A,

- Boakye DA, Bouchard J, Burney P, Busse WW, Chan-Yeung M, Chavannes NH, Chuchalin A, Dolen WK, Emuzyte R, Grouse L, Humbert M, Jackson C, Johnston SL, Keith PK, Kemp JP, Klossek JM, Larenas-Linnemann D, Lipworth B, Malo JL, Marshall GD, Naspitz C, Nekam K, Niggemann B, Nizankowska-Mogilnicka E, Okamoto Y, Orru MP, Potter P, Price D, Stoloff SW, Vandenplas O, Viegi G, Williams D, World Health O, Galen, AllerGen. 2008. Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) 2008 update (in collaboration with the World Health Organization, GA(2)LEN and AllerGen). *Allergy*, 63 Suppl 86:8-160.
- Brady JM, Cutright DE, Miller RA, Barristone GC. 1973. Resorption rate, route, route of elimination, and ultrastructure of the implant site of polylactic acid in the abdominal wall of the rat. *Journal of biomedical materials research*, 7 (2):155-166.
- Cai C, Mao S, Germershaus O, Schaper A, Rytting E, Chen D, Kissel T. 2009. Influence of morphology and drug distribution on the release process of FITC-dextran-loaded microspheres prepared with different types of PLGA. *Journal of microencapsulation*, 26 (4):334-345.
- Cameron FL, Gerasimidis K, Papangelou A, Missiou D, Garrick V, Cardigan T, Buchanan E, Barclay AR, McGrogan P, Russell RK. 2013. Clinical progress in the two years following a course of exclusive enteral nutrition in 109 paediatric patients with Crohn's disease. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 37 (6):622-629.
- Carlson M, Raab Y, Peterson C, Hallgren R, Venge P. 1999. Increased intraluminal release of eosinophil granule proteins EPO, ECP, EPX, and cytokines in ulcerative colitis and proctitis in segmental perfusion. *The American journal of gastroenterology*, 94 (7):1876-1883.
- Cartiera MS, Johnson KM, Rajendran V, Caplan MJ, Saltzman WM. 2009. The uptake and intracellular fate of PLGA nanoparticles in epithelial cells. *Biomaterials*, 30 (14):2790-2798.
- Cedervall T, Lynch I, Lindman S, Berggard T, Thulin E, Nilsson H, Dawson KA, Linse S. 2007. Understanding the nanoparticle-protein corona using methods to quantify exchange rates and affinities of proteins for nanoparticles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104 (7):2050-2055.
- Champion JA, Walker A, Mitragotri S. 2008. Role of particle size in phagocytosis of polymeric microspheres. *Pharm Res*, 25 (8):1815-1821.
- Chassaing B, Darfeuille-Michaud A. 2011. The commensal microbiota and enteropathogens in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*, 140 (6):1720-1728.
- Chen RF, Knutson JR. 1988. Mechanism of fluorescence concentration quenching of carboxyfluorescein in liposomes: energy transfer to nonfluorescent dimers. *Anal Biochem*, 172 (1):61-77.

- Chernenko T, Matthaus C, Milane L, Quintero L, Amiji M, Diem M. 2009. Label-free Raman spectral imaging of intracellular delivery and degradation of polymeric nanoparticle systems. *ACS Nano*, 3 (11):3552-3559.
- Ciapetti G, Cenni E, Pratelli L, Pizzoferrato A. 1993. In vitro evaluation of cell/biomaterial interaction by MTT assay. *Biomaterials*, 14 (5):359-364.
- Cockrem JF. 2013. Individual variation in glucocorticoid stress responses in animals. *Gen Comp Endocrinol*, 181:45-58.
- Cohen S, Yoshioka T, Lucarelli M, Hwang LH, Langer R. 1991. Controlled delivery systems for proteins based on poly(lactic/glycolic acid) microspheres. *Pharmaceutical research*, 8 (6):713-720.
- Collnot EM, Ali H, Lehr CM. 2012. Nano- and microparticulate drug carriers for targeting of the inflamed intestinal mucosa. *J Control Release*, 161 (2):235-246.
- Cosnes J. 2010. Smoking, physical activity, nutrition and lifestyle: environmental factors and their impact on IBD. *Digestive diseases (Basel, Switzerland)*, 28 (3):411-417.
- Cui C, Stevens VC, Schwendeman SP. 2007. Injectable polymer microspheres enhance immunogenicity of a contraceptive peptide vaccine. *Vaccine*, 25 (3):500-509.
- D'Souza SS, Selmin F, Murty SB, Qiu W, Thanoo BC, DeLuca PP. 2004. Assessment of fertility in male rats after extended chemical castration with a GnRH antagonist. *AAPS pharmSci*, 6 (1):E10.
- Dabritz J, Gerner P, Enninger A, Classen M, Radke M. 2017. Inflammatory Bowel Disease in Childhood and Adolescence. *Dtsch Arztebl Int*, 114 (19):331-338.
- Davis RR, Lockwood PE, Hobbs DT, Messer RL, Price RJ, Lewis JB, Wataha JC. 2007. In vitro biological effects of sodium titanate materials. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 83 (2):505-511.
- Dawes GJS, Fratila-Apachitei LE, Mulia K, Apachitei I, Witkamp GJ, Duszczyk J. 2009. Size effect of PLGA spheres on drug loading efficiency and release profiles. *Journal of materials science Materials in medicine*, 20 (5):1089-1094.
- Deibler GE, Holmes MS, Campbell PL, Gans J. 1959. Use of triton X-100 as a hemolytic agent in the spectrophotometric measurement of blood O₂ saturation. *Journal of applied physiology*, 14 (1):133-136.
- Ding AG, Schwendeman SP. 2008. Acidic microclimate pH distribution in PLGA microspheres monitored by confocal laser scanning microscopy. *Pharmaceutical research*, 25 (9):2041-2052.
- Dobrovolskaia MA, McNeil SE. 2007. Immunological properties of engineered nanomaterials. *Nat Nanotechnol*, 2 (8):469-478.
- Dobrovolskaia MA, Aggarwal P, Hall JB, McNeil SE. 2008. Preclinical studies to understand nanoparticle interaction with the immune system and its

- potential effects on nanoparticle biodistribution. *Molecular pharmaceuticals*, 5 (4):487-495.
- Domb A, Amselem S, Shah J, Maniar M. 1992. Degradable Polymers for Site-specific Drug Delivery Polymers for Advanced Technologies, 3:279-292.
- Dunne M, Corrigan I, Ramtoolsa Z. 2000. Influence of particle size and dissolution conditions on the degradation properties of polylactide-co-glycolide particles. *Biomaterials*, 21 (16):1659-1668.
- Elson CO, Cong Y, McCracken VJ, Dimmitt RA, Lorenz RG, Weaver CT. 2005. Experimental models of inflammatory bowel disease reveal innate, adaptive, and regulatory mechanisms of host dialogue with the microbiota. *Immunol Rev*, 206:260-276.
- Engel MA, Neurath MF. 2010. New pathophysiological insights and modern treatment of IBD. *Journal of gastroenterology*, 45 (6):571-583.
- Faisant N, Akiki J, Siepmann F, Benoit JP, Siepmann J. 2006. Effects of the type of release medium on drug release from PLGA-based microparticles: experiment and theory. *International journal of pharmaceuticals*, 314 (2):189-197.
- Feeney MA, Murphy F, Clegg AJ, Trebble TM, Sharer NM, Snook JA. 2002. A case-control study of childhood environmental risk factors for the development of inflammatory bowel disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 14 (5):529-534.
- Fiocchi C. 2009. Susceptibility Genes and Overall Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease: Where Do We Stand? *Digestive Diseases*, 27 (3):226-235.
- Ford AC, Bernstein CN, Khan KJ, Abreu MT, Marshall JK, Talley NJ, Moayyedi P. 2011. Glucocorticosteroid therapy in inflammatory bowel disease: systematic review and meta-analysis. *The American journal of gastroenterology*, 106 (4):590-599; quiz 600.
- Fornaguera C, Caldero G, Mitjans M, Vinardell MP, Solans C, Vauthier C. 2015. Interactions of PLGA nanoparticles with blood components: protein adsorption, coagulation, activation of the complement system and hemolysis studies. *Nanoscale*, 7 (14):6045-6058.
- Fournier E, Passirani C, Montero-Menei CN, Benoit JP. 2003. Biocompatibility of implantable synthetic polymeric drug carriers: focus on brain biocompatibility. *Biomaterials*, 24 (19):3311-3331.
- Franchimont D, Martens H, Hagelstein MT, Louis E, Dewe W, Chrousos GP, Belaiche J, Geenen V. 1999. Tumor necrosis factor alpha decreases, and interleukin-10 increases, the sensitivity of human monocytes to dexamethasone: potential regulation of the glucocorticoid receptor. *J Clin Endocrinol Metab*, 84 (8):2834-2839.
- Francis Ka-Ming Chan KM, María José De Rosa. 2013. Detection of Necrosis by Release of Lactate Dehydrogenase (LDH) Activity. *Methods Mol Biol*, 979:65-70.

- Frank DN, St Amand AL, Feldman RA, Boedeker EC, Harpaz N, Pace NR. 2007. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104 (34):13780-13785.
- Fredenberg S, Wahlgren M, Reslow M, Axelsson A. 2011. The mechanisms of drug release in poly(lactic-co-glycolic acid)-based drug delivery systems-A review. *International Journal of Pharmaceutics*, 415 (1-2):34-52.
- Freudenberg MA, Merlin T, Gumenscheimer M, Kalis C, Landmann R, Galanos C. 2001. Role of lipopolysaccharide susceptibility in the innate immune response to *Salmonella typhimurium* infection: LPS, a primary target for recognition of Gram-negative bacteria. *Microbes Infect*, 3 (14-15):1213-1222.
- Gasmi H, Siepman F, Hamoudi MC, Danede F, Verin J, Willart JF, Siepman J. 2016. Towards a better understanding of the different release phases from PLGA microparticles: Dexamethasone-loaded systems. *International journal of pharmaceutics*, 514 (1):189-199.
- Gilbert JA, Quinn RA, Debelius J, Xu ZZ, Morton J, Garg N, Jansson JK, Dorrestein PC, Knight R. 2016. Microbiome-wide association studies link dynamic microbial consortia to disease. *Nature*, 535 (7610):94-103.
- Ginhoux F, Jung S. 2014. Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis. *Nat Rev Immunol*, 14 (6):392-404.
- Gopferich A. 1996. Mechanisms of polymer degradation and erosion. *Biomaterials*, 17 (2):103-114.
- Graham DB, Xavier RJ. 2020. Pathway paradigms revealed from the genetics of inflammatory bowel disease. *Nature*, 578 (7796):527-539.
- Grzanka A, Misiolok M, Golusinski W, Jarzab J. 2011. Molecular mechanisms of glucocorticoids action: implications for treatment of rhinosinusitis and nasal polyposis. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 268 (2):247-253.
- Gu B, Sun X, Papadimitrakopoulos F, Burgess DJ. 2016. Seeing is believing, PLGA microsphere degradation revealed in PLGA microsphere/PVA hydrogel composites. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 228:170-178.
- Gu H, Song C, Long D, Mei L, Sun H. 2007. Controlled release of recombinant human nerve growth factor (rhNGF) from poly[(lactic acid)-co-(glycolic acid)] microspheres for the treatment of neurodegenerative disorders. *Polymer International*, 56 (10):1272-1280.
- Hakkarainen M. 2002. Aliphatic polyesters: Abiotic and biotic degradation and degradation products. *Degradable Aliphatic Polyesters*, 157:113-138.
- Han FY, Thurecht KJ, Whittaker AK, Smith MT. 2016. Bioerodable PLGA-Based Microparticles for Producing Sustained-Release Drug Formulations and Strategies for Improving Drug Loading. *Frontiers in pharmacology*, 7:185.

- Hau M, Casagrande S, Ouyang JQ, Baugh AT. 2016. Glucocorticoid-mediated Phenotypes in Vertebrates: Multilevel Variation and Evolution. *Advances in the Study of Behavior*. Elsevier, 41-115.
- Hellerer T. 2004. CARS-Mikroskopie : Entwicklung und Anwendung: Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Hickey T, Kreutzer D, Burgess DJ, Moussy F. 2002. Dexamethasone/PLGA microspheres for continuous delivery of an anti-inflammatory drug for implantable medical devices. *Biomaterials*, 23 (7):1649-1656.
- Hirota K, Hiroshi T. 2012. Endocytosis of Particle Formulations by Macrophages and Its Application to Clinical Treatment InTech.
- Huang X, Brazel CS. 2001. On the importance and mechanisms of burst release in matrix-controlled drug delivery systems. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 73 (2-3):121-136.
- Jain RA. 2000. The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices. *Biomaterials*, 21 (23):2475-2490.
- Joyce DA, Steer JH, Abraham LJ. 1997. Glucocorticoid modulation of human monocyte/macrophage function: control of TNF-alpha secretion. *Inflamm Res*, 46 (11):447-451.
- Jubeh TT, Barenholz Y, Rubinstein A. 2004. Differential adhesion of normal and inflamed rat colonic mucosa by charged liposomes. *Pharmaceutical research*, 21 (3):447-453.
- Kaji DM, Thakkar U, Kahn T. 1981. Glucocorticoid-induced alterations in the sodium potassium pump of the human erythrocyte. *J Clin Invest*, 68 (2):422-430.
- Kamada N, Hisamatsu T, Okamoto S, Chinen H, Kobayashi T, Sato T, Sakuraba A, Kitazume MT, Sugita A, Koganei K, Akagawa KS, Hibi T. 2008. Unique CD14 intestinal macrophages contribute to the pathogenesis of Crohn disease via IL-23/IFN-gamma axis. *J Clin Invest*, 118 (6):2269-2280.
- Kaplan GG. 2015. The global burden of IBD: from 2015 to 2025. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 12 (12):720-727.
- Kaser A, Zeissig S, Blumberg RS. 2010. Inflammatory bowel disease. *Annu Rev Immunol*, 28:573-621.
- Khanna P, Ong C, Bay BH, Baeg GH. 2015. Nanotoxicity: An Interplay of Oxidative Stress, Inflammation and Cell Death. *Nanomaterials*, 5 (3):1163-1180.
- Klose D, Siepmann F, Elkharraz K, Krenzlin S, Siepmann J. 2006. How porosity and size affect the drug release mechanisms from PLGA-based microparticles. *International journal of pharmaceutics*, 314 (2):198-206.
- Klotz U, Schwab M. 2005. Topical delivery of therapeutic agents in the treatment of inflammatory bowel disease. *Adv Drug Deliv Rev*, 57 (2):267-279.
- Kroll A, Pillukat MH, Hahn D, Schnekenburger J. 2009. Current in vitro methods in nanoparticle risk assessment: limitations and challenges. *European*

- journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft für Pharmazeutische Verfahrenstechnik e V, 72 (2):370-377.
- Kruis W. 2013. Probiotics. *Dig Dis*, 31 (3-4):385-387.
- Laaksonen T, Santos H, Vihola H, Salonen J, Riikonen J, Heikkilä T, Peltonen L, Kumar N, Murzin DY, Lehto VP, Hirvonen J. 2007. Failure of MTT as a toxicity testing agent for mesoporous silicon microparticles. *Chem Res Toxicol*, 20 (12):1913-1918.
- Lakowicz JR. 1999. Principles of fluorescence spectroscopy New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers.
- Lautenschlager C, Schmidt C, Lange K, Stallmach A. 2015. Drug delivery strategies for targeted treatment of inflammatory bowel disease. *Zeitschrift Für Gastroenterologie*, 53 (3):226-234.
- Lee PI. 1984. Effect of Non-Uniform Initial-Drug Concentration Distribution on the Kinetics of Drug Release from Glassy Hydrogel Matrices. *Polymer*, 25 (7):973-978.
- Levine JS, Burakoff R. 2011. Extraintestinal manifestations of inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Hepatol (N Y)*, 7 (4):235-241.
- Li C, Wang J, Wang Y, Gao H, Wei G, Huang Y, Yu H, Gan Y, Wang Y, Mei L, Chen H, Hu H, Zhang Z, Jin Y. 2019. Recent progress in drug delivery. *Acta Pharm Sin B*, 9 (6):1145-1162.
- Li L, Schwendeman SP. 2005. Mapping neutral microclimate pH in PLGA microspheres. *J Control Release*, 101 (1-3):163-173.
- Li M, Rouaud O, Poncelet D. 2008. Microencapsulation by solvent evaporation: state of the art for process engineering approaches. *International journal of pharmaceutics*, 363 (1-2):26-39.
- Lu SX, Ramirez WF, Anseth KS. 1998. Modeling and optimization of drug release from laminated polymer matrix devices. *Aiche Journal*, 44 (7):1689-1696.
- Lundqvist M, Stigler J, Elia G, Lynch I, Cedervall T, Dawson KA. 2008. Nanoparticle size and surface properties determine the protein corona with possible implications for biological impacts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105 (38):14265-14270.
- Mahmoudi M, Lynch I, Ejtehadi MR, Monopoli MP, Bombelli FB, Laurent S. 2011. Protein-nanoparticle interactions: opportunities and challenges. *Chem Rev*, 111 (9):5610-5637.
- Makadia HK, Siegel SJ. 2011. Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. *Polymers*, 3 (3):1377-1397.
- Malich G, Markovic B, Winder C. 1997. The sensitivity and specificity of the MTS tetrazolium assay for detecting the in vitro cytotoxicity of 20 chemicals using human cell lines. *Toxicology*, 124 (3):179-192.

- McGuckin MA, Eri R, Simms LA, Florin TH, Radford-Smith G. 2009. Intestinal barrier dysfunction in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis*, 15 (1):100-113.
- Miller RA, Brady JM, Cutright DE. 1977. Degradation rates of oral resorbable implants (polylactates and polyglycolates): rate modification with changes in PLA/PGA copolymer ratios. *J Biomed Mater Res*, 11 (5):711-719.
- Miltenyi S, Muller W, Weichel W, Radbruch A. 1990. High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry*, 11 (2):231-238.
- Mo Y, Lim LY. 2005. Paclitaxel-loaded PLGA nanoparticles: potentiation of anticancer activity by surface conjugation with wheat germ agglutinin. *J Control Release*, 108 (2-3):244-262.
- Müller R, Hildebrand G, Bauer K. 1998. *Pharmazeutische Technologie: Moderne Arzneiformen*. 2. Aufl. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft.
- Müller RH, Schuhmann R. 1996. *Teilchengrößenmessung in der Laborpraxis*. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Band 38.
- Murata N, Takashima Y, Toyoshima K, Yamamoto M, Okada H. 2008. Anti-tumor effects of anti-VEGF siRNA encapsulated with PLGA microspheres in mice. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 126 (3):246-254.
- Nameirakpam J, Rikhi R, Rawat SS, Sharma J, Suri D. 2020. Genetics on early onset inflammatory bowel disease: An update. *Genes Dis*, 7 (1):93-106.
- Neurath MF. 2014. Cytokines in inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol*, 14 (5):329-342.
- Nicolete R, dos Santos DF, Faccioli LH. 2011. The uptake of PLGA micro or nanoparticles by macrophages provokes distinct in vitro inflammatory response. *International immunopharmacology*, 11 (10):1557-1563.
- Olszak T, An D, Zeissig S, Vera MP, Richter J, Franke A, Glickman JN, Siebert R, Baron RM, Kasper DL, Blumberg RS. 2012. Microbial exposure during early life has persistent effects on natural killer T cell function. *Science (New York, N Y)*, 336 (6080):489-493.
- Orzekowsky-Schroeder R, Klinger A, Martensen B, Blessenohl M, Gebert A, Vogel A, Huttmann G. 2011. In vivo spectral imaging of different cell types in the small intestine by two-photon excited autofluorescence. *J Biomed Opt*, 16 (11):116025.
- Ott SJ, Musfeldt M, Wenderoth DF, Hampe J, Brant O, Folsch UR, Timmis KN, Schreiber S. 2004. Reduction in diversity of the colonic mucosa associated bacterial microflora in patients with active inflammatory bowel disease. *Gut*, 53 (5):685-693.
- Palmela C, Chevarin C, Xu Z, Torres J, Sevrin G, Hirten R, Barnich N, Ng SC, Colombel JF. 2018. Adherent-invasive *Escherichia coli* in inflammatory bowel disease. *Gut*, 67 (3):574-587.

- Park TG. 1995. Degradation of poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres: effect of copolymer composition. *Biomaterials*, 16 (15):1123-1130.
- Pithadia AB, Jain S. 2011. Treatment of inflammatory bowel disease (IBD). *Pharmacol Rep*, 63 (3):629-642.
- Pizzoferrato A, Ciapetti G, Stea S, Cenni E, Arciola CR, Granchi D, Savarino L. 1994. Cell culture methods for testing biocompatibility. *Clin Mater*, 15 (3):173-190.
- Podolsky DK. 2002. The current future understanding of inflammatory bowel disease. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 16 (6):933-943.
- Porporato PE, Payen VL, De Saedeleer CJ, Preat V, Thissen JP, Feron O, Sonveaux P. 2012. Lactate stimulates angiogenesis and accelerates the healing of superficial and ischemic wounds in mice. *Angiogenesis*, 15 (4):581-592.
- Rabinovitch M. 1995. Professional and non-professional phagocytes: an introduction. *Trends Cell Biol*, 5 (3):85-87.
- Reinbold J, Hierlemann T, Hinkel H, Muller I, Maier ME, Weindl T, Schlensak C, Wendel HP, Krajewski S. 2016. Development and in vitro characterization of poly(lactide-co-glycolide) microspheres loaded with an antibacterial natural drug for the treatment of long-term bacterial infections. *Drug Des Devel Ther*, 10:2823-2832.
- Rozehnal V, Nakai D, Hoepner U, Fischer T, Kamiyama E, Takahashi M, Yasuda S, Mueller J. 2012. Human small intestinal and colonic tissue mounted in the Ussing chamber as a tool for characterizing the intestinal absorption of drugs. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 46 (5):367-373.
- Sah H. 1997. Microencapsulation techniques using ethyl acetate as a dispersed solvent: Effects of its extraction rate on the characteristics of PLGA microspheres. *Journal of Controlled Release*, 47 (3):233-245.
- Sakamoto N, Kono S, Wakai K, Fukuda Y, Satomi M, Shimoyama T, Inaba Y, Miyake Y, Sasaki S, Okamoto K, Kobashi G, Washio M, Yokoyama T, Date C, Tanaka H, Epidemiology Group of the Research Committee on Inflammatory Bowel Disease in J. 2005. Dietary risk factors for inflammatory bowel disease: a multicenter case-control study in Japan. *Inflamm Bowel Dis*, 11 (2):154-163.
- Salthouse TN, Matlaga BF. 1976. Polyglactin 910 suture absorption and the role of cellular enzymes. *Surgery, gynecology & obstetrics*, 142 (4):544-550.
- Sannino A, Madaghiele M, Lionetto MG, Schettino T, Maffezzoli A. 2006. A cellulose-based hydrogel as a potential bulking agent for hypocaloric diets: An in vitro biocompatibility study on rat intestine. *Journal of Applied Polymer Science*, 102 (2):1524-1530.
- Sarmiento B, Mazzaglia D, Bonferoni MC, Neto AP, Monteiro MD, Seabra V. 2011. Effect of chitosan coating in overcoming the phagocytosis of insulin

- loaded solid lipid nanoparticles by mononuclear phagocyte system. *Carbohydrate Polymers*, 84 (3):919-925.
- Schmidt C, Stallmach A. 2005. Etiology and pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Minerva Gastroenterol Dietol*, 51 (2):127-145.
- Schmidt C, Lautenschlaeger C, Collnot EM, Schumann M, Bojarski C, Schulzke JD, Lehr CM, Stallmach A. 2013. Nano- and microscaled particles for drug targeting to inflamed intestinal mucosa: a first in vivo study in human patients. *J Control Release*, 165 (2):139-145.
- Schmitz H, Barmeyer C, Fromm M, Runkel N, Foss HD, Bentzel CJ, Riecken EO, Schulzke JD. 1999. Altered tight junction structure contributes to the impaired epithelial barrier function in ulcerative colitis. *Gastroenterology*, 116 (2):301-309.
- Schrader B. 1995. *Infrared and Raman Spectroscopy, methods and applications*. Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft mbH
- Sharp FA, Ruane D, Claass B, Creagh E, Harris J, Malyala P, Singh M, O'Hagan DT, Petrilli V, Tschopp J, O'Neill LA, Lavelle EC. 2009. Uptake of particulate vaccine adjuvants by dendritic cells activates the NALP3 inflammasome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106 (3):870-875.
- Shive MS, Anderson JM. 1997. Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres. *Adv Drug Deliv Rev*, 28 (1):5-24.
- Siegel HKMSJ. 2011. Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. *PMC*.
- Siepmann J, Elkharraz K, Siepmann F, Klose D. 2005. How autocatalysis accelerates drug release from PLGA-based microparticles: a quantitative treatment. *Biomacromolecules*, 6 (4):2312-2319.
- Smith SA, Pretorius WA. 2002. The conservative behaviour of fluorescein. *Water Sa*, 28 (4):403-406.
- Stallmach A, Dennler U, Marschall U, Schmidt C. 2015. Patient-relevant endpoints in inflammatory bowel diseases--have changes occurred in Germany over the past twelve years? *J Crohns Colitis*, 9 (5):390-397.
- Suttorp N., Möckel M., Siegmund B., Dietel M. 2016. Chronisch entzündliche Darmerkrankungen. *Harrisons Innere Medizin Bd. 3.19*. In: *ABW-Wissenschaftsverlag*, Hrsg.: Thieme, pp. 2390-2412.
- Tabata Y, Ikada Y. 1988. Macrophage phagocytosis of biodegradable microspheres composed of L-lactic acid/glycolic acid homo- and copolymers. *J Biomed Mater Res*, 22 (10):837-858.
- Tamoutounour S, Henri S, Lelouard H, de Bovis B, de Haar C, van der Woude CJ, Woltman AM, Reyat Y, Bonnet D, Sichien D, Bain CC, Mowat AM, Reis e Sousa C, Poulin LF, Malissen B, Guilliams M. 2012. CD64 distinguishes macrophages from dendritic cells in the gut and reveals the Th1-inducing role of mesenteric lymph node macrophages during colitis. *Eur J Immunol*, 42 (12):3150-3166.

- Ter Horst R, Jaeger M, Smeekens SP, Oosting M, Swertz MA, Li Y, Kumar V, Diavatopoulos DA, Jansen AFM, Lemmers H, Toenhake-Dijkstra H, van Herwaarden AE, Janssen M, van der Molen RG, Joosten I, Sweep F, Smit JW, Netea-Maier RT, Koenders M, Xavier RJ, van der Meer JWM, Dinarello CA, Pavelka N, Wijmenga C, Notebaart RA, Joosten LAB, Netea MG. 2016. Host and Environmental Factors Influencing Individual Human Cytokine Responses. *Cell*, 167 (4):1111-1124 e1113.
- Thomas S, Baumgart DC. 2012. Targeting leukocyte migration and adhesion in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Inflammopharmacology*, 20 (1):1-18.
- Thote AJ, Chappell JT, Jr., Gupta RB, Kumar R. 2005. Reduction in the initial-burst release by surface crosslinking of PLGA microparticles containing hydrophilic or hydrophobic drugs. *Drug Dev Ind Pharm*, 31 (1):43-57.
- Tirosh B, Khatib N, Barenholz Y, Nissan A, Rubinstein A. 2009. Transferrin as a luminal target for negatively charged liposomes in the inflamed colonic mucosa. *Molecular pharmaceuticals*, 6 (4):1083-1091.
- Tolstik E, Osminkina LA, Matthaus C, Burkhardt M, Tsurikov KE, Natashina UA, Timoshenko VY, Heintzmann R, Popp J, Sivakov V. 2016. Studies of silicon nanoparticles uptake and biodegradation in cancer cells by Raman spectroscopy. *Nanomedicine*, 12 (7):1931-1940.
- Tolstik T, Marquardt C, Matthaus C, Bergner N, Bielecki C, Krafft C, Stallmach A, Popp J. 2014. Discrimination and classification of liver cancer cells and proliferation states by Raman spectroscopic imaging. *Analyst*, 139 (22):6036-6043.
- Tsianakas A, Varga G, Barczyk K, Bode G, Nippe N, Kran N, Roth J, Luger TA, Ehrchen J, Sunderkoetter C. 2012. Induction of an anti-inflammatory human monocyte subtype is a unique property of glucocorticoids, but can be modified by IL-6 and IL-10. *Immunobiology*, 217 (3):329-335.
- Turabekova M, Rasulev B, Theodore M, Jackman J, Leszczynska D, Leszczynski J. 2014. Immunotoxicity of nanoparticles: a computational study suggests that CNTs and C60 fullerenes might be recognized as pathogens by Toll-like receptors. *Nanoscale*, 6 (7):3488-3495.
- Urayama S, Chang EB. 1997. Mechanisms and treatment of diarrhea in inflammatory bowel diseases. *Inflammatory bowel diseases*, 3 (2):114-131.
- van Apeldoorn AA, van Manen H-J, Bezemer JM, de Bruijn JD, van Blitterswijk CA, Otto C. 2004. Raman imaging of PLGA microspheres degradation inside macrophages. *Journal of the American Chemical Society*, 126 (41):13226-13227.
- Vishwakarma A, Bhise NS, Evangelista MB, Rouwkema J, Dokmeci MR, Ghaemmaghami AM, Vrana NE, Khademhosseini A. 2016. Engineering Immunomodulatory Biomaterials To Tune the Inflammatory Response. *Trends Biotechnol*, 34 (6):470-482.

- von Burkersroda F, Schedl L, Gopferich A. 2002. Why degradable polymers undergo surface erosion or bulk erosion. *Biomaterials*, 23 (21):4221-4231.
- Waage A, Bakke O. 1988. Glucocorticoids suppress the production of tumour necrosis factor by lipopolysaccharide-stimulated human monocytes. *Immunology*, 63 (2):299-302.
- Wahl B, Daum N, Ohrem HL, Lehr CM. 2008. Novel luminescence assay offers new possibilities for the risk assessment of silica nanoparticles. *Nanotoxicology*, 2 (4):243-251.
- Wang HT, Palmer H, Linhardt RJ, Flanagan DR, Schmitt E. 1990. Degradation of poly(ester) microspheres. *Biomaterials*, 11 (9):679-685.
- Wang J, Wang BM, Schwendeman SP. 2002. Characterization of the initial burst release of a model peptide from poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres. *J Control Release*, 82 (2-3):289-307.
- Winterkamp S, Raithel M, Hahn EG. 2000. Secretion and tissue content of eosinophil cationic protein in Crohn's disease. *J Clin Gastroenterol*, 30 (2):170-175.
- Wintermantel E, Ha S-W. 2009. *Medizintechnik: Life Science Engineering; Interdisziplinarität, Biokompatibilität, Technologien, Implantate, Diagnostik, Werkstoffe, Zertifizierung, Business*. 5. überarb. und erw. Aufl. Berlin: Springer.
- Wischke C, Schwendeman SP. 2008. Principles of encapsulating hydrophobic drugs in PLA/PLGA microparticles. *Int J Pharm*, 364 (2):298-327.
- Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ, Mathison JC. 1990. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science*, 249 (4975):1431-1433.
- Wu ZA, Wang HX. 2018. *MEDICINE: A Systematic Review of the Interaction Between Gut Microbiota and Host Health from a Symbiotic Perspective*. *SN Comprehensive Clinical Medicine*:1:224–235.
- Wynn TA, Chawla A, Pollard JW. 2013. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature*, 496 (7446):445-455.
- Xu J, Wong DH, Byrne JD, Chen K, Bowerman C, DeSimone JM. 2013. Future of the particle replication in nonwetting templates (PRINT) technology. *Angew Chem Int Ed Engl*, 52 (26):6580-6589.
- Youshia J, Lamprecht A. 2016. Size-dependent nanoparticulate drug delivery in inflammatory bowel diseases. *Expert Opin Drug Deliv*, 13 (2):281-294.
- Zhou L, Braat H, Faber KN, Dijkstra G, Peppelenbosch MP. 2009. Monocytes and their pathophysiological role in Crohn's disease. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66 (2):192-202.
- Zolnik BS, Burgess DJ. 2008. Evaluation of in vivo-in vitro release of dexamethasone from PLGA microspheres. *J Control Release*, 127 (2):137-145.

Anhang

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: multifaktorielle Pathogenese der CED	2
Abbildung 2: selektive Behandlungsstrategien bei CED	10
Abbildung 3: partikuläre Wirkstofffreisetzungsmechanismen	16
Abbildung 4: volumengewichtete Partikelgrößenverteilungen	37
Abbildung 5: repräsentative REM-Aufnahmen verschiedener Partikelformulierungen	38
Abbildung 6: Kalibrierfunktion	39
Abbildung 7: Fluoreszenzstabilitätsbestimmungen von partikelfreiem FITC-DEX	41
Abbildung 8: in vitro-Freisetzungskinetik von FITC-DEX-PLGA-Partikeln in PBS (pH 7,4)	41
Abbildung 9: Darstellung der konzentrationsabhängigen Hämolysewirkung der Partikel (DEX-PLGA- & PLGA-Partikel im Vergleich) auf Erythrozyten; 0 µg/ml = Negativkontrolle (Behandlung mit PBS pH 7,4) ≙ 0 % Hämolyse; nicht dargestellt wurde die Positivkontrolle (Behandlung mit 1 % Triton X-100) ≙ 100 % Hämolyse; Markierungslinien zeigen die Grenzeinteilung für Hämolyse; Mittelwerte aus n=3; Fehlerbalken zeigen den SEM	43
Abbildung 10: repräsentative Aufnahmen aus der Versuchsreihe der Erythrozytenaggregationsassays; oben links: Negativkontrolle (Behandlung mit PBS pH 7,4); oben rechts: Positivkontrolle (Behandlung mit 30 µg/ml 25 kDa bPEI); Darstellung der Erythrozytenaggregation unter Behandlung mit den DEX-PLGA- und PLGA-Partikelformulierungen in verschiedenen Konzentrationen (1 µg/ml – 1mg/ml)..	44
Abbildung 11: metabolische Aktivität nach Inkubation der humanen Monozyten mit verschiedenen Konzentrationen beider Partikelformulierungen (DEX-PLGA- & PLGA- Partikel im Vergleich); NC= Negativkontrolle (keine Partikelbehandlung) ≙ 100 % Zellviabilität; Markierungslinie gilt als Zytotoxizitätsgrenze; Mittelwerte aus n=3; Fehlerbalken geben den SEM an	46
Abbildung 12: LDH-Freisetzung aus Monozyten durch die Behandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen beider Partikelformulierungen (DEX-PLGA- &	

PLGA -Partikel im Vergleich); NC= Negativkontrolle (keine Partikelbehandlung) \triangleq 0 % LDH-Freisetzung; nicht dargestellt wurde die Positivkontrolle (Zellyse) \triangleq 100 % LDH-Freisetzung; Markierungslinie gilt als Zytotoxizitätsgrenze; LoD (Limit of Detection)= Nachweisgrenze; Mittelwerte aus n=3; Fehlerbalken geben den SEM an..... 47

Abbildung 13: (a) Dosisabhängiger Effekt von Dexamethason auf die LPS-induzierte TNF- α -Sekretion von humanen Monozyten; **(b)** Dosis-Wirkungs-Kurve der in (a) dargestellten Ergebnisse mit der mittleren Hemmkonzentration (IC_{50}) in mM; Mittelwerte aus n=6; Fehlerbalken geben den SEM an; NC= Negativkontrolle (Zellen kultiviert in Abwesenheit von LPS und DEX); PC= Positivkontrolle (Zellen mit 10 ng/ml LPS stimuliert ohne DEX) 49

Abbildung 14: Darstellung der Wirkung unterschiedlicher Konzentrationen von PLGA-Partikel (rot) und DEX-PLGA-Partikel (blau) in $\mu\text{g/ml}$ auf die Sekretion der Zytokine **(a)** TNF- α und **(b)** IL-6 von LPS-getriggerten Monozyten; Mittelwerte aus $n=5 \pm \text{SEM}$; NC= Negativkontrolle (Zellen kultiviert in Abwesenheit von LPS und Partikel); PC= Positivkontrolle (Zellen mit 10 ng/ml LPS stimuliert ohne Partikel) 51

Abbildung 15: Raman-Referenzspektren der Partikelmaterialien (PLGA-Partikel & Dexamethason) in Pulverform in der Spektralregion 200 – 3100 cm^{-1} ; Pfeile zeigen typische Spektralbanden für Dexamethason 52

Abbildung 16: DEX-PLGA-Mikropartikel nach 24 h Inkubation in RPMI-Medium; **(a)** Lichtmikroskopbild; **(b)** N-Finder Cluster- Analyse des vermessenen DEX-PLGA-Partikels mit unterschiedlicher Farbkodierung von PLGA (hellblau) & Dexamethason (blau); **(c)** Ramanreferenzspektrum des Mikropartikel- und Dexamethason-Clusters, farbliche Markierung entsprechend Bild (b), Pfeile zeigen wiedergefundene Spektralbanden von Dexamethason aus Abbildung 15 53

Abbildung 17: (a) Durchlichtmikroskopische Aufnahme von Monozyten mit DEX-PLGA-Mikropartikel, **(b)** Vergrößerung einer vermessenen Zelle, Partikel sichtbar; **(c)** Raman-Spektroskop-Bild der CH-Stretching-Region eines Monozyten mit Partikel in 2D (oben) und Z-Stack (unten); **(d)** N-Finder Cluster-Analyse des selben Ausschnittes wie (c) mit Farbkodierung von PLGA-Partikel (blau) und Zelle (rot) in 2D und Z-Stack; **(e)** korrespondierende Raman-Referenzspektren der Cluster aus (d) für DEX-PLGA-Partikel (blau, oben) und Monozyten (rot, unten) in der Spektralregion 200-3100 cm^{-1} , Pfeile

zeigen typische Spektralbanden für PLGA-Partikel (blau) und biologische Zellen (rot) 54

Abbildung 18: repräsentative Fluoreszenz-HR-SIM-Mikroskopbilder von Monozyten, welche 24 h mit FITC-DEX-PLGA-Partikeln inkubiert wurden; Zytoplasmamembran, gefärbt mit CellMask Deep Red, wird rot dargestellt; Fluorescein-Dexamethason in den Partikeln ist grün gekennzeichnet, Z-Stack zusätzlich dargestellt; Maßstabsbalken entspricht 2 μm 57

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Ergebnisse der Gehaltbestimmung von FITC-DEX in FITC-DEX-PLGA-Partikeln, n=3, DEX-Gehalt entspricht dem prozentualen Anteil an der Gesamtpartikelmasse	40
Tabelle 2: repräsentative Darstellung von Raman-Referenzspektren und farblich kodierter N-Finder Cluster Analyse (blau= DEX-PLGA-Mikropartikel; rot= Zelle) fünf vermessener Zellen in X*Y (2D)-Darstellung und Z-Stack	55

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben:

Prof. Dr. med. Andreas Stallmach

Univ. Prof. Dr. med. Tony Bruns

Dr. rer. nat. Tatiana Kirchberger-Tolstik

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Calau, 04.04.2021

Unterschrift des Verfassers

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen herzlich danken, die mir durch ihre vielfältige, erfahrene Hilfe sowie mit seelischer und moralischer Unterstützung mein Studium und die Vollen-
dung meiner Promotion ermöglichten:

Herrn Prof. Dr. Andreas Stallmach, meinem Doktorvater, danke ich für die anspruchs-
volle und interessante Promotionsthematik, die Betreuung, für alle konstruktiven Rat-
schläge und die Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Tony Bruns danke ich für seine stete Hilfsbereitschaft, seine förderlichen
Anregungen und Ideen, für fachliche Gespräche und für seine investierte Zeit.

Den Einstieg in die Thematik und das wissenschaftliche Arbeiten erleichterte mir vor al-
lem Dr. Christian Lautenschläger, sodass ich mich bei ihm für die wertvollen Telefonate
und Treffen bedanken möchte.

Ich möchte nicht versäumen meiner Arbeitsgruppe für die freundschaftliche und hilfsbe-
reite Atmosphäre und für alle anregenden Gespräche zu danken. Besonders Dr. Sven
Stengel, Arndt Steube und Dr. Nilay Köse-Vogel verdanke ich eine intensive Einführung
in die experimentelle Forschung und das wissenschaftliche Arbeiten sowie die Unterstüt-
zung bei der technischen Auswertung der Daten.

Bei Dr. Tatiana Kirchberger-Tolstik bedanke ich mich von Herzen für die aufgebrauchte
Zeit der Einweisung, Durchführung und Auswertung der Raman-Spektroskopie sowie für
die Herstellung des Kontaktes zum Leibniz-IPHT.

Außerdem gilt mein Dank Dr. Sarmiza Elena Stanca für die Hilfe bei den REM-Aufnah-
men und der ELYRA-Hochauflösungs-Mikroskopie.

Ebenfalls danke ich dem IZKF Jena für die finanzielle Unterstützung der Arbeit im Rah-
men meines Promotionsstipendiums.

Für die Durchsicht dieser Arbeit und die kritische Auseinandersetzung mit der Thematik
bedanke ich mich besonders bei Dr. Melanie Kahl und Thoralf Canis.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, meiner Schwester, meinen Großeltern und
meiner Schwieger-Familie, die mir das Medizinstudium erst ermöglichten und mich mit
ihrer liebevollen Fürsorge jederzeit und in allen Lebenslagen unterstützen.

Meinem Freund, Robert Müller, bin ich für seine Ermutigungen, seine konstruktive Kritik und den uneingeschränkten Rückhalt in dieser intensiven Zeit dankbar, jedoch besonders für seine bedingungslose Liebe in all der Zeit an meiner Seite.

Für ihr stets offenes Ohr, viel Herzlichkeit sowie für die vielfältigen Unterstützungen und Erfahrungen auf meinem bisherigen Lebensweg möchte ich meinen Freunden, meiner (Schwieger-) Familie und meinem Freund von Herzen danken.