AUS DEM LEHRSTUHL FÜR ZAHNERHALTUNG UND PARODONTOLOGIE
DIREKTOR: PROF. DR. G. SCHMALZ
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Bestimmung der photodynamischen Aktivität von Photosan auf dermale und gingivale Fibroblasten

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnmedizin

der
Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Sonja Ernst
aus Neumarkt i.d.OPf.

2009

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR ZAHNERHALTUNG UND PARODONTOLOGIE
DIREKTOR: PROF. DR. G. SCHMALZ
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Bestimmung der photodynamischen Aktivität von Photosan auf dermale und gingivale Fibroblasten

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnmedizin

der
Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Sonja Ernst
aus Neumarkt i.d.OPf.

2009

Dekan: Prof. Dr. Bernhard Weber

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Gottfried Schmalz

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. h.c. Michael Landthaler

Tag der mündlichen Prüfung: 24.03.2010

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 5

2 Literaturübersicht 7

2.1 Geschichte und Definition der photodynamischen Therapie 7

2.2 Photosensibilisatoren 7

2.3 Wirkmechanismus der photodynamischen Therapie 8

2.4 Anwendungsgebiete der photodynamischen Therapie 11

2.5 Bakterielle Erkrankungen in der Zahnheilkunde und Problematik der bestehenden Therapieverfahren 11

3 Fragestellung 16

4 Material 17

4.1 Biologisches Material/Zellen 17

4.1.1 *Neonatale humane dermale Fibroblasten (NHDF)* 17
4.1.2 *Gingivafibroblasten humaner Gingiva (primär)* 17
4.1.3 *Gingiva isoliert vom Schwein* 17

4.2 Photosensibilisator und Nachweisfarbstoffe 17

4.2.1 Photosan 17
4.2.2 Lyso Tracker® Green DND-26 19
4.2.3 Rhodamin 6G 19
4.2.4 Höchst 33342 20

4.3 Reagenzien, Puffer und Antibiotika 20

4.3.1 Reagenzien 20
4.3.2 Puffer 22
4.3.3 Antibiotika 22

4.4 Zellkulturmedien 22

4.4.1 *NHDF-Zellen* 22
4.4.2 *primäre humane Gingivafibroblasten* 22

4.5 Technische Geräte und Hilfsmittel 23

4.5.1 Technische Geräte 23
4.5.2 Hilfsmittel 25

5 Methoden 26

5.1 Zellkulturverfahren zur Kultivierung von primären Gingivafibroblasten 26

5.1.1 Isolierung und Verarbeitung der humanen Gingiva 26

5.1.2 Vermehrung der Zellen 26
5.1.3 Foto-Dokumentation der primären Gingivafibroblasten 27

5.2 Zellkulturverfahren von NHDF-Zellen 27

5.2.1 Vermehrung der Zellen 27
5.2.2 Verteilung der Zellen auf die Mikrotiterplatte 28
5.2.3 Verdünnungsreihe des Farbstoffes 28
5.2.4 Phototoxizitätstest von dermalen Fibroblasten *in vitro* 28
5.2.5 MTT-Test 29
5.2.6 Auswertung am Elisareader 29
5.2.7 Datenverarbeitung und statistische Analyse 29

5.3 *Ex vivo* Gingiva – Modell (Schwein) 30

5.3.1 Isolierung der Gingiva aus dem Schweinekiefer und nachfolgende Bearbeitung 30
5.3.2 Phototoxizitätstest (*ex vivo* Gingiva) 31
5.3.3 Probenentnahme und Histochemie 32
5.3.3.1 Nachweis von Apoptose mit dem *In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein und Tunel POD* 33
5.3.3.2 Nachweis von Apoptose mit dem *Fluorescein FragEL ™ DNA Fragmentation Detection Kit* 33
5.3.4 Auswertung 34

5.4 Experimente zur Aufnahme des Farbstoffes 35

5.4.1 Zelluläre Aufnahme von Photosan 35

5.5 Fluoreszenzaufnahmen 36

5.5.1 Lokalisation von Photosan bei NHDF-Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie 36
5.5.2 Lokalisation von Photosan im *ex vivo* Gingivagewebe (Schwein) 38

5.6 HE-Färbung am Paraffinschnitt – *Ex vivo* Gingiva–Modell (Schwein) 38

6 Ergebnisse 39

6.1 Primärkultur humaner Gingvafibroblasten 39

6.1.1 Zeitverlauf der Kultivierung 39

6.2 Nachweis der Aufnahme von Photosan bei NHDF-Zellen und *ex vivo* Gingivagewebe (Schwein) 42

6.2.1 Inkubation von NHDF-Zellen mit Photosan 42
6.2.2 Inkubation von *ex vivo* Gingivagewebe (Schwein) mit Photosan 44
6.2.3 Zelluläre Aufnahme und Lokalisation von Photosan bei NHDF-Zellen 46

6.3 Toxizität von Photosan gegenüber NHDF-Zellen nach Bestrahlung 50

6.3.1 Inkubationsdauer 5 Minuten 50
6.3.2 Inkubationsdauer 15 Minuten 52

6.3.3 Inkubationsdauer 90 Minuten 54
6.3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse der Phototoxizitätstest mit NHDF-Zellen 56

6.4 Toxizität von Photosan gegenüber *ex vivo* Gingivagewebe (Schwein) mit und ohne Bestrahlung 57

6.4.1 HE-Färbung – *Ex vivo* Gingiva – Modell (Schwein) 57
6.4.2 Nachweis von Apoptose mit dem *In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein und Tunel POD* 58
6.4.3 Nachweis von Apoptose mit dem *Fluorescein FragEL ™ DNA Fragmentation Detection Kit* 59

7 Diskussion 68

7.1 Kultivierungsmethode primärer humaner Gingivafibroblasten 68

7.2 Zelluläre Aufnahme und Lokalisation 68

7.3 Phototoxizitätsversuche 69

7.3.1 Photosensibilisatoren 70
7.3.2 Lichtquelle 72
7.3.3 Toxizität von Photosan gegenüber NHDF-Zellen nach Bestrahlung 72
7.3.4 *Ex vivo* Gingiva - Modell (Schwein) 73
7.3.5 Nachweis der Apoptose 75
7.3.6 Toxizität von Photosan gegenüber *ex vivo* Gingivagewebe (Schwein) nach Bestrahlung 75

7.4 Anwendung der PDT in der Mundhöhle mit dem Helbo-System 76

8 Zusammenfassung 79

9 Abkürzungsverzeichnis 81

10 Literaturverzeichnis 83

11 Danksagung 91

12 Lebenslauf 92

In liebevoller Erinnerung an meinen Vater

1 Einleitung

Die Mundhöhle eines Menschen wird von einer sehr großen Anzahl verschiedener Bakterien (mindestens 1000 verschiedene Spezies) besiedelt, die im Allgemeinen als „normale orale Mikroflora“ bezeichnet werden [36, 48, 82]. Während der größte Anteil dieser Mikroflora harmlos ist, wurden einige Bakterien davon als Ursache für eine Reihe verschiedener Erkrankungen innerhalb und außerhalb der Mundhöhle erkannt. Diese Erkrankungen unterteilen sich in solche wie Karies und Parodontitis, die sehr oft auftreten oder jene wie eine infektiöse Endokarditits oder Pneumonie, die seltener auftreten, aber lebensbedrohlich verlaufen können [67].

Eine Besonderheit der Mundhöhle ist, dass sich viele unterschiedliche Bakterien zu einem Biofilm, der sog. „Plaque“, auf der Zahnoberfläche zusammenschließen können [105]. Eine Ansammlung dieser Plaque über einen längeren Zeitraum hinweg verursacht bakteriell induzierte Erkrankungen wie Karies und Parodontitis. Parodontitis ist inzwischen die am häufigsten auftretende infektiöse Erkrankung des Menschen. 52,7% der 35 bis 44-jährigen leiden unter einer mittelschweren (CPI-Index Grad 3) Form der Parodontitis, 20,5% unter einer schweren Form (CPI-Index Grad 4) der Erkrankung. In der Gruppe der über 65-jährigen sind 48% von einer mittelschweren und 39,8% von einer schweren Ausprägung der Krankheit betroffen [13]. Die Bandbreite einer parodontalen Erkrankung reicht von der initialen Phase einer akuten Gingivitis über die fortgeschrittene Läsion mit Knochenabbau und Ausbildung einer parodontalen Tasche bis zum letztendlichen Zahnverlust. Die Behandlung dieser Erkrankung erfordert die möglichst weitgehende Entfernung aller parodontopathogenen Keime aus der parodontalen Tasche. Dabei werden sowohl die Konkremente mechanisch entfernt als auch die „floating plaque“ durch ausgedehntes Spülen der parodontalen Tasche ausgewaschen [42]. Jedoch ist eine effiziente Entfernung aller schädigenden Keime aus allen Geweben des Zahnhalteapparates oftmals nur in Verbindung mit einer antibiotischen Behandlung bzw. durch den unterstützenden Einsatz von Antiseptika wie Chlohexidinglukonat möglich. Da eine therapeutisch wirksame Konzentration dieser Substanzen in der Mundhöhle meist schwer zu erzielen ist, bzw. der Nutzen dieser Substanzen durch Resistenzentwicklung bei den Bakterien oder Schädigung des gesunden Gewebes fraglich ist, besteht eine Notwendigkeit zur Entwicklung neuer antibakterieller Strategien in der Behandlung von Parodontitis.

Als „neues“ innovatives Verfahren ist die bereits Anfang des 20. Jahrhunderts entdeckte photodynamische Inaktivierung von Bakterien zu nennen. Dabei werden pathogene Bakterien mit Hilfe eines Farbstoffes angefärbt und durch Bestrahlung mit Licht geeigneter Wellenlänge in Anwesenheit von Sauerstoff abgetötet. Die Vorteile dieser Methode liegen darin, dass die Bakterien in sehr kurzer Zeit (Sekunden oder Minuten) abgetötet werden können und eine Resistenzentwicklung in der Zielzelle sehr unwahrscheinlich ist [106]. Ein wichtiger Punkt hierbei ist es jedoch, ein therapeutisches Fenster zu finden und Bedingungen wie Inkubationsdauer, Lichtdosis und Konzentration des Photosensibilisators (PS) zu definieren, bei denen die assoziierten Bakterien erfolgreich abgetötet werden, gleichzeitig aber eine Schädigung des umliegenden gesunden Gewebes vermieden wird.

2 Literaturübersicht

2.1 Geschichte und Definition der photodynamischen Therapie

Bereits Anfang des letzten Jahrhunderts wurden erste Erkenntnisse über photodynamische Reaktionen gegenüber Prokaryonten und Eukaryonten gewonnen. Im Jahre 1900 legte der Medizinstudent RAAB [77] den Grundstein für die wissenschaftliche Untersuchung photodynamischer Erscheinungen. Im Rahmen seiner Dissertation am pharmakologischen Institut der Königlichen Universität zu München konnte er zeigen, dass die Toxizität von Acridinhydrochlorid gegenüber Pantoffeltierchen (*Paramecium caudatum*) von der Lichtintensität abhängig war, mit welcher die Probenansätze belichtet wurden. Obwohl der genaue Wirkmechanismus damals noch unbekannt war, führten sein Doktorvater, v. TAPPEINER und JESIONEK [98] im Jahr 1903 erste Behandlungsversuche am Menschen mit Eosin als photoaktiver Substanz bei Hautkrebs, Tuberkulose und Syphilis durch. Später konnten v. TAPPEINER und JODLBAUER [99] zeigen, dass die toxischen Effekte durch Bestrahlung nicht auf eine Wärmeentwicklung zurückzuführen waren, sondern auf sauerstoffabhängige Prozesse. Dafür formulierten sie im Jahr 1904 erstmals den Begriff „photodynamische Reaktion“. Unter Photodynamischer Therapie (PDT) versteht man die Beeinflussung von Zellen durch Licht unter Verwendung eines Photosensibilisators in Gegenwart von Sauerstoff. Die Rolle des Photosensibilisators besteht in der Übertragung der Lichtenergie auf Sauerstoff. Durch die Energiezufuhr wird der molekulare Sauerstoff zu toxischem Singulett-Sauerstoff angeregt. Diese Sauerstoff-Spezies oxidiert die unmittelbare Umgebung und induziert dadurch apoptotische bzw. nekrotische Prozesse, die ein Absterben der Zielzellen bewirken [41, 76].

2.2 Photosensibilisatoren

Porphyrine sind bereits seit Mitte des 19. Jahrhunderts bekannt. Das Hämatoporphyrin, ein eisenfreier Hämoglobinabkömmling, wurde erstmalig durch SCHERER [81] 1841 bei Blutuntersuchungen entdeckt, allerdings erst 1871 durch HOPPE-SEYLER [40] als solches benannt. HAUSMANN [34] am Physiologischen Institut der Hochschule für Bodenkultur in Wien übertrug seine Erfahrungen mit fluoreszierenden Blattfarbstoffen auf das Hämatoporphyrin. Durch experimentelle Untersuchungen im Jahr 1911 entdeckte

HAUSMANN [34] die sensibilisierende[1] Wirkung des Hämatoporphyrins in Kombination mit Licht, welches 1955 von SCHWARTZ et al. [83] als vielfältiges Gemisch therapeutisch wirksamer sowie unwirksamer Porphyrine identifiziert wurde. Daraufhin synthetisierten SCHWARTZ et al. [83] ein Gemisch mit einem höheren Anteil an hydrophoben, oligomeren Porphyrinen, das sie als Hämatoporphyrinderivat (HpD) bezeichneten und das eine höhere Wirksamkeit und Tumorspezifität aufwies. Dies bestätigten LIPSON et al. [55] in den 60er Jahren und publizierten 1967 erstmals Daten über den Nutzen von HpD. So wurde HpD als ein geeignetes Mittel für den Nachweis und für die Behandlung von Krebs, v. a. im Halsbereich, in der Speiseröhre sowie im Mastdarm und anderen Regionen bezeichnet. In den 70er Jahren behandelten DOUGHTERY et al. [24] erstmals mittels photodynamischer Therapie Patienten mit Karzinomen verschiedener Lokalisationen (wie z.B. Brust, Darm und Prostata) und anderen Geschwulsten erfolgreich. Seither hat eine Vielzahl klinischer Untersuchungen die Wirksamkeit der photodynamischen Therapie mit Hämatoporphyrinderivat und weiterentwickelten Präparaten wie dem Photofrin II oder dem Photosan-3 belegt [23, 29, 104]. Das Oligomerengemisch Photofrin wurde 1995 für die klinische PDT bei verschiedenen onkologischen Indikationen wie z.B. der Behandlung von Blasentumoren, Tumoren in der Lunge oder im Kopf- und Halsbereich zugelassen [23]. Photosan, im Gegensatz zu Photofrin ein angereichertes Oligomerengemisch ohne Monomere, ist seit 2002 in der Europäischen Union als Medizinprodukt für die photodynamische Therapie u.a. bei Basaliomen, Plattenepithelkarzinomen der Haut, der Mundhöhle oder des Larynx sowie bei Karzinomen des Ösophagus zugelassen [84].

2.3 Wirkmechanismus der photodynamischen Therapie

Bei der PDT wird zunächst ein nichttoxischer Photosensibilisator appliziert, der bei Bestrahlung mit Licht einer bestimmten Wellenlänge im Organismus seine zytotoxische Wirkung entfaltet **(Abb. 1)**. Durch die Lichteinwirkung geht der Photosensibilisator durch Aufnahme eines Photons von seinem Grundzustand (S_o) in den angeregten Singulettzustand S_1 über. Die so aufgenommene Energie kann nun durch Übergang des angeregten Photosensibilisators vom Singulettzustand wieder in seinen Grundzustand entweder in Form von Wärme oder als Fluoreszenzstrahlung abgegeben werden, oder er geht nicht

[1] Der Farbstoff muss sich an den Bakterien anlagern oder von den Bakterien aufgenommen werden.

strahlungsemittierend in den langlebigeren Triplettzustand T_1 über [51]. Durch die höhere Stabilität dieses Triplettzustandes wird somit ein Energietransfer auf andere Moleküle wahrscheinlicher.

Von Bedeutung für die zytotoxische Wirkung der PDT sind die photooxidativen Reaktionen vom Typ I und II, bei denen das Vorhandensein von Sauerstoff notwendig ist sowie vom Typ III, der keinen Sauerstoff benötigt [85]. Bei der photooxidativen Reaktion vom Typ I kommt es zur Reduktion von Sauerstoff unter Bildung von Superoxidradikalen. Hierbei sind als Ursache der Zellschädigung Redoxreaktionen und Radikalketten-reaktionen, die durch Elektronentransfer ausgelöst werden, anzusehen [37]. Bei der phototoxischen Reaktion vom Typ II findet ein Elektronentransfer vom Triplett-Zustand des PS auf Sauerstoff statt. Dies führt zur elektronischen Anregung vom Sauerstoff im Grundzustand ($O_2(^3\Sigma_g^-)$, Triplett-Zustand) in den niedrigsten Singulett-$^1\Delta_g$-Zustand. Dieser hochreaktive Singulett-$^1\Delta_g$-Zustand wird auch als Singulett-Sauerstoff $^1O_2$ bezeichnet, der daraufhin mit dem Gewebe in seiner unmittelbaren Umgebung reagiert und Aminosäuren, Nukleinsäuren, ungesättigte Fette und Fettsäuren oxidiert [68]. Die Reaktion vom Typ III findet in hypoxischen bzw. anoxischen Arealen statt. Der angeregte Photosensibilisator gibt Elektronen ab, die direkt mit Proteinen reagieren können und so deren Struktur und Funktion beeinflussen [51]. Typ I-, Typ II- und Typ III-Reaktionen laufen während der PDT nebeneinander ab, wobei das Verhältnis dieser Reaktionen zueinander stark vom Photosensibilisator, vom Gewebe, vom Redoxpotential zwischen PS und zu oxidierender Zielstruktur, vom Sauerstoffpartialdruck sowie von der Konzentration der photoaktiven Substanz im Gewebe abhängt [33, 60]. Vieles deutet jedoch bei der Verwendung von Porphyrinen darauf hin, dass die Produktion von Singulett-Sauerstoff im Rahmen der Typ II-Reaktion hauptverantwortlich für die Zytotoxizität der PDT ist [68].

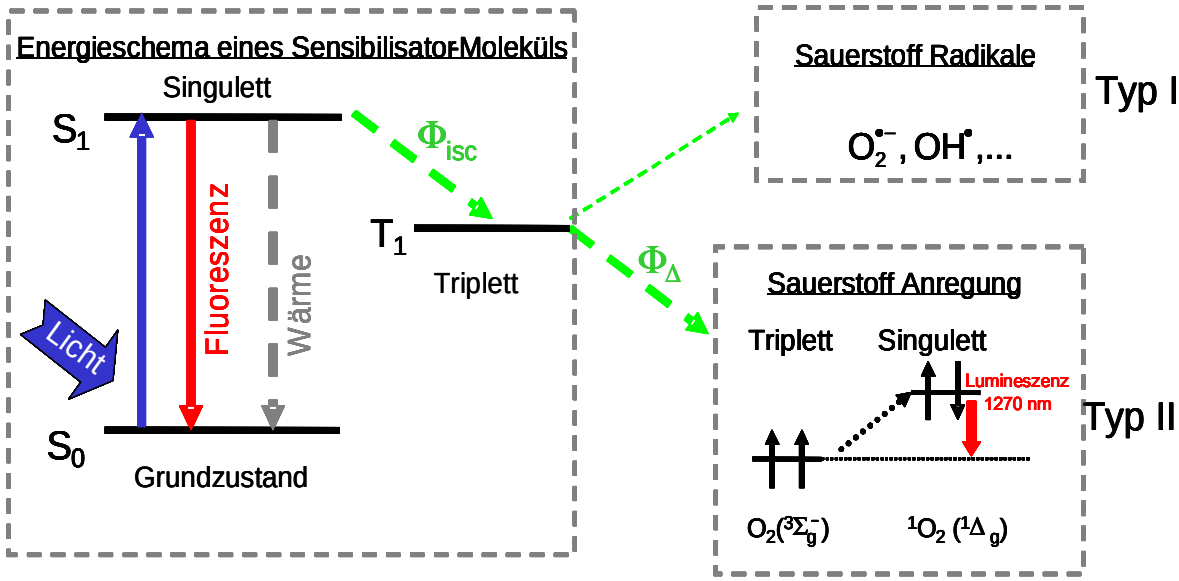


Abb. 1: Energieschema zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies

Der erste Schritt bei allen photosensibilisierenden Reaktionen besteht in der Absorption von Licht durch einen Photosensibilisator. Dadurch gelangt dieser vom Grundzustand S_0 in einen angeregten Zustand, bei dem es sich meist um den S_1-Zustand handelt. Dieser angeregte Singulett-Zustand ist jedoch sehr kurzlebig, wobei die Energie entweder als Wärme oder als Fluoreszenzlicht abgegeben wird. Zusätzlich ist vom S_1-Zustand eine Relaxation über sog. Interkombination (Intersystem Crossing, ISC) in einen Triplett-Zustand möglich (Φ_{ISC}). Dabei handelt es sich im Allgemeinen um den T_1-Zustand, der eine wesentlich längere Lebensdauer hat als der S_1-Zustand. Die nun ablaufenden photochemischen Reaktionen lassen sich in zwei Gruppen einteilen. Bei der sog. photodynamischen Reaktion vom Typ I handelt es sich um eine Reaktion zwischen einem angeregten Photosensibilisator im T_1-Zustand und einem Substratmolekül, bei welcher ein Elektron oder ein Wasserstoffatom übertragen wird. Die Radikale, welche aus den primären Typ I-Prozessen entstehen, können anschließend verschiedene Reaktionen eingehen. Typischerweise entstehen dabei z. B. das Superoxidanion ($O_2^{\cdot-}$) oder das Hydroxylradikal ($OH^{\cdot}$). Bei der photodynamischen Reaktion vom Typ II ist die Anwesenheit von Sauerstoff zwingend erforderlich und es findet lediglich ein direkter Energieübertrag vom angeregten Photosensibilisatormolekül auf Sauerstoff statt. Dies führt zum einen zur Relaxation des Sensibilisators aus dem T_1- in den S_0-Zustand, zum anderen aber auch zur elektronischen Anregung von Sauerstoff im Grundzustand ($O_2(^3\Sigma_g^-)$, Triplett-Zustand) in den niedrigsten Singulett-$^1\Delta_g$-Zustand. Dieser hochreaktive Singulett-$^1\Delta_g$-Zustand wird auch als Singulett-Sauerstoff ($^1O_2$) bezeichnet. Dieser gibt nun hauptsächlich seine Energie durch Relaxation ab. Die entstehende Lumineszenzleistung bei 1270 nm wird als Nachweismethode für Singulett-Sauerstoff verwendet [58].

Aufgrund des eher lipophilen Charakters vieler Photosensibilisatoren lokalisieren diese vorwiegend in zellulären Membranen aus Lipid-Doppelschichten. Dadurch entstehen durch Bestrahlung oxidative Schäden an Fettsäuren der Lipid-Doppelschicht oder der darin enthaltenen Proteine. Es entstehen Lipidhydroperoxide, denaturierte Proteine oder neue Protein-Protein-Vernetzungen, die ihrerseits eine weitere Schädigung der Zelle oder funktionelle Beeinträchtigungen verursachen können [33].

2.4 Anwendungsgebiete der photodynamischen Therapie

Die photodynamische Therapie an sich ist ein etabliertes Verfahren in der Dermatologie zur Behandlung von verschiedenen Tumoren, wie z.B. dem semimalignen oberflächlichen Basalzellkarzinom oder von Präkanzerosen wie der aktinischen Keratose [12]. Darüber hinaus wird das Indikationsspektrum der PDT auch auf nicht-onkologische Erkrankungen ausgeweitet [23, 54]. In diesem Zusammenhang stößt die Anwendung der PDT bei der Behandlung von infektiösen Erkrankungen auf zunehmendes Interesse [18, 43, 44, 47, 65, 80, 86, 106].

2.5 Bakterielle Erkrankungen in der Zahnheilkunde und Problematik der bestehenden Therapieverfahren

In der Zahnheilkunde handelt es sich bei pathologischen Veränderungen der Hartgewebe, der Pulpa sowie des Zahnhalteapparates vorwiegend um bakteriell induzierte Erkrankungen. So werden bei der Entstehung von Karies u.a. *Streptococcus mutans* und *Laktobacillus sp.* als Leitkeime diskutiert [97]. Ziel einer effizienten Therapie ist hier die vollständige Entfernung aller relevanten Keime aus den Zahnhartsubstanzen durch mechanische Exkavation mittels Handinstrumenten oder rotierender Instrumente. Jedoch kann eine ausreichende Reduktion aller Bakterien nicht gewährleistet und damit ein erneutes Auftreten von Sekundärkaries nicht immer vermieden werden. Oftmals ist auch eine Eröffnung der Pulpa mit anschließender endodontischer Behandlung nicht auszuschließen, da gerade in tieferen, pulpanahen Bereichen eine Unterscheidung zwischen infiziertem und nicht-infiziertem Dentin nur schwer möglich ist. Auch hier werden Misserfolge Keimen wie z.B. *Escherichia coli*, *Streptococcus intermedius*, *Enterococcus faecalis* und *Porphyromas gingivalis* zugrunde gelegt.

Als Leitkeime in der Parodontologie hingegen stehen *Actinobacillus actinomycetem-comitans* sowie *Porphyromonas gingivalis* im Vordergrund [39, 102]. Oberstes Ziel einer geeigneten Therapie ist die effiziente Entfernung aller parodontopathogenen Keime aus der parodontalen Tasche. Dabei werden sowohl die Konkremente mit Hilfe von Hand-instrumenten, Schallscalern oder Lasern entfernt als auch die „floating plaque“ durch ausgedehntes Spülen der parodontalen Tasche [42]. Jedoch ist auch hier eine effiziente Entfernung aller schädigenden Keime aus allen Geweben des Zahnhalteapparates nicht gesichert.

Als zusätzliche Maßnahmen werden daher neben dem Einsatz von Antibiotika die Anwendung von Antiseptika und Desinfektionsmittel wie Chlorhexidinglukonat (CHX) propagiert, um den Erfolg der mechanischen Therapiekonzepte zu optimieren [9, 31, 72]. Chlorhexidin wurde im Jahr 1954 eingeführt und ist ein weit verbreitetes und das am meisten gebräuchliche Antiseptikum und Desinfektionsmittel [49]. Es handelt sich hierbei um ein synthetisch hergestelltes kationisches bis-Biguanid [49]. CHX wirkt antibakteriell und hemmt in den im klinischen Einsatz üblichen Konzentrationen von max. 0,2% die Plaquebildung. Es wirkt bakteriostatisch und bakterizid gegen grampositive Bakterien, in höheren Dosierungen auch bakterizid gegen gramnegative Bakterien. Es besitzt weiterhin eine hohe Substantivität. Durch die elektrostatische Bindung der kationischen Gruppen an die negativ geladenen Oberflächen von Zähnen, Gingiva, Mukosa sowie Plaque überdauert die Wirkung von CHX die Spülzeit und bildet ein „Reservoir“ [35].

Obwohl Chlorhexidin bis heute als sog. Goldstandard zur Mundhöhlenantiseptik und Plaquehemmung eingesetzt wird, sind einige Risiken zu beachten. So wirkt Chlorhexidin unter anderem mutagen, besitzt eine neurotoxischen Potenz und kann bereits nach 14-tägiger Anwendung tierexperimentell reversible prämaligne Alterationen in der Mundhöhle induzieren [88]. Deshalb wird die Auffassung vertreten, dass eine Anwendung von Chlorhexidin in der Mundhöhle nicht länger als zwei Wochen erfolgen sollte [88].

Hinzu kommt die Möglichkeit allergischer und anaphylaktischer Reaktionen gegenüber Chlorhexidin [5]. Es wird von verschiedenen Überempfindlichkeiten berichtet, meist verzögerte Reaktionen wie Kontaktdermatitis oder Lichtempfindlichkeiten [49, 109]. Aber auch eine zunehmende Anzahl von Reaktionen vom Soforttyp wie Kontakturtikaria, beruflich bedingtes Asthma oder anaphylaktische Schocks sind dokumentiert [6, 30, 49, 69, 71, 73, 95, 101]. Seit dem Jahr 1983 ist das potenzielle Risiko anaphylaktischer Reaktionen hinsichtlich der Anwendung von Chlorhexidin wohlbekannt, vor allem

bezogen auf die Applikation auf Schleimhäute. So wurde 1984 vom japanischen Gesundheitsminister empfohlen, den Gebrauch von Chlorhexidin auf Schleimhäuten zu vermeiden [49]. Nur der Einsatz von 0,05%-igem CHX in der Wunddesinfektion bzw. auf intakter Haut scheint soweit sicher zu sein [49].

Lokale Nebenwirkungen wie Desquamation von Epithelzellen der Schleimhaut, Geschmacksirritationen sowie gelbbraune Verfärbungen von Zähnen, Füllungen und Zunge sind zusätzliche limitierende Faktoren [49]. So kam eine klinische Doppelblindstudie mit zwei verschiedenen Testgruppen zu dem Ergebnis, dass das Spülen in der ersten Testgruppe mit 0,2%-igem CHX ohne Alkohol über eine Woche hinweg zu wesentlich mehr Irritationen der oralen Schleimhaut, zu einem stärkerem Gefühl des Brennens auf der Schleimhaut und zu veränderten Geschmacksempfindungen führte als das Spülen mit einem Placebo in der zweiten Gruppe [32]. Eine andere Doppelblindstudie mit zwei Testgruppen untersuchte die Nebenwirkungen und Patientenakzeptanz von Chlorhexidinspülungen hinsichtlich der Konzentrationen von 0,2% oder 0,1%. Bis auf die bessere Akzeptanz des Geschmackes von CHX 0,1% wurde kein statistisch signifikanter Unterschied in den beiden Gruppen hinsichtlich der Häufigkeit geäußerter Nebenwirkungen festgestellt. So wird in dieser Studie der Einsatz von 0,1%-igem Chlorhexidin empfohlen [38].

Auch wies eine Studie, deren Ziel die Untersuchung der Genotoxizität von Chlorhexidindiglukonat im peripheren Rattenblut und in Zellen der oralen Mukosa war, eine signifikante Zunahme von primärer DNA-Schädigung in Leukozyten und oralen Mukosazellen nach, die zweimal täglich für acht Tage mit 0,12%-igem Chlorhexidinglukonat behandelt wurden [79]. MARIOTTI und RUMPF [62] zeigten, dass CHX für eine dosisabhängige Reduktion der zellulären Proliferation von humanen Gingivafibroblasten verantwortlich ist. Auch konnten sie demonstrieren, dass Konzentrationen von Chlorhexidin (1 µM), die nur einen sehr geringen Einfluss auf die Proliferation haben, dennoch signifikant die Produktion sowohl von Kollagen-Proteinen (Reduktion um 65%) als auch von nicht-Kollagen Proteinen (Reduktion um 57%) der humanen Gingivafibroblasten reduzieren können. Das Fazit dieser Studie war, dass kommerziell erhältliche Konzentrationen von CHX, respektive 0,12% bzw. verdünnt mit einer Konzentration geringer als 0,00009%, Gingivafibroblasten toxisch belasten können und daher womöglich die Wundheilung negativ beeinflussen.

Des Weiteren wurde berichtet, dass Chlorhexidin in höchstem Maße zytotoxisch gegenüber oralen humanen Fibroblasten sowie Fibroblasten der Haut *in vitro* ist, dass aber

die verschiedenen Funktionen einer Zelle wie Proliferation und Proteinsynthese unterschiedlich beeinflusst werden, je nach Konzentration der verwendeten Lösung. So zeigte eine 0,002%-ige CHX-Lösung zwar minimale Zytotoxizität, unterdrückte die Zellteilung aber beinahe vollständig. Auch die Kollagen-Gel-Kontraktion als ein Modell für die Wundkontraktion wurde von allen verwendeten Konzentrationen (0,002%, 0,005%, 0,12%) vielseitig beeinflusst. Die Proteinsynthese z. B. wurde von 0,005%- und 0,12%-igem CHX um 30 bis 50% reduziert, von 0,002%-igem CHX hingegen nicht signifikant [75].

In einer anderen Studie wurde der *in vitro* Effekt niedriger CHX-Konzentrationen auf die Proliferation von primären humanen Gingivafibroblasten untersucht. Die Zellen wurden 24 Stunden lang bei 37°C Konzentrationen von 0,07 bis 40 µM (entspricht 3,5 x 10^{-6} bis 0,002%) ausgesetzt. Bei Konzentrationen bis zu 5 µM (0,00025%) wurden keine signifikanten Effekte auf das Wachstum festgestellt. Hingegen bei Konzentrationen von 10 und 20 µM (0,0005 und 0,001%) wurde das Zellwachstum im Vergleich zu Kontrollzellen um 75% reduziert [20].

Die Auswirkung einer Behandlung von Wurzeloberflächen mit Chlorhexidin auf die Haftung humaner gingivaler Fibroblasten im Rahmen einer parodontalen Behandlung wurde in einer weiteren *in vitro* - Studie untersucht. Hier wurden impaktierte Weisheitszähne in vier Stücke geteilt, für drei Minuten mit 0,12%-igem CHX in Kontakt gebracht, mit destilliertem Wasser abgewaschen und anschließend mit humanen gingivalen Fibroblasten unter Verwendung gängiger Zellkulturverfahren inkubiert. Im Vergleich zu den Kontrollgruppen gab es einen signifikanten Unterschied hinsichtlich der Anzahl der anhaftenden Zellen. Der Kontakt der Wurzeloberflächen mit Chlorhexidin verhindert eine spätere Anhaftung der Fibroblasten, was eine Regeneration des Parodontiums zu verhindern mag. So rät diese Studie dazu, einen Kontakt von CHX mit Wurzeloberflächen durch physikalische Barrieren zu vermeiden [1].

CLINE und LAYMAN [15] hingegen fanden heraus, dass die Haftung parodontaler Ligamentzellen an der Wurzeloberfläche nach einer 15-minütigen Behandlung mit 0,12% CHX nicht wesentlich beeinflusst wird, zum anderen aber die Zellmorphologie bei Konzentrationen von 0,2 bis 2,0% stark verändert wird. So hatten die Zellen bei 0,2% ein rundliches Aussehen, bei 2% waren sie gequollen, das Zytoplasma schien aus der Zelle ausgetreten zu sein. Außerdem erzeugte eine direkte Exposition von humanen gingivalen Fibroblasten mit 0,01%-igem CHX (100 µg/ml) eine Reduktion von inkorporiertem 3H-

Thymidin, das als selektiver Marker für die DNA-Synthese verwendet wird, um 92%.
In einem weiteren Experiment wurden die zytotoxischen Effekte von Chlorhexidin, Wasserstoffperoxid und Natriumhypochlorid auf kultivierte humane Fibroblasten sowie basale Keratinozyten getestet. Konzentrationen, in denen diese Antiseptika für gewöhnlich eingesetzt werden, erzeugten alle eine Zellsterblichkeit von 100%. Dieses Ergebnis zeigte, dass sowohl Fibroblasten als auch Keratinozyten als Zellen, die maßgeblich an der Wundheilung beteiligt sind, gleich empfindlich gegenüber diesen Antiseptika reagieren, wobei Chlorhexidin noch das am wenigsten toxische Agens ist, Natriumhypochlorid das am meisten toxische [100]. Auch DAMOUR et al. [16, 28] bestätigten einen zytotoxischen Effekt u.a. von CHX bei therapeutischen Konzentrationen gegenüber humanen Fibroblasten und Keratinozyten.
Außerdem scheint eine intensive Behandlung mit CHX-Gel, die kombiniert wird mit sorgfältigsten Mundhygienemaßnahmen, womöglich toxische Effekte an der Oberfläche von Gingiva und Mukosa zu induzieren. So wurde 12 Patienten 2 Wochen lang je 10 Minuten am Tag ein gebräuchliches CHX-Gel auf die Schleimhaut des Unterkiefers appliziert. Auf einer Seite des Unterkiefers wurde zusätzlich effektive Mundhygiene betrieben. 8 Patienten entwickelten weißliche Flecken, die nach dem Ablösen ulzerierende Areale hinterließen, aber nur dort, wo beides kombiniert wurde [2].
Die geschilderte Problematik vielseitiger Schädigungen und Irritationen des gesunden Gewebes durch den Einsatz von Antiseptika wie Chlorhexidin als Adjuvans zur mechanischen Therapie zeigt die Notwendigkeit zur Entwicklung neuer Therapiekonzepte in der unterstützenden Behandlung von Parodontitis und Karies. Als mögliches Verfahren ist die photodynamische Inaktivierung der Bakterien mit Hilfe eines Photosensibilisators nach Bestrahlung zu nennen.

3 Fragestellung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, die Toxizität des Photosensibilisators Photosan auf eukaryontische Zellen der Mundhöhle nach Bestrahlung zu untersuchen.

Die Herausforderung in der antibakteriellen photodynamischen Therapie im Bereich der Mundhöhle stellt die Suche nach einem geeigneten therapeutischen Fenster dar. So müssen Bedingungen wie Inkubationsdauer, Lichtdosis (mW/cm^2) und Konzentrationen des verwendeten PS definiert werden, bei denen die pathogenen Bakterien abgetötet werden, möglichst ohne dem umliegenden gesunden Gewebe zu schaden.

Es soll ein geeignetes Zellkulturverfahren zur Kultivierung von primären humanen Gingivafibroblasten etabliert werden, um die Versuche zur Bestimmung der Phototoxizität mit diesem Zelltyp durchführen zu können.

Zusätzlich sollen Versuche zur Lokalisation des Farbstoffes in NHDF-Zellen und *ex vivo* Gingivagewebe (Schwein) mittels Fluoreszenzmikroskopie durchgeführt und die zelluläre Aufnahme von Photosan in NHDF-Zellen mit Hilfe des Spektralphotometers bestimmt werden.

Zudem soll die Toxizität von Photosan gegenüber NHDF-Zellen bzw. *ex vivo* Gingivagewebe (Schwein) nach Bestrahlung *in vitro* bestimmt werden.

4 Material

4.1 Biologisches Material / Zellen

4.1.1 Neonatale humane dermale Fibroblasten (NHDF)

Cryopreserved Cells CC-2509 von Clonetics® (St. Katharinen, Deutschland)
Alter: neugeboren, Geschlecht: männlich
Anlieferung: tief gefroren in Passage 2

4.1.2 Gingivafibroblasten humaner Gingiva (primär)

Die frischen Patientenisolate (Gewebegröße: ½ cm^2) wurden am Universitätsklinikum Regensburg gewonnen und freundlicherweise vom OP-Team der MKG-Chirurgie zur Verfügung gestellt. Eingewickelt in eine sterile Gaze wurden sie übergeben und innerhalb 1 Stunde weiterverarbeitet.

4.1.3 Gingiva isoliert vom Schwein

Rasse: Hausschwein
Alter*:* 6 Monate
Lokalisation: bukkal
Größe: ca. 3cm x 1cm
Die Schweinekieferhälften, die in der ersten Versuchsreihe verwendet wurden, waren zum Zeitpunkt der Verarbeitung bereits ca. 6 Stunden alt. Für die weiteren Versuchsreihen wurden Schweinekieferhälften aus einer anderen Metzgerei bezogen, die frisch geschlachtet zu Versuchsbeginn maximal 2 Stunden alt waren.

4.2 Photosensibilisator und Nachweisfarbstoffe

4.2.1 Photosan

Photosan (Seehof-Laboratorium GmbH, Wesselburenerkoog, Deutschland) ist ein für die klinische PDT bei verschiedenen onkologischen Indikationen zugelassenes Medizinprodukt [84]. Es handelt sich um ein aufgereinigtes Haematoporphyrin-Equivalent als Poly-Haematoporphyrin, das als vorwiegend photosensibilisierend wirkende Komponente oligomere Verbindungen mit überwiegend Esterbindungen enthält. Hämatoporphyrin ist

ein proteinfreies Hämodialysat aus Wirbeltierblut. Es ist ein künstliches Abbauprodukt des Hämoglobins, Hämins oder Hämatins und eisenfrei. Das Molekulargewicht von Hämatoporphyrin beträgt 598,69 g/mol (Monomer).

Abbildung 2 zeigt die Strukturformel von Hämatoporphyrin IX, **Abbildung 3** zeigt die Strukturformel von Photosan.

Das Absorptionsmaximum von Photosan liegt bei ca. 400 nm (Soretbande), im Bereich von 500-630 nm liegen die vier Q-Banden von Photosan **(Abb. 4)**.

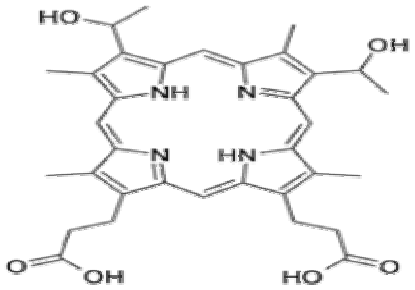


Abb. 2: Hämatoporphyrin IX

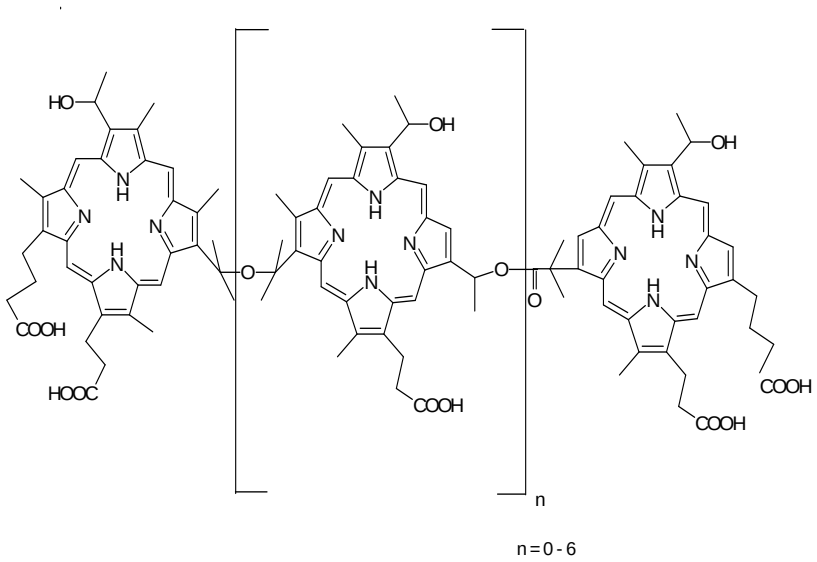


Abb. 3: Photosan

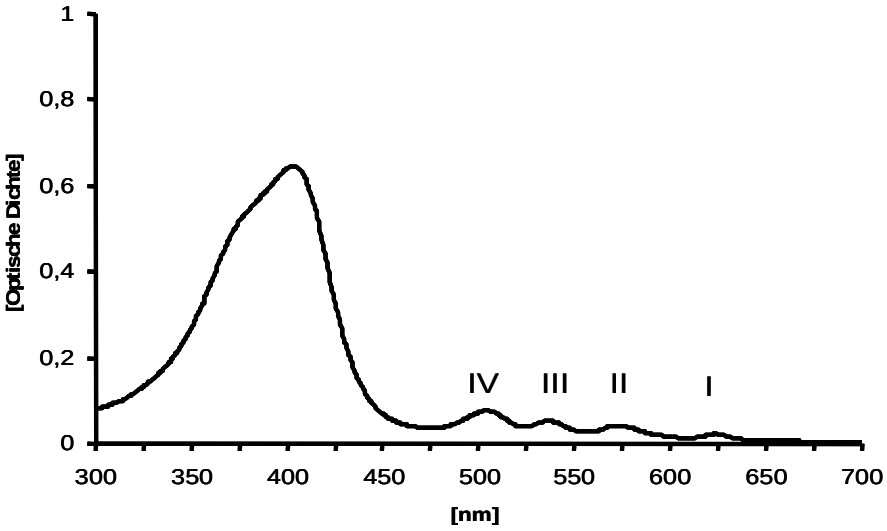


Abb.4: Absorptionskoeffizient von 5 µg Photosan in H_20 in Abhängigkeit von der Wellenlänge. Die Hauptbande ist die Soretbande, IV-I kennzeichnen die vier Q-Banden von Photosan. Siehe [107].

4.2.2 Lyso Tracker® Green DND-26

Der azidophile Farbstoff Lyso Tracker® Green DND-26 **(Abb. 5)**, Molecular Probes (Eugene, OR, USA), ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der in sauren Kompartimenten der Zelle akkumuliert und daher zum Anfärben von lysosomalen und endosomalen Bereichen verwendet wird.

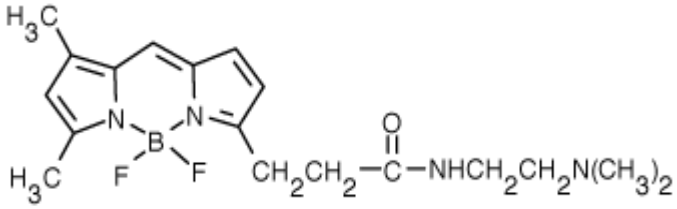


Abb. 5: Strukturformel Lyso Tracker® Green DND-26

4.2.3 Rhodamin 6G

Der Farbstoff Rhodamin 6G **(Abb. 6)** (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) ist ein

Fluoreszenzfarbstoff, der zur Darstellung von Mitochondrien verwendet wird.

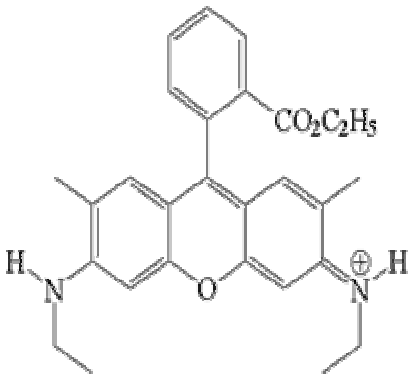


Abb. 6: Strukturformel von Rhodamin 6G

4.2.4 Höchst 33342

Der Farbstoff Höchst 33342 **(Abb. 7)**, Molecular Probes (Eugene, OR, USA), ist ein Fluoreszenzfarbstoff, mit dessen Hilfe Nukleinsäuren nachgewiesen werden können.

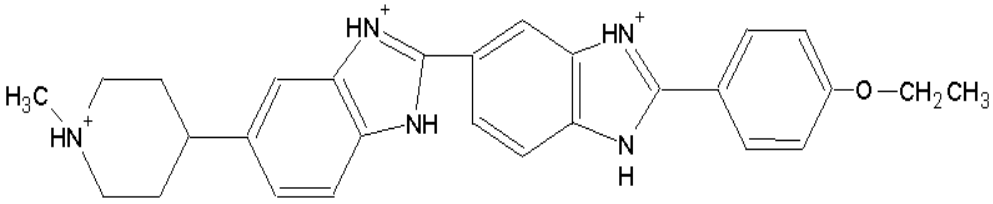


Abb. 7: Strukturformel von Höchst 33342

4.3 Reagenzien, Puffer und Antibiotika

4.3.1 Reagenzien

Trypsin/EDTA 1×konzentriert; 1:10 in PBS verdünnt; 0,05% Trypsin und 0,53 mM EDTA (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland)

MTT-Reagenz (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid) (5 mg/ml in PBS) (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland)

SDS Sodiumdodecylsulfat 20% in H_2O (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland)

Formalin als 4%-ige Lösung (Merck, Darmstadt, Deutschland)

BSA Rinderserumalbumin Fraktion V als 10%-ige Lösung (Biomol, Hamburg, Deutschland)

DNAseI Grad I 1 mg/ml in 50 mM TRIS-HCl (pH 7,5), enthält 1 mM $MgCl_2$, 1 mg/ml BSA (Roche, Penzberg ,Deutschland)

In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein 25 µl TUNEL-Enzyme (TdT Enzym = Terminale Deoxynukleotidyl Transferase) + 475 µl Labeling Reagent; Verd. 1:20 (Roche, Penzberg, Deutschland)

TUNEL-POD Konverter POD: Anti–Fluorescein–AK, Fab Fragment vom Schaf, konjugiert mit Peroxidase (POD) (Roche, Penzberg, Deutschland)

AEC-Chromogen-Substrat gebrauchsfertig (ZytoMed Systems, Berlin, Deutschland)

Triton X-100 als 1%-ige Lösung (200 µl Triton X-100 + 19,8 ml PBS) (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland)

Fluorescein FragEL ™ DNA Fragmentation Detection Kit (Calbiochem®, USA)

- Proteinkinase K: 2 mg/ml Proteinase K in 10 mM Tris, pH 8
- 5×TdT Äquilibrierungspuffer
- Fluorescein FragEL ™ Labeling Reaction Mix
- TdT Enzym (Terminale Deoxynukleotidyl Transferase)
- Mounting Medium (die darin enthaltenen 4,6,-DiAmidino-2-PhenylIndole (DAPI) erlauben bei einer Wellenlänge von 330-380 nm die Sichtbarmachung der Zellkerne)
- Kontrollschnitte (Positivkontrolle: HL-60 Zellen, für 19 h mit 0,5 µg/ml Aktinomycin inkubiert, um Apoptose zu erzeugen; Negativkontrolle: nicht inkubierte HL-60 Zellen)

Tissue Tek Einfriermedium (Sakura, Japan)

4.3.2 Puffer

PBS (Biochrom, Berlin, Deutschland); „phosphate buffered saline“, physiologischer Phosphatpuffer mit folgender Zusammensetzung für 1l:
8000 mg NaCl, 200 mg KCl, 1150 mg Na_2HPO_4, 200 mg KH_2PO_4

Hepes-Agar dafür werden 16,68 ml Hepes in 150 ml handwarmem Agar gelöst
Agar: 1,5 g Agar, reinst, gepulvert, (Merck, Darmstadt, Deutschland); mit 150 ml sterilem aqua destillata gekocht, abgekühlt, danach Zugabe von Hepes;
Hepes: 40 g NaCl (Merck) + 1,5 g KCl (Merck) + 11,9 g Hepes (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) + 10 g Glucose (Merck) + 450 ml aqua destillata (pH 7,55)

TBS 20 mM Tris pH 7,6 + 140 mM NaCl
Tris (Invitrogen, Carlsbad, USA); NaCl (Merck, Darmstadt, Deutschland)

4.3.3 Antibiotika – Zusatz zu PBS
Gentamicin (Invitrogen Gibco, Karlsruhe); Gentamicin-Solution 20 ml, Konzentration 50 mg/ml. Benötigte Endkonzentration: 0,5 µg/ml → Zusatz von 5 µl / 500 ml PBS

Tylosin (Sigma-Aldrich, Taufkirchen); Tylosin-Solution 20 ml, Konzentration 8 mg/ml
Benötigte Endkonzentration: 1,8 µg/ml → Zusatz von 113 µl / 500 ml PBS

4.4 Zellkulturmedien

4.4.1 *NHDF-Zellen*

Inhalt: 500 ml FBM® + FGM®-2 Single Quots: 0,5 ml Insulin + 0,5 ml rhFGF-B (r-Human Fibroblast Growth Factor-B) + 0,5 ml GA-1000 (Gentamicin Sulfate Amphotericin-B) + 10 ml FBS

- FBM®: Fibroblast Basal Medium, (Clonetics®, Cambrex, Walkersville USA)
- FGM®-2 Single Quots: (Clonetics®, Cambrex, Walkersville USA)

4.4.2 *primäre humane Gingivafibroblasten*

Inhalt: 10,17 g/l MEMα + 2,2 g/l $NaHCO_3$ + 20% FBS + destilliertes Wasser bis zum

erforderlichen Endvolumen

Auf eine 500 ml Flasche kommen zusätzlich noch 5 ml Penicillin/Streptomycin + 2,5 ml Antibiotik / Antimycotic + 1 ml Geneticin.

Nach der Herstellung wird das Medium steril abfiltriert und über Nacht bei 37°C inkubiert (Sterilprobe).

- MEMα (Gibco, Eggenstein, Deutschland)
- $NaHCO_3$ (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- FBS (**F**etal **B**ovine **S**erum) (Gibco, Eggenstein, Deutschland)
- Penicillin/Streptomycin (Gibco, Eggenstein, Deutschland)
- Antibiotic/Antimycotic 100x: 10000 Einheiten Penicillin (Base) + 10000 µg/ml Streptomycin (Base) + 25 µg/ml Amphotericin B in 0,85% Kochsalzlösung; 1:200 verdünnt (Invitrogen Gibco, Karlsruhe, Deutschland)
- Geneticin (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)

4.5 Technische Geräte und Hilfsmittel

4.5.1 Technische Geräte

4.5.1.1 *Lichtquelle*

Als Lichtquelle wurde die Lampe PDT 1200 von Waldmann Medizintechnik (Villingen-Schwenningen, Deutschland) eingesetzt. **Abb. 8** zeigt das Emmissionsspektrum der Lampe PDT 1200 L (λ_{em} 600-750 nm).

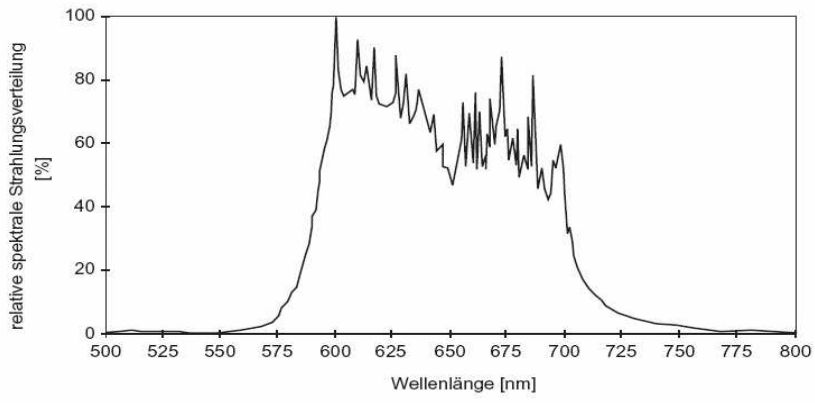


Abb.8: Emissionsspektrum der Lampe PDT 1200 L (aus dem technischem Datenblatt der Firma Waldmann)

4.5.1.2 *Spektralphotometer*

Spektralphotometer DU® 640 (Beckman, Fullerton, USA)

4.5.1.3 *Zentrifugen*

Zentrifuge Multifuge 3-S-R (Heraeus, Nürnberg, Deutschland)

Tischzentrifuge Mini Spin (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)

4.5.1.4 *Elisa-Reader* (Enzyme-linked Immunoabsorbent Assay-Reader)

(MWG-Biotech, Ebersberg, Deutschland)

4.5.1.5 *Mikroskope*

Lichtmikroskop

Mikroskop Laborlux S

(Leitz, Wetzlar, Deutschland)

Fluoreszenzmikroskop

Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Vario-Axio Tech, Göttingen, Deutschland).

Für die Anregung und Detektion des Farbstoffes wurden folgende Filter von Omega® Optical, Inc. (Brattleboro, USA) benutzt:

	Anregungsfilter	dichroider Spiegel	Emissionsfilter
Photosan	405 DF 40	415 DRLP	600 EFLP
Lyso Tracker® Green	500 AF 25	25 DRLP	530 ALP
Rhodamin	75 AF 40	505 DRLP	545 AF 35
Höchst 33342	365 WB 50	400 DRLP	450 AF 58

4.5.1.6 *Rotationsmikrotom*

Microm (Heidelberg, Deutschland) mit Einmalklingen S35 (Schnittwinkel 35°)

4.5.1.7 *Kryotom*

Microm (Kältemikrotom) (Heidelberg, Deutschland)

4.5.1.8 *Medi Machine* (79200)

Maschine zur mechanischen Zerkleinerung der humanen Gingiva

Dako AIS, Dänemark; Cod. CN00130

4.5.1.9 *Medicons*

Filter für die Medi Machine

Dako AIS, Dänemark; Codierung 79400S Medicons; 50µm

4.5.2 Hilfsmittel

4.5.2.1 *Stanzen*

Biopsy Punch, ø 4 mm (Stiefel Laboratorium GmbH, Offenbach am Main, Deutschland)

4.5.2.2 *Objektträger*

Micro Slides, white (Surgipath, Richmond, USA)

4.5.2.3 *Küvetten*

Cuvettes, 10×4×45 mm, No. 67.742 (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)

4.5.2.4 *96-Well-Mikrotiterplatte*

Cat.No. 3598 (Costar Corning, New York, USA)

4.5.2.5 *Zellschaber*

Cell Scraper 25 cm, 2-postion blade (Sarstedt, Newton, USA)

4.5.2.6 *Parafilm*

Pechiney Plastic Packaging (Chicago, USA)

5 Methoden

5.1 Zellkulturverfahren zur Kultivierung von primären Gingivafibroblasten

5.1.1 Isolierung und Verarbeitung der humanen Gingiva

Nachdem die frisch isolierte humane Gingiva (Gewebegröße ca. ½ cm²) eingewickelt in eine sterile Gaze übergeben war, wurde das Gewebe unter sterilen Bedingungen weiterverarbeitet. Das Gewebe wurde mit einer Pinzette entnommen und in eine 6-Well-Platte überführt, je einmal in PBS mit Gentamicin/Tylosin und je zweimal in purem PBS gewaschen. Eine enzymatische Behandlung wurde nicht durchgeführt. Danach wurde das Gewebe in Medium überführt und 500 µl davon im Medi-Apparat mechanisch dissoziiert.
Im 1.Versuch wurde dieses Volumen nun direkt in eine T25-Zellkulturflasche überführt und sofort mit Medium auf ca. 5 ml aufgefüllt, dann bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen mikroskopisch betrachtet und es wurde festgestellt, dass sie nicht am Boden der Zellkulturflasche adhärierten, sondern im Medium schwammen. Daraufhin wurde die gesamte Zellsuspension in ein Falcon pipettiert, für 5 min bei 1200 U/min zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Pellet mit frischem Medium resuspendiert. Die Suspension wurde in eine neue T25 überführt und die Zellen somit neu ausgesät.
Beim 2.Versuch wurde die mechanisch dissoziierte Medium-Gewebe-Mischung in der offenen T25-Zellkulturflasche ohne zusätzliches Medium unter sterilen Bedingungen für ca. 30 min angetrocknet, im Anschluss vorsichtig mit ca. 5 ml Medium überschichtet und bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Nach 24 h wurden die adhärenten Zellen vorsichtig mit einem Zellschaber vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst, die Suspension in ein Falcon pipettiert und für 5 min bei 1200 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Pellet mit frischem Medium resuspendiert, die Suspension in eine neue T25 überführt und weiter kultiviert.

5.1.2 Vermehrung der Zellen

Zur Anreicherung der primären Gingivazellen wurden diese am 1., 2., 5. und 6. Tag jeweils mit Puffer gewaschen und mit frischem Medium (7 ml) überdeckt, um möglichst wenig

Keimen die Möglichkeit zu geben, sich zu vermehren. Am 8., 13. und 14. Tag wurde nach dem Waschvorgang jeweils 10 ml frisches Medium aufgefüllt. Am 16. Tag sollten die Zellen in eine neue T25 überführt werden. Hierfür wurden die Zellen mit PBS gewaschen, danach wurde versucht die Zellen mit 1 ml Trypsin (1:10 verdünnt) vom Boden der Zellkulturflasche abzulösen. Da nach 30 Minuten kein Erfolg festzustellen war, wurde ein weiteres mal 1 ml Trypsin (1:10 verdünnt) für 10 Minuten hinzu gegeben, jedoch ohne erwünschten Effekt. Nach der Zugabe von unverdünntem Trypsin löste sich der Zellklon vom Boden der Zellkulturflasche ab, die Reaktion wurde mit 18 ml Medium gestoppt, die Suspension bei 1200 U/min für 5 Minuten zentrifugiert und mit Medium resuspendiert in eine neue T25 überführt.
Da keine ausreichende Menge an primären Gingivafibroblasten gewonnen werden konnte, wurden im weiteren Verlauf dieser Arbeit NHDF-Zellen verwendet (siehe 5.2).

5.1.3 Foto-Dokumentation der primären Gingivafibroblasten

Am 5., 6., 8., 13. und 16. Tag der Kultivierung der Zellen aus Versuch 2 wurden Fotoaufnahmen zur Dokumentation angefertigt.

5.2 Zellkulturverfahren von NHDF-Zellen

5.2.1 Vermehrung der Zellen

Die NHDF-Zellen wurden in FBM-Medium mit FGM-2-Zusatz in einer feuchten Atmosphäre bei 5% CO_2 und 37°C kultiviert. Zur Passagierung bzw. für die Experimente sind die Zellen mindestens bis zu einer Konfluenz von 70% angewachsen. Zur Vermehrung der Zellen wurden diese mit PBS gewaschen und danach mit Trypsin/EDTA 1× konzentriert bei 37°C für 5-10 min inkubiert, um die Zellen vom Boden der Zellkulturflasche abzulösen. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Medium gestoppt. Anschließend wurde die Lösung bei 1200 U/min und 20°C für 5 min zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Pellet in Medium resuspendiert. Die Zellen wurden im Verhältnis 1:3 bzw. 1:5 auf neue T75-Zellkulturflaschen verteilt.
Die Anlieferung der Zellen erfolgte in Passage 2, danach wurden sie vermehrt und zwischen Passsage 5 und 14 verwendet.

5.2.2 Verteilung der Zellen auf die Mikrotiterplatte

Für die Toxizitätsexperimente wurden die Zellen, nachdem sie wie oben beschrieben abtrypsiniert wurden, mit Hilfe der Neubauer Zählkammer gezählt und entsprechend mit Medium verdünnt, so dass bei der Verteilung der Zellen auf eine 96-Mikrotiterplatte in Reihe 2-9 pro Vertiefung 100 µl Suspension mit je 7500 Zellen waren. Reihe 1 der Mikrotiterplatte wurde später für den MTT-Test mit MTT-Reagenz befüllt und diente als Kontrolle. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Danach wurde jede Vertiefung mit 100 µl PBS befüllt (siehe 5.2.4).

5.2.3 Verdünnungsreihe des Farbstoffes

Der Farbstoff Photosan wurde mit einer Stammkonzentration von 2000 µg/ml in PBS-Puffer angesetzt. Lichtgeschützt wurde davon mit PBS eine Verdünnungsreihe der Konzentrationen 200 µg/ml, 100 µg/ml, 20 µg/ml, 10µg/ml, 2 µg/ml, 1 µg/ml, 0,2 µg/ml und 0 µg/ml hergestellt. Diese wurden mit Alufolie abgedeckt und bis zur weiteren Verwendung bei Raumtemperatur aufbewahrt.

5.2.4 Phototoxizitätstest von dermalen Fibroblasten *in vitro*

Je 100 µl der jeweiligen Verdünnung (siehe 5.2.3) wurden davon in die entsprechende Reihe der 96-Mikrotiterplatte zu den 100 µl der gewaschenen Zellen (siehe 5.2.2) gegeben (Endkonzentration von Photosan nun 100 µg/ml, 50 µg/ml, 10 µg/ml, 5 µg/ml, 1 µg/ml, 0,5 µg/ml, 0,1 µg/ml und 0 µg/ml), welche anschließend für 90 Minuten, 15 Minuten oder 5 Minuten im Brutschrank bei 37°C inkubiert wurden. Danach wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen, in 100 µl PBS resuspendiert und bestrahlt. Zur Sensibilisierung wurde die Lampe von Waldmann Medizintechnik verwendet. Die Bestrahlungsdauer betrug 30 Minuten, 10 Minuten oder 2 Minuten bei einer tatsächlich applizierten Energiedosis von 40 mW/cm² (72 J/cm², 24 J/cm², 4,8 J/cm²).
Als Kontrollen wurden identisch bearbeitete 96-Mikrotiterplatten mitgeführt, die ebenfalls mit Photosan inkubiert, aber nicht bestrahlt wurden (Dunkelkontrolle).
Nach der Bestrahlung wurde der jeweilige Überstand abgesaugt, danach wurden in Reihe 1

bis 9 pro Vertiefung 100 µl Medium gegeben und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

5.2.5 MTT-Test

Die MTT-Methode wird zur Bestimmung der Phototoxizität von Photosan gegenüber Fibroblasten angewendet [70]. Diese Nachweismethode beruht auf der Reduktion von Tetrazoliumsalz durch mitochondriale Enzyme zu gefärbten Formazanen als Indikator für die Vitalität. Der Test erfasst ausschließlich lebende Zellen, wobei die Signalstärke vom Aktivierungszustand der Zelle abhängig ist.
Hierfür wurden pro Vertiefung 10 µl MTT-Reagenz direkt zum Medium zugegeben und für 4 Stunden im Brutschrank inkubiert. Proportional zur Aktivität der Dehydrogenasen bildet sich in den Zellen unlösliches Formazan. Dieses wird in 100 µl SDS pro Vertiefung gelöst und über Nacht im Brutschrank inkubiert.

5.2.6 Auswertung am Elisareader

Die Auswertung des MTT - Test erfolgte mit dem Elisareader bei einer Wellenlänge von 540 nm. Hierbei wird die optische Dichte des blau-violetten Formazan in Abhängigkeit der Enzymaktivität in den Mitochondrien gemessen. Je größer der Wert der optischen Dichte ist, desto vitaler sind die Zellen.

5.2.7 Datenverarbeitung und statistische Analyse

Mit den NHDF-Zellen wurden für jede Bedingung jeweils 3 unabhängige Versuche durchgeführt. Für eine Farbstoffkonzentration standen jeweils 8 Vertiefungen in der 96-Mikrotiterplatte zur Verfügung, so dass man pro Versuch und pro Bedingung 8 OD-Werte erhielt. Aus diesen 8 OD-Werten wurde jeweils ein Median berechnet. Die somit erhaltenen 3 Mediane (aus 3 Versuchen) wurden als unabhängige Daten betrachtet und der weiteren Analyse zugeführt. Hierbei wurden die entsprechenden Mediane und dazugehörigen Quartilen berechnet und grafisch dargestellt.
Pro Versuch wurden die absoluten OD-Werte der unbestrahlten Kontrollen (Medium + Zellen) auf 100% normalisiert und alle Werte darauf relativiert. Der EC50-Wert gibt die

Farbstoffkonzentration an, bei der 50% der Zellen abgetötet werden konnten. Zur Verdeutlichung wurde der EC50-Wert als horizontale schwarze Linie in die Grafik eingezeichnet. Wenn das 75%-Quartil unter dem EC50-Wert lag, wurde die photodynamische Inaktivierung als effektiv angesehen.
Zur Datenverarbeitung und statistischen Analyse wurde das Programm SPSS Version 15.0 (SPSS Incorporation, Chicago, Illinois, USA) verwendet.

5.3 *Ex vivo* Gingiva-Modell (Schwein)

5.3.1 Isolierung der Gingiva aus dem Schweinekiefer und nachfolgende Bearbeitung

Die Gingiva wurde durch eine marginale Schnittführung mit Hilfe von Skalpell, Raspatorium und Pinzette vom Kiefer isoliert. Anschließend wurde das *ex vivo* Gingivagewebe je zweimal in PBS und einmal in 70% Ethanol gewaschen. Danach wurden die Gewebestücke, beschwert durch mit PBS gefüllte Petri-Schalen, mit Hepes-Agar in Petri-Schalen eingebettet **(Abb. 9 A+B)**.

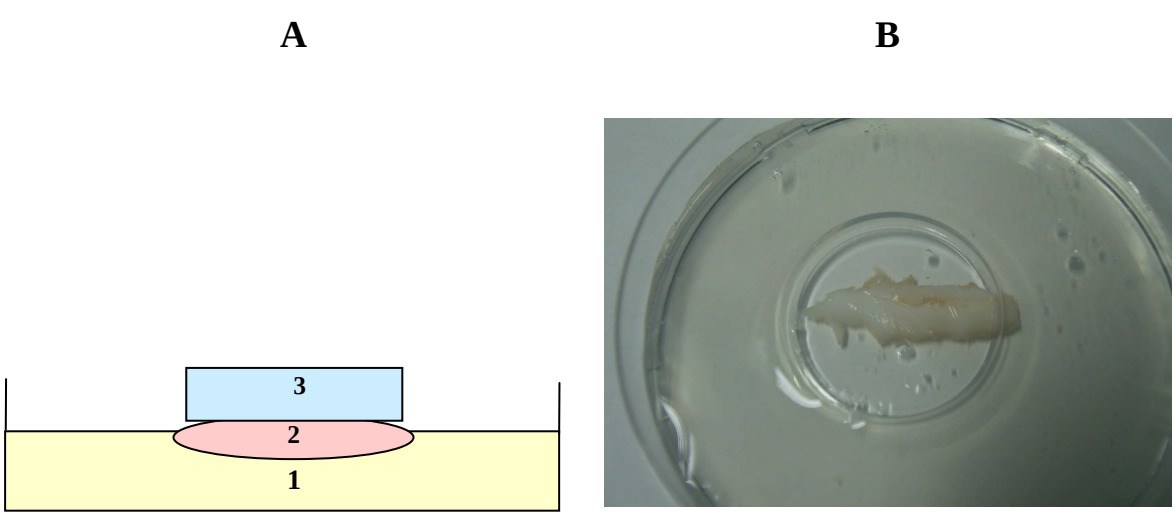


Abb. 9: (A) Schematische Darstellung der Einbettung des *ex vivo* Gingivagewebes in Hepes-Agar: (1) Petri-Schale, befüllt mit Hepes-Agar; (2) Gingivagewebe (Schwein); (3) kleine Petri-Schale, befüllt mit PBS zur Beschwerung. **(B)** Gingivagewebe (Schwein), eingebettet in Hepes-Agar, die bukkale Fläche der Gewebestücke hatte Luftkontakt.

5.3.2 Phototoxizitätstest (*ex vivo* Gingiva)

Für die Toxizitätsexperimente wurden drei Konzentrationen des Farbstoffes Photosan verwendet. Zum einen die Stammkonzentration von 2000 µg/ml PBS und zum anderen die in einer Verdünnungsreihe unter lichtgeschützten Bedingungen mit PBS hergestellten Konzentrationen von 200 µg/ml und 100 µg/ml. Die Farbstofflösungen wurden jeweils mit Alufolie bedeckt gelagert.
Die Versuchsbedingungen wurden hinsichtlich der Inkubationsdauer und der Bestrahlungsdosis analog zu denen der Zellversuche ausgewählt.

- In der ersten Versuchsreihe (Dunkelkontrolle, keine Bestrahlung) wurde das *ex vivo* Gingivagewebe nur mit Photosan (2000 µg/ml, 200 µg/ml, 100 µg/ml) für 90 Minuten, 15 Minuten oder 5 Minuten inkubiert, in Alufolie gewickelt bei Raumtemperatur. Hierfür wurden je ca. 1000 µl der jeweiligen Konzentration auf das entsprechende Gewebestück (ohne Ring) aufpipettiert **(Abb. 10)**.
- In der zweiten Versuchsreihe wurden das *ex vivo* Gingivagewebe nur bestrahlt, ohne vorher mit Photosan inkubiert zu werden. Zur Bestrahlung wurde die Lampe von Waldmann Medizintechnik verwendet. Die Bestrahlungsdauer betrug 30 Minuten, 10 Minuten oder 2 Minuten bei einer tatsächlich applizierten Energiedosis von 40 mW/cm² (72 J/cm², 24 J/cm², 4,8 J/cm²).
- In der dritten Versuchsreihe wurde *ex vivo* Gingivagewebe mit Photosan inkubiert (2000 µg/ml, 200 µg/ml, 100 µg/ml) und bestrahlt. Die Inkubation dauerte 90 Minuten, 15 Minuten oder 5 Minuten. Hierfür wurden je ca. 1000 µl der jeweiligen Konzentration auf das entsprechende Gewebestück (ohne Ring) aufpipettiert **(Abb. 10)**. Die Präparate wurden in Alufolie gewickelt bei Raumtemperatur gelagert. Zur Bestrahlung wurde die Lampe von Waldmann Medizintechnik verwendet. Die Bestrahlungsdauer betrug 30 Minuten, 10 Minuten oder 2 Minuten bei einer tatsächlich applizierten Energiedosis von 40 mW/cm² (72 J/cm², 24 J/cm², 4,8 J/cm²).
- Als Kontrollen wurden identisch bearbeitete Präparate mitgeführt, die weder mit Photosan inkubiert noch bestrahlt wurden, jedoch mit Alufolie vor Umwelteinflüssen geschützt wurden.

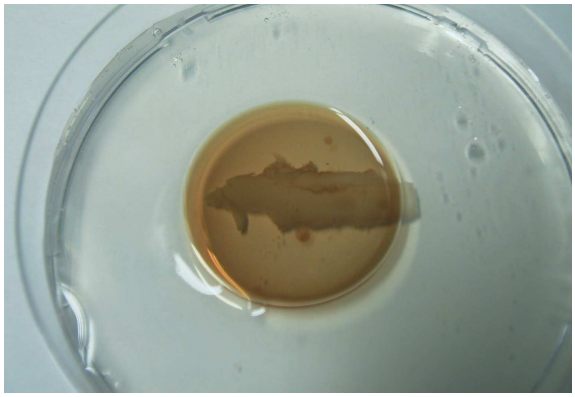


Abb.10: *Ex vivo* Gingivagewebe (Schwein), eingebettet in Hepes-Agar, mit 1ml Photosan (2000µg/ml) inkubiert (bukkale Fläche zeigte nach oben).

5.3.3 Probenentnahme und Histochemie

Nach Versuchsende wurden aus jedem Präparat der unterschiedlichen Versuchsansätze nach jeweils 0 h, 3 h, 6 h und 22 h Proben mit Hilfe einer Biopsiestanze (ø 4mm) entnommen **(Abb. 11)** und für mindestens 24 Stunden in geschlossene Behälter mit 4% Formalin eingelegt.

Die in Formalin eingebetteten Biopsieproben wurden 24 h später in Einbettkassetten überführt und über Nacht entwässert. Nach 24 Stunden wurden die Proben in Paraffin eingebettet und anschließend gekühlt, so dass sie dann mit dem Rotationsmikrotom in 2 µm dünne Scheiben geschnitten und auf Objektträger aufgezogen werden konnten.

A **B**

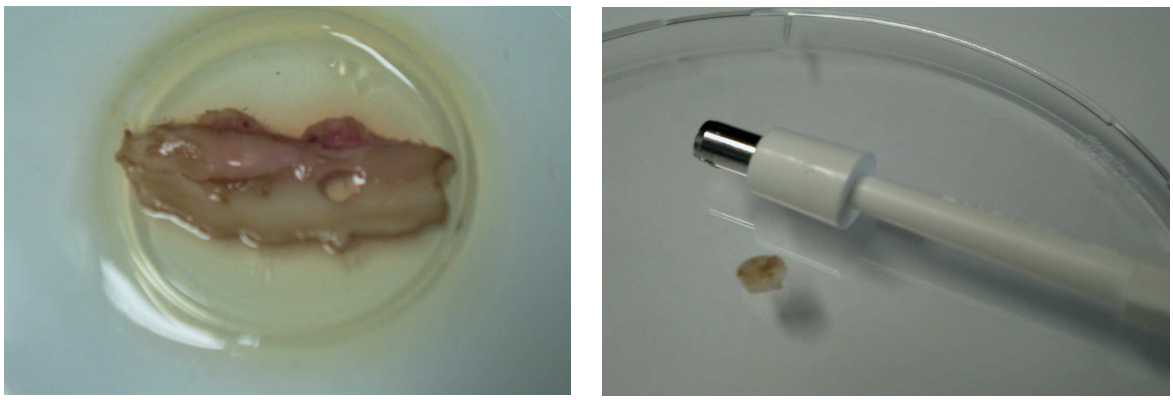


Abb. 11: (A) *Ex vivo* Gingivagewebe (Schwein) nach Probenentnahme **(B)** *Ex vivo* Gingivagewebe (Schwein), Probenentnahme mit einer Biopsiestanze ø 4mm.

5.3.3.1 Nachweis von Apoptose mit dem *In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein und Tunel POD*

Nachdem die Objektträger mit den Gewebeschnitten im Trockenschrank bei 68°C für 20 min getrocknet wurden, wurden sie in absteigender Alkoholreihe (folgende Reihenfolge: 2×5 min Xylol, je 2×3 min 100% EtOH, 95% EtOH, 70% EtOH) entparaffiniert. Danach wurde die endogene Peroxidase für 20 min in 3% H_2O_2 (gelöst in 70% Ethanol) blockiert und anschließend zweimal mit PBS gespült. Die Objektträger wurden nun 30 min in 0,1 mol/l Zitronensäure (pH 6,0) gekocht, und für 30 min abgekühlt, danach mit PBS gespült. Die Positivkontrolle (interne Kontrolle) wurde 30 min bei 37°C mit DNAseI (1 mg/ml) inkubiert, anschließend dreimal in PBS gespült. Danach wurden die Objektträger mit dem TUNEL–Reagenz für 30 min bei 37°C inkubiert, die Negativkontrolle jedoch nur mit dem Labeling–Reagenz. Nach Abschluss der Inkubationszeit wurde dreimal mit PBS gespült, im Anschluss unspezifische Proteinbindungsstellen mit 2% BSA (gelöst in PBS) für 10 min bei Raumtemperatur blockiert, danach die Lösung abgeklopft. Nun wurden die Objektträger mit TUNEL-POD, Verdünnung 1:2 in 2% BSA (gelöst in PBS) für 30 min bei 37°C inkubiert, danach dreimal in PBS gespült. Des Weiteren wurden die Objektträger mit AEC-Chromogen-Substrat für 10 min inkubiert, ehe die Färbung in Aqua destillata gestoppt wurde. Anschließend erfolgte die Gegenfärbung in Mayer´s Hämalaun, die Objektträger wurden in lauwarmem Leitungswasser gebläut, bis das Wasser klar war. Zum Abschluss wurden die Objektträger mit Deckglas bedeckt.

5.3.3.2 Nachweis von Apoptose mit dem *Fluorescein FragEL ™ DNA Fragmentation Detection Kit*

Das Fluorescein FragEL™ DNA Fragmentation Detection Kit dient zum Nachweis von DNA-Strangbrüchen in apoptotischen Zellkernen u.a. von Gewebeschnitten, die in Paraffin eingebettet wurden. Zelluläre Apoptose führt zur Schrumpfung der Zelle, pyknotischen Zellkernen, Chromatinkondensation und Platzen der Plasma-Membran. Neben verschiedensten molekularen und biochemischen Mechanismen wurde die Aktivität einer endogenen Endonuklease identifiziert, die DNA in Fragmente spaltet und an eben diesen freie 3´-OH Gruppen erzeugt. Das Detection Kit markiert diese Hydroxyl–Gruppen mit Fluorescein–beladenen Deoxynukleotiden. Als Katalysator dieser Reaktion

fungiert die terminale Deoxynucleotidyl-Transferase (TdT).
Angeregtes Fluorescein erzeugt dann ein helles grünes Signal (tote Zellen), das mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskopes detektiert werden kann. Das im Kit enthaltene Mounting–Medium ist für die Photostabilität von Fluorescein verantwortlich. Die darin enthaltenen 4,6,-DiAmidino-2-PhenylIndole (DAPI) färben die Zellkerne der gesamten Zellpopulation und erlauben bei einer Wellenlänge von 330 bis 380 nm die Sichtbarmachung sowohl von markierten (toten) als auch unmarkierten (lebenden) Zellkernen.
Nachdem die Gewebeschnitte in absteigender Alkoholreihe (folgende Reihenfolge: 2×5 min Xylen, 2×5 min 100% Ethanol, 3 min 90% Ethanol, 3 min 80% Ethanol, 3 min 70% Ethanol) entparaffiniert und anschließend einmal mit TBS gespült wurden, wurden sie mit einem wasserfesten Stift markiert und danach bei Raumtemperatur für 20 min mit 2 mg/ml Proteinase K 1:100 (gelöst in 10mM Tris pH 8) inkubiert. Hierbei wurden pro Schnitt 100 µl verwendet. Dann wurden die Schnitte wieder einmal mit TBS gewaschen und vorsichtig getrocknet.
Um eine Positivkontrolle zu erhalten, wurde das Gewebe bei Raumtemperatur für 20 min mit 1 µg/µl DNase I (gelöst in 1×TBS/1 mM $MgSO_4$) inkubiert, im Anschluss einmal mit TBS gespült und danach die Objektträger um das Gewebe getrocknet. Zusätzlich wurde die Positivkontrolle aus dem Kit verwendet, die HL-60-Zellen enthält, die für 19 Stunden mit 0,5 µg/ml Aktinomycin D inkubiert wurden, um Apoptose zu erzeugen.
Anschließend wurden die Gewebeschnitte mit 100 µl von 5×TdT Äquilibrierungspuffer, der 1:5 in dH_2O verdünnt wurde, für ca. 20 min bei Raumtemperatur inkubiert, danach vorsichtig getrocknet. Nun wurden pro Schnitt 60 µl TdT-Labeling-Reaktion (57 µl Fluorescein FragEL™ TdT Labeling Reaction Mix + 3 µl TdT Enzym) aufgetragen, mit Parafilm bedeckt und das Gewebe in feuchter Kammer bei 37°C 1-1,5 Stunden inkubiert. Bei der Negativkontrolle wurde das TdT Enzym in der Labeling-Reaktion durch dH_2O ersetzt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der Parafilm entfernt, die Schnitte je dreimal für 1 min mit TBS gewaschen, getrocknet und mit Hilfe von Mounting-Medium und Deckgläsern eingedeckelt.

5.3.4 Auswertung

Die Objektträger, die mit dem *In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein und Tunel POD* behandelt wurden, wurden mit dem Mikroskop ausgewertet. Hierzu wurde ein

jeweils repräsentatives Areal bei einer 40xfachen Vergrößerung ausgewählt und sowohl die apoptotischen als auch die lebenden Zellen manuell ausgezählt.
Beim Nachweis der Apoptose mit dem *Fluorescein FragEL™ DNA Fragmentation Detection Kit* fand die Auswertung mit dem Fluoreszenzmikroskop statt. Wird ein für DAPI spezieller Filter (330-380 nm) benutzt, so können die Zellkerne der gesamten Zellpopulation sichtbar gemacht werden, eine Unterscheidung zwischen lebenden Zellen und toten Zellen ist jedoch noch nicht möglich. Verwendet man einen Fluorescein Filter (465-495 nm), so erzeugen positive gefärbte Zellen (tote Zellen) ein helles grünes Signal. Darüber hinaus können aber auch mit einem Lichtmikroskop charakteristische morphologische Merkmale zur Interpretation der Ergebnisse herangezogen werden. Bei apoptotischen Zellen findet eine starke Veränderung der Zellform statt, es kommt zur Chromatinkondensation, die Kernmembran rollt sich ein (Fragmentierung), in der Zellmembran bilden sich Bläschen, schließlich resultiert daraus die Bildung einzelner apoptotischer Körper. Da die apoptotischen Vorgänge nicht synchron verlaufen, sind diese meist nur vereinzelt in großen Zellpopulationen zu finden.
Die Versuche wurden jeweils einmal durchgeführt und unabhängig voneinander im Abstand mehrerer Monate dreimal ausgewertet. Hierbei wurden die apoptotischen Zellen (grün) und die lebenden Zellen (blau) anhand der oben beschriebenen Merkmale im gesamten Blickfeld manuell ausgezählt und relativ zur Gesamtzahl der Zellen pro Blickfeld als Prozentzahlen berechnet. Anschließend wurden die einzelnen Werte (%) grafisch dargestellt.

5.4 Experimente zur Aufnahme des Farbstoffes

5.4.1 Zelluläre Aufnahme von Photosan

NHDF-Zellen der Passage 5 (T75) wurden einmal mit PBS gewaschen, danach mit ca. 2 ml Trypsin/T75 (1:10 verdünnt) im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Diese Reaktion wurde nach ca. 5-10 Minuten durch die Zugabe von Medium gestoppt, anschließend wurde die Zellsuspension bei 1200 U/min und 20°C für 5 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde nach Absaugen des Überstandes in FBM-Medium ohne FGM-2-Zusatz (kein FBS) resuspendiert. Nun wurden die Zellen mit Hilfe der Neubauer Zählkammer gezählt und so

verteilt, dass sich in 0,5 ml Zellsuspension je 500.000 Zellen befanden.

- Für die ersten drei Ansätze (n=3) wurden je 0,5 ml Zellsuspension in einem 1,5 ml Eppendorf-Cup mit je 0,5 ml Photosan/PBS der Konzentration 500 µg/ml im Dunkeln bei 37°C und 5% CO_2 für 90 Minuten inkubiert.
- Für weitere drei Ansätze (n=3) wurden je 0,5 ml Zellsuspension in einem 1,5 ml Eppendorf-Cup mit je 0,5 ml Photosan/PBS der Konzentration 500 µg/ml im Dunkeln bei 37°C und 5% CO_2 für 60 Minuten inkubiert.
- Für weitere drei Ansätze (n=3) wurden je 0,5 ml Zellsuspension in einem 1,5 ml Eppendorf-Cup mit je 0,5 ml Photosan/PBS der Konzentration 500 µg/ml im Dunkeln bei 37°C und 5% CO_2 für 15 Minuten inkubiert.
- Für weitere drei Ansätze (n=3) wurden je 0,5 ml Zellsuspension in einem 1,5 ml Eppendorf-Cup mit je 0,5 ml Photosan/PBS der Konzentration 500 µg/ml im Dunkeln bei 37°C und 5% CO_2 für 5 Minuten inkubiert.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Suspensionen einmal für 5 Minuten bei 10000U/min mit der Tischzentrifuge zentrifugiert, bis deutliche Zellpellets zu erkennen waren. Diese wurden in 1 ml Triton X-100 1% resuspendiert und für 30 min auf Eis lysiert. Anschließend wurden die Eppendorf-Cups erneut bei 10000 U/min für 5 min in der Tischzentrifuge zentrifugiert und danach die Absorption im Überstand mit dem Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 380 bis 800 nm gemessen.
Als Blank wurde ein Ansatz mit 1 ml Zellen in FBM-Medium ohne FGM-2-Zusatz verwendet, der ebenfalls für 30 min mit 1 ml Triton X-100 1% auf Eis lysiert wurde und wie oben beschrieben zentrifugiert wurde. Danach wurde die Absorption des Überstandes gemessen. Die verschiedenen Absorptionsspektren wurden nach der Peakhöhe bewertet.

5.5 Fluoreszenzaufnahmen

5.5.1 Lokalisation von Photosan bei NHDF-Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie

NHDF-Zellen der Passage 6 bis 9 (T75) wurden einmal mit PBS gewaschen, danach mit ca. 2 ml Trypsin/T75 (1:10 verdünnt) im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Diese Reaktion wurde nach ca. 5-10 Minuten durch die Zugabe von Medium gestoppt, anschließend wurde die Zellsuspension bei 1200 U/min und 20°C für 5 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde nach Absaugen des Überstandes in FBM-Medium ohne FGM-2-Zusatz

resuspendiert. Nun wurden die Zellen mit Hilfe der Neubauer Zählkammer gezählt und so verteilt, dass sich in 0,5 ml Zellsuspension je 500.000 Zellen befanden.

Nun wurden sterile Objektträger mit je 3ml Zellsuspension (1,5 Millionen Zellen) bedeckt und über Nacht bei 37°C und 5% CO_2 kultiviert. Am nächsten Tag wurde der Überstand abgesaugt, die Zellen mit Medium ohne FGM-2-Zusatz gewaschen und mit 1 ml davon beschichtet. Eine Ausnahme bildeten hierbei die NHDF-Zellen, die 24 h lang inkubiert wurden: diese wurden mit Medium mit Zusatz bedeckt. Anschließend wurden die Zellen mit 1 ml Photosan, verdünnt in FBM-Medium ohne FGM-2-Zusatz, der Konzentration 100 µg/ml inkubiert.

Es wurden folgende Inkubationszeiten gewählt: 24 h, 90 min, 15 min und 5 min. Innerhalb einer Inkubationszeit gab es drei unterschiedliche Ansätze.

- Der erste Ansatz wurde lediglich mit 1 ml Photosan inkubiert,
- der zweite Ansatz sowohl mit 1 ml Photosan als auch mit 1 ml Lyso Tracker® Green DND-26 8 µM (2 h) inkubiert und
- der dritte Ansatz neben Photosan mit 1 ml Rhodamin 123 Fluoropure 50 ng/ml (5 min).

Anschließend wurden die drei unterschiedlichen Ansätze zur Färbung der Zellkerne noch mit je 100 µl Farbstoff Höchst 33342, 10 µM, für ca. 5 min inkubiert.

Zum Abschluss wurden die verschiedenen Ansätze nochmals gewaschen und letztendlich mit 2 ml Medium ohne Zusatz überschichtet.

Für die Aufnahmen am Fluoreszenzmikroskop wurden folgende Filter von Omega® Optical, Inc. (Brattleboro, USA) verwendet:

	Anregungsfilter	dichroider Spiegel	Emissionsfilter
Photosan	405 DF 40	415 DRLP	600 EFLP
Lyso Tracker® Green	500 AF 25	25 DRLP	530 ALP
Rhodamin	75 AF 40	505 DRLP	545 AF 35
Höchst 33342	365 WB 50	400 DRLP	450 AF 58

5.5.2 Lokalisation von Photosan im *ex vivo* Gingivagewebe (Schwein)

Ex vivo Gingivagewebe (Schwein) wurde, nachdem es in Hepes-Agar wie oben beschrieben (unter Punkt 5.3.1) eingebettet wurde, für jeweils 1 min, 5 min, 15 min und 90 min mit 200 µg/ml Photosan (1 ml) inkubiert. Die Farbstofflösung wurde so aufgetragen, dass das gesamte Gewebe über die komplette Inkubationszeit vollständig damit bedeckt war **(Abb. 10)**. Die Petrischalen wurden hierbei mit Alufolie bedeckt. Danach wurden Proben (ø 4mm) gestanzt, diese in Einfriermedium (Tissue Tek) eingebettet und auf Trockeneis durchgefroren. Anschließend wurde das Gewebe mit dem Kryotom in 5 µm dünne Scheiben geschnitten, auf Objektträger aufgebracht und unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet.
Für die Aufnahmen am Fluoreszenzmikroskop wurde folgender Filter von Omega® Optical, Inc. (Brattleboro, USA) verwendet:

	Anregungsfilter	dichroider Spiegel	Emissionsfilter
Photosan	405 DF 40	415 DRLP	600 EFLP

5.6 HE-Färbung am Paraffinschnitt – *Ex vivo* Gingiva – Modell (Schwein)

Die Paraffinschnitte wurden in absteigender Alkoholreihe (folgende Reigenfolge: 2×5 min Xylol, je 2×3 min 100% EtOH, 95% EtOH, 70% EtOH) entparaffiniert. Nachdem der Schnitt mit destilliertem Wasser kurz gespült wurde, wurde er für 7 Minuten in Hämalaun gebläut, danach unter fließendem Leitungswasser entfärbt, anschließend kurz in 2%-ige Essigsäure getaucht. Darauf folgend wurde der Schnitt für 10 Minuten in Eosin getaucht und mit Leitungswasser gespült, danach in aufsteigender Alkoholreihe fixiert und mit Entellan eingedeckelt.
Bei der HE-Färbung werden Zellkerne und Zytoplasmaanteile, die reich an endoplasmatischem Retikulum sind, durch das Hämatoxylin blau-violett gefärbt; Eosin färbt andere Zytoplasmaanteile sowie viele faserige extrazelluläre Komponenten rot.

6 Ergebnisse

Um die Toxizität von Photosan nach Bestrahlung gegenüber eukaryonten Zellen der Mundhöhle zu testen, sollte ein geeignetes Verfahren zur Kultivierung von primären Gingivafibroblasten etabliert werden.

6.1 Primärkultur humaner Gingivafibroblasten

6.1.1 Zeitverlauf der Kultivierung

In einem ersten Versuch wurde die isolierte humane Gingiva mechanisch mit dem Medi-Apparat zerkleinert und direkt in eine T25-Zellkulturflasche überführt. Allerdings haben sich bei dieser Methode keine Zellen an die Zellkulturflasche adhäriert (sind angewachsen), sondern schwammen nur im Medium (Daten nicht gezeigt).
In einem weiteren Versuch wurde das ebenfalls mit dem Medi-Apparat mechanisch zerkleinerte Gingivagewebe in die Zellkulturflasche gegeben und angetrocknet. Am nächsten Tag konnte man mehrere adhärierte Zellhaufen mit dem Mikroskop erkennen (Daten nicht gezeigt), die sich auch durch mehrmaliges Waschen nicht vom Zellkulturboden ablösten. An den Tagen 2, 5 und 6 wurden die primären humanen Gingivafibroblasten mit Puffer gewaschen und mit frischem Medium (7 ml) überdeckt.
Vergleicht man nun die Fotoaufnahmen vom 5. und 6. Tag, so erkennt man hier bereits eine deutliche Veränderung mit beginnender Proliferation der Zellen **(Abb. 12/13)**.

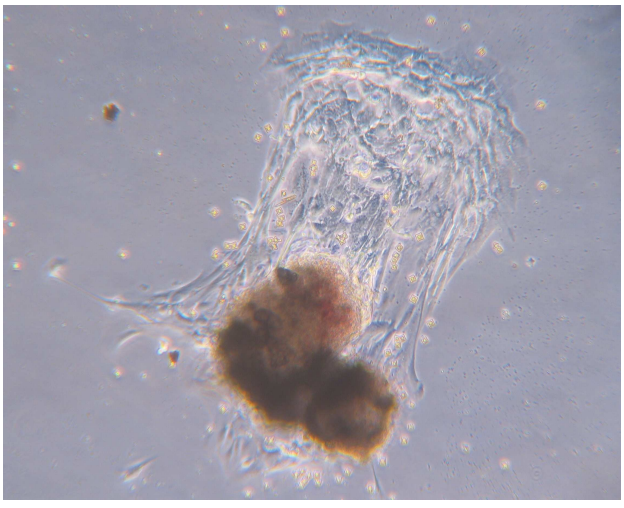


Abb. 12: Primäre humane Gingiva, 5 Tage alt. Isolierung von Gingivafibroblasten aus humanem Gingivagewebe. Das Gewebe wurde mit dem Medi-Apparat mechanisch zerkleinert und unter sterilen Bedingungen in einer offenen T25 angetrocknet. Vergrößerung 40x.

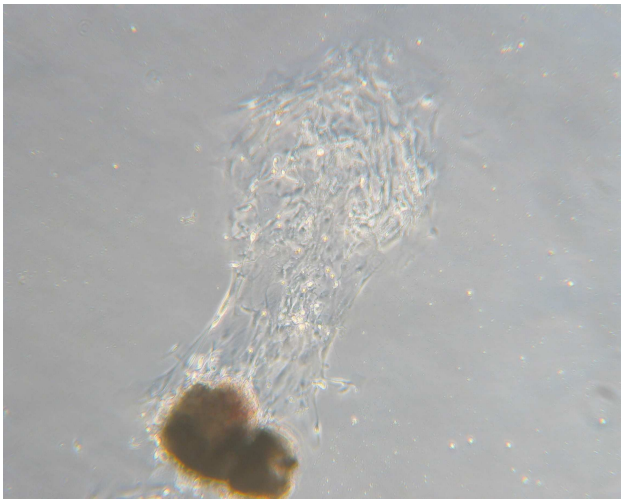


Abb. 13: Primäre humane Gingiva, 6 Tage alt. Isolierung von Gingivafibroblasten aus humanem Gingivagewebe. Das Gewebe wurde mit dem Medi-Apparat mechanisch zerkleinert und unter sterilen Bedingungen in einer offenen T25 angetrocknet. Vergrößerung 40x.

Am 8., 13. und 14. Tag wurde nach dem Waschvorgang jeweils 10 ml frisches Medium aufgefüllt. Die Zellen waren angewachsen und haben sich stetig vermehrt, wie man in den Fotoaufnahmen vom 8. und 13. Tag beobachten konnte **(Abb. 14/15)**.

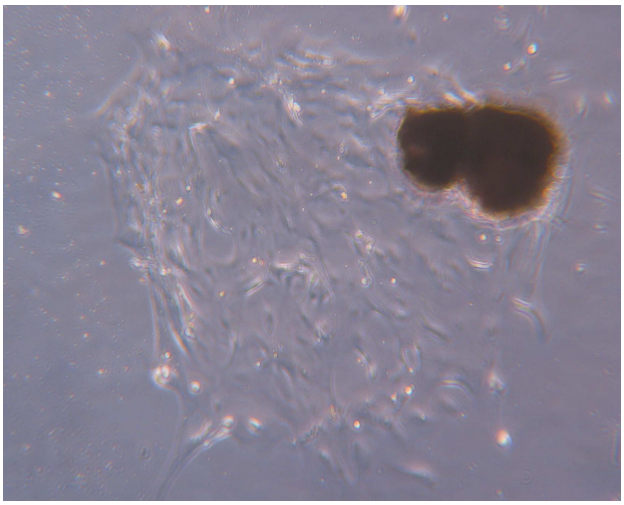


Abb. 14: Primäre humane Gingiva, 8 Tage alt. Isolierung von Gingivafibroblasten aus humanem Gingivagewebe. Das Gewebe wurde mit dem Medi-Apparat mechanisch zerkleinert und unter sterilen Bedingungen in einer offenen T25 angetrocknet. Vergrößerung 40x.

Abb. 15: Primäre humane Gingiva, 13 Tage alt. Isolierung von Gingivafibroblasten aus humanem Gingivagewebe. Das Gewebe wurde mit dem Medi-Apparat mechanisch zerkleinert und unter sterilen Bedingungen in einer offenen T25 angetrocknet. Vergrößerung 40x.

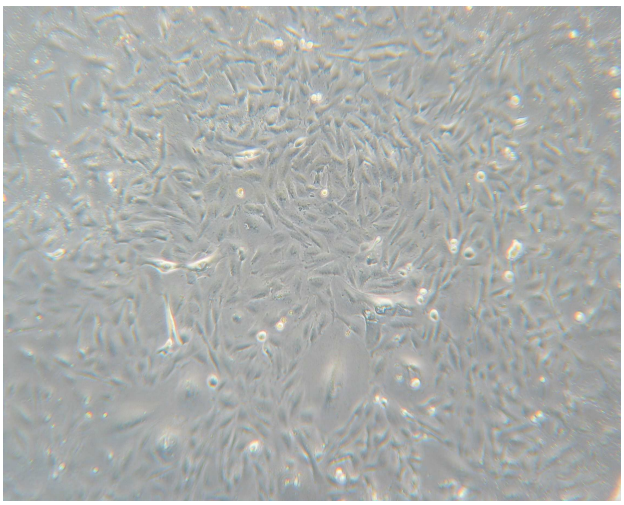


Abb. 16: Primäre humane Gingiva, 16 Tage alt. Isolierung von Gingivafibroblasten aus humanem Gingivagewebe. Das Gewebe wurde mit dem Medi-Apparat mechanisch zerkleinert und unter sterilen Bedingungen in einer offenen T25 angetrocknet. Vergrößerung 40x.

Nachdem die Zellen bis zum 16. Tag konfluent gewachsen waren (Zellkulturflasche war vollständig mit Zellen bedeckt) **(Abb. 16)**, wurde versucht, die Zellen zu passagieren und auf neue Zellkulturflaschen zu verteilen, um so genügend Zellen für die Phototoxizitätsexperimente zu erhalten. Nachdem jedoch auch eine längere Inkubation (bis zu 30 min) mit Trypsin zum Ablösen der Zellen keinen Erfolg brachte, wurde die Reaktion mit Medium gestoppt, die Suspension abzentrifugiert, mit Medium resuspendiert und in eine neue T25 überführt. Am nächsten Tag waren die Zellen aus dem resuspendierten Überstand nicht angewachsen (Daten nicht gezeigt).

Dass die Kultivierung von primären humanen Gingivafibroblasten prinzipiell möglich ist, zeigte der zweite Versuch. Jedoch stellte es ein Problem dar, aus einem einzigen Patientenisolat eine ausreichende Menge an primären Gingivafibroblasten zu gewinnen.

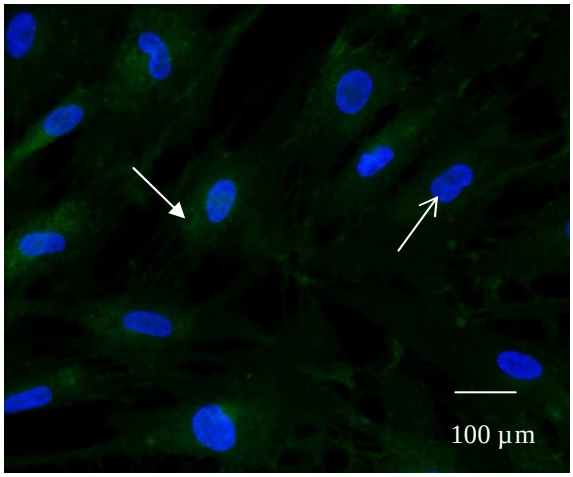
6.2 Nachweis der Aufnahme von Photosan bei NHDF-Zellen und *ex vivo* Gingivagewebe (Schwein)

Um eine Inaktivierung von verschiedenen Zellarten erzielen zu können, ist es notwendig, dass ein Photosensibilisator von den Zellen aufgenommen wird, bevor die Bestrahlung mit Licht einer geeigneten Wellenlänge erfolgt. Der Nachweis der Aufnahme von Photosan bei NHDF-Zellen und *ex vivo* Gingivagewebe (Schwein) ist mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie möglich.
Da keine ausreichende Menge an primären Gingivafibroblasten gewonnen werden konnte, wurden im weiteren Verlauf dieser Arbeit NHDF-Zellen bzw. *ex vivo* Gingivagewebe (Schwein) verwendet.

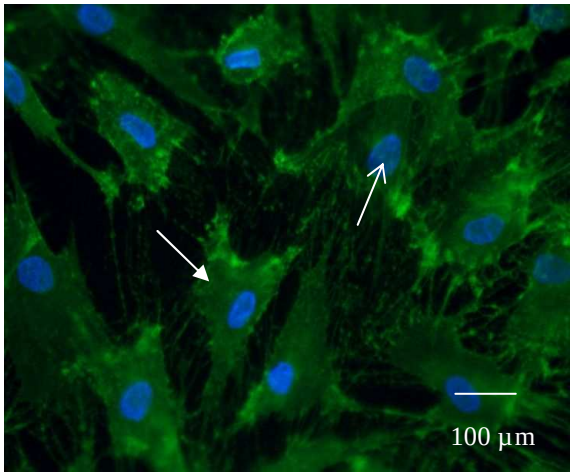
6.2.1 Inkubation von NHDF-Zellen mit Photosan

Die Penetration von Photosan in dermale Fibroblasten wurde mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Hierfür wurden NHDF-Zellen für 5 Minuten, 15 Minuten und 90 Minuten mit 1 ml Photosan (100 µg/ml) inkubiert und anschließend der Zellkern mit 100 µl des Farbstoffes Höchst 33342 (10 µM) angefärbt. **Abbildung 17** zeigt die Lokalisation von Photosan zu den drei unterschiedlichen Zeitpunkten. Nach einer 5-minütigen Inkubation mit Photosan lässt sich eine Fluoreszenz nur im Bereich der Zytoplasmamembran erkennen, wohingegen eine längere Inkubationszeit von 15 Minuten und 90 Minuten zu einer intrazellulären Akkumulation von Photosan führte.

A



B



C

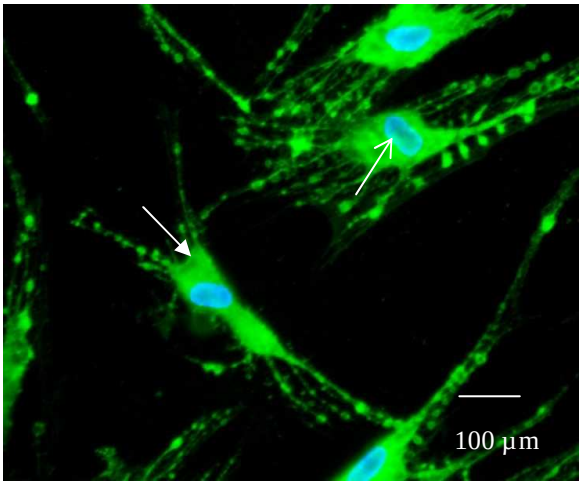


Abb. 17: Lokalisation von Photosan zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Die NHDF-Zellen wurden mit 100µg/ml Photosan inkubiert (grün ⟶), die Zellkerne wurden mit 10µM Höchst 33342 gefärbt (blau ⟶). **(A)** 5-minütige Inkubation mit Photosan; **(B)** 15-minütige Inkubation mit Photosan; **(C)** 90-minütige Inkubation mit Photosan. Alle Aufnahmen Vergrößerung 100x.

6.2.2 Inkubation von *ex vivo* Gingivagewebe (Schwein) mit Photosan

In einem mehr angewandten Modell wurde nun *ex vivo* Gingiva verwendet, um die Penetration von Photosan zu untersuchen. Komplettes Gingivagewebe kommt der *in vivo* Situation wesentlich näher als ein Monolayer von Zellen.

Auch hier wurde Gingivagewebe jeweils für 1 Minute, 5 Minuten, 15 Minuten oder 90 Minuten mit 200 µg/ml Photosan (1 ml) inkubiert und anschließend fluoreszenz-mikroskopisch untersucht.

Wie in **Abbildung 18** gezeigt, findet man hier mit zunehmender Inkubationszeit eine Steigerung der Fluoreszenzsignale. Jedoch beschränkt sich die Aufnahme von Photosan auf das Stratum corneum des gingivalen Epithels, eine Penetration von Photosan in tiefer liegende Schichten der Gingiva konnte nicht detektiert werden.

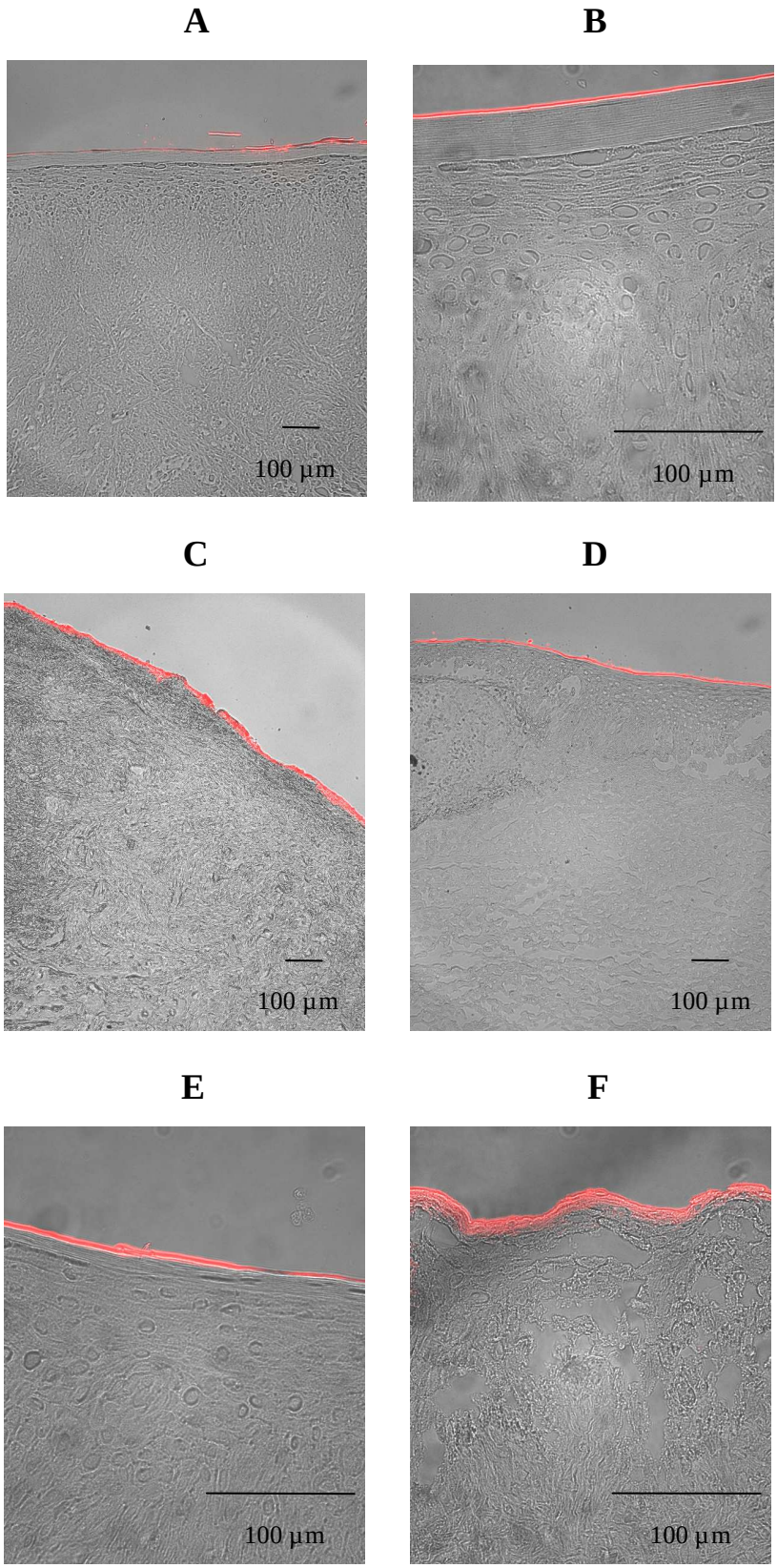


Abb. 18: *Ex vivo* Gingiva-Modell: Penetration von Photosan. Gingivagewebe (Schwein) wurde für **1min** (**A**: Vergr. 100x / **B**: Vergr. 400x), **5min** (**C**: Vergr. 100x), **15min** (**D**: Vergr. 100x / **E**: Vergr. 400x) oder **90min** (**F**: Vergr. 400x) mit 200µg/ml Photosan (rot) inkubiert und danach fluoreszenzmikroskopisch beurteilt.

6.2.3 Zelluläre Aufnahme und Lokalisation von Photosan bei NHDF-Zellen

In einem ersten Schritt konnte qualitativ gezeigt werden, dass der Photosensibilisator Photosan von den dermalen Fibroblasten aufgenommen wird. In einem weiteren Schritt wurde nun mit Hilfe der Spektroskopie überprüft, ob in Abhängigkeit der Inkubationszeit eine Anhäufung von Photosan in den Zellen gegeben ist. Eine Zunahme der Absorption ist gleichbedeutend mit einem Anstieg der Photosankonzentration in den Zellen.
Zellsuspensionen von NHDF-Zellen wurden mit 500 µg/ml Photosan für 5, 15, 60 und 90 Minuten inkubiert, lysiert und anschließend wurde die Absorption im Überstand spektrometisch gemessen.
In **Abbildung 19** zeigt die blaue Kurve die Absorption von Photosan bei NHDF-Zellen nach Inkubation bei 37°C und 5% CO_2 für 5 Minuten. Bei längeren Inkubationszeiten von 15 Minuten (pink), 60 Minuten (gelb) und 90 Minuten (grün) kommt es zu einer deutlichen Zunahme der Absorption. So ergibt sich eine zunehmende Aufnahme von Photosan bei den NHDF-Zellen abhängig von einer steigenden Inkubationsdauer. Insgesamt konnten die Ergebnisse der Fluoreszenzmikroskopie bestätigt werden.

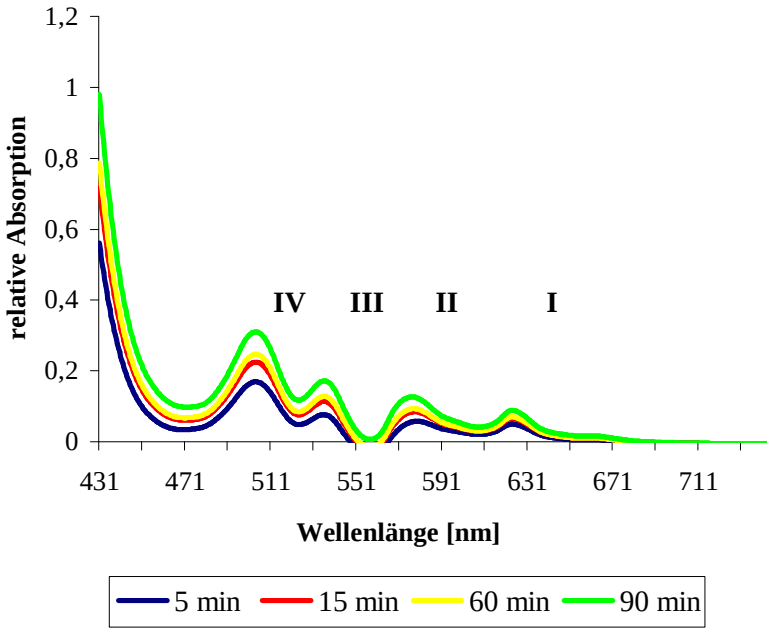


Abb. 19: Absorptionsspektren von Photosan nach Inkubation mit NHDF-Zellen
Auschnitt des Absorptionsspektrums von Photosan mit den charakteristischen Q-Banden (IV-I) im Wellenlängenbereich von 500–700nm. Blau: 500µg/ml Photosan für 5min, rot 500µg/ml Photosan für 15min, gelb 500µg/ml Photosan für 60min, grün 500µg/ml Photosan für 90min.

Nachdem nun gezeigt werden konnte, dass Photosan intrazellulär aufgenommen worden ist, sollte in einem nächsten Schritt die intrazelluläre Lokalisation genauer bestimmt werden. Dazu wurden Co-Lokalisationsexperimente mit Farbstoffen durchgeführt, die bei lebenden Zellen spezifisch Lysosomen und Mitochondrien färben.

- NHDF-Zellen wurden für 5 Minuten, 15 Minuten, 90 Minuten und 24 Stunden jeweils mit 100 µg/ml Photosan inkubiert.
- Bei einem weiteren Ansatz wurden die Zellen zusätzlich mit 1 ml Lyso Tracker® Green DND-26 für 2 h zur Färbung der Lysosomen inkubiert
- und bei einem anderen Ansatz wurden die Zellen mit Photosan und 50 ng/ml Rhodamin 123 Fluoropure für 5 Minuten zur Färbung der Mitochondrien inkubiert.

Anschließend wurden die unterschiedlichen Ansätze zur Färbung der Zellkerne noch mit 10 µM Höchst 33342 für ca. 5 min inkubiert.

Bei der gleichzeitigen Färbung mit dem Farbstoff Lyso-Tracker® Green konnte nach einer 5-minütigen, 15-minütigen und 90-minütigen Inkubation mit Photosan keine Co-Lokalisation in den Lysosomen festgestellt werden **(Abb. 20 A/C; Abb. 21 A)**. Lediglich eine Färbung der Zytoplasmamembran ist zu erkennen. Nach einer 24-stündigen Inkubation mit Photosan (rot) hingegen zeigte sich eine subzelluläre Verteilung des Farbstoffes in den dermalen Fibroblasten. So sieht man in **Abbildung 21 C** eine Co-Lokalisation (gelb) mit dem Lysosomen-spezifischen Farbstoff Lyso-Tracker® Green (grün).

Markiert man die Mitochondrien gleichzeitig mit dem Farbstoff Rhodamin 6G, so findet sich hier nach 5-minütiger, 15-minütiger, 90-minütiger und 24-stündiger Inkubation mit Photosan keine Co-Lokalisation, sondern nur eine Verteilung des Farbstoffes im Zytoplasma **(Abb. 20 B/D; Abb. 21 B/D)**. Man erkennt mitochondriale Strukturen, jedoch keine Co-Lokalisation des Farbstoffes in den Mitochondrien **(Abb. 20 B/D; Abb. 21 B/D)**. Nur in den Lysosomen kommt es hiermit nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden mit Photosan und Lyso-Tracker® Green zu einer Co-Lokalisation.

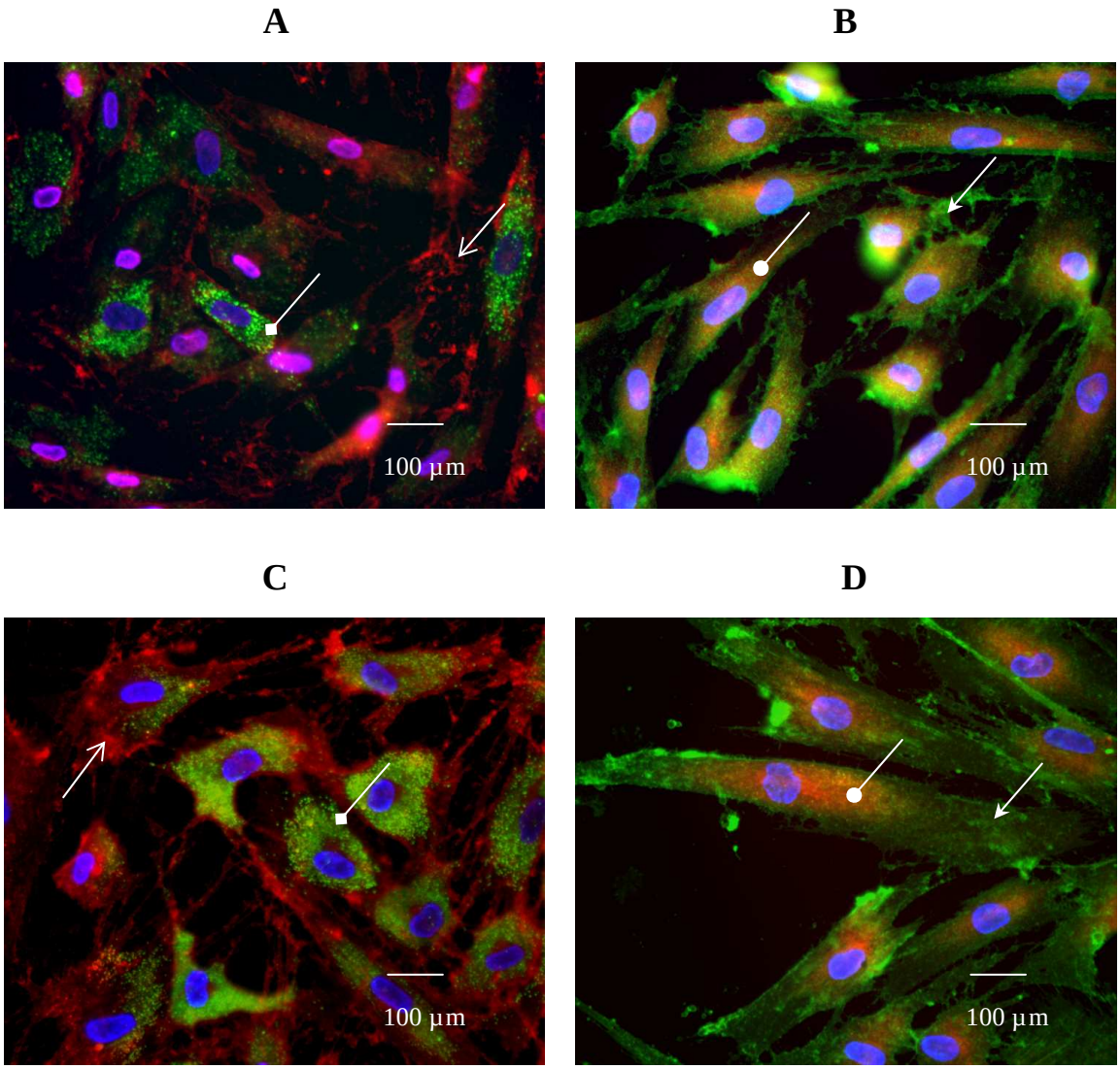


Abb. 20: Zelluläre Lokalisation von Photosan. NHDF-Zellen wurden mit 100µg/ml Photosan für 5min oder 15min inkubiert. Die Zellkerne wurden mit Höchst 33342 angefärbt (blau). **(A)** 5-minütige Inkubation mit Photosan (rot ⟶) mit gleichzeitiger Färbung der Lysosomen (grün ⟶◆); **(B)** 5-minütige Inkubation mit Photosan (grün ⟶) mit gleichzeitiger Färbung der Mitochondrien (rot ⟶●); **(C)** 15-minütige Inkubation mit Photosan (rot ⟶) mit gleichzeitiger Färbung der Lysosomen (grün ⟶◆); **(D)** 15-minütige Inkubation mit Photosan (grün ⟶) mit gleichzeitiger Färbung der Mitochondrien (rot ⟶●). Alle Aufnahmen Vergrößerung 100x.

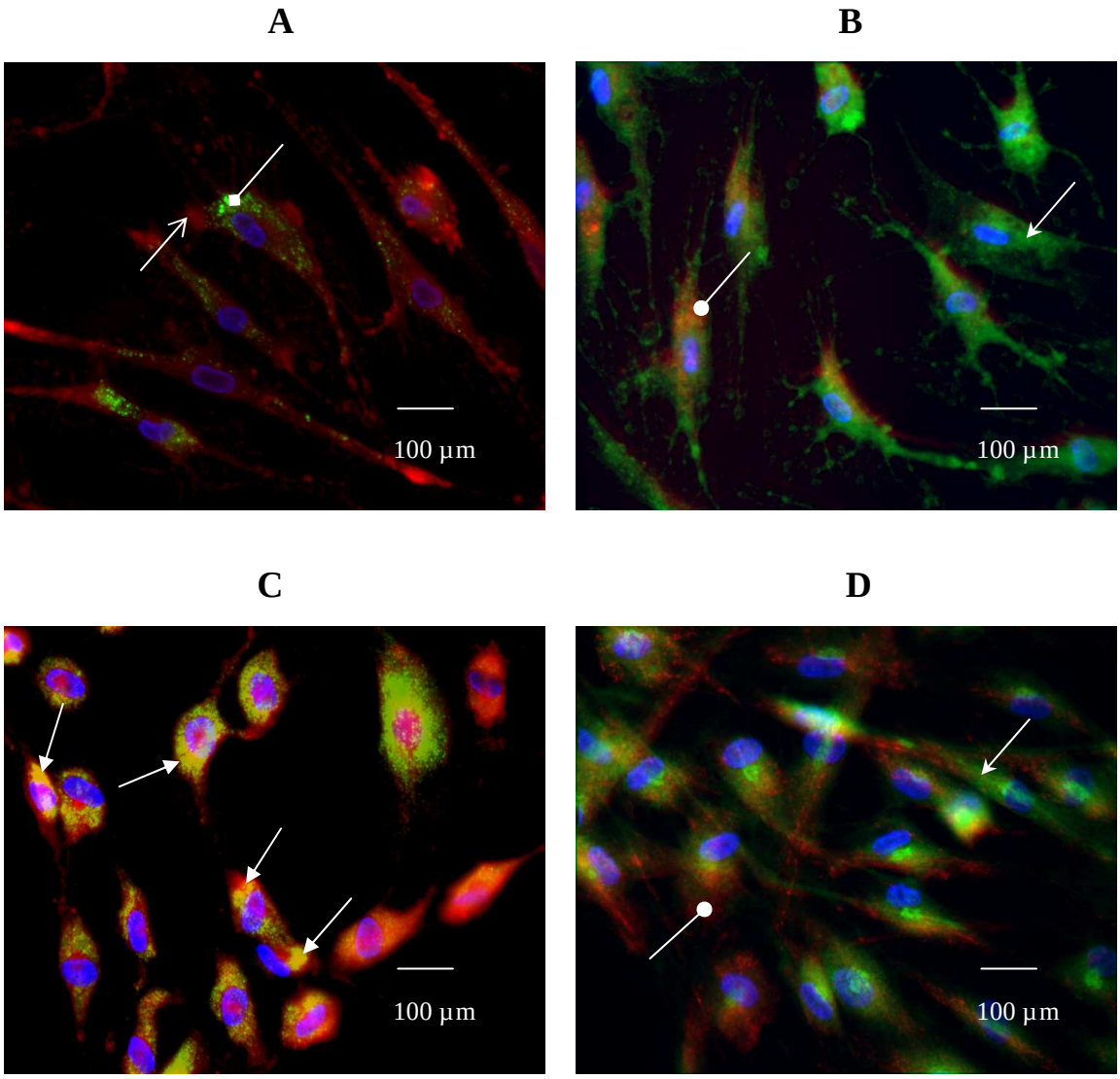


Abb. 21: Zelluläre Lokalisation von Photosan. NHDF-Zellen wurden mit 100µg/ml Photosan für 90min oder 24h inkubiert. Die Zellkerne wurden mit Höchst 33342 angefärbt (blau). **(A)** 90-minütige Inkubation mit Photosan (rot →) mit gleichzeitiger Färbung der Lysosomen (grün —◆); **(B)** 90-minütige Inkubation mit Photosan (grün →) mit gleichzeitiger Färbung der Mitochondrien (rot —●); **(C)** 24-stündige Inkubation mit Photosan (rot) mit gleichzeitiger Färbung der Lysosomen (grün), Co-Lokalisation (gelb →); **(D)** 24-stündige Inkubation mit Photosan (grün →) mit gleichzeitiger Färbung der Mitochondrien (rot —●). Alle Aufnahmen Vergrößerung 100x.

6.3 Toxizität von Photosan gegenüber NHDF-Zellen nach Bestrahlung

Unter Verwendung von NHDF-Zellen wurde die Toxizität verschiedener Konzentrationen (0; 0,1; 0,5; 1; 5; 10; 50 und 100 µg/ml) des Farbstoffes Photosan nach Bestrahlung getestet. Die Zellen wurden für 5 Minuten, 15 Minuten oder 90 Minuten mit Photosan inkubiert und anschließend für 2 Minuten (4,8 J/cm², 40 mW/cm²), 10 Minuten (24 J/cm², 40 mW/cm²) oder 30 Minuten (72 J/cm², 40 mW/cm²) mit der Lampe PDT 1200 von Waldmann Medizintechnik bestrahlt. Als Kontrollen wurden Zellen in identisch behandelten 96-Mikrotiterplatten mitgeführt, die ebenfalls mit Photosan inkubiert, aber nicht bestrahlt wurden (Dunkelkontrolle).

6.3.1 Inkubationsdauer 5 Minuten (Bestrahlungsdauer 2, 10 oder 30 Minuten)

Bei 5-minütiger Inkubation und 2-minütiger Bestrahlung liegt die Konzentration von Photosan, bei der mehr als 50% der Zellen absterben, bei 50 µg/ml **(Abb. 22 A)**. Steigt die Bestrahlungszeit auf 10 Minuten, werden bereits bei einer Konzentration von 1 µg/ml mehr als 50% der Zellen abgetötet **(Abb. 22 B)**. Erhöht man die Bestrahlungsdauer auf 30 Minuten, so sinkt die Überlebensrate der Zellen bei einer Konzentration von 0,5 µg/ml Photosan auf weniger als 50% (**Abb. 22 C)**.
Betrachtet man bei 5-minütiger Inkubation und 2-minütiger Bestrahlung die Farbstoffkonzentrationen von 0 bis 1 µg/ml, so findet man einen Zuwachs der Zellen **(Abb. 22 A)**.
Eine Inkubation von NHDF-Zellen mit Photosan ohne Bestrahlung (Dunkelkontrolle) ergibt bei einer 5-minütigen Inkubation und 2- bzw. 10-minütiger Bestrahlung erst ab einer Konzentration von 50 µg/ml eine Abnahme der Überlebensrate um 10% **(Abb. 22 A/B)**. Bei einer 5-minütigen Inkubation mit 30-minütiger Bestrahlung findet man bei einer Konzentration von 100 µg/ml eine Abnahme der Überlebensrate um 3% **(Abb. 22 C)**.

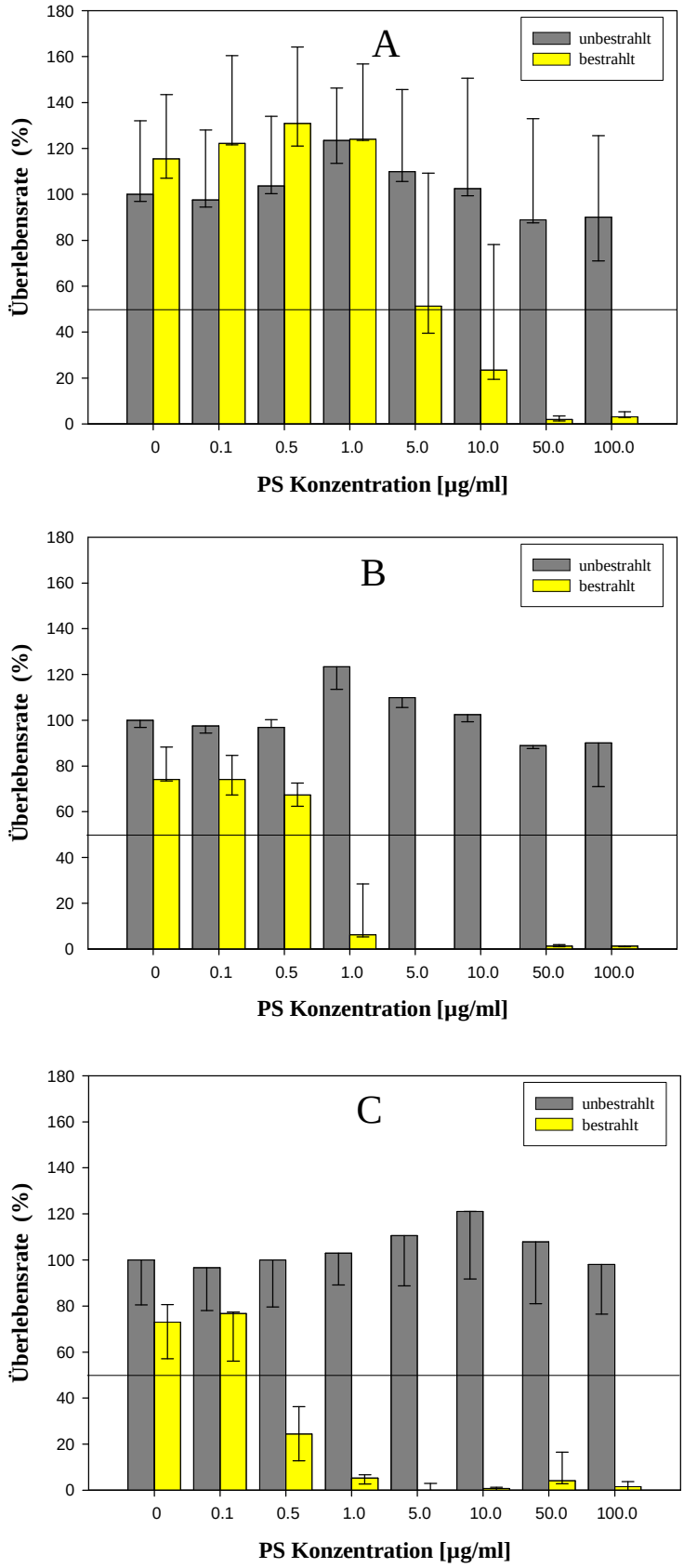


Abb. 22: Phototoxizität von Photosan gegenüber NHDF-Zellen. Die Zellen wurden für 5 Minuten mit verschiedenen Konzentrationen von Photosan inkubiert. Graue Balken: Inkubation (Photosan), keine Bestrahlung (Dunkelkontrolle). Gelbe Balken: Inkubation (Photosan) und Bestrahlung für **(A)** 2min (4,8J/cm²), **(B)** 10min (24J/cm²) oder **(C)** 30min (72J/cm²). 24h später wurde die Vitalität der Zellen mittels MTT-Test bestimmt. Die OD-Werte der Dunkelkontrolle wurden auf 100% normalisiert. Die waagrechte schwarze Linie kennzeichnet die Überlebensrate von 50% (n=3, Median mit 25% - bis 75%-Perzentile).

6.3.2 Inkubationsdauer 15 Minuten (Bestrahlungsdauer 2, 10 oder 30 Minuten)

Bei einer 15-minütigen Inkubation mit 2-minütiger Bestrahlung zeigt sich bei einer Konzentration von 10 µg/ml (Photosan) eine Überlebensrate der Zellen von 50% **(Abb. 23 A)**. Bei einer höheren Bestrahlungsdauer von 10 Minuten sterben bereits bei einer Konzentration von 1 µg/ml mehr als 50% der Zellen **(Abb. 23 B)**. Werden die Zellen für 30 Minuten bestrahlt, reicht eine Konzentration von 0,5 µg/ml aus, um mehr als 50% der Zellen abzutöten **(Abb. 23 C)**.

Bei den mitgeführten Kontrollplatten (Dunkelkontrolle), die nicht bestrahlt wurden, lässt sich ab 50 µg/ml ein dunkeltoxischer Effekt nachweisen **(Abb. 23 A-C)**. Bei der 15-minütigen Inkubation kombiniert mit einer Bestrahlung von 2 und 10 Minuten findet man Konzentrationen von 100 µg/ml Photosan, die die Überlebensrate der Zellen um mehr als 50% senken, bei einer Bestrahlung von 30 Minuten werden bereits bei einer Konzentration von 50 µg/ml Photosan mehr als 50% der Zellen abgetötet **(Abb. 23 A-C)**.

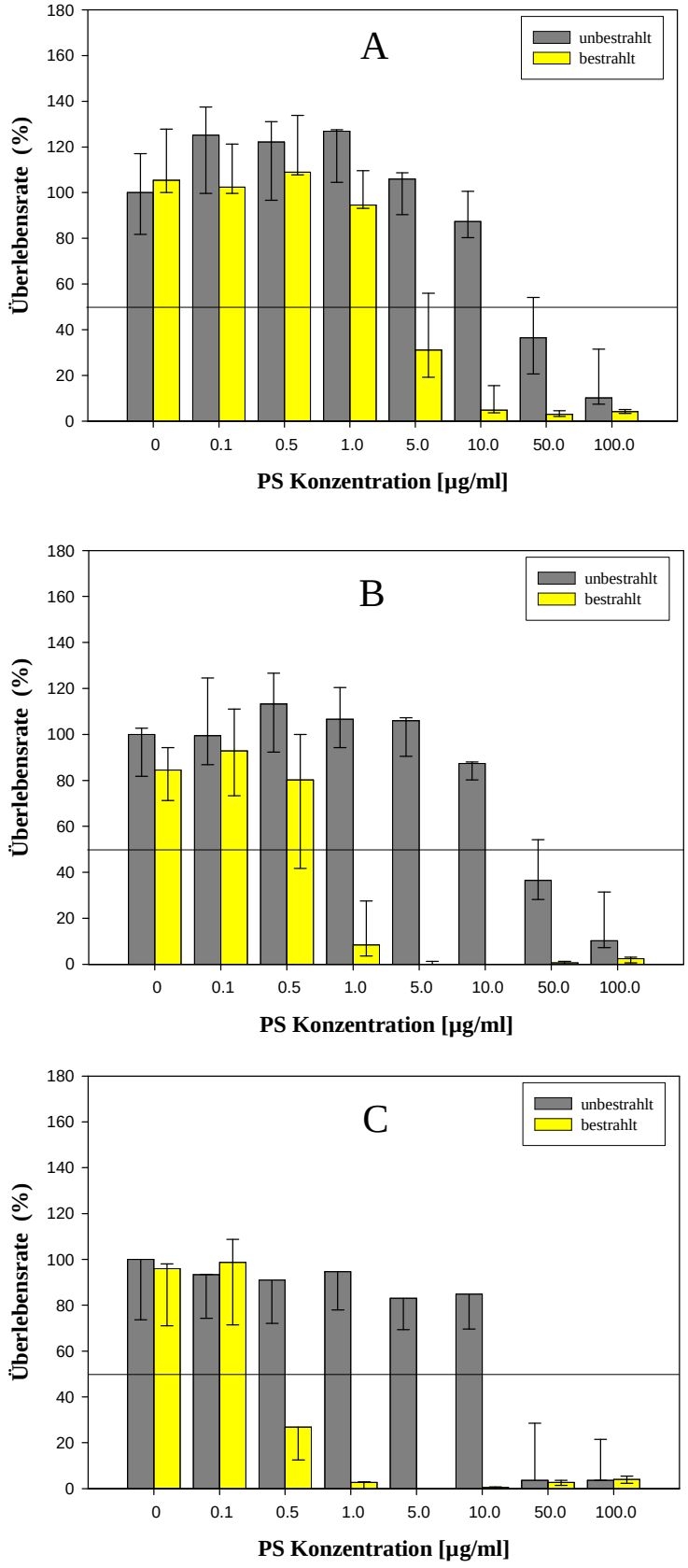


Abb. 23: Phototoxizität von Photosan gegenüber NHDF-Zellen. Die Zellen wurden für 15 Minuten mit verschiedenen Konzentrationen von Photosan inkubiert. Graue Balken: Inkubation (Photosan), keine Bestrahlung (Dunkelkontrolle). Gelbe Balken: Inkubation (Photosan) und Bestrahlung für **(A)** 2min (4,8J/cm²), **(B)** 10min (24J/cm²) oder **(C)** 30min (72J/cm²). 24h später wurde die Vitalität der Zellen mittels MTT-Test bestimmt. Die OD-Werte der Dunkelkontrolle wurden auf 100% normalisiert. Die waagrechte schwarze Linie kennzeichnet die Überlebensrate von 50% (n=3, Median mit 25%- bis 75%-Perzentile).

6.3.3 Inkubationsdauer 90 Minuten (Bestrahlungsdauer 2, 10 oder 30 Minuten)

Nach einer 90-minütigen Inkubation mit Photosan und einer 2-minütigen Bestrahlung sterben bei einer Konzentration von 5 µg/ml mehr als 50% der Zellen **(Abb. 24 A)**. Bei zunehmender Bestrahlungsdauer von 10 Minuten werden bei einer Konzentration von 0,5 µg/ml mehr als 50% der Zellen abgetötet **(Abb. 24 B)**. Die maximale Bestrahlungsdauer von 30 Minuten lässt die Überlebensrate der Zellen bereits bei einer Konzentration von 0,1 µg/ml auf weniger als 50% sinken **(Abb. 24 C)**.
Eine dunkeltoxische Wirkung ist bei der 90-minütigen Inkubation kombiniert mit einer Bestrahlung von 2 Minuten ab einer Konzentration von 50 µg/ml festzustellen. Bei einer Konzentration von 100 µg/ml sinkt die Überlebensrate auf weniger als 50% (**Abb. 24 A)**. Bei einer höheren Bestrahlungsdauer von 10 bzw. 30 Minuten werden bereits bei einer Konzentration von 10 µg/ml mehr als 50% der Zellen abgetötet **(Abb. 24 A-C)**.

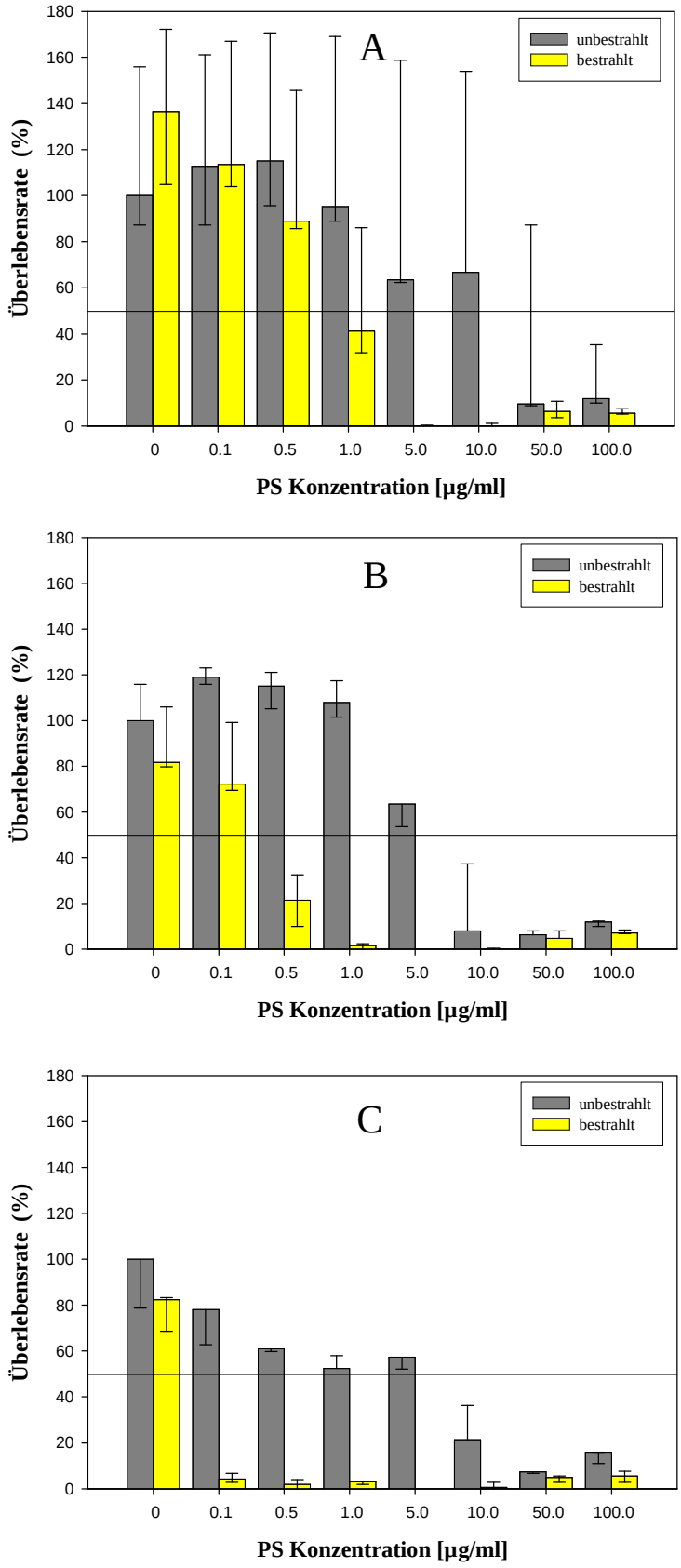


Abb. 24: Phototoxizität von Photosan gegenüber NHDF-Zellen. Die Zellen wurden für 90 Minuten mit verschiedenen Konzentrationen von Photosan inkubiert. Graue Balken: Inkubation (Photosan), keine Bestrahlung (Dunkelkontrolle). Gelbe Balken: Inkubation (Photosan) und Bestrahlung für **(A)** 2min (4,8J/cm²), **(B)** 10min (24J/cm²) oder **(C)** 30min (72J/cm²). 24h später wurde die Vitalität der Zellen mittels MTT-Test bestimmt. Die OD-Werte der Dunkelkontrolle wurden auf 100% normalisiert. Die waagrechte schwarze Linie kennzeichnet die Überlebensrate von 50% (n=3, Median mit 25%- bis 75%-Perzentile).

6.3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse der Phototoxizitätstest mit NHDF-Zellen

Vergleicht man jeweils die drei unterschiedlichen Inkubationszeiten in einem Bestrahlungsfenster, so kommt es hier zu einer Abnahme der Überlebensrate der Zellen in Abhängigkeit von einer steigenden Inkubationsdauer (**Tabelle 1)**.
Bei der jeweiligen Gegenüberstellung der drei Bestrahlungszeiten von 2 Minuten, 10 Minuten und 30 Minuten in einem Inkubationsfenster, erkennt man, dass mit zunehmender Bestrahlungsdauer die Konzentration des Farbstoffes, bei der 50% der NHDF-Zellen überleben, abnimmt **(Tabelle 1)**.
Zusammenfassend kommt man zu dem Ergebnis, dass die Toxizität von Photosan im Rahmen der photodynamischen Therapie bei neonatalen humanen dermalen Fibroblasten sowohl abhängig von der Inkubationszeit als auch von der Konzentration des Farbstoffes und der applizierten Lichtintensität ist (**Tabelle 1)**.

Reduktion der Zellvitalität durch Photosan (µg/ml) von mind. 50%				
		Bestrahlung		
		2 min	**10 min**	**30 min**
Inkubation	**5 min**	50	1	0,5
	15 min	10	1	0,5
	90 min	5	0,5	0,1

Tabelle 1: Toxizität von Photosan gegenüber NHDF-Zellen nach Bestrahlung – Übersicht über die Konzentrationen von Photosan (µg/ml), die eine Reduktion der Zellvitalität von mind. 50% erzielen, in Abhängigkeit von der Inkubationszeit und Bestrahlungsdauer. Die Daten wurden aus Abb. 22-24 abgelesen und zusammengefasst: wenn das 75%-Quartil unter dem EC50-Wert lag, wurde die photodynamische Inaktivierung als effektiv angesehen. Der EC50-Wert gibt die Farbstoffkonzentration an, bei der 50% der Zellen abgetötet werden konnten. Zur Verdeutlichung wurde der EC50-Wert als horizontale schwarze Linie in die Grafiken der Abb. 22-24 eingezeichnet.

6.4 Toxizität von Photosan gegenüber *ex vivo* Gingivagewebe (Schwein) mit und ohne Bestrahlung

Nachdem nun im vorherigen Kapitel die Toxizität von Photosan nach Bestrahlung gegenüber NHDF-Zellen untersucht worden ist, sollte nun in einem mehr angewandten Modell unter Verwendung explantierter Gingiva aus dem Schweinekiefer die Phototoxizität untersucht werden. Hierzu wurde die *ex vivo* Gingiva mit Photosan unterschiedlich lang inkubiert und anschließend mit verschiedenen Lichtdosen bestrahlt.
Aus jedem Präparat der unterschiedlichen Versuchsansätze wurden nach jeweils 0 h, 3 h, 6 h und 22 h Stanzen entnommen (Probenentnahme), histologische Schnitte hergestellt und gefärbt.
Die Präparation des Gingivagewebes stellte jedoch ein Problem dar, da sich das Schleimhautepithel sehr leicht ablöste **(Abb. 25)**.

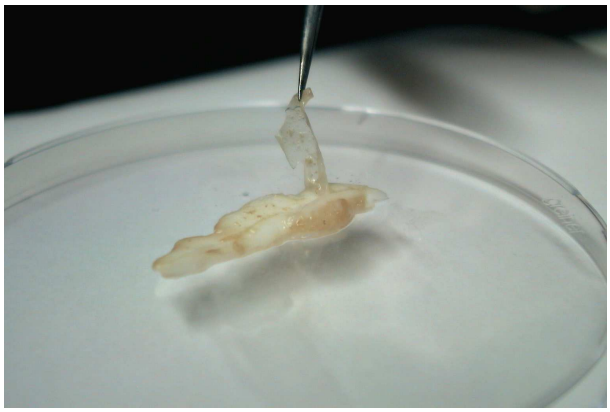


Abb. 25: *Ex vivo* Gingivagewebe (Schwein): abgelöstes Stratum corneum

6.4.1 HE-Färbung – *Ex Vivo* Gingiva – Modell (Schwein)

Aufgrund des sich leicht ablösenden Schleimhautepithels wurde bei verschiedenen Paraffinschnitten exemplarisch eine HE-Färbung durchgeführt, um die Integrität des Gewebes festzustellen.
Dazu wurde *ex vivo* Gingivagewebe (Schwein) unterschiedlich behandelt. So wurde ein Isolat für 1 Minute mit 200 µg/ml Photosan (1000 µl) inkubiert **(Abb. 26 A)**, ein anderes Präparat wurde für 90 Minuten mit 200 µg/ml Photosan (1000 µl) inkubiert und für 10

Minuten (24 J/cm², 40 mW/cm²) bestrahlt **(Abb. 26 B)**. Im Anschluss daran wurden Paraffinschnitte angefertigt und mit Hilfe der HE-Färbung analysiert.
Die HE-Färbung zeigte nach unterschiedlichen Behandlungsmustern des *ex vivo* Gingivagewebes (Schwein) stets eine intakte Gingiva.

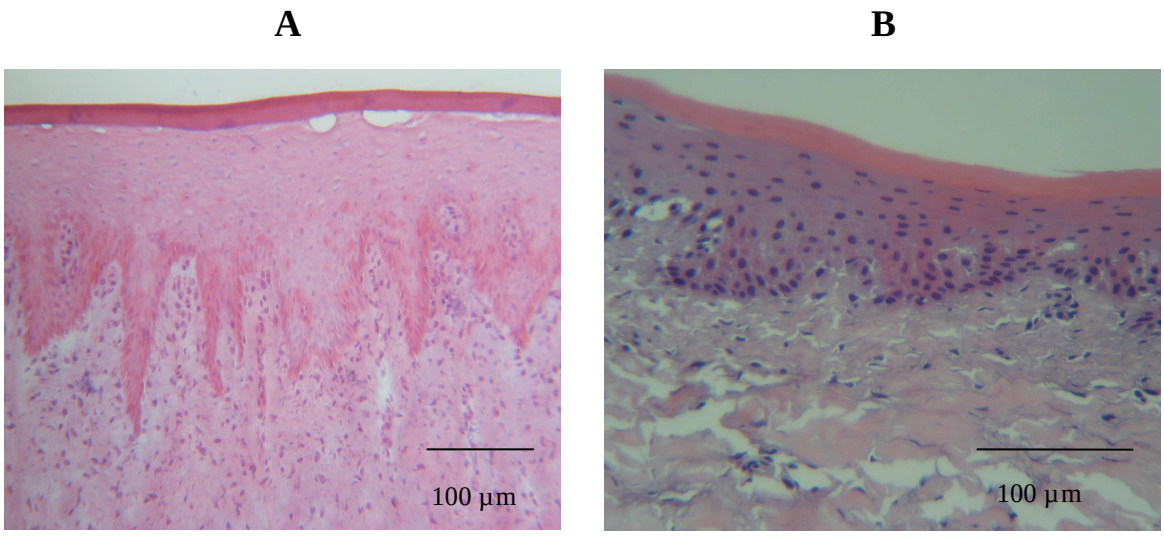


Abb. 26: HE-Färbung vom Paraffinschnitt: *Ex vivo* Gingivagewebe (Schwein). **(A)** Gingivagewebe (Schwein), für 1min mit 200µg/ml Photosan (1000µl) inkubiert. Vergrößerung 20x; **(B)** Gingivagewebe (Schwein), für 90min mit 200µg/ml Photosan (1000µl) inkubiert und für 10min (24J/cm², 40mW/cm²) bestrahlt, Vergrößerung 40x.

6.4.2 Nachweis von Apoptose mit dem *In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein und Tunel POD*

Die Objektträger mit den Gewebeschnitten, die mit dem *In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein und Tunel POD* behandelt wurden, wurden mit dem Lichtmikroskop ausgewertet. Hierzu wurde ein jeweils repräsentatives Areal bei Vergrößerung 40 ausgewählt und sowohl die apoptotischen als auch die lebenden Zellen manuell ausgezählt. Aufgrund der heterogenen Farbstruktur der einzelnen Schnitte war mit dieser Methode keine Auswertung möglich und somit wurde der Nachweis von Apoptose auf diese Art verworfen (Daten nicht gezeigt).

6.4.3 Nachweis von Apoptose mit dem *Fluorescein FragEL ™ DNA Fragmentation Detection Kit*

Da der Nachweis der Apoptose mit dem *In Situ Cell Death Detection Kit* (siehe 6.4.2) nicht möglich war, wurde im weiteren Verlauf dieser Arbeit mit dem *Fluorescein FragEL™ DNA Fragmentation Detection Kit* gearbeitet. Hierbei erfolgte die Auswertung mit dem Fluoreszenzmikroskop.

Wird ein DAPI Filter (330-380 nm) benutzt, so können die Zellkerne der gesamten Zellpopulation sichtbar gemacht werden, eine Unterscheidung zwischen lebenden Zellen und toten Zellen ist jedoch nicht möglich. Verwendet man einen Fluorescein Filter (465-495 nm), so erzeugen positive gefärbte Zellen (tote Zellen) ein helles grünes Signal. Darüber hinaus können aber auch charakteristische morphologische Merkmale zur Interpretation der Ergebnisse herangezogen werden. Bei apoptotischen Zellen findet eine starke Veränderung der Zellform statt, es kommt zur Chromatinkondensation, die Kernmembran rollt sich ein, in der Zellmembran bilden sich Bläschen, schließlich resultiert daraus die Bildung einzelner apoptotischer Körper. Da die apoptotischen Vorgänge nicht synchron verlaufen, sind diese meist nur vereinzelt in großen Zellpopulationen zu finden.

Als Positivkontrolle wurden Schnitte bei Raumtemperatur für 20 min mit 1 µg/µl DNase I (gelöst in 1xTBS/1 mM $MgSO_4$) inkubiert, um die DNA zu fragmentieren und somit positive grün-gefärbte Zellen (apoptotische Zellen) nachzuweisen **(Abb. 27 C/D)**. Bei der Negativkontrolle wurde das TdT Enzym in der Labeling-Reaktion durch dH_2O ersetzt **(Abb. 27 A/B)**.

Die Versuche wurden jeweils einmal durchgeführt und unabhängig voneinander im Abstand mehrerer Monate dreimal ausgewertet. Hierbei wurden die apoptotischen Zellen (grün) und die lebenden Zellen (blau) anhand der oben beschriebenen Merkmale im gesamten Blickfeld manuell ausgezählt und relativ zur Gesamtzahl der Zellen pro Blickfeld als Prozentzahlen berechnet. Anschließend wurden die einzelnen Werte (%) grafisch dargestellt.

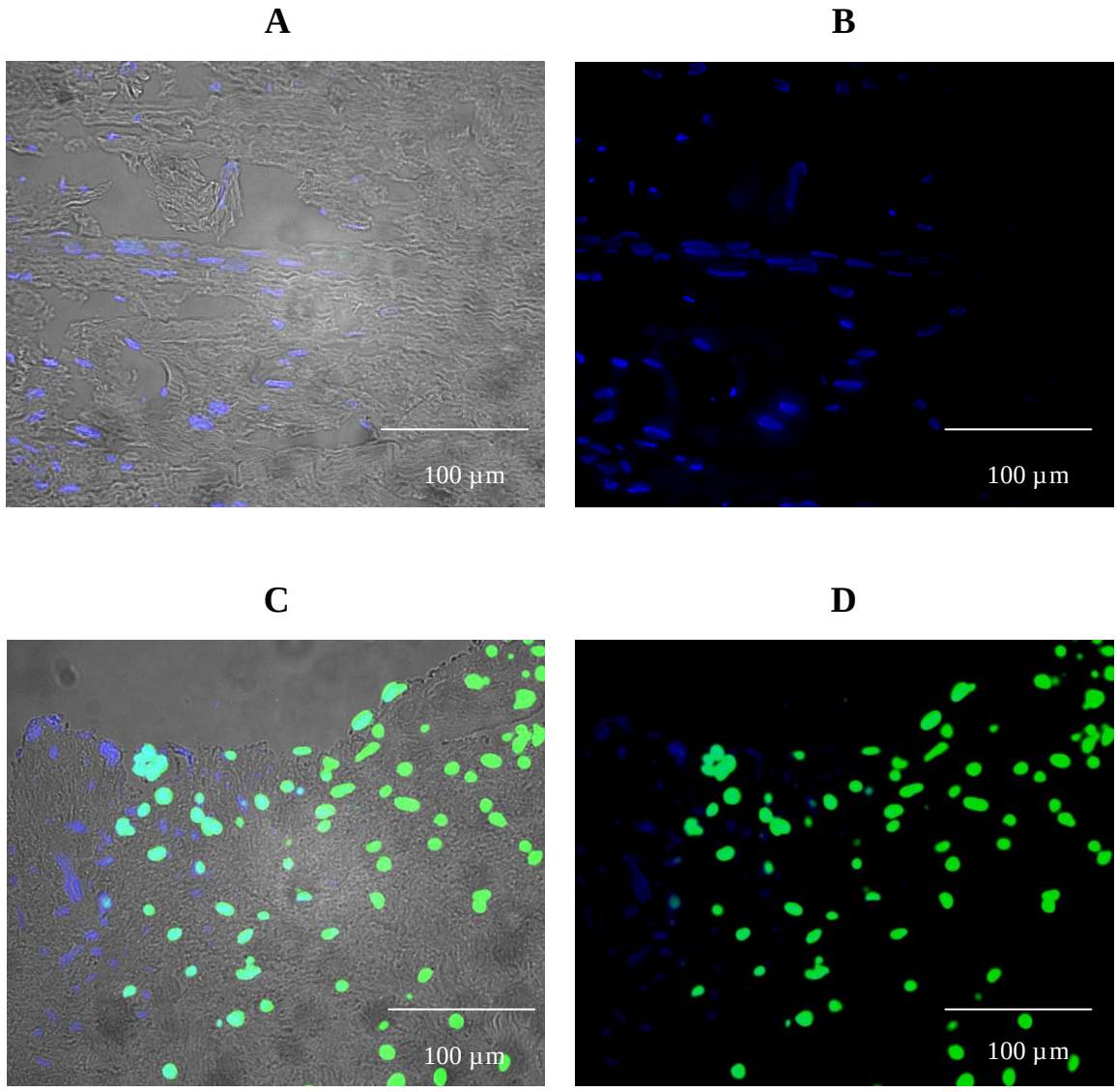


Abb. 27: Nachweis von Apoptose mit dem *Fluorescein FragEL ™ DNA Fragmentation Detection Kit.* Die Auswertung erfolgte mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops. Apoptotische Zellen sind grün gefärbt, während lebende Zellen blau (DAPI-Färbung) dargestellt werden. Für eine Negativkontrolle wurde das TdT Enzym in der Labeling-Reaktion durch dH_2O ersetzt: **(A)** Negativkontrolle als Durchlichtaufnahme; das Gingivagewebe wurde für 90min mit 200µg/ml Photosan (1000µl) inkubiert und für 10min (24J/cm², 40mW/cm²) bestrahlt, Probenentnahme nach 6h; **(B)** Negativkontrolle als Fluoreszenzaufnahme. **(C)** Um eine Positivkontrolle zu erhalten, wurde das Gewebe bei Raumtemperatur für 20min mit 1µg/µl DNase I (gelöst in 1×TBS/1mM $MgSO_4$) inkubiert: Positivkontrolle als Durchlichtaufnahme und Fluoreszenzaufnahme; das Gingivagewebe wurde für 90min mit 200µg/ml Photosan (1000µl) inkubiert und für 10min (24J/cm², 40mW/cm²) bestrahlt, Probenentnahme nach 22h; **(D)** Positivkontrolle als Fluoreszenzaufnahme. Alle Aufnahmen Vergrößerung 400x.

Die Anzahl apoptotischer Zellen nimmt in den Kontrollschnitten, die weder mit Photosan inkubiert noch bestrahlt wurden, mit zunehmender Experimentdauer stetig zu **(Abb. 28 A, Abb. 29 A/B)**. Da dieses Ergebnis auf eine zunehmende Apoptose nach einer längeren Experimentdauer hindeutet, musste dies in den folgenden Versuchsreihen mit-berücksichtigt werden **(Abb. 28 B)**.

Inkubiert man Gingivagewebe vom Schwein mit 1 ml Photosan der Stammkonzentration 2 mg/ml für 5 Minuten, lässt sich im Vergleich zu den mitgeführten Kontrollen eine geringe Steigerung der Apoptose erkennen **(Abb. 28 A, Abb. 29 C/D)**. Berücksichtigt man die durch die Experimentdauer bedingte Apoptose, so findet man hauptsächlich nach 22 Stunden einen Anstieg apoptotischer Zellen **(Abb. 28 B)**. Erfolgt zusätzlich zu der 5-minütigen Inkubation mit 2 mg/ml eine 10-minütige Bestrahlung mit einer Lichtintensität von 24 J/cm² (40 mW/cm²), so ergibt sich erneut eine Zunahme der Apoptose **(Abb. 28 A, Abb. 29 E/F)**, vor allem auch dann, wenn man die Werte abzüglich der Apoptose durch die Experimentdauer (Liegedauer während der Experimente) betrachtet **(Abb. 28 B)**.

Vergleicht man nun die Ergebnisse der einzelnen Versuchsreihen zu den Auswirkungen der unterschiedlichen Bestrahlungszeiten - nur Bestrahlung, keine Inkubation - von 2 Minuten (4,8 J/cm², 40 mW/cm²), 10 Minuten (24 J/cm², 40 mW/cm²) und 30 Minuten (72 J/cm², 40 mW/cm²) in **Abbildung 28 A und B**, so zeigt sich auch hier eine zunehmende Apoptose abhängig von einer steigenden Bestrahlungsintensität und von einer zunehmenden Experimentdauer **(Abb. 30)**. Ein Anstieg apoptotischer Zellen ist hier vor allem in einer Gegenüberstellung der 2-minütigen Bestrahlungsdauer mit längeren Bestrahlungszeiten von 10 oder 30 Minuten unter Berücksichtigung der Liegedauer der Präparate während der Experimente festzustellen. Wohingegen bei einer Bestrahlungsintensität von 4,8 J/cm² anfänglich keine Apoptose festzustellen ist, zeigt sich bei 10- und 30-minütiger Bestrahlung schon nach 0 bzw. 3 Stunden eine hoher Anteil apoptotischer Zellen. Analysiert man die Probenentnahmen nach 6 und 22 Stunden, so spielt vermutlich der längere Aufbewahrungszeitraum eine entscheidende Rolle. Aber auch hier fällt ein deutlicher Unterschied zwischen kurzer Bestrahlungseinheit mit wenigen apototischen Zellen und langer Bestrahlungseinheit mit einem höheren Anteil apoptotischer Zellen auf.

Verringert man die Konzentration von Photosan für die 5-minütige Inkubationszeit des Gingivagewebes von 2 mg/ml auf 200 µg/ml und bestrahlt es ebenfalls für 10 Minuten (24 J/cm², 40 mW/cm²), so erkennt man im Vergleich zu der Versuchsreihe mit 2 mg/ml eine

verringerte Apoptose, jedoch eine Steigerung der Anzahl apoptotischer Zellen im Vergleich zu den Kontrollschnitten und tendenziell ähnliche Werte im Vergleich zu einer alleinigen Inkubation der Zellen mit 2 mg/ml **(Abb. 28 A, Abb. 31 A/B, Abb. 32 A/B)**. Berücksichtigt man die Apoptose, die durch die Dauer des Experiments bedingt ist, so kommt man vor allem nach 6 und 22 Stunden zu einer sichtbaren Apoptose **(Abb. 28 B)**. Inkubiert man das Gingivagewebe nun für 90 Minuten mit einer Konzentration von 200 µg/ml Photosan kombiniert mit einer 10-minütigen Bestrahlung, so findet man weniger apoptotische Zellen als bei einer 5-minütigen Inkubation mit 2 mg/ml Photosan und 10-minütiger Bestrahlung, aber mehr als bei einer 5-minütigen Inkubation mit 200 µg/ml Photosan und 10-minütiger Bestrahlung und mehr als bei einer alleinigen Inkubation der Zellen mit 2 mg/ml Photosan **(Abb. 28 A, Abb. 31 E/F, Abb. 32 C/D)**. Werden die Werte abzüglich der Apoptose der Kontrollschnitte betrachtet, so lässt sich ein allgemeiner Anstieg apoptotischer Zellen nachweisen, mit einer Zunahme nach 22 Stunden **(Abb. 28 B)**. Wird die Bestrahlungszeit bei einer 5-minütigen Inkubation mit 200 µg/ml Photosan von 10 Minuten (24 J/cm², 40 mW/cm²) auf 30 Minuten (72 J/cm², 40 mW/cm²) erhöht, steigt auch die Anzahl apoptotischer Zellen. Im Vergleich zu einer 5-minütigen Inkubation mit 200 µg/ml Photosan kombiniert mit einer 10-minütigen Bestrahlung sowie im Vergleich zu einer 90-minütigen Inkubation mit 200 µg/ml Photosan in Kombination mit einer 10-minütigen Bestrahlung findet man eine deutliche Zunahme der Apoptose **(Abb. 28 A, Abb. 31 C/D)**. Nur bei der Gegenüberstellung mit dem Versuch der 5-minütigen Inkubation mit 2 mg/ml und 10-minütiger Bestrahlung fällt zumindest nach der ersten Probenentnahme eine verringerte Apoptose auf **(Abb. 28 A)**. Jedoch scheint die Verlängerung der Bestrahlungseinheit von 10 auf 30 Minuten im Vergleich zu einer Verlängerung der Inkubationszeit von 5 Minuten auf 90 Minuten ausschlaggebend für eine stärkere Apoptose zu sein. Werden hier die Werte der Kontrollschnitte mit einbezogen, kommt man auf einen deutlichen Anstieg apoptotischer Zellen **(Abb. 28 B)**.

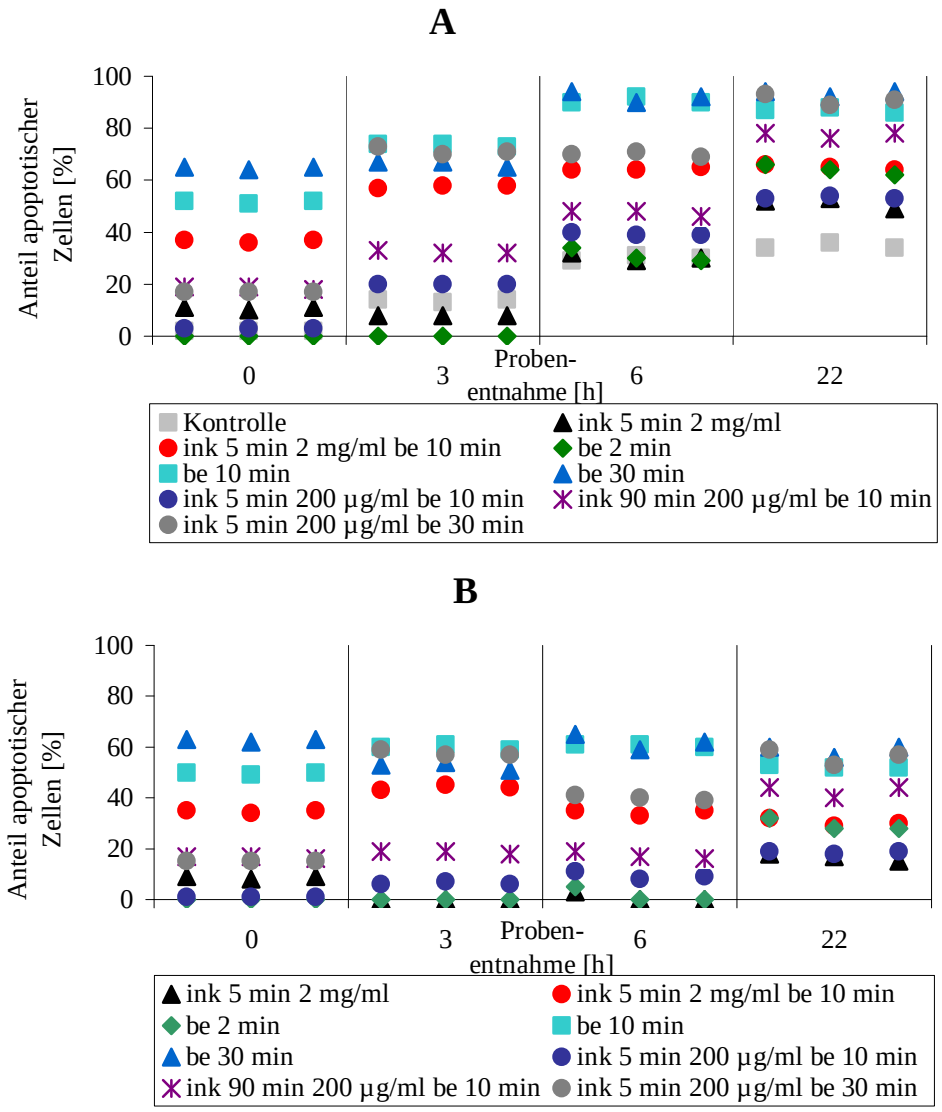


Abb. 28: Toxizität von Photosan gegenüber *ex vivo* Gingivagewebe (Schwein). Nachweis von apoptotischen Zellen mittels *Fluorescein FragEL ™ DNA Fragmentation Detection Kit*. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops. Hellgrau: Kontrolle, keine Inkubation, keine Bestrahlung. Schwarz: Ink für 5min (Photosan 2mg/ml). Rot: Ink für 5min (Photosan 2mg/ml) und Be für 10min (24J/cm², 40mW/cm²). Grün: Be für 2min (4,8J/cm², 40mW/cm²). Hellblau: Be für 10min (24J/cm², 40mW/cm²). Blau: Be für 30min (72J/cm², 40mW/cm²). Dunkelblau: Ink für 5 min (Photosan 200µg/ml) und Be für 10min (24J/cm², 40mW/cm²). Lila: Ink für 90 min (Photosan 200µg/ml) und Be für 10min (24J/cm², 40mW/cm²). Dunkelgrau: Ink für 5 min (Photosan 200µg/ml) und Be für 30min (72J/cm², 40mW/cm²). **(A)** Die Versuche wurden jeweils einmal durchgeführt und unabhängig voneinander im Abstand mehrerer Monate dreimal ausgewertet. Die angegebenen Werte entsprechen Einzelmessungen. Hierbei wurden die apoptotischen Zellen (grün) und die lebenden Zellen (blau) im gesamten Blickfeld manuell ausgezählt und relativ zur Gesamtzahl der Zellen als Prozentzahlen grafisch dargestellt. **(B)** Die hier dargestellten Werte entsprechen den Werten von (A) abzüglich des prozentualen Anteils der Apoptose, die durch die Experimentdauer bedingt ist. Ink: Inkubation, Be: Bestrahlung.

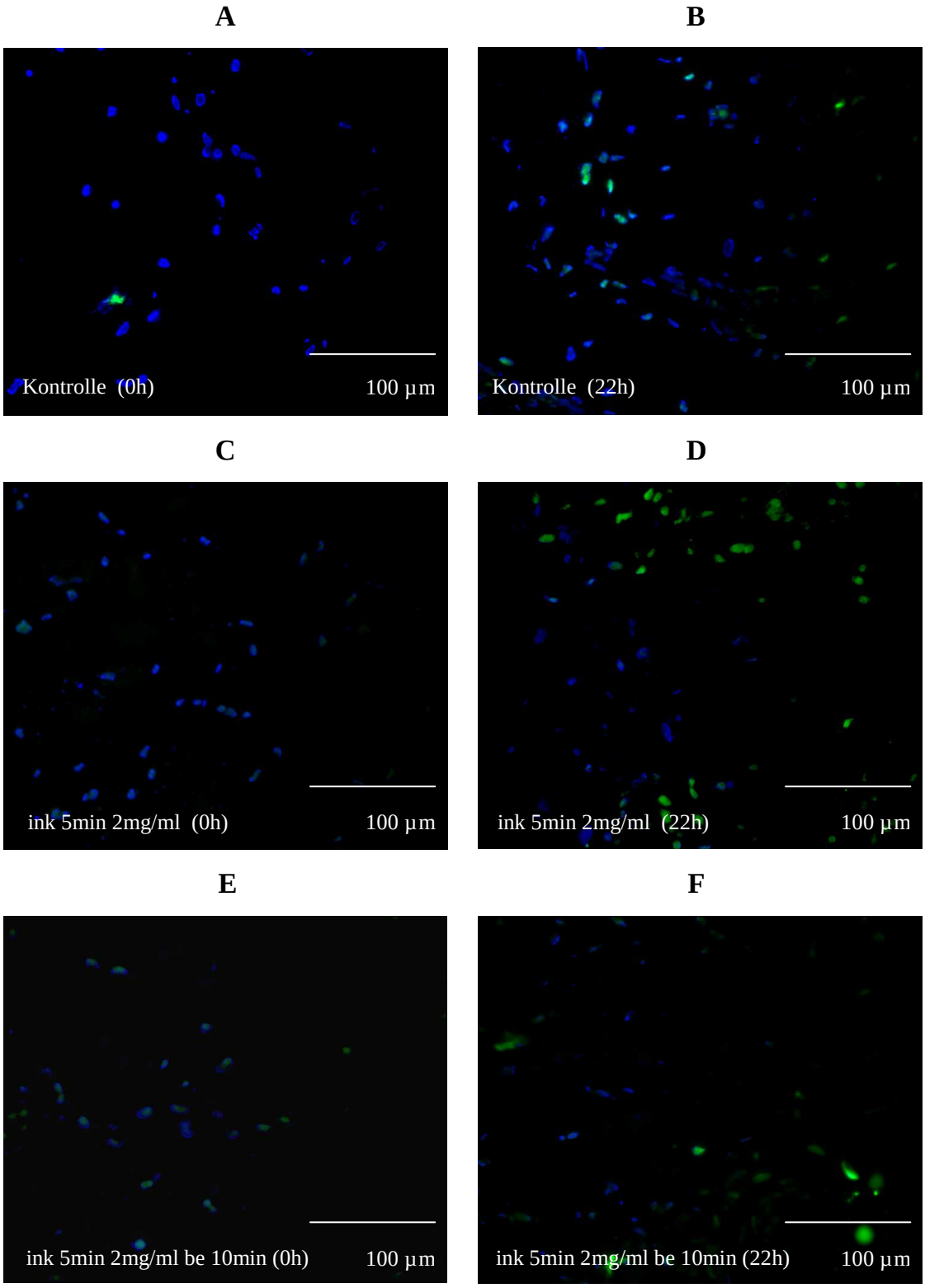


Abb. 29: Nachweis von apoptotischen Zellen mittels *Fluorescein FragEL ™ DNA Fragmentation Detection Kit*. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops. Apoptotische Zellen sind grün gefärbt, während lebende Zellen blau (DAPI-Färbung) dargestellt werden. **(A)** 0h **(B)** 22h: Gingivagewebe: nicht inkubiert, nicht bestrahlt; **(C)** 0h **(D)** 22h: Gingivagewebe: Ink für 5min (Photosan 2mg/ml); **(E)** 0h **(F)** 22h: Gingivagewebe: Ink für 5min (Photosan 2mg/ml) und Be für 10min (24J/cm², 40mW/cm²). Alle Aufnahmen Vergrößerung 400x. Ink: Inkubation, Be: Bestrahlung.

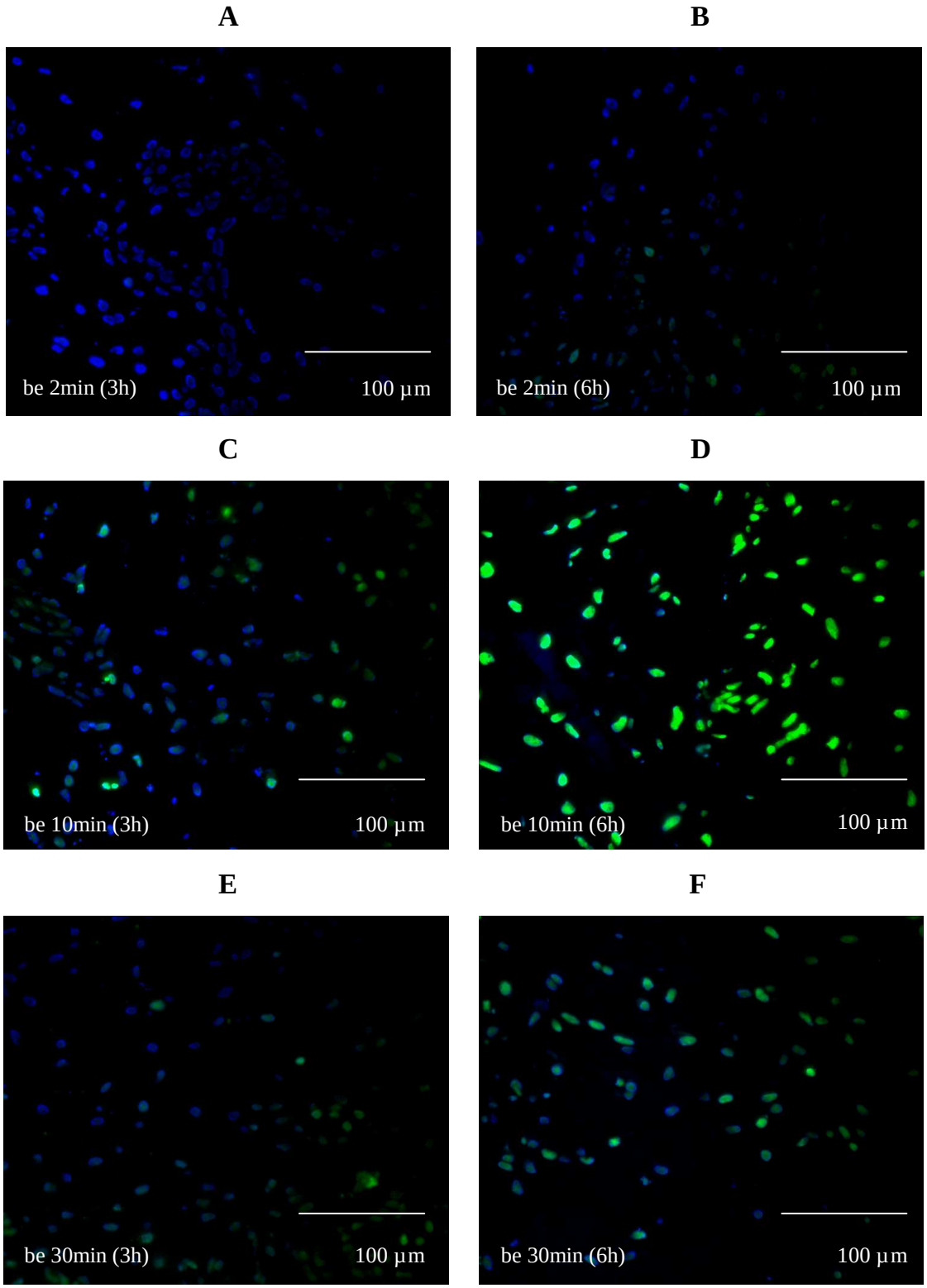


Abb. 30: Nachweis von apoptotischen Zellen mittels *Fluorescein FragEL ™ DNA Fragmentation Detection Kit*. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops. Apoptotische Zellen sind grün gefärbt, während lebende Zellen blau (DAPI-Färbung) dargestellt werden. **(A)** 3h **(B)** 6h: Gingivagewebe: Be für 2min (4,8J/cm², 40mW/cm²); **(C)** 3h **(D)** 6h: Gingivagewebe: Be für 10min (24J/cm², 40mW/cm²); **(E)** 3h **(F)** 6h: Gingivagewebe: Be für 30min (72J/cm², 40mW/cm²). Alle Aufnahmen Vergrößerung 400x. Be: Bestrahlung.

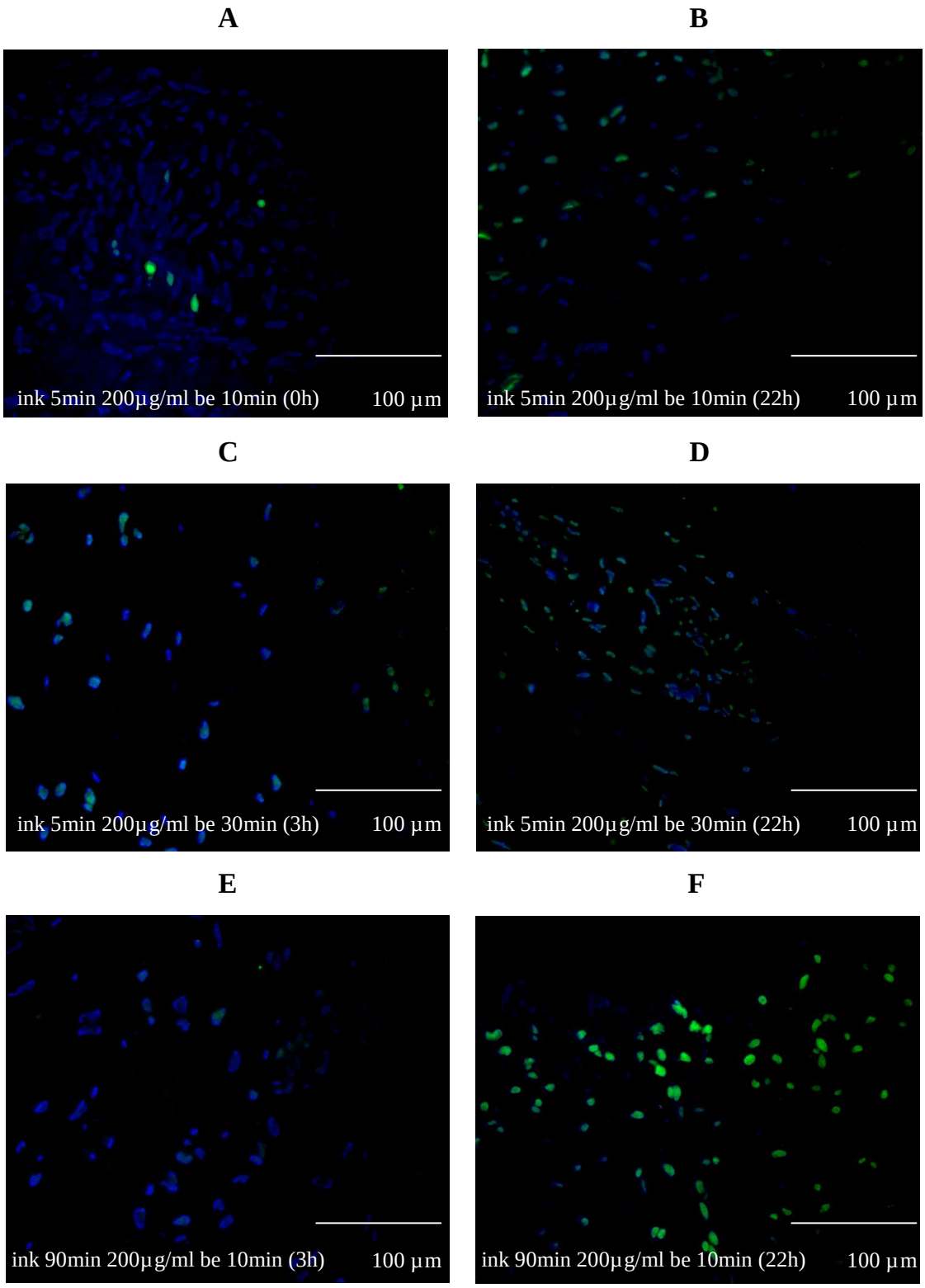


Abb. 31: Nachweis von apoptotischen Zellen mittels *Fluorescein FragEL ™ DNA Fragmentation Detection Kit*. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops. Apoptotische Zellen sind grün gefärbt, während lebende Zellen blau (DAPI-Färbung) dargestellt werden. **(A)** 0h **(B)** 22h: Gingivagewebe: Ink 5min (Photosan 200µg/ml), Be 10min (24J/cm²,40mW/cm²);**(C)** 3h **(D)** 22h**:** Gingivagewebe: Ink 5min (200µg/ml Photosan), Be 30min (72J/cm²,40mW/cm²); **(E)** 3h **(F)** 22h: Gingivagewebe: Ink 90min (200µg/ml Photosan), Be 10min (24J/cm²,40mW/cm²). Alle Aufnahmen Vergr. 400x. Ink: Inkubation, Be: Bestrahlung.

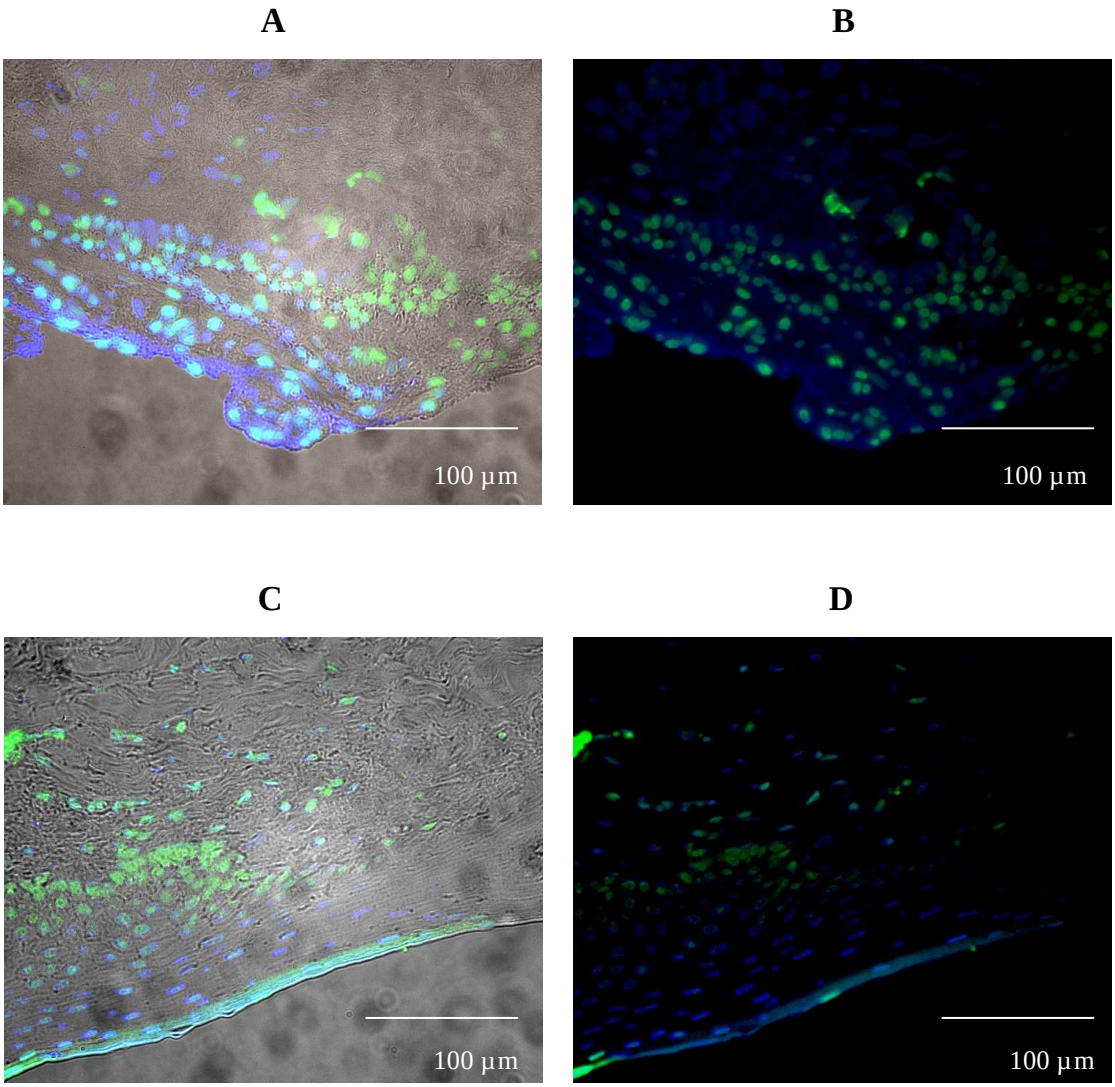


Abb. 32: Nachweis von apoptotischen Zellen mittels *Fluorescein FragEL ™ DNA Fragmentation Detection Kit*. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops. Apoptotische Zellen sind grün gefärbt, während lebende Zellen blau (DAPI-Färbung) dargestellt werden. **(A)** Gingivagewebe: Ink für 5min (Photosan 200µg/ml) und Be für 10 min (24J/cm², 40mW/cm²) nach 22h; Durchlichtaufname und Fluoreszenzaufnahme; **(B)** Gingivagewebe: Ink für 5min (Photosan 200µg/ml) und Be für 10min (24J/cm², 40mW/cm²) nach 22h; Fluoreszenzaufnahme; **(C)** Gingivagewebe: Ink für 90min (Photosan 200µg/ml) und Be für 10min (24J/cm², 40mW/cm²), 6h; Durchlichtaufnahme und Fluoreszenzaufnahme; **(D)** Gingivagewebe: Ink für 90min (Photosan 200µg/ml) und Be für 10min (24J/cm², 40mW/cm²), 6h; Fluoreszenzaufnahme. Alle Aufnahmen Vergrößerung 400x. Ink: Inkubation, Be: Bestrahlung.

7 Diskussion

7.1 Kultivierungsmethode primärer humaner Gingivafibroblasten

Der vorgestellte Versuchsaufbau zeigte, dass die Kultivierung von primären humanen Gingivafibroblasten prinzipiell möglich ist. Hierbei wurde die Medium-Gewebe-Mischung in der Zellkulturflasche nach der Dissoziation mit dem Medi-Apparat unter sterilen Bedingungen angetrocknet, was dazu führte, dass die Zellen am Boden der Zellkulturflasche adhärierten.

Jedoch war es in der vorliegenden Arbeit problematisch, aus einem einzigen Patienten-Isolat eine ausreichende Menge an primären Gingivafibroblasten zu gewinnen, um mit diesen reproduzierbare Experimente durchführen zu können. So wurden z.B. für die Photo-toxizitätsversuche mit den NHDF-Zellen für ein Experiment (2 x 96-Mikrotiterplatten) je ca. 1,4 x 10^6 Zellen benötigt. Für weitere Kultivierungsversuche wäre es daher sinnvoll, mehr Ausgangsmaterial zu verwenden, welches mit dem Medi-Apparat zu einem Zellbrei dissoziiert wird, um somit eine größere Zellmasse zu gewinnen, die in Kultur genommen werden kann.

7.2 Zelluläre Aufnahme und Lokalisation

Die Aufnahme von Photosan bei der untersuchten *ex vivo* Gingiva (Schwein) beschränkte sich auf das Stratum corneum, eine Penetration in tiefer liegende Schichten der Gingiva konnte nicht detektiert werden. Möglicherweise können photoreaktive Substanzen tiefer eindringen, jedoch ist das mit dem unter den gegebenen Versuchsbedingungen verwendeten Nachweisverfahren nicht festzustellen.

Da Photosan als Poly-Hämatoporphyrin aber ein Molekulargewicht von ca. 1135 g/mol hat, zeigt sich nach der „500-Dalton-Regel“ auch ein schlechteres Penetrationsverhalten als für kleinere Moleküle. Die „500-Dalton-Regel“ postuliert eine geringe bzw. unzureichende Hautpenetration für Moleküle mit einem Molekulargewicht von mehr als 500 Da [8]. Für Cyclosporin (MW 1202 g/mol) mit ungefähr identischer Größe konnte gezeigt werden, dass es nicht in der Lage ist, genügend tief in die Haut einzudringen [8]. Demgegenüber zeigt 5-ALA mit einem geringeren Molekulargewicht von ca. 168 g/mol sehr gute Penetrationseigenschaften. Benutzt man Penetrationsverstärker wie z.B. Ethanol, so ist 5-

ALA sogar in der Lage, bis zur Basalmembran einzudringen [61]. Betrachtet man aber den Sicherheitsaspekt einer Anwendung von Photosensibilisatoren in der Mundhöhle z.B. bei der Behandlung von Karies und Parodontitis, so würde Photosan im Vergleich zu kleineren Molekülen einen klaren Vorteil zeigen. Da Photosan nicht über das Stratum corneum hinaus in die tiefer liegenden Schichten der Gingiva eindringt, ist der Farbstoff leichter wegzuspülen und würde somit nicht toxisch auf das darunter liegende gesunde Gewebe wirken.

Mittels Fluoreszenzmikroskopie konnten bei den NHDF-Zellen unterschiedliche Lokalisationsmuster für Photosan abhängig von der Inkubationsdauer ermittelt werden. Die Co-Lokalisation von Photosan mit Lyso-Tracker® Green zeigte nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden eine Lokalisation von Photosan in den Lysosomen, wohingegen nach einer Inkubationszeit von 5, 15 und 90 Minuten, bzw. nach einer 5-minütigen, 15-minütigen, 90-minütigen und 24-stündigen Inkubation mit Rhodamin 6G keine Co-Lokalisation in den Lysosomen bzw. Mitochondrien festgestellt werden konnte.

Bei dem Photosensibilisator CTP1, der ebenfalls ein Porphyrinderivat darstellt, wurde bei einer gleichzeitigen Färbung mit dem Farbstoff Lyso-Tracker® Green nach einer 4-stündigen Inkubation eine Co-Lokalisation in den Lysosomen festgestellt, während eine gleichzeitige Färbung mit Rhodamin 6G keine Co-Lokalisation nachweisen konnte [59]. Andere Photosensibilisatoren wie z.B. XF70 und XF73 hingegen zeigten nach einer 4-stündigen Inkubation mit Rhodamin 6G eine Co-Lokalisation in den Mitochondrien, jedoch keine Co-Lokalisation in den Lysosomen nach gleichzeitiger Färbung mit Lyso-Tracker® Green [59].

7.3 Phototoxizitätsversuche

Unter Anwesenheit von Licht und Sauerstoff zeigen Farbstoffe, die vom Porphyrin abstammen, wie z.B. CTP1, XF70 oder mTHPC, signifikante photosensibilisierende Effekte, sowohl gegenüber prokaryotischen Zellen als auch gegenüber Eukaryonten [57, 59, 80]. Die Herausforderung in der antibakteriellen photodynamischen Therapie im Bereich der Mundhöhle stellt die Suche nach einem geeigneten therapeutischen Fenster dar. So sollten im Rahmen dieser Arbeit Bedingungen wie Inkubationsdauer, Lichtdosis (mW/cm^2) und Konzentrationen des verwendeten Photosensibilisators Photosan definiert werden, bei denen eukaryonte Zellen der Mundhöhle absterben. In einem weiteren Schritt

muss nun die Phototoxizität des Photosensibilisators gegenüber oralen Bakterien bestimmt werden, um abschätzen zu können, ob ein therapeutisches Fenster vorliegt, in dem nur Bakterien abgetötet werden, ohne dem umliegenden gesunden Gewebe zu schaden.
Die Entwicklung eines solchen Systems zur photodynamischen Inaktivierung von oralen Bakterien, die für parodontale Erkrankungen verantwortlich sind, ist mit anderen Farbstoffen wie z.B. Toluidinblau und Erythrosin bereits erfolgreich untersucht worden [87, 108]. Auch eine mögliche alternative Behandlung der oropharyngealen Candidiasis, verursacht durch Candida albicans, mittels PDT wird beschrieben [21].

7.3.1 Photosensibilisatoren

Damit eine Substanz als Photosensibilisator wirken kann, muss sie folgende Anforderungen erfüllen:

- selektive Anreicherung des PS im Zielgewebe
- geeignete Pharmakokinetik/Penetrationseigenschaften
- geringe Photosensibilisierung des gesunden Gewebes („therapeutisches Fenster“)
- geringe Dunkeltoxizität
- hohe Triplettquantenausbeute (Singulettsauerstoffproduktion)
- keine Mutagenität, Kanzerogenität und Teratogenität

Unterschieden werden systemisch anzuwendende Photosensibilisatoren, wie z.B. Photosan bzw. HpD von topisch einsetzbaren Substanzen, wie 5-ALA oder Toluidinblau-O.

Vergleich von Photosan mit 5-ALA

Vergleicht man die Photosensibilisatoren Photosan bzw. HpD mit dem Farbstoff 5-ALA, so erkennt man als klaren Vorteil von Photosan eine direkte photoaktive Wirksamkeit ohne längere Inkubationsdauer. 5-ALA hingegen, ein Vorläufer von Protoporphyrin IX (PpIX) in der Hämbiosynthese, muss erst zu PpIX umgewandelt werden, ehe es photodynamisch wirksam werden kann. Hier besteht in der sehr niedrigen Bioverfügbarkeit von 5-ALA der größte Nachteil. Bestimmte Zelltypen können PpIX nur synthetisieren, wenn sie adäquaten Konzentrationen von 5-ALA ausgesetzt sind. Dass sowohl höhere Dosen [56, 96] als auch

längere Inkubationszeiten in Kauf genommen werden müssen, liegt an dem hydrophilen Charakter des 5-ALA-Moleküls, der zu einer erschwerten Penetration durch biologische Barrieren mit lipophilen Eigenschaften wie dem Stratum corneum führt.
Ein wesentlicher Nachteil von Photosan und HpD liegt in einer langen Halbwertszeit [22] sowie in einer Anreicherung dieser Substanzen nach systemischer Anwendung in Leber, Milz, Nieren und der Haut [46]. Bei 5-ALA ist eine kurze Halbwertszeit [45] und die Möglichkeit zur lokalen Applikation ohne schwerwiegende systemische Nebenwirkung als Vorteil zu nennen. 5-ALA induziertes PPIX wird u.a. zur Behandlung epithelialer Dysplasien, Präkanzerosen, oberflächlicher Basalzellkarzinome, Plattenepithelkarzinome und aktinischer Keratosen eingesetzt, sowie für die Detektion von Tumoren in der Mundhöhle verwendet [50, 53].

Toluidinblau-O (TB-O)

Toluidinblau-O, ein Thiazin-Farbstoff mit antibakteriellen Eigenschaften [7, 87], ist eine seit Jahrzehnten klinisch erprobte Substanz, deren Hauptindikation sowohl in der Behandlung der Methämoglobinämie [17] als auch in der intravitalen Färbung von Magen- und Cercixkarzinomen [26] bzw. in der Anfärbung präkanzeröser Läsionen im Rahmen der Diagnostik von Mundschleimhauttumoren liegt [27, 64]. TB-O besitzt darüber hinaus aber auch eine photodynamische Potenz. So beobachteten SOUKOS et al. [87] in einer Studie zur Untersuchung der photodynamischen Effekte von TB-O eine konzentrationsabhängige Dunkeltoxizität gegen orale Keratinozyten und Fibroblasten *in vitro*, aber Sie entdeckten auch die Möglichkeit eines therapeutischen Fensters in der Behandlung parodontaler Erkrankungen. Folgt man dieser Untersuchung, so findet sich bei TB-O im Vergleich zu Photosan eine wesentlich höhere dunkeltoxische Wirkung. Andere klinische Untersuchungen zeigten, dass TB-O *in vivo* in einer 2000-mal höheren Konzentration ohne Nebenwirkungen in der Diagnose prämaligner oraler Läsionen appliziert werden konnte [63].
Nach REDMAN et. al [78] besitzt TB-O keine karzinogene Wirkung, DUNIPACE et. al [25] entdeckten jedoch einen mutagenen Effekt. In einer anderen Studie konnte nachgewiesen werden, dass TB-O einen signifikanten Anstieg an Chromosomenschäden induziert [4].

7.3.2 Lichtquelle

Zur Photosensibilisierung wurde die Lampe PDT 1200 von Waldmann mit einem Emissionsspektrum im orange-roten Spektralbereich (600-750 nm) und einer konstanten Bestrahlungsstärke von 40 mW/cm² (tatsächlich applizierte Energiedosis) verwendet. Dieses Anregungsspektrum ist sinnvoll, da das Absorptionsmaximum von Photosan bei ca. 400 nm (Soretbande) liegt bzw. die vier Q-Banden von Photosan im Bereich von 500-630 nm liegen.
Im Wellenlängenbereich von UV bis ins tiefe Infrarot nimmt die Penetrationstiefe des Lichts im Gewebe mit höherer Wellenlänge zu. Aus diesem Grund erfolgt die Anregung eines Photosensibilisators generell bei der längstmöglichen Wellenlänge. Eine Behandlung mit HpD wird deshalb im Allgemeinen bei einer Lichtwellenlänge von ca. 630 nm durchgeführt. Solches Licht entspricht einem weit im roten Spektralbereich liegenden Absorptionsmaximum. Bei solchen Wellenlängen kann eine wirkungsvolle Penetration des Lichts erreicht werden.

7.3.3 Toxizität von Photosan gegenüber NHDF-Zellen nach Bestrahlung

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Photosensibilisator Photosan im Rahmen der photodynamischen Reaktion fähig ist, unter bestimmten Bedingungen toxisch gegenüber NHDF-Zellen zu wirken. Die Ergebnisse verdeutlichen, dass die Photosensibilisierung der dermalen Fibroblasten mittels Photosan sowohl abhängig von der Konzentration des Farbstoffes als auch von der Dauer der Inkubation und der Intensität der Bestrahlung ist. Je länger die Inkubationsdauer, je höher die Farbstoffkonzentration und je stärker die Bestrahlungsintensität ist, desto höher ist die phototoxische Wirkung zu bewerten. Definiert man ein therapeutische Fenster für die antimikrobielle photodynamische Inaktivierung, so ist es erforderlich, Bedingungen festzulegen, die maximal erreicht werden dürfen, um Bakterien abzutöten, ohne dabei eukaryonten Zellen zu schaden.
Bei niedriger Inkubationsdauer von 5 Minuten und geringer Bestrahlungszeit von 2 Minuten liegt die Konzentration von Photosan, bei der mehr als 50% der Zellen absterben, noch bei 50 µg/ml, bei 5-minütiger Inkubation und 30-minütiger Bestrahlung fällt sie bereits auf 0,5 µg/ml Photosan. Wählt man die in der vorliegenden Arbeit maximal

untersuchten Bedingungen einer 90-minütigen Inkubation und 30-minütigen Bestrahlung (72 J/cm², 40 mW/cm²), so sinkt die Überlebensrate bereits bei minimalen Farbstoffkonzentrationen von 0,1 µg/ml auf weniger als 50%.
Zusätzlich wurde die Abhängigkeit von der Inkubationsdauer mittels Fluoreszenzmikroskopie bestätigt, wobei eine steigende intrazelluläre Akkumulation des Farbstoffes in Abhängigkeit einer zunehmenden Inkubationszeit nachgewiesen wurde. Zum anderen wurde mit Hilfe eines spektroskopischen Nachweisverfahrens gezeigt, dass Photosan von den NHDF-Zellen umso stärker aufgenommen wird, je länger inkubiert wird.
Der anfängliche Zuwachs der Zellen bei geringer Bestrahlungsdauer von 2 Minuten und niedrigen Farbstoffkonzentrationen bis zu 1 µg/ml könnte auf immunregulatorische Prozesse im Rahmen der „low-dose“ PDT hindeuten [74, 103, 110]. Bei einer „low-dose“ PDT wird eine der drei Komponenten Licht, Sauerstoff oder Photosensibilisator in reduzierter Form zur Verfügung gestellt, so dass die meisten Zellen nicht sofort absterben, sondern unter Aktivierung transduktorischer Prozesse weiter wachsen. Hier in diesem Fall sind es die niedrigen Photosensibilisatorkonzentrationen, die während der Bestrahlung nicht ausreichend toxische reaktive Sauerstoffmoleküle erzeugen und somit eher stimulierend als abtötend wirken. Unterstützt wird diese Beobachtung durch eine Studie von ZHANG et al [110], in der Gehirne von athymischen Mäusen im Rahmen einer „low-dose“ PDT mit 2 mg/kg Photofrin behandelt und mit einer Lichtdosis von nur 2 oder 4 J/cm² bestrahlt wurden (vgl. „high-dose“ PDT für Tumortherapie: ~ 50-100 J/cm²). Dabei zeigte sich, dass sowohl die Anzahl immunreaktiver Zellen signifikant zunahm, als auch die Expression des Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) und somit der endothelialen Zellproliferation. Bei dem Wachstumsfaktor VEGF handelt es sich um ein Signalmolekül, das u.a. in der Angiogenese (Ausbildung neuer Gefäßstrukturen) seine Wirkung entfaltet und dort die zur Bildung der Gefäßwände notwendigen Endothelzellen, Perizyten und glatten Muskelzellen stimuliert. Die Angiogenese spielt im adulten Leben eine wichtige Rolle etwa als Reparatur-Prozess bei der Wundheilung.

7.3.4 *Ex vivo* Gingiva – Modell (Schwein)

Um die Phototoxizität von Photosan in einem mehr angewandten Modell zu untersuchen, wurde das in der vorliegenden Arbeit verwendete *ex vivo* Schweinekiefermodell gewählt, da es der Situation *in vivo* sehr nahe kommt. Bei diesem Modell kam bukkales

Gingivagewebe von 6 Monate alten Hausschweinen zum Einsatz. In der Dermatologie wird z.B. ein in Hepes-Agar eingebettetes *ex vivo* Schweinevollhautmodell (Rückenhaut) verwendet, um Phototoxizitätsversuche mit dem Photosensibilisator 5-ALA durchzuführen [61]. Hinsichtlich der Permeabilität für menschliches Gewebe bzw. solches vom Schwein gibt es keine signifikanten Unterschiede, bis auf den Bereich des Mundbodens **(Tabelle 2)**, der bei menschlichem Gewebe durchlässiger scheint [52], so dass das in der Arbeit beschriebene *ex vivo* Schweinekiefermodell prinzipiell auf den Menschen übertragen werden kann.

Mensch	**Kp**	**Schwein**	**Kp**
Haut	44 ± 4	Haut	62 ± 5
bukkale Mucosa	579 ± 16	bukkale Mucosa	634 ± 19
Mundboden	973 ± 33	Mundboden	808 ± 23

Tabelle 2: Permeabilität der Mundschleimhaut und der Haut von Mensch und Schwein Permeabilitätskonstante Kp in cm/min × 10^{-7} [52]

Als problematisch bei dem angewandten Testverfahren ist die unterschiedlich lange und nur schwer kontrollierbare Liegedauer (ca. 4-6 Stunden) der einzelnen Schweinekieferhälften vor der Durchführung der Versuche zu bewerten. So konnte keine exakte Angabe der Metzgereien über den Zeitpunkt der Schlachtung bzw. über die nachfolgende Aufbewahrung bis zur Abholung der Schweinekieferhälften erfolgen.
Eine weitere Herausforderung stellte die Präparation des Gingivagewebes dar, da sich das Schleimhautepithel sehr leicht ablöste. Dies ist vermutlich ebenfalls auf die Liegedauer der Schweinekieferhälften zum einen vor Versuchsbeginn in der Metzgerei und zum anderen während der Dauer der Experimente zurückzuführen. So konnte nicht garantiert werden, dass die oberflächliche Keratinschicht als Schutz- und Penetrationsbarriere [14] bei allen Experimenten vorhanden war. Allerdings zeigten die exemplarische HE-Färbung und die Fluoreszenzaufnahmen zum einen ein intaktes Stratum corneum und zum anderen keine Penetration von Photosan über das Stratum corneum hinaus. Da die Penetration der Substanzen normalerweise in den keratinisierten Bereichen der Mundschleimhaut aufgrund

der durch das Stratum corneum bedingten Retention erschwert wird und die Penetrationsrate an der Mundschleimhaut eben neben der PS-Konzentration und der Applikationszeit überwiegend von der Barrieredichte abhängig ist [89-94], müsste eine dadurch bedingte Beeinflussung der Ergebnisse in weiteren Experimenten untersucht werden.

7.3.5 Nachweis der Apoptose

Aufgrund der heterogenen Farbstruktur der einzelnen Schnitte war mit dem *In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein und Tunel POD* keine präzise und standardisierbare Auswertung möglich und somit wurde der Nachweis von Apoptose auf diese Art verworfen. Die Auswertung der Experimente mit dem *ex vivo* Gingivagewebe wurde mit Hilfe des *Fluorescein FragEL ™ DNA Fragmentation Detection Kit* durchgeführt, das zum Nachweis der Apoptose verwendet wird [3, 66]. Dieses Verfahren kann als geeignet betrachtet werden, da mit Hilfe eines Fluorescein Filters (465-495 nm) eine einfache Unterscheidung zwischen apoptotischen (also positiv gefärbten, grünen Zellen) und lebenden Zellen möglich ist.

7.3.6 Toxizität von Photosan gegenüber *ex vivo* Ginigivagewebe (Schwein) nach Bestrahlung

Durch die lange Liegedauer (ca. 4-6 Stunden) der Schweinekieferhälften vor der Durchführung der Versuche lassen sich vermutlich auch gewisse Unterschiede der Ergebnisse erklären. So erzeugte eine alleinige Bestrahlung der Gingivapräparate für 10 Minuten einen höheren Anteil apoptotischer Zellen als in einem Versuch, in dem die gleiche Bestrahlung mit einer 5-minütigen Inkubation mit 2 mg/ml Photosan bzw. 200 µg/ml kombiniert wurde. Ebenfalls führte eine alleinige Bestrahlung der Präparate für 30 Minuten zu einer wesentlich stärkeren Apoptose, als wenn die Bestrahlung mit einer 5-minütigen Inkubation mit 200 µg/ml Photosan durchgeführt wird. Bei der Gegenüberstellung der beiden Bestrahlungsfenster von 10 und 30 Minuten fiel weiterhin auf, dass eine deutliche Zunahme der Apoptose bei Steigerung der Bestrahlung ausgeblieben ist.
Betrachtet man das Kontrollpräparat, dass nach 22 Stunden bereits eine Apoptose von ca. 30% aufwies und berücksichtigt diesen Apoptoseanteil, verursacht durch die Experiment-

dauer, bei anderen Bedingungen wie bei der 5-minütigen Inkubation mit 2 mg/ml Photosan oder der 5-minütigen Inkubation mit 200 µg/ml Photosan kombiniert mit einer 10-minütigen Bestrahlung oder der 2-minütigen Bestrahlung, so lässt sich feststellen, dass die durch die gewählten Bedingungen erzielte zusätzliche Apoptose nur sehr gering steigt. Dies deutet darauf hin, dass der apoptotische Effekt bei niedrig gewählten Bedingungen unwesentlich ist und hier durch die Versuchsdauer zu erklären ist. Steigen jedoch die Farbstoffkonzentrationen bzw. die Bestrahlungszeiten an, kommt es auch zu einer deutlichen Zunahme der Toxizität. Dies scheint tendenziell die Ergebnisse der Phototoxizitätstests mit Photosan gegenüber NHDF-Zellen zu bestätigen, wobei die *ex vivo* Präparate insgesamt mit höheren Farbstoffkonzentrationen behandelt wurden.

7.4 Anwendung der PDT in der Mundhöhle mit dem Helbo-System

In der vorliegenden Arbeit wurden Bedingungen wie Lichtdosis (mW/cm²), Inkubationsdauer und Konzentrationen des Photosensibilisators Photosan aufgezeigt und definiert, unter denen NHDF-Zellen bzw. Gingivafibroblasten (Schwein) überleben können bzw. absterben. Ziel einer photodynamischen Behandlung einer Erkrankung der Mundhöhle wie z.B. Parodontitis muss aber das Vorhandensein eines therapeutischen Fensters sein, d.h. dass nur die assoziierten Bakterien abgetötet werden, ohne dem gesunden umliegenden Gewebe zu schaden.

Ein bereits im klinischen Einsatz befindliches Modell stellt das Helbo-System (HELBO Photodynamic Systems GmbH & Co KG, Grieskirchen, Österreich) dar. Obwohl bei diesem System nicht der in der Arbeit verwendete Photosensibilisator Photosan, sondern ein Phenothiazinchlorid verwendet wird, bzw. die Anwendung dieses Systems in der Mundhöhle erfolgt und somit nicht mit den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Bedingungen übereinstimmt, wird das Helbo-System beschrieben, um einen Eindruck zu verschaffen, wie ein Modell zur Durchführung der Photodynamischen Therapie in der Mundhöhle aussehen kann, bzw. welche klinischen Ergebnisse damit zu erzielen sind. Untersuchungen, wie sie in dieser Arbeit durchgeführt worden sind, liegen zu diesem System nicht vor, so dass kein Vergleich und somit eine abschließende Beurteilung möglich erscheint.

Das Helbo-System ist nach Angaben des Herstellers ein Therapiesystem zur Durchführung der antimikrobiellen Photodynamischen Therapie (aPDT) in der Mundhöhle bei

Parodontitis, Periimplantitis und Wurzelkanalbehandlungen. Bei einer parodontalen Erkrankung erfolgt zunächst eine professionelle Reinigung der Zahnfleisch- und Knochentaschen, um weiche und harte Beläge zu entfernen und die Keimzahl zu reduzieren. Anschließend wird eine Farblösung des Photosensibilisators (Phenothiazinchlorid, HELBO® Blue Photosensitizer) in die Zahnfleisch- und Knochentasche appliziert, der sich an die Zellwand von Bakterien anheftet und diese anfärbt. Danach kommt es durch die Belichtung mit einem Diodenlaser (660 nm, 100 mW) zur Bildung von aktivem Sauerstoff und zur dadurch bedingten Zerstörung der Bakterien.
Zum jetzigen Zeitpunkt wird allerdings empfohlen, dieses Therapiesystem nicht als alternative Behandlungsmethode bei parodontalen Läsionen zu verwenden, sondern unterstützend, bzw. im Rahmen parodontalprophylaktischer Maßnahmen und bei der Behandlung initialer Parodontitiden. Auch eine Anwendung dieses Systems in schwer zugänglichen Bereichen scheint sinnvoll. Über langfristige Wirkungen des Helbo-Systems, mikrobiologische Effekte und einen evtl. Verzicht auf antibiotisch wirksame Substanzen liegen derzeit noch keine klinischen Studien vor [10].
Untersuchungen gibt es aber z.B. zur unterstützenden Anwendung der aPDT. In einer Studie hierzu wurde eine Gruppe von 20 Patienten mit chronischer Parodontitis einer konventionellen Therapie mittels mechanischer Kürettage unterzogen. Patienten in der Testgruppe wurden in 2 Quadranten zusätzlich mit einer antimikrobiellen photodynamischen Therapie behandelt. Die Werte für Sondierungstiefe, Attachment und BOP (Bleeding on probing) sind 3 Monate danach in beiden Gruppen signifikant zurückgegangen, jedoch in der Gruppe mit zusätzlicher aPDT wesentlich stärker [11].
In einer anderen Studie wurden 10 Patienten mit aggressiver Parodontitis entweder konventionell durch mechanisches Scaling und Root Planing oder mit einer aPDT unter Verwendung des Helbo-Systems behandelt [19]. In beiden Gruppen verlief die postoperative Wundheilung komplikationslos, was darauf hindeutet, dass die aPDT ohne Schwierigkeiten wie Abszessbildung oder Infektion toleriert wird. In beiden Gruppen kam es 3 Monate nach der Behandlung u.a. zu signifikant reduzierten Werten für die Sondierungstiefe und zu einem signifikanten Gewinn an Attachment, jedoch ohne signifikante Unterschiede zwischen beiden Gruppen. In verschiedenen Untersuchungen zu einer „Standardtherapie“ (manuelle Kürettage und kombinierte Antibiotikagabe) bei aggressiver Parodontitis wurde nachgewiesen, dass diese Behandlungsmethode jedoch nur durch mehrmaliges und zeitaufwändiges „Nacharbeiten“ zu langfristig zufrieden stellenden

Ergebnissen führt. Da manuelles Arbeiten zudem oftmals an schwer zugänglichen Stellen stattfindet und in einigen Fällen auch Bakterien wie z.B. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* trotz manueller Kürettage und Reinigung in der Tasche verbleiben, stellt das Helbo-System in diesen Fällen eine unterstützende, zeitsparende und für den Behandler einfach anzuwendende Alternative mit hoher Effizienz dar [19]. In Tierversuchen mit Ratten und Hunden wurde zudem nach histologischen Untersuchungen des Gewebes gezeigt, dass es nach einer aPDT zu keinen Nebenwirkungen wie Ulzerationen oder Entzündungen des benachbarten Gewebes kommt. Der Vorteil von einer aPDT liegt aber vor allem in der lokalisierten und nicht-invasiven Anwendbarkeit, außerdem ist eine Ausbildung von Resistenzen unwahrscheinlich, da die Aktivität gegen Bakterien durch reaktive Spezies wie Hydroxylradikale zustande kommt. Als angenehm für den Patienten ist zudem der Verzicht auf ein Anästhetikum zu erwähnen [19].

8 Zusammenfassung

Vielseitige Schädigungen des gesunden Gewebes in der Mundhöhle durch den Einsatz von Antiseptika wie Chlorhexidin als Adjuvans zur mechanischen Therapie in der Behandlung von Parodontitis und Karies erfordern die Entwicklung neuer Therapiekonzepte. Eine mögliche Alternative stellt die photodynamische Inaktivierung der assoziierten Keime unter Verwendung eines mit Licht angeregten Photosensibilisators dar.

So wurde in der vorliegenden Arbeit sowohl die Toxizität von Photosan (ein für die PDT zugelassenes Medizinprodukt) auf dermale Fibroblasten und *ex vivo* Gingivagewebe (Schwein) nach Bestrahlung untersucht, als auch Versuche zur Lokalisation und zellulären Aufnahme von Photosan durchgeführt.

Mit Photosan als Photosensibilisator wurde bei neonatalen humanen dermalen Fibroblasten zunächst mittels Fluoreszenzmikroskopie eine steigende intrazelluläre Akkumulation des Farbstoffes abhängig von einer zunehmenden Inkubationszeit nachgewiesen, beim *ex vivo* Gingivagewebe (Schwein) kam es ebenfalls zu einer deutlichen Zunahme der Fuoreszenzsignale, jedoch war eine Penetration des Farbstoffes über das Stratum corneum hinaus in tiefer liegende Schichten der Gingiva nicht festzustellen. Die nachgewiesene Co-Lokalisation von Photosan in NHDF-Zellen mit Lyso-Tracker® Green zeigte nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden eine Lokalisation von Photosan in den Lysosomen. Mit Hilfe eines spektroskopischen Nachweisverfahrens konnte gezeigt werden, dass Photosan von NHDF-Zellen in Abhängigkeit der Inkubationszeit (5-90 min) aufgenommen wird.

Unterschiedliche Konzentrationen (0-100 µg/ml) von Photosan, verschiedene Inkubationszeiten (5 min, 15 min, 90 min) und unterschiedliche Lichtintensitäten (4,8 J/cm², 24 J/cm², 72 J/cm²) wurden benutzt, um die Phototoxizität gegenüber NHDF-Zellen mit dem MTT-Test zu bestimmen. Bei den Versuchen konnte gezeigt werden, dass die Phototoxizität von Photosan abhängig von der Inkubationszeit und von der applizierten Lichtintensität ist. Bei niedriger Inkubationsdauer von 5 Minuten und kurzer Bestrahlungszeit von 2 Minuten liegt die Konzentration von Photosan, bei der mehr als 50% der Zellen absterben, noch bei 50 µg/ml, bei 5-minütiger Inkubation und 30-minütiger Bestrahlung bereits bei 0,5 µg/ml Photosan. Wählt man die in der vorliegenden Arbeit maximal untersuchten Bedingungen einer 90-minütigen Inkubation und 30-minütigen Bestrahlung (72 J/cm², 40 mW/cm²), so sinkt die Überlebensrate bereits bei minimalen Farbstoffkonzentrationen von 0,1 µg/ml auf weniger als 50%.

Im Rahmen der Untersuchungen der Phototoxizität in einem mehr angewandten *ex vivo* Modell mit Gingiva vom Schwein konnte exemplarisch gezeigt werden, dass eine kurze Inkubations- und Bestrahlungsdauer geringer Toxizität und eine längere Inkubations- und Bestrahlungsdauer steigender Toxizität zugeordnet werden kann.

Die Herausforderung in der antibakteriellen photodynamischen Therapie im Bereich der Mundhöhle stellt die Suche nach einem geeigneten therapeutischen Fenster dar, in dem nur relevante Keime wie z.B. *Streptococcus mutans* abgetötet werden, ohne dem umliegenden gesunden Gewebe zu schaden. Wie in den Phototoxizitätsversuchen gezeigt werden konnte, müssen die Bedingungen deshalb sowohl im Bereich kurzer Inkubationszeiten als auch im Bereich geringer Bestrahlungsintensitäten liegen.

9 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol
Ak	Antikörper
Aqua dest	Destilliertes Wasser
BSA	Rinderserumalbumin
CHX	Chlorhexidin
CO_2	Kohlenstoffdioxid
CPI-Index	Community Periodontal Index
DAPI	4,6,-DiAmidino-2-PhenylIndole
dH_2O	destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiaminintetraessigsäure
FBM	Fibroblast Basal Medium
FBS	Fetal Bovine Serum
FGM	Fibroblast Growth Medium
g	Gramm
h	Stunde
HCl	Chlorwasserstoff
HE	Hämatoxylin-Eosin
HL-60 Zellen	humane Leukämiezellen Klon 60
H_2O	Wasser
HpD	Hämatoporphyrinderivat
J	Joule
KCl	Kaliumchlorid
KH_2PO_4	Kaliumdihydrogenphosphat
l	Liter
m	Milli
M	Mol
MEMα	Minimal Essential Medium alpha
min	Minute

$MgCl_2$	Magnesiumchlorid
MKG-Chirurgie	Mund-Kiefer-Gesichts-Chirurgie
MTT	(3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid)
NaCl	Natriumchlorid
$NaHCO_3$	Natriumhydrogencarbonat
Na_2HPO_4	Dinatriumhydrogenphosphat
NHDF-Zellen	Neonatale humane dermale Fibroblasten
PBS	Phosphate Buffered Saline
PDT	Photodynamische Therapie
pH	pH-Wert
POD	Peroxidase
PS	Photosensibilisator
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sog.	sogenannt
T25, T75	Zellkulturflasche 25 cm^2 oder 75 cm^2
TBS	Tris Buffered Saline
TdT	Terminale deoxynukleotidyltransferase
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Umdrehung
Vergr.	Vergrößerung
W	Watt
µ	Mikro

10 Literaturverzeichnis

(1) Alleyn CD, O'Neal RB, Strong SL, Scheidt MJ, Van Dyke TE, McPherson JC. The effect of chlorhexidine treatment of root surfaces on the attachment of human gingival fibroblasts in vitro. J Periodontol 1991 Jul; 62 (7): 434-8.

(2) Almqvist H, Luthman J. Gingival and mucosal reactions after intensive chlorhexidine gel treatment with or without oral hygiene measures. Scand J Dent Res 1988 Dec; 96 (6): 557-60.

(3) Aravindan N, Aravindan S, Shanmugasundaram K, Shaw AD. Periods of systemic partial hypoxia induces apoptosis and inflammation in rat skeletal muscle. Mol Cell Biochem 2007 Aug; 302 (1-2): 51-8.

(4) Au W, Hsu TC. Studies on the clastogenic effects of biologic stains and dyes. Environ Mutagen 1979; 1 (1): 27-35.

(5) Beaudouin E, Kanny G, Morisset M, Renaudin JM, Mertes M, Laxenaire MC, et al. Immediate hypersensitivity to chlorhexidine: literature review. Allerg Immunol (Paris) 2004 Apr; 36 (4): 123-6.

(6) Bergqvist-Karlsson A. Delayed and immediate-type hypersensitivity to chlorhexidine. Contact Dermatitis 1988 Feb; 18 (2): 84-8.

(7) Bhatti M, MacRobert A, Meghji S, Henderson B, Wilson M. A study of the uptake of toluidine blue O by Porphyromonas gingivalis and the mechanism of lethal photosensitization. Photochem Photobiol 1998 Sep; 68 (3): 370-6.

(8) Bos JD, Meinardi MM. The 500 Dalton rule for the skin penetration of chemical compounds and drugs. Exp Dermatol 2000 Jun; 9 (3): 165-9.

(9) Bowden GH. Mutans streptococci caries and chlorhexidine. J Can Dent Assoc 1996 Sep; 62 (9): 700, 03-7.

(10) Braun A, Dehn C, Krause F, Jepsen S. Antimikrobielle Photodynamische Therapie (aPDT) bei der parodontalen Behandlung. Quintessenz, Team-Journal 2007; 37.

(11) Braun A, Dehn C, Krause F, Jepsen S. Short-term clinical effects of adjunctive antimicrobial photodynamic therapy in periodontal treatment: a randomized clinical trial. J Clin Periodontol 2008 Oct; 35 (10): 877-84.

(12) Buggiani G, Troiano M, Rossi R, Lotti T. Photodynamic therapy: off-label and alternative use in dermatological practice. Photodiagnosis Photodyn Ther 2008 Jun; 5 (2): 134-8.

(13) Bundesvereinigung K, Bundeszahnärztekammer. Vierte Deutsche Mund-gesundheitsstudie (DMS IV) Kurzfassung. 2006; 11-13.

(14) Bykov VL. [The functional morphology of the epithelial barrier of the oral mucosa]. Stomatologiia (Mosk) 1997; 76 (3): 12-7.

(15) Cline NV, Layman DL. The effects of chlorhexidine on the attachment and growth of cultured human periodontal cells. J Periodontol 1992 Jul; 63 (7): 598-602.

(16) Damour O, Hua SZ, Lasne F, Villain M, Rousselle P, Collombel C. Cytotoxicity evaluation of antiseptics and antibiotics on cultured human fibroblasts and keratinocytes. Burns 1992 Dec; 18 (6): 479-85.

(17) Daunderer M. [Antidote therapy: toluidine blue in methemoglobinemia]. Fortschr Med 1980 Apr; 98 (13): 462-4.

(18) de Almeida JM, Theodoro LH, Bosco AF, Nagata MJ, Bonfante S, Garcia VG. Treatment of Experimental Periodontal Disease by Photodynamic Therapy in Rats With Diabetes. J Periodontol 2008 Nov; 79 (11): 2156-65.

(19) de Oliveira RR, Schwartz-Filho HO, Novaes AB, Jr., Taba M, Jr. Antimicrobial photodynamic therapy in the non-surgical treatment of aggressive periodontitis: a preliminary randomized controlled clinical study. J Periodontol 2007 Jun; 78 (6): 965-73.

(20) Dogan S, Gunay H, Leyhausen G, Geurtsen W. Effects of low-concentrated chlorhexidine on growth of Streptococcus sobrinus and primary human gingival fibroblasts. Clin Oral Investig 2003 Dec; 7 (4): 212-6.

(21) Donnelly RF, McCarron PA, Tunney MM, David Woolfson A. Potential of photodynamic therapy in treatment of fungal infections of the mouth. Design and characterisation of a mucoadhesive patch containing toluidine blue O. J Photochem Photobiol B 2007 Jan; 86 (1): 59-69.

(22) Dougherty TJ, Cooper MT, Mang TS. Cutaneous phototoxic occurrences in patients receiving Photofrin. Lasers Surg Med 1990; 10 (5): 485-8.

(23) Dougherty TJ, Gomer CJ, Henderson BW, Jori G, Kessel D, Korbelik M, et al. Photodynamic therapy. J Natl Cancer Inst 1998 Jun; 90 (12): 889-905.

(24) Dougherty TJ, Kaufman JE, Goldfarb A, Weishaupt KR, Boyle D, Mittleman A. Photoradiation therapy for the treatment of malignant tumors. Cancer Res 1978 Aug; 38 (8): 2628-35.

(25) Dunipace AJ, Beaven R, Noblitt T, Li Y, Zunt S, Stookey G. Mutagenic potential of toluidine blue evaluated in the Ames test. Mutat Res 1992 Jun; 279 (4): 255-9.

(26) Eichelbaum E, Gonzalez Navas A, Colmenares Arreaza G. [Toluidine blue and gastric cancer]. G E N 1977 Apr-Jun; 31 (4): 283-9.

(27) Epstein JB, Scully C, Spinelli J. Toluidine blue and Lugol's iodine application in the assessment of oral malignant disease and lesions at risk of malignancy. J Oral Pathol Med 1992 Apr; 21 (4): 160-3.

(28) Fabreguette A, Zhi Hua S, Lasne F, Damour O. [Evaluation of the cytotoxicity of antiseptics used in current practice on cultures of fibroblasts and keratinocytes]. Pathol Biol (Paris) 1994 Nov; 42 (9): 888-92.

(29) Feyh J. Photodynamic treatment for cancers of the head and neck. J Photochem Photobiol B 1996 Nov; 36 (2): 175-7.

(30) Fujita S, Sumita S, Kawana S, Iwasaki H, Namiki A. [Two cases of anaphylactic shock induced by chlorhexidine]. Masui 1997 Aug; 46 (8): 1118-21.

(31) Greenstein G, Berman C, Jaffin R. Chlorhexidine. An adjunct to periodontal therapy. J Periodontol 1986 Jun; 57 (6): 370-7.

(32) Gurgan CA, Zaim E, Bakirsoy I, Soykan E. Short-term side effects of 0.2% alcohol-free chlorhexidine mouthrinse used as an adjunct to non-surgical periodontal treatment: a double-blind clinical study. J Periodontol 2006 Mar; 77 (3): 370-84.

(33) Halliwell B, Gutteridge JM. Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage, and antioxidant therapy. Lancet 1984 Jun; 1 (8391): 1396-7.

(34) Hausmann W. Die sensibilisierende Wirkung des Hämatoporphyrins. alt 1911; 30: 276-316.

(35) Hellwig E, Klimek J, Attin T. Einführung in die Zahnerhaltung. Urban & Fischer Verlag München 2003; 3. Auflage: 457-58.

(36) Henderson B, Wilson M. Commensal communism and the oral cavity. J Dent Res 1998 Sep; 77 (9): 1674-83.

(37) Henderson BW, Dougherty TJ. How does photodynamic therapy work? Photochem Photobiol 1992 Jan; 55 (1): 145-57.

(38) Hepso HU, Bjornland T, Skoglund LA. Side-effects and patient acceptance of 0.2% versus 0.1% chlorhexidine used as post-operative prophylactic mouthwash. Int J Oral Maxillofac Surg 1988 Feb; 17 (1): 17-20.

(39) Holt SC, Ebersole JL. Porphyromonas gingivalis, Treponema denticola, and Tannerella forsythia: the "red complex", a prototype polybacterial pathogenic consortium in periodontitis. Periodontol 2000 2005; 38: 72-122.

(40) Hoppe-Seyler F. Med. Chem. Untersuchungen. Eberhard-Karls-Universität, Berlin 1871.

(41) Hsi RA, Rosenthal DI, Glatstein E. Photodynamic therapy in the treatment of cancer: current state of the art. Drugs 1999 May; 57 (5): 725-34.

(42) Jentsch H. Parodontitistherapie in der täglichen Praxis-Hinweise und wesentliche Gesichtspunkte. ZMK 2009; Ausgabe 6: 414-24.

(43) Jori G. Photodynamic therapy of microbial infections: state of the art and perspectives. J Environ Pathol Toxicol Oncol 2006; 25 (1-2): 505-20.

(44) Jori G, Fabris C, Soncin M, Ferro S, Coppellotti O, Dei D, et al. Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: basic principles and perspective applications. Lasers Surg Med 2006 Jun; 38 (5): 468-81.

(45) Kennedy JC, Pottier RH. Endogenous protoporphyrin IX, a clinically useful photosensitizer for photodynamic therapy. J Photochem Photobiol B 1992 Jul; 14 (4): 275-92.

(46) Kessel D. Chemical and biochemical determinants of porphyrin localization. Prog Clin Biol Res 1984; 170: 405-18.

(47) Komerik N, MacRobert AJ. Photodynamic therapy as an alternative antimicrobial modality for oral infections. J Environ Pathol Toxicol Oncol 2006; 25 (1-2): 487-504.

(48) Kononen E. Development of oral bacterial flora in young children. Ann Med 2000 Mar; 32 (2): 107-12.

(49) Krautheim AB, Jermann TH, Bircher AJ. Chlorhexidine anaphylaxis: case report and review of the literature. Contact Dermatitis 2004 Mar; 50 (3): 113-6.

(50) Lang K, Lehmann P, Bolsen K, Ruzicka T, Fritsch C. Aminolevulinic acid: pharmacological profile and clinical indication. Expert Opin Investig Drugs 2001 Jun; 10 (6): 1139-56.

(51) Laustriat G. Molecular mechanisms of photosensitization. Biochimie 1986 Jun; 68 (6): 771-8.

(52) Lesch CA, Squier CA, Cruchley A, Williams DM, Speight P. The permeability of human oral mucosa and skin to water. J Dent Res 1989 Sep; 68 (9): 1345-9.

(53) Leunig A, Rick K, Stepp H, Gutmann R, Alwin G, Baumgartner R, et al. Fluorescence imaging and spectroscopy of 5-aminolevulinic acid induced protoporphyrin IX for the detection of neoplastic lesions in the oral cavity. Am J Surg 1996 Dec; 172 (6): 674-7.

(54) Levy JG, Obochi M. New applications in photodynamic therapy. Introduction. Photochem Photobiol 1996 Nov; 64 (5): 737-9.

(55) Lipson RL, Baldes EJ, Gray MJ. Hematoporphyrin derivative for detection and management of cancer. Cancer 1967 Dec; 20 (12): 2255-7.

(56) Loh CS, MacRobert AJ, Bedwell J, Regula J, Krasner N, Bown SG. Oral versus intravenous administration of 5-aminolaevulinic acid for photodynamic therapy. Br J Cancer 1993 Jul; 68 (1): 41-51.

(57) Ma L, Moan J, Berg K. Evaluation of a new photosensitizer, meso-tetra-hydroxyphenyl-chlorin, for use in photodynamic therapy: a comparison of its photobiological properties with those of two other photosensitizers. Int J Cancer 1994 Jun; 57 (6): 883-8.

(58) Maisch T, Baier J, Franz B, Maier M, Landthaler M, Szeimies RM, et al. The role of singlet oxygen and oxygen concentration in photodynamic inactivation of bacteria. Proc Natl Acad Sci U S A 2007 Apr; 104 (17): 7223-8.

(59) Maisch T, Bosl C, Szeimies RM, Lehn N, Abels C. Photodynamic effects of novel XF porphyrin derivatives on prokaryotic and eukaryotic cells. Antimicrob Agents Chemother 2005 Apr; 49 (4): 1542-52.

(60) Maisch T, Szeimies RM, Jori G, Abels C. Antibacterial photodynamic therapy in dermatology. Photochem Photobiol Sci 2004 Oct; 3 (10): 907-17.

(61) Maisch T, Worlicek C, Babilas P, Landthaler M, Szeimies RM. A HCl/alcohol formulation increased 5-aminolevulinic acid skin distribution using an ex vivo full thickness porcine skin model. Exp Dermatol 2008 Oct; 17 (10): 813-20.

(62) Mariotti AJ, Rumpf DA. Chlorhexidine-induced changes to human gingival fibroblast collagen and non-collagen protein production. J Periodontol 1999 Dec; 70 (12): 1443-8.

(63) Mashberg A. Final evaluation of tolonium chloride rinse for screening of high-risk patients with asymptomatic squamous carcinoma. J Am Dent Assoc 1983 Mar; 106 (3): 319-23.

(64) Mashberg A, Samit A. Early diagnosis of asymptomatic oral and oropharyngeal squamous cancers. CA Cancer J Clin 1995 Nov-Dec; 45 (6): 328-51.

(65) Meisel P, Kocher T. Photodynamic therapy for periodontal diseases: state of the art. J Photochem Photobiol B 2005 May; 79 (2): 159-70.

(66) Men H, Monson RL, Parrish JJ, Rutledge JJ. Degeneration of cryopreserved bovine oocytes via apoptosis during subsequent culture. Cryobiology 2003 Aug; 47 (1): 73-81.

(67) Meyer DH, Fives-Taylor PM. Oral pathogens: from dental plaque to cardiac disease. Curr Opin Microbiol 1998 Feb; 1 (1): 88-95.

(68) Moan J. Properties for optimal PDT sensitizers. J Photochem Photobiol B 1990 May; 5 (3-4): 521-4.

(69) Moghadam BK, Drisko CL, Gier RE. Chlorhexidine mouthwash-induced fixed drug eruption. Case report and review of the literature. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1991 Apr; 71 (4): 431-4.

(70) Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods 1983 Dec; 65 (1-2): 55-63.

(71) Nikaido S, Tanaka M, Yamoto M, Minami T, Akatsuka M, Mori H. [Anaphylactoid shock caused by chlorhexidine gluconate]. Masui 1998 Mar; 47 (3): 330-4.

(72) Nonato M, Trombelli L, Parma Benfenati S. [Chlorhexidine in periodontal therapy]. Minerva Stomatol 1989 May; 38 (5): 547-56.

(73) Okano M, Nomura M, Hata S, Okada N, Sato K, Kitano Y, et al. Anaphylactic symptoms due to chlorhexidine gluconate. Arch Dermatol 1989 Jan; 125 (1): 50-2.

(74) Piette J, Volanti C, Vantieghem A, Matroule JY, Habraken Y, Agostinis P. Cell death and growth arrest in response to photodynamic therapy with membrane-bound photosensitizers. Biochem Pharmacol 2003 Oct; 66 (8): 1651-9.

(75) Pucher JJ, Daniel JC. The effects of chlorhexidine digluconate on human fibroblasts in vitro. J Periodontol 1992 Jun; 63 (6): 526-32.

(76) Puolakkainen P, Schroder T. Photodynamic therapy. Ann Chir Gynaecol 1990; 79 (4): 240-3.

(77) Raab O. Über die Wirkung fluoreszierender Stoffe auf Infusorien. Z Biologie 1900; 39 524-46.

(78) Redman RS, Krasnow SH, Sniffen RA. Evaluation of the carcinogenic potential of toluidine blue O in the hamster cheek pouch. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1992 Oct; 74 (4): 473-80.

(79) Ribeiro DA, Bazo AP, da Silva Franchi CA, Marques ME, Salvadori DM. Chlorhexidine induces DNA damage in rat peripheral leukocytes and oral mucosal cells. J Periodontal Res 2004 Oct; 39 (5): 358-61.

(80) Rovaldi CR, Pievsky A, Sole NA, Friden PM, Rothstein DM, Spacciapoli P. Photoactive porphyrin derivative with broad-spectrum activity against oral pathogens In vitro. Antimicrob Agents Chemother 2000 Dec; 44 (12): 3364-7.

(81) Scherer H. Chemisch - physiologische Untersuchungen. Ann Chem Pharm 1841; 40 1.

(82) Schuster GS. Oral flora and pathogenic organisms. Infect Dis Clin North Am 1999 Dec; 13 (4): 757-74.

(83) Schwartz SK, Absolon K, Vermund H. Some relationships of porphyrins, X-rays and tumours. Univ Minn Med Bull 1955; 27: 7-13.

(84) Seehof L, Entwicklungsgesellschaft F-u. Photosan-der Photosensibilisator für die Photodynamische Therapie, Informationen zu Photosan. 2003.

(85) Sibata CH, Colussi VC, Oleinick NL, Kinsella TJ. Photodynamic therapy: a new concept in medical treatment. Braz J Med Biol Res 2000 Aug; 33 (8): 869-80.

(86) Soukos NS, Mulholland SE, Socransky SS, Doukas AG. Photodestruction of human dental plaque bacteria: enhancement of the photodynamic effect by photomechanical waves in an oral biofilm model. Lasers Surg Med 2003; 33 (3): 161-8.

(87) Soukos NS, Wilson M, Burns T, Speight PM. Photodynamic effects of toluidine blue on human oral keratinocytes and fibroblasts and Streptococcus sanguis evaluated in vitro. Lasers Surg Med 1996; 18 (3): 253-9.

(88) Splieth C, Kramer A. Chlorhexidineinsatz. In: Splieth C (Hrsg), Professionelle Prävention. Quintessenz, Berlin 2000; 129-38.

(89) Squier CA. The permeability of keratinized and nonkeratinized oral epithelium to horseradish peroxidase. J Ultrastruct Res 1973 Apr; 43 (1): 160-77.

(90) Squier CA. Membrane coating granules in nonkeratinizing oral epithelium. J Ultrastruct Res 1977 Aug; 60 (2): 212-20.

(91) Squier CA. Penetration of nicotine and nitrosonornicotine across porcine oral mucosa. J Appl Toxicol 1986 Apr; 6 (2): 123-8.

(92) Squier CA, Cox P, Hall BK. Enhanced penetration of nitrosonornicotine across oral mucosa in the presence of ethanol. J Oral Pathol 1986 May; 15 (5): 276-9.

(93) Squier CA, Hall BK. The permeability of skin and oral mucosa to water and horseradish peroxidase as related to the thickness of the permeability barrier. J Invest Dermatol 1985 Mar; 84 (3): 176-9.

(94) Squier CA, Rooney L. The permeability of keratinized and nonkeratinized oral epithelium to lanthanum in vivo. J Ultrastruct Res 1976 Feb; 54 (2): 286-95.

(95) Staab W, Gangler P. [Allergic reaction to chlorhexidine gluconate. A case report]. Stomatol DDR 1982 Oct; 32 (10): 700-3.

(96) Szeimies RM, Sassy T, Landthaler M. Penetration potency of topical applied delta-aminolevulinic acid for photodynamic therapy of basal cell carcinoma. Photochem Photobiol 1994 Jan; 59 (1): 73-6.

(97) Tanzer JM, Livingston J, Thompson AM. The microbiology of primary dental caries in humans. J Dent Educ 2001 Oct; 65 (10): 1028-37.

(98) Tappeiner Hv, Jesionek A. Therapeutische Versuche mit fluoreszierenden Stoffen. Münch Med Wochenschau 1903; 50: 2042-44.

(99) Tappeiner Hv, Jodlbauer A. Über die Wirkung der photodynamischen (fluoreszierenden) Stoffe auf Infusorien. Dtsch Arch Klin Med 1904; 80: 427-87.

(100) Tatnall FM, Leigh IM, Gibson JR. Comparative study of antiseptic toxicity on basal keratinocytes, transformed human keratinocytes and fibroblasts. Skin Pharmacol 1990 3 (3): 157-63.

(101) Thune P. [Two patients with chlorhexidine allergy--anaphylactic reactions and eczema]. Tidsskr Nor Laegeforen 1998 Sep; 118 (21): 3295-6.

(102) van Winkelhoff AJ, Loos BG, van der Reijden WA, van der Velden U. Porphyromonas gingivalis, Bacteroides forsythus and other putative periodontal pathogens in subjects with and without periodontal destruction. J Clin Periodontol 2002 Nov; 29 (11): 1023-8.

(103) Vancikova Z. Principles of the photodynamic therapy and its impact on the immune system. Sb Lek 1998; 99 (1): 1-11.

(104) Wilson BD, Mang TS, Stoll H, Jones C, Cooper M, Dougherty TJ. Photodynamic therapy for the treatment of basal cell carcinoma. Arch Dermatol 1992 Dec; 128 (12): 1597-601.

(105) Wilson M. Bacterial biofilms and human disease. Sci Prog 2001; 84 (Pt 3): 235-54.

(106) Wilson M. Lethal photosensitisation of oral bacteria and its potential application in the photodynamic therapy of oral infections. Photochem Photobiol Sci 2004 May; 3 (5): 412-8.

(107) Wittke G. Farbstoffchemie. Sauerländer, Frankfurt am Main 1979.

(108) Wood S, Metcalf D, Devine D, Robinson C. Erythrosine is a potential photosensitizer for the photodynamic therapy of oral plaque biofilms. J Antimicrob Chemother 2006 Apr; 57 (4): 680-4.

(109) Yusof WZ, Khoo SP. Mucosal sensitivity to chlorhexidine mouthwash. Singapore Dent J 1988 Dec; 13 (1): 39-40.

(110) Zhang X, Jiang F, Zhang ZG, Kalkanis SN, Hong X, deCarvalho AC, et al. Low-dose photodynamic therapy increases endothelial cell proliferation and VEGF expression in nude mice brain. Lasers Med Sci 2005 Sep; 20 (2): 74-9.

11 Danksagung

Herrn Professor Dr. Schmalz danke ich herzlichst für die Überlassung des Themas und für seine wohlwollende Unterstützung bei der wissenschaftlichen Durchführung und Erstellung dieser Arbeit im Forschungsbereich der Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie.

Vor allem danke ich auch Herrn Professor Dr. Dr. h. c. Landthaler für die großzügige Bereitstellung von Arbeitsmitteln und die Möglichkeit der praktischen Durchführung der Versuche im Forschungsbereich der Dermatologie.

Bei Herrn Dr. Hiller bedanke ich mich für die äußerst hilfsbereite Unterstützung bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse und der Korrektur dieser Arbeit.

Ganz besonders aber möchte ich Herrn PD Dr. Tim Maisch für die erfolgreiche Zusammenarbeit und die kompetente, unglaublich engagierte sowie freundliche Unterstützung und seine unendliche Geduld über einen so langen Zeitraum danken.

Bei Petra Unger und Claudia Bosl möchte ich mich für die Anleitung bei der Laborarbeit, die vielen praktischen Tipps für die Zellanzucht und die offene und herzliche Arbeitsatmosphäre bedanken.
Dem gesamten Forschungsteam der Dermatologie danke ich für den stets netten Beistand und den vielen Spaß, den wir auch mal außerhalb des Labors hatten.

Nicht zuletzt gilt mein ausdrücklicher Dank auch meinen Eltern, die mich während meines Studiums und dem Verfassen dieser Arbeit stets mit liebevoller Aufmerksamkeit begleitet und unterstützt haben.

12 Lebenslauf

- **Persönliche Daten**

Name: Sonja Ernst
Geburtsdatum: 18.05.1981
Geburtsort: Neumarkt i.d.OPf.

- **Ausbildungsdaten**

1987	Einschulung in die Grund- und Hauptschule in Postbauer-Heng
1991	Übertritt auf das Ostendorfer-Gymnasium in Neumarkt i.d.OPf.
Juni 2000	Abitur
Oktober 2000	Immatrikulation an der Universität in Regensburg (Zahnmedizin)
Oktober 2002	Naturwissenschaftliche Vorprüfung
September 2003	Zahnärztliche Vorprüfung
19. Juni 2006	Zahnärztliche Prüfung
24. Juli 2006	Approbation als Zahnärztin
bis Oktober 2006	Arbeit an der Promotion an der Universität in Regensburg

- **Beruflicher Werdegang**

01/11 2006 - 31/10 2008	Anstellung als Vorbereitungsassistentin in der Praxis Dr. W. Kick in Nürnberg
seit 01/11 2008	Angestellte Zahnärztin in der Praxis Dr. Th. Rauscher & Kollegen in Hilpoltstein