

**Biodistribution parenteraler Nanoemulsionen:
Wie innovatives Partikeldesign und reproduktives Altern die
Akkumulation in weiblichen Geschlechtsorganen beeinflusst.**

Kumulative Dissertation

zur Erlangung des
Dotkorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Biowissenschaften

der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg,

vorgelegt von

Herrn Eike Folker Busmann

Gutachter:

1. Prof. Dr. Karsten Mäder
2. Prof. Dr. Lea Ann Dailey
3. Prof. Dr. Jörg Kreßler

Tag der öffentlichen Verteidigung: 12.12.2023 in Halle (Saale)

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	V
Symbolverzeichnis	VII
Abkürzungsverzeichnis	IX
1. Einleitung	1
1.1. Nanoemulsionen als Arzneistoffträgersysteme	2
1.2. Anforderungen an Arzneimittel zur intravenösen Verabreichung	6
1.3. Akkumulation in weiblichen Geschlechtsorganen	7
1.4. Effekte des Alterns in weiblichen Mäusen	9
1.5. Zielstellung der Arbeit	10
2. Kumulativer Teil	13
2.1. Publikation I	14
2.2. Publikation II	15
2.3. Publikation III	16
3. Ergebnisse und Diskussion	17
3.1. Prozess- und Produktentwicklung parenteraler Nanoemulsionen	17
3.1.1. Einfluss der Salinität auf die Formulierung neutraler Nanoemulsionen	18
3.1.2. Isotonisierung der Nanoemulsionen	21
3.1.3. Formulierung negativer Nanoemulsionen durch Oberflächenmodifikation	25
3.2. Physikochemische Eigenschaften der finalen Nanoemulsionen	26
3.3. Sterilisation	28
3.4. Langzeitstabilität	29
3.5. Zelltoxizität auf Fibroblasten	31
3.6. Interaktion mit Blutzellen	37
3.7. Biodistribution in weiblichen Mäusen	38
3.7.1. Einfluss des Partikeldesigns	39
3.7.2. Einfluss des reproduktiven Alterns	47
3.8. Vergleich zur Biodistribution in männlichen Mäusen	56
4. Zusammenfassung und Ausblick	61

Literaturverzeichnis	65
A. Anhang	73

Abbildungsverzeichnis

1.1. Schematische Darstellung von Emulsionen	2
1.2. Schematische Darstellung der Herstellungsmethoden von O/W Nanoemulsionen über die Phaseninversion	4
1.3. Anzahl der Publikationen auf PubMed nach den Suchbegriffen „Nanoemulsion“, „Drug Nanoemulsion“, „Diagnostic Nanoemulsion“ und „Theranostic Nanoemulsion“	6
1.4. Schematische Darstellung der Interaktion von Nanopartikeln mit Follikeln oder Eizellen im Ovar	8
1.5. Anzahl der Publikationen auf PubMed nach den Suchbegriffen „Ovarian Toxicity“, „Ovarian Accumulation“, „Ovarian Drug Delivery“ und „Ovarian Nanoparticle“	9
2.1. Grafische Zusammenfassung zur ersten Publikation	14
2.2. Grafische Zusammenfassung zur zweiten Publikation	15
2.3. Grafische Zusammenfassung zur dritten Publikation	16
3.1. Zusammensetzung der Nanoemulsionen	17
3.2. Einfluss der Salinität auf die Phaseninversion	19
3.3. Einfluss der Salinität auf die Formulierung neutraler Nanoemulsionen	20
3.4. Osmolalität wässrig gelöstem/dispergiertem Salz, MHS und PG	22
3.5. Formulierung isotoner neutraler Nanoemulsionen	24
3.6. Formulierung isotoner negativer Nanoemulsionen	25
3.7. Physikochemische Eigenschaften der ausgewählten Nanoemulsionen	27
3.8. Partikelgrößenverteilungen der Nanoemulsionen	27
3.9. Fluoreszenzspektrometrie der neutralen NE150 nach Produktion, autoklaviert, strahlensterilisiert und sterilfiltriert	29
3.10. Langzeitstabilität der Nanoemulsionen	30
3.11. Partikelgrößenverteilungen der Nanoemulsionen nach 12 Wochen Lagerung	31
3.12. Dosis-Wirkungs-Kurven der Nanoemulsionen auf 3T3 und NHDF Fibroblasten	32
3.13. Phasenkontrastmikroskopiebilder der 3T3 Fibroblasten mit Kristallbildung aus 12-Hydroxystearinsäure	34
3.14. Phasenkontrastmikroskopiebilder der NHDF Fibroblasten mit Kristallbildung aus 12-Hydroxystearinsäure	35
3.15. IC ₅₀ der Nanoemulsionen auf 3T3 und NHDF Fibroblasten	36
3.16. AMS der DiR gelabelten Nanoemulsionen in der Blutzellen- und Plasmafraktion	37
3.17. Experimentelles Design der Tierversuche	39

3.18. <i>In vivo</i> Fluoreszenzbilder der repräsentativen weiblichen adulten Mäuse mit intravenös applizierten neutralen und negativen Nanoemulsionen	40
3.19. AMS der Organe und Blut weiblicher adulter Mäuse mit intravenös applizierten negativen und neutralen Nanoemulsionen	42
3.20. Verlauf der gemittelten AMS der Organe weiblicher adulter Mäuse mit höchster Akkumulation über die Partikelgröße und Zeta Potential der Nanoemulsionen	43
3.21. <i>Ex vivo</i> Fluoreszenzbilder der Organe der repräsentativen weiblichen adulten Mäuse mit höchster Akkumulation der neutralen und negativen Nanoemulsionen	46
3.22. <i>In vivo</i> Fluoreszenzbilder der repräsentativen weiblichen Mäuse unterschiedlicher Altersklassen mit intravenös applizierten neutralen Nanoemulsionen	48
3.23. AMS der Organe und Blut weiblicher Mäuse unterschiedlicher Altersklassen mit intravenös applizierten neutralen Nanoemulsionen	50
3.24. Verlauf der gemittelten AMS der Organe weiblicher Mäuse unterschiedlicher Altersklassen mit höchster Akkumulationen über die Partikelgröße und das Alter	51
3.25. <i>Ex vivo</i> Fluoreszenzbilder der Organe repräsentativer Mäuse unterschiedlicher Altersklassen mit höchster Akkumulation der neutralen Nanoemulsionen	55
3.26. <i>In vivo</i> Fluoreszenzbilder der repräsentativen adulten weiblichen und männlichen Mäuse mit intravenös applizierter negativer und neutraler NE100	56
3.27. AMS der Organe und Blut adulter weiblicher und männlicher Mäuse mit intravenös applizierter negativer und neutraler NE100	57
3.28. <i>Ex vivo</i> Fluoreszenzbilder der Organe repräsentativer adulter weiblicher und männlicher Mäuse mit höchster Akkumulation der negativen und neutralen NE100 sowie Geschlechtsorgane	60
4.1. Grafische Zusammenfassung der Ergebnisse dieser Arbeit	61
A.1. Einfluss der Salinität der wässrigen Phase auf die mittlere Partikelgröße und den PDI der formulierten Nanoemulsionen abhängig vom MHS:MCT Verhältnis.	73
A.2. Salinität der wässrigen Phase vor der Schockverdünnung	73
A.3. Eigenschaften der isotonen neutralen Nanoemulsionen abhängig vom MHS:MCT Verhältnis	74
A.4. Eigenschaften der isotonen negativen Nanoemulsionen abhängig vom MHS:MCT Verhältnis	75
A.5. Dosis-Wirkungs-Kurven über den MHS-Gehalt der Nanoemulsionen auf 3T3 und NHDF Fibroblasten nach 24 h Inkubation	76

Tabellenverzeichnis

2.1. Übersicht zu den internationalen Fachzeitschriften der drei Publikationen	13
2.2. Darlegung des prozentualen Eigenanteils an den drei Publikationen	13
A.1. Kompositionen der ausgewählten sieben Formulierungen	74
A.2. Gemittelte AMS der entnommenen Organe und Blut	77
A.3. 2-seitige exakte Signifikanz und U-Wert nach Mann-Whitney-U-Tests, die den Effekt der Partikelgröße auf die AMS zeigen	79
A.4. 2-seitige exakte Signifikanz und U-Wert nach Mann-Whitney-U-Tests, die den Effekt der Oberflächenladung auf die AMS zeigen	82
A.5. 2-seitige exakte Signifikanz und U-Wert nach Mann-Whitney-U-Tests, die den Effekt des Alterns auf die AMS zeigen	83
A.6. 2-seitige exakte Signifikanz und U-Wert nach Mann-Whitney-U-Tests, die den Effekt des Geschlechts auf die AMS zeigen	85

Symbolverzeichnis

Lateinische Symbole

<i>A</i>	Alter	Wochen
<i>AMS</i>	Anteil der mittleren Strahlungseffizienz	%
<i>b</i>	Steigung	versch. Einheiten
<i>B</i>	Assoziationskonstante	-
<i>c</i>	Konzentration	Gew.% bzw. mg/ml
<i>d</i>	Durchmesser	nm
<i>I</i>	Intensität	% bzw. cps/ μ A
<i>IC</i>	inhibitorische Konzentration	mg/ml
<i>LD</i>	letale Dosis	g/kg
<i>logP</i>	logarithmischer n-Octanol/Wasser Verteilungskoeffizient	-
<i>M</i>	Molekulargewicht	kg/mol
<i>n</i>	Anzahl	-
<i>O</i>	Osmolalität	mosmol/kg
<i>PDI</i>	Polydispersitätsindex	-
<i>pH</i>	Gegenzahl zur logarithmischen Wasserstoffionenaktivität	-
<i>PIT</i>	Phaseninversionstemperatur	$^{\circ}$ C
<i>R²</i>	Bestimmtheitsmaß	-
<i>S</i>	Strahlungseffizienz	(p/s/cm ² /sr)/(μ W/cm ²)
<i>t</i>	Zeit	s, min, h bzw. a
<i>x</i>	Massenanteil	Gew.%
<i>z</i>	Partikelgröße/-durchmesser	nm
<i>ZV</i>	Zellviabilität	%

Griechische Symbole

λ	Wellenlänge	nm
ζ	Zeta Potential	mV
ϕ	osmotischer Koeffizient	-

Indizes

1	erste
2	zweite
3	dritte
50	median
<i>ave</i>	mittlere
<i>begin</i>	zum Anfang
<i>end</i>	zum Ende
<i>isoton</i>	isoton
<i>MHS</i>	Macrogol 15 Hydroxystearat
<i>MCT</i>	mittelkettiges Triglycerid
<i>NaCl</i>	Natriumchlorid
<i>NaCl-Lsg</i>	Natriumchloridlösung
<i>NE</i>	Nanoemulsion
<i>PG</i>	Phosphatidylglycerol
<i>PJ</i>	Publikationsjahr
<i>Produkt</i>	Produkt

Abkürzungsverzeichnis

3T3	embryonale Fibroblasten der Maus
AMS	Anteil der mittleren Strahlungseffizienz
DiI	1,1'-Dioctadecyl-3,3',3'-Tetramethylindocarbocyanin-Perchlorat
DiR	1,1'-Dioctadecyl-3,3',3'-Tetramethylindotricarbocyanin-Iodid
FDA	Food and Drug Administration
HLB	Hydrophilic-Lipophilic-Balance
IC ₅₀	mediane inhibitorische Konzentration
ICH	International Conference for Harmonization
INS	Infusion Nursing Society
ISO	International Organization for Standardization
LD ₅₀	mediane letale Dosis
logP	logarithmischer n-Octanol/Wasser Verteilungskoeffizient
MCT	mittelkettige Triglyceride
MHS	Macrogol 15 Hydroxystearat
NE25	Nanoemulsion mit 25 nm mittlerer Partikelgröße
NE50	Nanoemulsion mit 50 nm mittlerer Partikelgröße
NE100	Nanoemulsion mit 100 nm mittlerer Partikelgröße
NE150	Nanoemulsion mit 150 nm mittlerer Partikelgröße
NHDF	normale menschliche dermale Fibroblasten
OVCAR 8	menschliche Ovarialkarzinomzellen
O/W	Öl in Wasser Emulsion
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PDI	Polydispersitätsindex
PEG	Polyethylenglykol
PG	Phosphatidylglycerol
pH	Gegenzahl zur logarithmischen Wasserstoffionenaktivität
Ph. Eur.	Pharmacopoea Europaea, Europäisches Arzneibuch
PIK	Phaseninversionskomposition
PIT	Phaseninversionstemperatur
PIT _{begin}	beginnende Phaseninversionstemperatur
PIT _{end}	endende Phaseninversionstemperatur
PIZ	Phaseninversionszone
RES	retikuloendotheliales System

RT	Raumtemperatur
USP	United States Pharmacopeia
W/O	Wasser in Öl Emulsion

1. Einleitung

Viele zugelassene, bereits vermarktete sowie über 40 % der Wirkstoffe, welche sich noch in der Entwicklung befinden, haben eine schlechte Wasserlöslichkeit und/oder Permeabilität durch physiologische Barrieren. Das führt zu einer geringen Bioverfügbarkeit der Wirkstoffe an ihrem gewünschten Wirkort [1–5]. Es gibt viele Ansätze zur Verbesserung der Bioverfügbarkeit solcher Wirkstoffe: pH-Modifikation, Entwicklung von Salzformen, Cosolvenz, Tensidsolubilisierung oder Einschlusskomplexierung von Wirkstoffmolekülen, Entwicklung amorpher Solid Dispersions oder Co-Kristalle und Reduktion der Partikelgröße von Wirkstoffkristallen in den Submicron-Bereich mittels Top-down- oder Bottom-up-Prozesse. Darüber hinaus ist die laufende Entwicklung unterschiedlichster nanopartikulärer Arzneistoffträgersysteme ein vielversprechender Ansatz, um neben der Verbesserung der Bioverfügbarkeit dieser Wirkstoffe zusätzlich die Nebenwirkungen zu reduzieren [5, 6]. Als nanoskalige Trägersysteme für Arzneistoffe, Diagnostika oder Theranostika kommen dabei feste Lipid- oder Polymer-Nanopartikel, Nanokapseln, flüssige Nanoemulsionen, Liposomen oder Mizellen zum Einsatz [5–13]. Der physikalische Einschluss der Wirkstoffe im Kern solcher nanoskaligen Trägersysteme bietet die Möglichkeit, schwer lösliche oder auch empfindliche Wirkstoffe zu solubilisieren und vor äußeren Einflüssen zu schützen [6–9, 14, 15]. Aufgrund der sehr geringen Größe können sich die physikochemischen Eigenschaften der nanoskaligen Arzneistoffträgersysteme erheblich von den Eigenschaften mikroskaliger oder größerer (Bulk-)Materialien unterscheiden. So besitzen sie beispielsweise eine höhere Aufnahmerate und Wechselwirkung im biologischem Gewebe, verbessertes Targeting zu ihrem Wirkort oder höhere Reaktivität aufgrund ihrer deutlich größeren spezifischen Oberfläche. Folglich übertreffen nanoskalige Arzneistoffträgersysteme häufig die Kinetik, Absorption, Distribution und metabolischen Eigenschaften im Vergleich zu ihren kongenerischen (Bulk-)Materialien. Allerdings können alle diese Eigenschaften auch zu Bedenken hinsichtlich nanotoxikologischer Nebenwirkungen führen [16–19].

Die Entwicklung innovativer Partikeldesigns der nanoskaligen Arzneistoffträger kann durch eine gezielte Anpassung der Partikeleigenschaften genutzt werden, um die Pharmakokinetik, wie die Blutzirkulationszeit, das metabolische Verhalten oder das Biodistributionsprofil, den Anforderungen entsprechend zu beeinflussen. Das Ziel dabei ist, den Wirkstoff effizient an seinen Wirkort zu transportieren und freizusetzen [1, 20, 21]. Die Partikelgröße und -form der nanoskaligen Arzneistoffträgersysteme spielt dabei eine wichtige Rolle für deren Verbleib und Wechselwirkung mit dem biologischen Gewebe, da diese die Adhäsion an der Zelloberfläche bzw. Membran sowie die Art der zellulären Aufnahme via direkte Penetration durch die Membran oder Endozytose beeinflussen [18, 22]. Je kleiner die nanoskaligen Arzneistoffträger sind, umso schneller und leichter können sie die Kapillarwände durchdringen. Mit weniger als 50 nm können sie aus dem zirkulie-

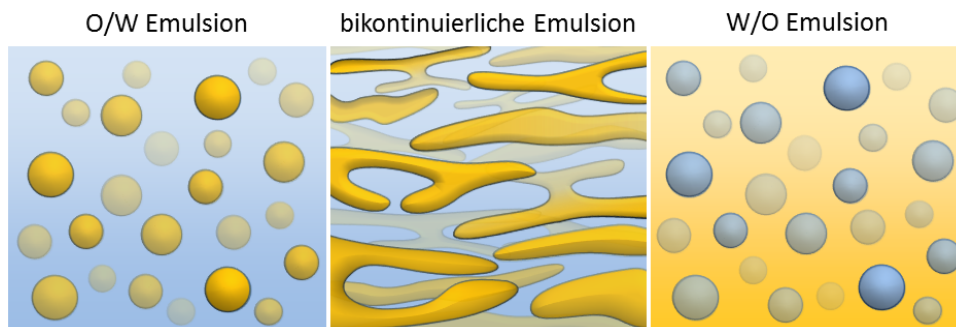


Abbildung 1.1. Schematische Darstellung von Emulsionen mit einer O/W Emulsion, bikontinuierlichen Emulsion und W/O Emulsion, die lipide Phase ist gelb und die wässrige ist blau dargestellt.

rendem Blutstrom in die Zellen eindringen, mit weniger als 20 nm und damit ähnlich groß wie Viren, Proteine oder Enzyme werden sie sogar nochmals deutlich schneller aufgenommen [23,24]. Darüber hinaus hängt die Pharmakokinetik, einschließlich der Verteilung vom Blutstrom in das Gewebe der Organe, zusätzlich von der Oberflächenszusammensetzung, Oberflächenladung sowie der Flexibilität der nanoskaligen Arzneistoffträgersysteme ab [19, 24, 25].

1.1. Nanoemulsionen als Arzneistoffträgersysteme

Emulsionen sind disperse Systeme aus zwei nicht miteinander mischbaren Flüssigkeiten, welche in Abbildung 1.1 schematisch dargestellt sind. Dabei bildet die eine Flüssigkeit in der Regel sphärische Tröpfchen als disperse Phase aus, während die andere die Tröpfchen umgebende kontinuierliche Phase bildet. Wenn dabei nanoskalige Öltröpfchen als disperse Phase in einer kontinuierlichen wässrigen Phase vorliegen, handelt es sich um Öl in Wasser (O/W) Nanoemulsionen. Wässrige nanoskalige Tröpfchen in einer kontinuierlichen lipiden Phase werden als Wasser in Öl (W/O) Nanoemulsionen bezeichnet. Neben O/W oder W/O Emulsionen können die beiden nicht miteinander mischbaren Flüssigkeiten bikontinuierliche Systeme ausbilden, bei denen sowohl die wässrige als auch die lipide Phase gleichzeitig als dreidimensionale kontinuierliche Phasen vorliegen. Für die lipide Phase können unterschiedlichste unpolare Moleküle wie Mono-, Di- und Triglyceride, freie Fettsäuren, Ölsäureethylester, mineralische oder ätherische Öle verwendet werden. Die wässrige Phase besteht primär aus Wasser, deren physikochemischen Bulk-Eigenschaften durch weitere Additive wie polare Moleküle, Co-Lösungsmittel (einfache oder mehrwertige Alkohole), Kohlenhydrate, Mineralien, Säuren oder Basen optimiert werden können [9, 26, 27]. Die Bildung von Nanoemulsionen, deren Stabilität sowie physikochemischen Eigenschaften hängt von den Bulk-Eigenschaften wie der Viskosität, Dichte, Polarität, Grenzflächenspannung und chemischen Stabilität der lipiden Phase sowie von der durch Art und Konzentration der oben genannten Additive einstellbaren Viskosität, Dichte, Polarität, Grenzflächenspannung, pH-Wert und Ionenstärke der wässrigen Phase ab [26–28].

Als dritte Komponente ist für die Bildung stabiler Nanoemulsionen die Zugabe eines Emulgators oder eine Kombination mehrerer Emulgatoren zwingend notwendig. Emulgatoren sind oberflächenaktive Moleküle, welche durch Adsorption an der Grenzfläche zwischen den beiden nicht

mischbaren Phasen die Grenzflächenspannung verringern. So erleichtern Emulgatoren die Zerteilung von Emulsionströpfchen durch Homogenisationsprozesse oder ermöglichen die spontane Bildung nanoskaliger Emulsionströpfchen unter bestimmten Bedingungen. Um die Grenzfläche zwischen den beiden nicht mischbaren Phasen bei der Entstehung neuer Emulsionströpfchen direkt zu belegen, muss der Emulgator während des Herstellungsprozesses im Überschuss vorliegen [9,27,29]. Das Verhältnis zwischen dem hydrophilen und lipophilen Anteil des Emulgatormoleküls, Hydrophilic-Lipophilic-Balance (HLB) genannt, hat dabei einen großen Einfluss auf die Bildung stabiler Emulsionen. Da sich lipophile Emulgatoren mit HLB-Werten < 10 besser in der lipiden Phase lösen, neigen diese zur Bildung von W/O Emulsionen bei Raumtemperatur. Mit höherer Löslichkeit in der wässrigen Phase bilden hydrophile Emulgatoren mit HLB-Werten > 10 eher O/W Emulsionen bei Raumtemperatur [26, 29, 30]. Der HLB-Wert des Emulgators sowie das eingesetzte Massenverhältnis Emulgator zur lipiden Phase beeinflusst dabei die resultierende Partikelgröße und Stabilität der Emulsionströpfchen [30–34].

Neben dem HLB-Wert können Emulgatoren nach ihren elektrischen Eigenschaften als nicht-ionisch, ionisch und zwitterionisch klassifiziert werden. Nicht-ionische Emulgatoren sind elektrisch neutral und werden meist zur sterischen Stabilisierung der Emulsionströpfchen eingesetzt. Bei O/W Nanoemulsionen verhindern dabei lange hydrophile Ketten, bei W/O Nanoemulsionen lange lipophile Ketten des amphiphilen Emulgatormoleküls die Kollision von sich aneinander annähernden Emulsionströpfchen und folglich deren Flokkulation oder Koaleszenz. Ionische Emulgatoren, entweder kationisch oder anionisch, können zur elektrostatischen Stabilisierung von O/W Nanoemulsionen unter Ausbildung einer positiven bzw. negativen Oberflächenladung der Emulsionströpfchen verwendet werden. Ebenso zwitterionische Emulgatoren, welche mindestens zwei unterschiedlich geladene ionisierbare Gruppen besitzen, und so je nach pH des wässrigen Dispersionsmediums negativ, neutral oder positiv geladen sein können. Aneinander annähernde Emulsionströpfchen stoßen sich aufgrund der repulsiven Kräfte ihrer gleichgeladenen Oberflächenladung im polaren wässrigen Dispersionsmedium ab, womit es zu keiner Kollision der Emulsionströpfchen kommt. Bei W/O Nanoemulsionen ist die elektrostatische Stabilisierung allerdings nicht möglich. Aufgrund des unpolaren lipiden Dispersionsmedium kommt es hier nur zu einer sehr schwachen elektrostatischen Abstoßung, welche die Kollision von Emulsionströpfchen und die daraus folgende Flokkulation oder Koaleszenz nicht verhindern kann [3, 9, 26, 27]. Als Emulgatoren stehen Phospholipide, Polysaccharide, Proteine oder Tenside zur Auswahl, welche neben dem Stabilisierungsmechanismus in einigen Fällen auch die Toxizität, das pharmakokinetische sowie -dynamische Profil der Nanoemulsion beeinflussen können [9, 26, 27]. Durch eine gezielte Auswahl der Emulgatoren können die physikochemischen Eigenschaften der Nanoemulsionen modifiziert werden, um einen Wirkstofftransport durch aktives oder passives Targeting in die gewünschten Zellen oder Organe zu erzielen [3, 4].

Für die Herstellung von Nanoemulsionen stehen eine Vielzahl von Verfahren zur Verfügung, welche generell in Verfahren mit hohem Energieinput oder niedrigem Energieinput kategorisiert werden können. Bei den weit verbreiteten hochenergetischen Verfahren werden größere Emulsionströpfchen durch Eintragen mechanischer Energie in nanoskalige Tröpfchen zerteilt. Dieser hohe Energieeintrag kann beispielsweise durch Hochdruckhomogenisieren, Mischen mit

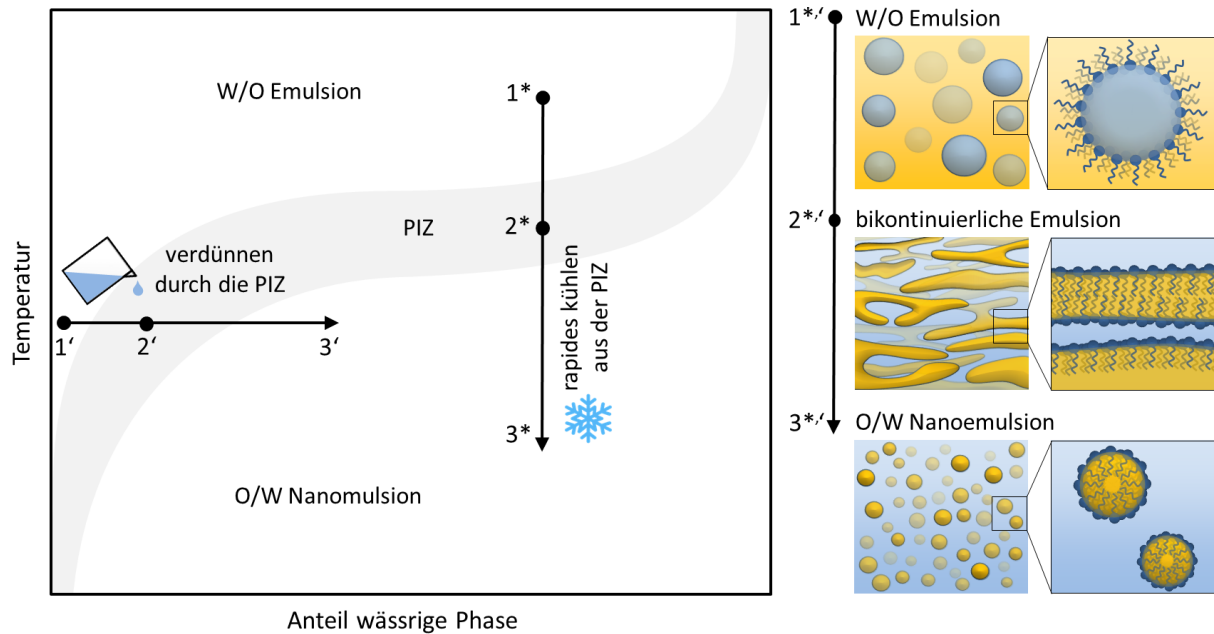


Abbildung 1.2. Schematische Darstellung der Herstellungsmethoden von O/W Nanoemulsionen über die Phaseninversionstemperatur ($1^* - 3^*$) oder Phaseninversionskomposition ($1' - 3'$), adaptiert nach [27, 35, 36].

hoher Scherung, Membranemulgierung, Mikrofluidisierung oder Ultraschall bereit gestellt werden. Eine geringe Viskosität der dispersen Phase sowie die durch Emulgatoren reduzierte Grenzflächenspannung erleichtern dabei die durch Scher- und Kavitationskräfte induzierte Zerteilung der Emulsionströpfchen [3, 9, 26, 27, 35]. Mit zunehmendem Interesse wurden in den letzten Jahren auch niedrigerenergetische Verfahren erforscht und entwickelt, da sie für die eingekapselten Wirkstoffmoleküle schonend, für die industrielle Produktion im großen Maßstab mit geringen technischen Equipment kostengünstig realisierbar und besonders energiesparend sind [3, 26, 34, 35]. Die Bildung nanoskaliger Emulsionströpfchen erfolgt dabei intrinsisch durch die Änderung der Physikochemie oder Temperatur eines Gemisches aus einem oder mehreren Emulgatoren mit den beiden nicht miteinander mischbaren Phasen. Dafür stehen Methoden zur Verfügung, welche auf spontaner Emulsifikation, Lösungsmittelverdrängung oder Phaseninversion basieren. Bei der Phaseninversion kommt es zu einer Transformation von dem einen Emulsionstypen in den anderen, W/O zu O/W oder vice versa. Die Inversion wird dabei entweder über Änderung der Temperatur oder der Komposition induziert [9, 26, 27, 35], wie in Abbildung 1.2 zur Herstellung von O/W Nanoemulsionen schematisch dargestellt.

Die Herstellung von O/W Nanoemulsionen über die Phaseninversionstemperatur (PIT) beruht auf einer besonderen Eigenschaft, welche nur bestimmte Emulgatoren aufweisen, meist nicht-ionische Tenside mit Polyethylenglykol (PEG)-Ketten. Das PEG wechselt seine Affinität zur wässrigen oder lipiden Phase in Abhängigkeit von der Temperatur und folglich die relative Löslichkeit des Tensids in der jeweiligen Phase. Bei hohen Temperaturen liegen die PEG-Ketten dehydratisiert vor. Das Tensid ist lipophil, sodass sich die Tensid-Monoschicht in der Grenzfläche zwischen wässriger und lipider Phase zur Bildung von W/O Emulsionströpfchen krümmt, dar-

gestellt als Zustand 1* in Abbildung 1.2. Mit abnehmender Temperatur werden die PEG-Ketten hydratisiert und das Tensid wird zunehmend hydrophiler bis eine gegensätzliche Krümmung der Tensid-Monoschicht energetisch günstiger wird, sodass sich mit dem Durchlaufen der Phaseninversionszone (PIZ) (Zustand 2*) schließlich O/W Emulsionströpfchen ausbilden (Zustand 3*). Der Übergang in der PIZ kann dabei den Zustand einer bikontinuierlichen Emulsion oder einer flüssigkristallinen Phase einnehmen. Die besonders geringe Grenzflächenspannung zwischen den beiden Phasen innerhalb der PIZ begünstigt die Bildung kleinster Tröpfchen, aber auch wieder ihre sofortige Koaleszenz. Daher ist eine sehr rapide Abkühlung des Systems notwendig, um kinetisch stabile O/W Nanoemulsionströpfchen mit kleiner Partikelgrößenverteilung zu formulieren. Die Temperatur der PIZ kann durch die Zugabe von Elektrolyten wie NaCl, AlCl₃, KCl oder CaCl₂ in die wässrige Phase deutlich reduziert werden. Dieser Prozess ist reversibel und kann durch Erhitzen auch umgekehrt durchgeführt werden um W/O Emulsionen herzustellen [27, 35, 37–39].

Bei der Phaseninversionskomposition (PIK) werden O/W Nanoemulsionen durch Verändern des Verhältnisses lipider zu wässriger Phase hergestellt, während die Eigenschaften der genutzten Tenside sowie die Temperatur konstant bleiben. Die Phaseninversion wird dabei durch die Erhöhung oder Verringerung des Anteils der dispersen Phase über die PIZ induziert. So bilden sich bei gradueller Zugabe der wässrigen Phase in eine lipide Phase mit gelöstem Emulgator zunächst Wassertröpfchen als W/O Emulsion aus (Zustand 1'). Die weitere Steigerung des Anteils der wässrigen Phase in die PIZ führt schließlich unter ständigem Rühren zum Koaleszieren der Wassertröpfchen und zu einer bikontinuierlichen Emulsion oder einer flüssigkristallinen Phase (Zustand 2'). Übersteigt die Koaleszenzrate der Wassertröpfchen die Rate der rekoalisierenden Öltröpfchen, kommt es letztendlich zur Bildung einer O/W Emulsion (Zustand 3'). Die Bildung nanoskaliger Emulsionströpfchen setzt dabei wie bei der PIT eine besonders geringe Grenzflächenspannung zwischen den Phasen innerhalb der PIZ voraus. So hängt die Partikelgröße der Emulsionströpfchen von der Konzentration des Emulgators und dessen Diffusion aus der lipiden Phase zur Grenzfläche ab. Dazu können sowohl PEGilierte als auch andere nicht-ionische oder ionische niedermolekulare Tenside eingesetzt werden, welche sowohl W/O als auch O/W Emulsionen stabilisieren können [27, 35–37, 40–44].

Zusammenfassend bietet die Herstellung von O/W Nanoemulsionen über die Phaseninversion die Möglichkeit, diese ohne Verwendung potenziell toxischer organischer Lösungsmittel, mit geringem Energieaufwand sowie mit geringem technischen Equipment herzustellen [45–47]. Durch die Inkorporation von lipophilen Wirkstoffen in die flüssige Lipidmatrix der Emulsionströpfchen sind O/W Nanoemulsionen ein attraktives nanoskaliges Arzneistoffträgersystem, was sich in der überproportional steigenden Anzahl an Publikationen in den letzten zwei Jahrzehnten widerspiegelt, wie in Abbildung 1.3 gezeigt. Darüber hinaus gibt es bereits einige Forschungsarbeiten über Nanoemulsionen als Trägersysteme für Diagnostika oder auch Theranostika. Der Einsatz von O/W Nanoemulsionen als nanoskalige Arzneistoffträgersysteme weist zahlreiche Vorteile auf: Sie besitzen einen akzeptierten regulatorischen Status, da viele Inhaltsstoffe bereits für parenterale Ernährung und Wirkstoffemulsionen genutzt werden. Sie sind in der Regel nur geringfügig toxisch durch die Verwendung von physiologischen und biologisch leicht abbaubaren

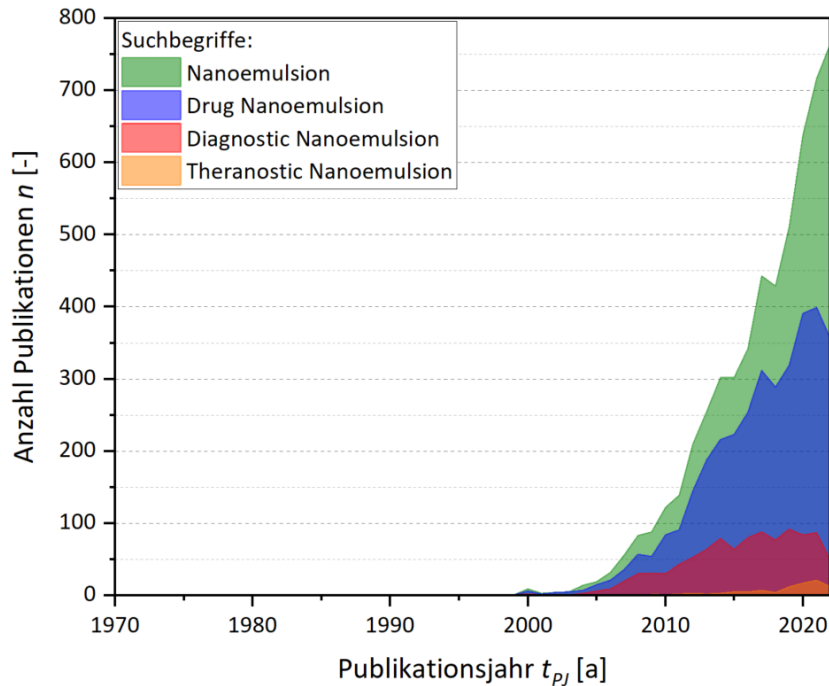


Abbildung 1.3. Anzahl der Publikationen auf der Meta-Datenbank PubMed nach den Suchbegriffen „Nanoemulsion“, „Drug Nanoemulsion“, „Diagnostic Nanoemulsion“ und „Theranostic Nanoemulsion“; Stand 2023 [49–52].

Substanzen wie Triglyceriden und Phospholipiden. Es sind sehr hohe Wirkstoffbeladungen in der Lipidmatrix schon während (Pre-Loading) oder nach (Post-Loading) dem Herstellungsprozess der Nanoemulsionen realisierbar. Sie bieten einen hohen Schutz lipophiler Wirkstoffe gegen Hydrolyse oder Oxidation, da diese vollständig in der Lipidmatrix eingeschlossen werden und kaum aus der Matrix an die Tröpfchenoberfläche heraus migrieren. Darüber hinaus stellen Nanoemulsionen eine wässrige Formulierung mit niedriger Viskosität dar, welche gut zur parenteralen intravenösen Anwendungen geeignet sind [3, 15, 21, 26, 48].

1.2. Anforderungen an Arzneimittel zur intravenösen Verabreichung

Die intravenöse Verabreichung von Arzneimitteln unterliegt sehr restriktiven Anforderungen, um ihre sichere Applikation zu gewährleisten. Sie müssen steril und frei von Pyrogenen sein [53, 54]. Im Falle von Nanoemulsionen ist die Sterilisation als Endprodukt sehr herausfordernd. So werden die Nanoemulsionen beim Autoklavieren durch die Hitze häufig physikalisch oder chemisch destabilisiert. Bei der Gamma-Bestrahlung degradieren Wirkstoffe und es können sich freie Radikale in wässriger Formulierung bilden. Lediglich die Sterilfiltration bietet einen schonenden Prozess, welcher die physikochemischen Eigenschaften der nanoskaligen Arzneistoffträger in der Regel nicht beeinflusst. Allerdings können größere Emulsionströpfchen in den 0,2 - 0,22 μm großen Membranporen zurückgehalten werden oder diese gar blockieren. Sollte das Sterilisieren des Endproduktes mit keiner Methode möglich sein, können Nanoemulsionen auch mit zuvor sterilisierten Edukten aseptisch hergestellt werden [3, 54–58]. Eine Depyrogenisierung des Endpro-

duktes über die meisten herkömmlichen Verfahren wie beispielsweise trockene Hitze, Destillation oder Ultrafiltration ist für nahezu alle nanoskaligen Formulierungen nur selten realisierbar, ohne deren physikochemischen Eigenschaften zu beeinflussen. Folglich kann die Kontamination parenteraler Nanoemulsionen mit Pyrogenen meist nur unter kontrollierten Produktionsbedingungen inklusive pyrogenfreier Ausgangsstoffe ausgeschlossen werden [58–60].

Darüber hinaus müssen Arzneimittel zur intravenösen Applikation frei von Partikeln sein, welche potentiell Blutkapillaren verstopfen könnten. Die kleinsten Blutkapillaren beim Menschen sind mit ca. 5 - 8 μm Durchmesser (im Durchschnitt 6,3 μm) in der Lunge zu finden [61, 62]. Folglich können Partikel mindestens gleichgroßen Durchmessers die Blutkapillaren in den Lungen verstopfen und zur Embolie mit fatalen Folgen führen. Allerdings sind Emulsionströpfchen flexibel und werden durch den leichten Druckanstieg in einer zu verstopfen drohenden Kapillare verformt und können diese Engstellen teilweise passieren. Für eine sichere intravenöse Applikation parenteraler Emulsionen empfiehlt das amerikanische Arzneibuch United States Pharmacopeia (USP) nach Kapitel 729, dass Emulsionströpfchen größer als 5 μm im Durchmesser einen volumengewichteten Anteil von maximal 0,05 % nicht überschreiten dürfen und der mediane Partikeldurchmesser kleiner als 500 nm sein sollte [61, 63, 64].

Für den pH-Wert sowie für die Osmolalität gibt es für die intravenöse Applikation keine eindeutig definierte Zulassungsbereiche. Bei physiologisch stark abweichenden pH-Wert und Osmolalität kann es allerdings zu erheblichen Schmerzen an der Injektionsstelle oder gar Venenentzündungen kommen. Zudem führt eine physiologisch stark abweichende Osmolalität zum Schrumpfen oder zur Hämolyse roter Blutkörperchen. Um solche Ereignisse zu vermeiden, sollten intravenös applizierte Arzneiformen bestenfalls euhydrisch und isotonisch sein [65–67]. Der pH-Wert im Blut liegt normalerweise zwischen 7,35 und 7,45, welcher physiologisch mittels des Puffersystems im Blut, der Atmung und über die Nieren stabilisiert wird. Aufgrund der schnellen Verdünnung von Injektionen kleiner Volumina (< 100 ml) ist ein pH-Bereich zwischen 3 - 11 als akzeptabel angegeben, für größere Volumina bei Infusionen empfiehlt die Infusion Nursing Society (INS) einen pH-Bereich zwischen 5 - 9 [6, 65, 66, 68]. Die Osmolalität von Vollblut beträgt 302 ± 5 mosmol/kg und von Plasma 291 ± 4 mosmol/kg [69]. Für Injektionen kleinerer Volumina empfiehlt sich unter einer Osmolalität von 1000 mosmol/kg zu bleiben und für Infusionen unterhalb von 500 mosmol/kg nach Empfehlung der INS [66, 67]. Darüber hinaus sollten alle verwendeten Edukte bestenfalls nicht toxisch sein und zu keinen allergischen Reaktionen führen [6, 54].

1.3. Akkumulation in weiblichen Geschlechtsorganen

In mehreren Studien mit Nagetieren wie Ratten und Mäusen wurde eine deutliche Akkumulation verschiedener nanoskaliger Arzneistoffträgersysteme wie feste Nanopartikel, Lipid-Nanokapseln und auch Nanoemulsionen im Gewebe der weiblichen Geschlechtsorgane festgestellt, insbesondere in den Ovarien [17, 19, 24, 25, 70–74]. Diese Akkumulation kann aufgrund von Interaktion der Nanopartikeln mit den Hauptfunktionen der Ovarien die Synthese von Sexualsteroidhormonen, Follikelentwicklung und Meiose der Eizelle beeinflussen, wie in Abbildung 1.4 schematisch darge-

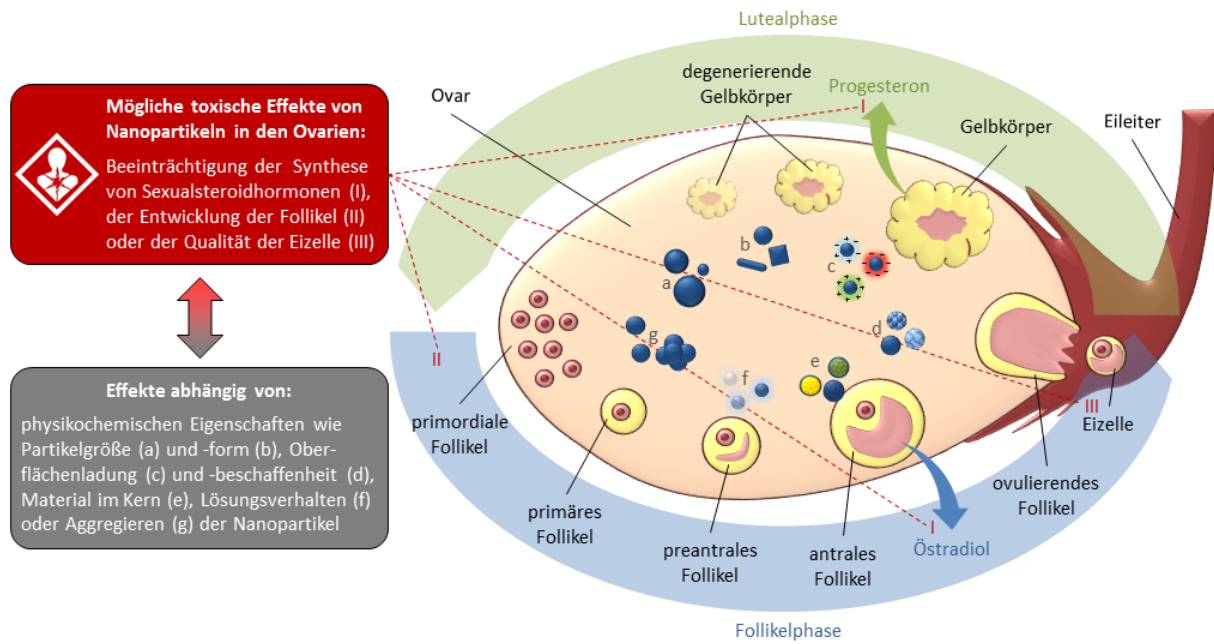


Abbildung 1.4. Schematische Darstellung der Interaktion von Nanopartikeln mit Follikeln oder Eizellen im Ovar, adaptiert nach [74].

stellt. Es wird davon ausgegangen, dass sowohl die Akkumulation als auch die Interaktion mit den verschiedenen Zellen im Ovar von den physikochemischen Eigenschaften der Nanopartikel wie Partikelgröße und -form oder deren Oberflächenladung und -zusammensetzung abhängt [74–78].

So stellt die Akkumulation von nanoskaligen Arzneistoffträgern auf der einen Seite ein hohes Toxizitätsrisiko dar. Neben der unbeabsichtigten Freisetzung von Wirkstoffen durch eine unerwünschte Akkumulation in den Ovarien wurde ebenfalls berichtet, dass einige Nanopartikel bereits selber Schäden in den Ovarien verursachen. So führten einige Nanopartikel zu Entzündungen, Stauungen oder Extravasation roter Blutkörper, Fibrose und Apoptose ovarieller Zellen in Ratten. Andere verringerten die Anzahl der Follikel in den Ovarien nach intravenöser Applikation in weiblichen Mäusen [17, 70, 71].

Auf der anderen Seite könnte die gezielte Akkumulation nanoskaliger Arzneistoffträgersysteme in den Ovarien zur Behandlung von ovariellen Fehlfunktionen oder Erkrankungen genutzt werden. So wurden intravenös applizierte Nanopartikel, welche mit Chemotherapeutika sowie auch in Kombination mit Kontrast- oder Fluoreszenzfarbstoffen beladen wurden, für therapeutische, diagnostische oder sogar theranostische Ansätze zur Behandlung von Ovarkarzinoma untersucht [10–13, 79, 80]. Als Alternative zur Chemotherapie induzierten auch Tocotrienol und Curcumin beladene Nanoemulsionen die Apoptose menschlicher Ovarialkarzinomzellen (OVCAR 8) in *in vitro* Studien [81]. Für die Therapie der primären Ovarialinsuffizienz schlugen Studien eine konstant niedrig dosierte parenterale Hormoninfusion vor, welche die tägliche Hormonproduktion der Ovarien während des Östruszyklusses nachahmt. So würde der First-Pass-Effekt oraler Darreichungsformen der Hormone überwunden und gleichzeitig das Brustkrebsrisiko durch die Verringerung der Dosis gemindert [82, 83]. Des Weiteren könnte eine intravenöse Applikation von Metforminhydrochlorid beladenen Nanopartikel, welche bei Mäusen ohne Nebenwirkungen blieb,

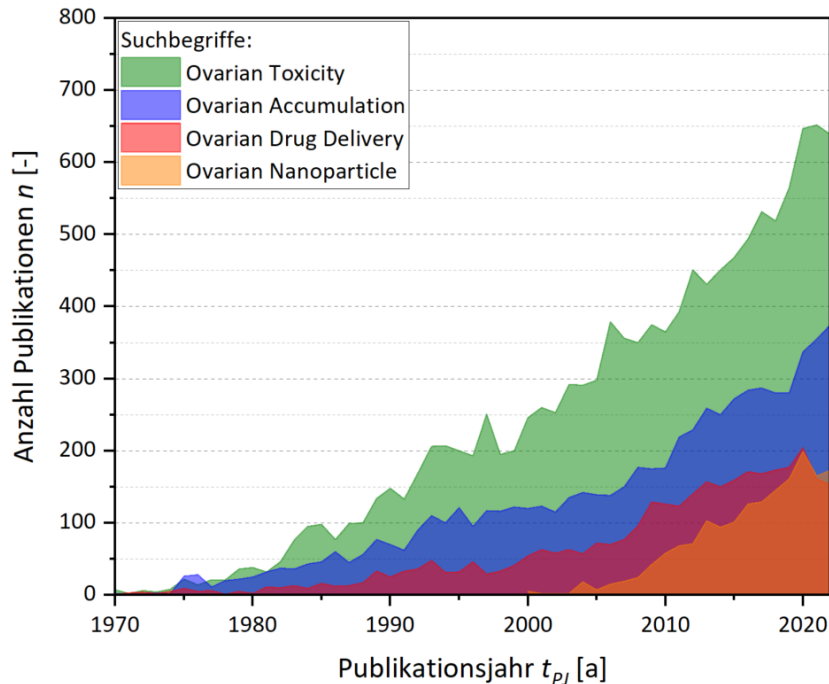


Abbildung 1.5. Anzahl der Publikationen auf der Meta-Datenbank PubMed nach den Suchbegriffen „Ovarian Toxicity“, „Ovarian Accumulation“, „Ovarian Drug Delivery“ und „Ovarian Nanoparticle“; Stand 2023 [87–90].

bei der Behandlung des polyzystischen Ovarialsyndroms zum Überwinden der Insulinresistenz sowie Steigerung der Insulinempfindlichkeit verwendet werden [84–86].

Wie in Abbildung 1.5 gezeigt, stieg die Anzahl an Publikationen über Toxizität und Akkumulation in den Ovarien über die letzten Jahrzehnten kontinuierlich an. Auch die Anzahl Veröffentlichungen über die ovarielle Akkumulation von Nanopartikeln stieg in den letzten zwei Jahrzehnten. Jedoch besteht weiterhin dringender Forschungsbedarf, um Muster zwischen den physikochemischen Eigenschaften der Nanopartikel und deren Akkumulation in den Ovarien zu identifizieren und zu verstehen [74].

1.4. Effekte des Alterns in weiblichen Mäusen

Das Altern beeinflusst die Funktion mehrerer Organe. Wie beim Menschen ändert sich auch bei Mäusen mit zunehmenden Alter die Kapazität des retikuloendothelialen Systems (RES), an dem mehrere Organe wie die Leber, Milz, Lymphknoten und das Knochenmark beteiligt sind [91–93]. Studien zufolge nahm die Clearance-Kapazität des RES bei Mäusen innerhalb der ersten 14 Wochen nach Geburt deutlich ab bis zum Erreichen eines konstanten Niveaus bei fortschreitendem Lebensalter [94, 95]. Folglich könnte sich mit der Änderung der Kapazität des RES das Verteilungsprofil von nanoskaligen Arzneistoffträger mit zunehmenden Alter ändern.

Des Weiteren spielen die sich mit dem Altern ändernden weiblichen Sexualsteroidhormonspiegel eine wichtige Rolle: Sie leiten die Pubertät ein, regulieren den Östruszyklus geschlechtsreifer Frauen und führen schließlich zur Menopause, bei der die Fruchtbarkeit innerhalb von 2 bis

7 Jahren bis zum vollständigen Verlust allmählich abnimmt. Während dieser Phase sinkt der Hormonspiegel in den Ovarien sowie der Blutfluss im ovariellen Stroma deutlich [96,97]. Bis heute ist allerdings kein einziger Mausstamm bekannt, welcher die gleichen reproduktiven Alterungserscheinungen wie bei menschlichen Frauen aufweist [96,98]. Dennoch gibt es einige Gemeinsamkeiten: Im Alter von 4 bis 6 Wochen steigen mit dem Beginn der Pubertät die Progesteron- und Östradiolspiegel im Serum der Mäuse deutlich an und es kommt zum ersten Eisprung bei den juvenilen weiblichen Mäusen [99–101]. Geschlechtsreife adulte Mäuse durchlaufen dann innerhalb von 4 bis 5 Tagen wiederholt den Östruszyklus, einschließlich dem zirkulierenden Sexualsteroidhormonspiegel [102–104]. Mit fortschreitendem reproduktiven Altern durchlaufen die Mäuse jedoch keine vollständige Menopause wie Menschen, sondern je nach Mausstamm nimmt ihre Fruchtbarkeit nach 6 bis 7 Monaten mit abnehmender Wurfgröße ab und hört dann nach 9 bis 12 Monaten fast vollständig auf. Während dieses Zeitraums wird der Östruszyklus zunehmend unregelmäßiger, bis er schließlich nahezu vollständig zum Erliegen kommt. Damit endet auch der Sexualsteroidhormonzyklus mit einhergehendem Rückgang des Östradiol- und Progesteronspiegels [96,98,103–108]. Das reproduktive Alter und damit der Zustand der Sexualsteroidhormone sowie der Durchblutung des ovariellen Stromas könnten daher eine wichtige Rolle bei der Akkumulation von nanoskaliger Arzneistoffträgern in den sich entwickelnden, geschlechtsreifen und alternden weiblichen Geschlechtsorganen spielen.

1.5. Zielstellung der Arbeit

Mit der rasanten Entwicklung nanoskaliger Arzneistoffträgersysteme in den letzten zwei Dekaden sowie ihrer zunehmend kommerziellen Vermarktung besteht dringender Bedarf, die Bioverteilung dieser Systeme im Hinblick auf die Akkumulation in den weiblichen reproduktiven Organen zu charakterisieren und zu beurteilen. Nebst der Chance einer zielgerichteten Wirkstofffreisetzung zur Behandlung ovarieller Fehlfunktionen oder Erkrankungen, birgt deren ungewollte Akkumulation in den Ovarien jedoch deutliche toxikologische Risiken. Es gibt bereits einige Publikationen über die ovarielle Akkumulation einzelner nanoskaliger Arzneistoffträgersysteme oder auch wirkstofffreier Nanopartikel. Allerdings konnte bis dato noch kein großes zusammenhängendes Muster eindeutig charakterisiert werden, wie die Partikeleigenschaften der Nanopartikel sowie das reproduktive Altern, damit die einhergehenden Änderungen im Sexualsteroidhormonspiegel und reduzierende Kapazität des RES, die Akkumulation in den weiblichen Geschlechtsorganen beeinflusst.

Ziel der vorliegenden Arbeit war das Identifizieren eines solchen von der Partikelgröße und Oberflächenladung abhängigen Musters der Biodistribution im präklinischen Tiermodell, auch im Hinblick auf den Einfluss des reproduktiven Alterns der Versuchstiere. Für dieses Vorhaben mussten zunächst nanoskalige Modell-Arzneistoffträgersysteme entwickelt werden, welche nebst einstellbarer Partikelgröße und Oberflächenladung ebenfalls die stringenten Anforderungen für Arzneimittel zur intravenösen Verabreichung erfüllten. Mit der Wahl auf Nanoemulsionen als Modell-Arzneistoffträgersystems wurden die eingesetzten Edukte auf bereits erprobte sowie zur intravenösen Applikation zugelassene Lipide und Emulgatoren beschränkt. Neben einem zur in-

travenösen Verabreichung akzeptablen pH-Bereich wurde bei der Entwicklung der verschiedenen partikeltechnologisch maßgeschneiderten Formulierungen Isotonie sowie eine möglichst geringe Toxizität angestrebt.

Die Charakterisierung der Bioverteilung dieser maßgeschneiderten Nanoemulsionen sollte im präklinischen Tiermodell mittels *in vivo* als auch *ex vivo* Fluoreszenzbildgebungsverfahren erfolgen. Die Bioverteilung der Nanoemulsionen sollte dabei in weiblichen Mäusen der Altersklassen juvenil präpuberal (noch nicht fruchtbar), adult (hohe Fruchtbarkeit) und seneszent (verringerte bis vollständig verlorene Fruchtbarkeit) untersucht werden. Zur Detektion der intravenös applizierten maßgeschneiderten Nanoemulsionen im Fluoreszenzbildgebungsverfahren musste ein adäquater Fluoreszenzfarbstoff in die Lipidmatrix der Emulsionströpfchen eingearbeitet werden. Dieser muss innerhalb der Lipidmatrix verbleiben, nicht mit dem zirkulierenden Blut interagieren sowie ein gut messbares Signal während der *in vivo* Fluoreszenzbildgebung liefern. Eine statistische Auswertung der gewonnenen Daten aus den Tierversuchen soll dabei die von den Partikeleigenschaften und vom reproduktiven Altern abhängigen Muster in der Bioverteilung offenlegen.

Hinweis: Zur besseren Lesbarkeit werden im Folgenden Nanoemulsionen mit neutraler Oberflächenladung vereinfacht als „neutrale Nanoemulsionen“ und Nanoemulsionen mit negativer Oberflächenladung als „negative Nanoemulsionen“ bezeichnet.

2. Kumulativer Teil

Die im Folgendem beschriebenen drei Forschungsartikel wurden durch das anerkannte Peer Review Verfahren bei den in Tabelle 2.1 aufgeführten internationalen Fachzeitschriften publiziert. Sie bilden den Schwerpunkt der während meiner Promotion durchgeführten Experimente sowie deren ausführliche Beschreibung und Diskussion der Methoden und Ergebnisse. Der Eigenanteil an der experimentellen Durchführung und Auswertung sowie vom Anfertigen der Manuskripte dieser drei Publikationen ist in Tabelle 2.2 aufgelistet.

Tabelle 2.1. Übersicht zu den internationalen Fachzeitschriften der drei Publikationen [109–111].

Fachzeitschrift	Impact Factor 2021	5-Year Impact Factor	Herausgeber
Beilstein Journal of Nanotechnology	3,27	3,32	Beilstein-Institut
International Journal of Molecular Sciences	6,21	6,63	MDPI
Pharmaceutics	6,53	7,23	MDPI

Tabelle 2.2. Darlegung des prozentualen Eigenanteils an den drei Publikationen: (a) an der Planung, Durchführung, Auswertung der Experimente und (b) an der Anfertigung des Manuskripts.

Nr.	Publikation	Eigenanteil
I	E. F. Busmann, D. García Martínez, H. Lucas und K. Mäder. Phase inversion-based nanoemulsions of medium chain triglyceride as potential drug delivery system for parenteral applications. <i>Beilstein Journal of Nanotechnologie</i> , 11(1):213-224, 2020.	(a) ca. 80 % (b) ca. 85 %
II	E. F. Busmann, J. Kollan, K. Mäder und H. Lucas. Ovarian Accumulation of Nanoemulsions: Impact of Mice Age and Particle Size. <i>International Journal of Molecular Sciences</i> , 22(15):8283, 2021.	(a) ca. 70 % (b) ca. 85 %
III	E. F. Busmann und H. Lucas. Particle engineering of innovative nanoemulsion designs to modify the accumulation in female sex organs by particle size and surface charge. <i>Pharmaceutics</i> , 14(2):301, 2022.	(a) ca. 75 % (b) ca. 90 %

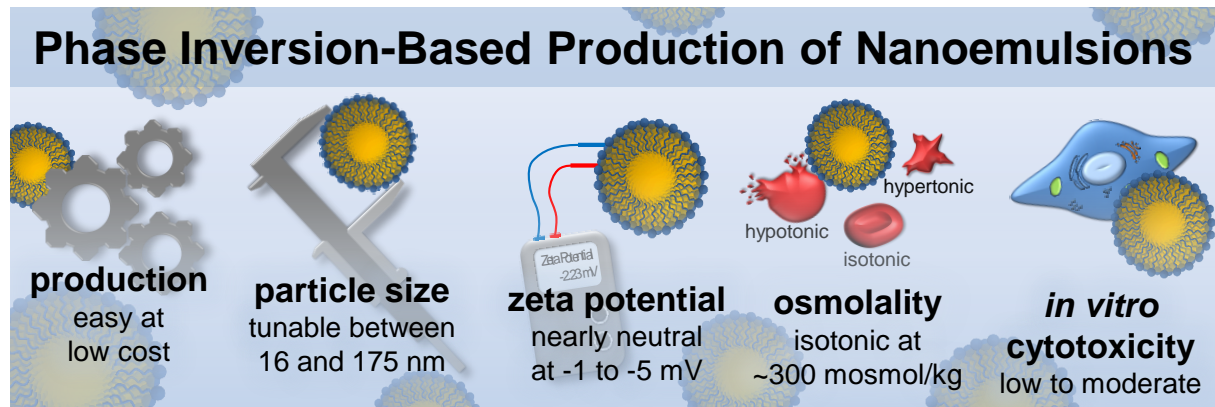


Abbildung 2.1. Grafische Zusammenfassung zur ersten Publikation [112].

2.1. Publikation I

Die erste Publikation mit dem Titel *Phase inversion-based nanoemulsions of medium chain triglyceride as potential drug delivery system for parenteral applications* beschreibt die Herstellung von Nanoemulsionen zur parenteralen Applikation mittels einer kombinierten Schockkühlung und -verdünnung während der thermotropen Phaseninversion, dessen grafische Zusammenfassung in Abbildung 2.1 dargestellt ist. Das systematische Screening der Konzentrationen der drei involvierten Komponenten Macrogol 15 Hydroxystearat (MHS), wässrige Salzlösung und mittelkettige Triglyceride (MCT) zeigte, dass die resultierende mittlere Partikelgröße gezielt zwischen 16 bis zu 175 nm nur durch das Anpassen des MHS:MCT Verhältnisses eingestellt werden konnte. Durch die Verwendung des nicht-ionischen Tensids MHS war die resultierende Oberflächenladung der Nanoemulsionen bei physiologischem pH 7,4 nahezu neutral.

Anstelle eines zu erwartenden Plateaus oberhalb der kritischen Mizellbildungskonzentration wies die Osmolalität reiner MHS Lösungen mit steigender Konzentration einen ungewöhnlichen nicht-linearen Anstieg auf. Dieser Anstieg wurde durch eine modifizierte van't Hoff Polynomfunktion vierten Grades angepasst und konnte zur Herstellung isotoner Nanoemulsionen berücksichtigt werden, um so eine komplikations- und schmerzfreie intravenöse Applikation zu ermöglichen.

Die *in vitro* Zelltoxizität auf Fibroblasten wurde anhand von drei ausgesuchten Formulierungen mit mittleren Partikelgrößen von etwa 25, 50 und 100 nm untersucht. Dabei wurde MHS als der hauptsächlich toxische Inhaltsstoff identifiziert. So stieg die Zelltoxizität mit kleiner werdender mittlerer Partikelgröße, aufgrund der dazu notwendigen größeren MHS Konzentration in den Formulierungen.

Link: <https://doi.org/10.3762/bjnano.11.16>

Zitat: E. F. Busmann, D. García Martínez, H. Lucas und K. Mäder. Phase inversion-based nanoemulsions of medium chain triglyceride as potential drug delivery system for parenteral applications. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 11(1):213-224, 2020.

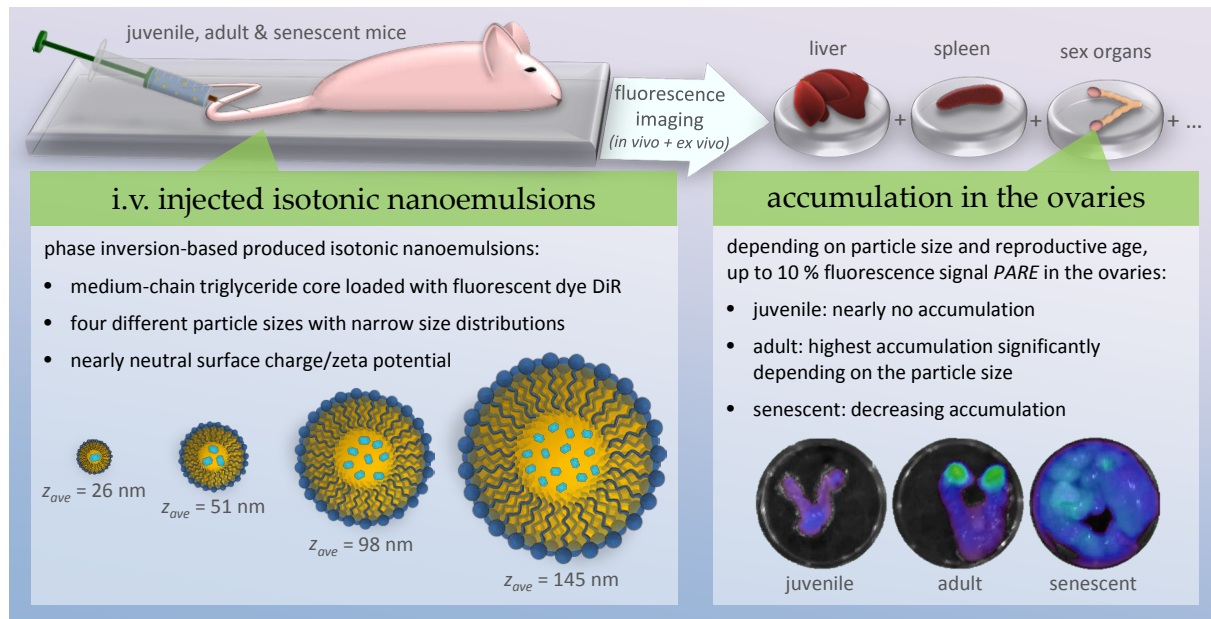


Abbildung 2.2. Grafische Zusammenfassung zur zweiten Publikation [113].

2.2. Publikation II

Auf dem ersten Forschungsartikel aufbauend wurde mit der zweiten Publikation *Ovarian Accumulation of Nanoemulsions: Impact of Mice Age and Particle Size* systematisch der Einfluss des Alters sowie der Einfluss der Partikelgröße auf die Biodistribution intravenös applizierter Nanoemulsionen in weiblichen Mäusen untersucht. Abbildung 2.2 zeigt die grafische Zusammenfassung des Artikels. Die ausgewählten Nanoemulsionen hatten mittlere Partikelgrößen von etwa 25, 50, 100 und 150 nm mit einer nahezu neutralen Oberflächenladung bei physiologischem pH 7,4. *In vitro* wiesen die Nanoemulsionen mit abnehmender mittlerer Partikelgröße eine steigende Zelltoxizität auf, was auf deren steigende MHS Konzentration zurückzuführen war. Die Nanoemulsionen sowie der für die Fluoreszenzbildgebung inkorporierte Fluoreszenzfarbstoff 1,1'-Diocadecyl-3,3,3',3'-Tetramethylindotricarbocyanin-Iodid (DiR) interagierten *in vitro* kaum mit Blutzellen, sondern verblieben inert im Plasma.

In vivo und *ex vivo* Fluoreszenzbildgebung zeigte für alle Altersgruppen und mittlere Partikelgrößen eine hohe Akkumulation der intravenös applizierten Nanoemulsionen in Leber und Milz als Teile des RES. In den weiblichen Geschlechtsorganen juveniler präpuberaler Mäuse kam es kaum zur Akkumulation der Nanoemulsionen. Bei adulten fruchtbaren Mäusen stieg diese allerdings abhängig von der mittleren Partikelgröße stark an, mit deutlich erkennbaren Hotspots in den Ovarien. Der Anteil der mittleren Strahlungseffizienz (AMS) erreichte dabei nahezu 10 % bei 150 nm mittlerer Partikelgröße. Mit weiterem Altern und somit abnehmender Fruchtbarkeit der seneszenten Mäusen sank die Akkumulation wieder auf ein moderates Niveau.

Link: <https://doi.org/10.3390/ijms22158283>

Zitat: E. F. Busmann, J. Kollan, K. Mäder und H. Lucas. Ovarian Accumulation of Nanoemulsions: Impact of Mice Age and Particle Size. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(15):8283, 2021.

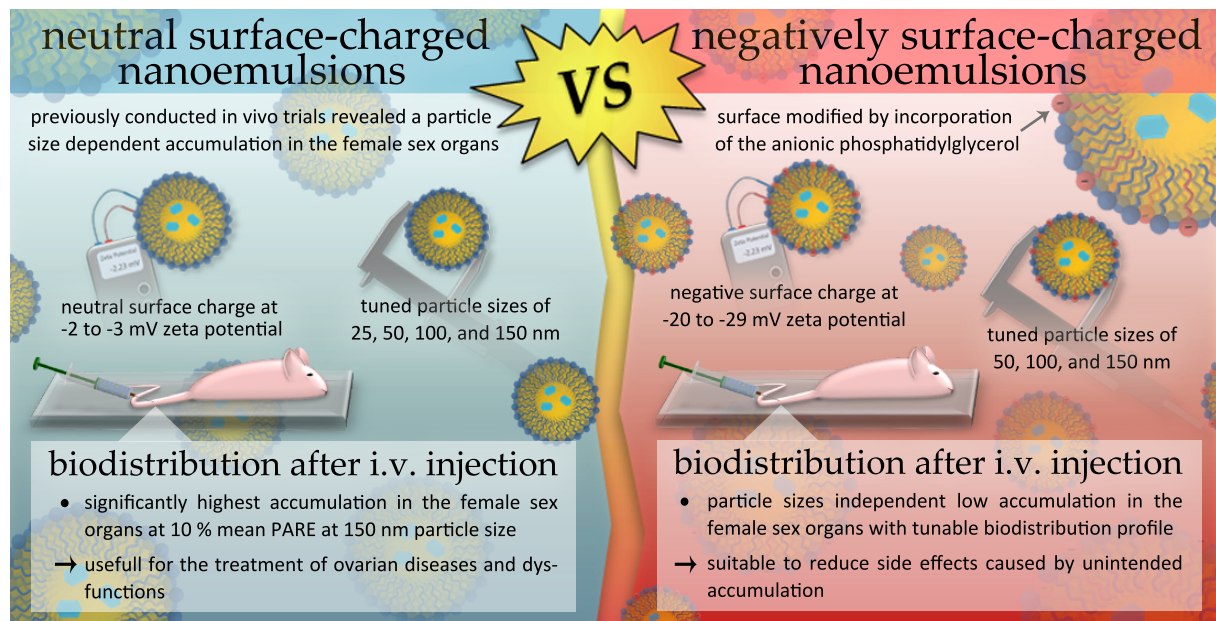


Abbildung 2.3. Grafische Zusammenfassung zur dritten Publikation [114].

2.3. Publikation III

In der dritten Publikation *Particle engineering of innovative nanoemulsion designs to modify the accumulation in female sex organs by particle size and surface charge* wurden die Oberflächenladung der Nanoemulsionen durch das anionische Phosphatidylglycerol (PG) modifiziert, wie in der grafischen Zusammenfassung in Abbildung 2.3 dargestellt. Durch Integration von PG in die stabilisierende MHS Schicht der Emulsionströpfchen war es möglich, maßgeschneiderte Nanoemulsionen mit einstellbarer mittlerer Partikelgröße von 27 bis nahezu 150 nm mit Oberflächenladungen bis zu -29 mV Zeta Potential bei physiologischem pH 7,4 zu produzieren.

Die aus dem Screening ausgewählten drei Nanoemulsionen von etwa 50, 100 und 150 nm mittlerer Partikelgröße und -20 bis -29 mV Zeta Potential sowie der inkorporierte Fluoreszenzfarbstoff DiR interagierten *in vitro* kaum mit den Blutzellen. Diese verblieben ebenfalls inert im Plasma. Die Toxizität auf Fibroblasten war allerdings durch die reduzierte MHS Konzentration deutlich geringer als bei den neutralen Nanoemulsionen.

Bei der *in vivo* und *ex vivo* Fluoreszenzbildgebung wiesen die drei negativen Nanoemulsionen nach intravenöser Applikation ebenfalls eine hohe Akkumulation in den RES Organen Leber und Milz der adulten weiblichen Mäuse auf. In den weiblichen Geschlechtsorganen wurde für alle drei Nanoemulsionen mit der negativen Oberflächenladung nur 5 % AMS gemessen. So wurde durch die Oberflächenmodifikation mit PG der Einfluss der mittleren Partikelgröße auf die Akkumulation in den weiblichen Geschlechtsorganen überwunden.

Link: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14020301>

Zitat: E. F. Busmann und H. Lucas. Particle engineering of innovative nanoemulsion designs to modify the accumulation in female sex organs by particle size and surface charge. *Pharmaceutics*, 14(2):301, 2022.

3. Ergebnisse und Diskussion

Im Folgenden werden zunächst die Ergebnisse der Produkt- und Prozessentwicklung von parenteralen Nanoemulsionen mit unterschiedlichen Partikeldesigns vorgestellt und diskutiert. Sieben ausgewählte Nanoemulsionen mit maßgeschneiderten Partikeleigenschaften wurden neben ihrer Langzeitstabilität auf ihre *in vitro* Zelltoxizität sowie Interaktion mit Blutzellen untersucht. Mit besonderem Augenmerk auf die Akkumulation in den weiblichen Geschlechtsorganen wurde der Einfluss des Partikeldesigns und des reproduktiven Alters auf die Biodistributionsprofile in präklinischen Versuchen im Mausmodell charakterisiert. Für einen Vergleich wurde zusätzlich die Biodistribution zweier Nanoemulsionen mit neutraler sowie negativer Oberflächenladung in männlichen Mäusen charakterisiert.

3.1. Prozess- und Produktentwicklung parenteraler Nanoemulsionen

Mit umfangreichen Screening-Versuchen der Prozessparameter wurden Formulierungen von O/W Nanoemulsionen mit unterschiedlichen Partikelgrößen zum einen mit neutraler und zum anderen mit möglichst negativer Oberflächenladung entwickelt. Die Zusammensetzungen dieser Nanoemulsionen sind in Abbildung 3.1 schematisch dargestellt. Der Lipidkern der Nanoemulsionen bestand dabei aus MCT, welches bereits häufig als Lipid in zugelassenen und vermarkteten Emulsionen zur parenteralen Ernährung eingesetzt wurde. Im experimentellen Vergleich mit anderen Lipiden wurde MCT schnell metabolisiert, lagerte sich nur geringfügig als Körperfett ab und wurde als nahezu immun-neutral beschrieben. Die akute mediane letale Dosis (LD₅₀) von MCT betrug bei Mäusen 3,7 g/kg nach intravenöser Applikation [115–119]. Als hydrophiles nicht-ionisches Tensid wurde MHS mit einem HLB-Wert von 16,3 [120] für die Bildung stabiler

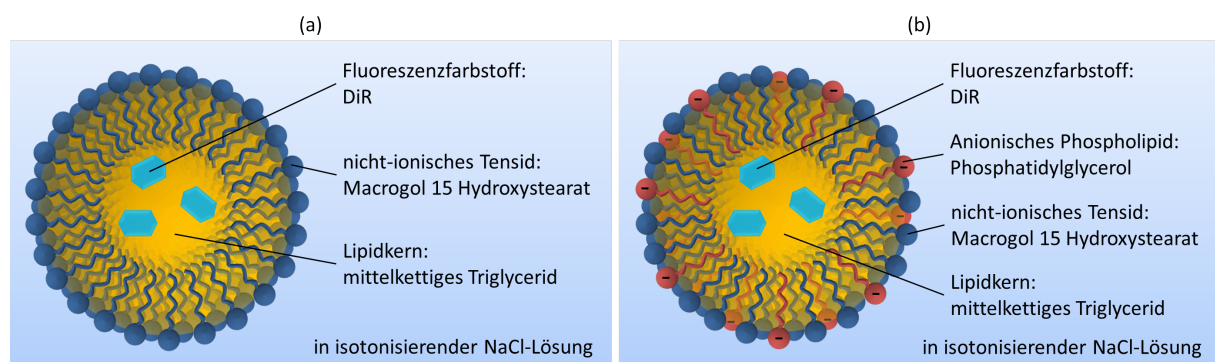


Abbildung 3.1. Zusammensetzung der (a) neutralen und (b) negativen Nanoemulsionen mit integriertem anionischem PG in der stabilisierenden Tensidschicht nach [113, 114].

O/W Nanoemulsionströpfchen eingesetzt. Das Tensid wies keine signifikanten Anzeichen akuter Toxizität nach parenteraler Applikation in Mäusen, Ratten, Kaninchen sowie Hunden auf. Bei Mäusen betrug die LD_{50} von MHS 3,16 g/kg nach intravenöser Applikation. Als Hilfsstoff in einigen injizierbaren Arzneimitteln wurde MHS bereits international durch viele Zulassungsbehörden wie die amerikanische Food and Drug Administration (FDA) zugelassen [119,121]. Für die Formulierung negativer Nanoemulsionen wurde das anionische Phospholipid PG in die stabilisierende MHS Schicht der Nanoemulsionströpfchen integriert. PG besitzt eine negative Ladung in seiner hydrophilen Kopfgruppe und kommt als natürliches Tensid sowohl in der Lunge als auch im Plasma von Säugetieren vor [122–124]. Es wurde als nicht toxisch sowie nicht hämolytisch beschrieben und zeigte darüber hinaus eine entzündungshemmende Wirkung *in vitro* [125–127]. Der lipiden Kern der Nanoemulsionen wurde für die Ermittlung der Biodistributionsprofile mittels Fluoreszenzbildgebung in den präklinischen Studien mit dem Fluoreszenzfarbstoff DiR beladen, welcher aufgrund seiner langen C18 Alkylketten mit einem $\log P$ von 17,4 stark lipophil und in Wasser nicht löslich ist [128]. Eine Studie zeigte, dass ein ähnlicher aus der Familie der Dialkylcarbocyanin-Fluoreszenzfarbstoffe stammende lipophile Farbstoff 1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-Tetramethylindotricarbocyanin-Iodid (DiI) mit 20,0 $\log P$ nur sehr gering und langsam über einen mehrwöchigen Zeitraum bei 37 °C aus dem Lipidkern von Nanoemulsionen heraus transferierte [48]. Demnach verbleibt ein derart lipophiler Farbstoff wie DiR auch während der *in vivo* Studien wahrscheinlich zu größten Teilen im Lipidkern der Nanoemulsionen. Wegen des nah-infraroten Fluoreszenzspektrums vom DiR wird das Autofluoreszenzsignal der Mäuse bei der Fluoreszenzbildgebung minimiert sowie die Lichtabsorption der Gewebezellenkomponenten im sichtbaren und ultravioletten Wellenlängenbereich vermieden. Die Detektion des Fluoreszenzsignals der gelabelten Nanoemulsionen in größeren Gewebetiefen ist somit durch nah-infrarote Fluoreszenzfarbstoffe realisierbar [129,130]. DiR wurde bereits zur *in vivo* Fluoreszenzbildgebung eingesetzt und erwies sich als nicht toxisch [19,131–133]. Als parenterale Formulierungen sollten diese Nanoemulsionen isoton, einen zur intravenösen Injektion akzeptablen pH-Wert sowie eine akzeptable Toxizität aufweisen.

3.1.1. Einfluss der Salinität auf die Formulierung neutraler Nanoemulsionen

Zu Beginn der Prozessentwicklung wurde der Einfluss der Salinität der wässrigen Phase auf die thermotrope Phaseninversion untersucht, bei der die Emulsion von O/W zu W/O umschwenkt. Dazu wurde die elektrische Leitfähigkeit der Emulsionen mit einer Zusammensetzung MCT:MHS:NaCl-Lösung (20:20:60) beim Aufheizen auf 99 °C gemessen. Das Einsetzen der Phaseninversion kennzeichnete sich dabei als ein deutlicher Abfall der elektrischen Leitfähigkeit in der wässrigen kontinuierlichen Phase bis zum Nullpunkt nach dem vollendeten Umschwung zur nicht leitfähigen kontinuierlichen Ölphase, dem Ende der Phaseninversion. Abbildung 3.2 zeigt die Temperatur der beginnenden Phaseninversion (PIT_{begin}), die PIZ und die Phaseninversion beendende Temperatur (PIT_{end}) in Abhängigkeit zur Salinität der wässrigen Phase. Mit steigender Salinität verringerte sich die PIT_{begin} von 81,5 °C bei 0,4 Gew.% Salzkonzentration auf 49,3 °C bei 5 Gew.% Salzkonzentration.

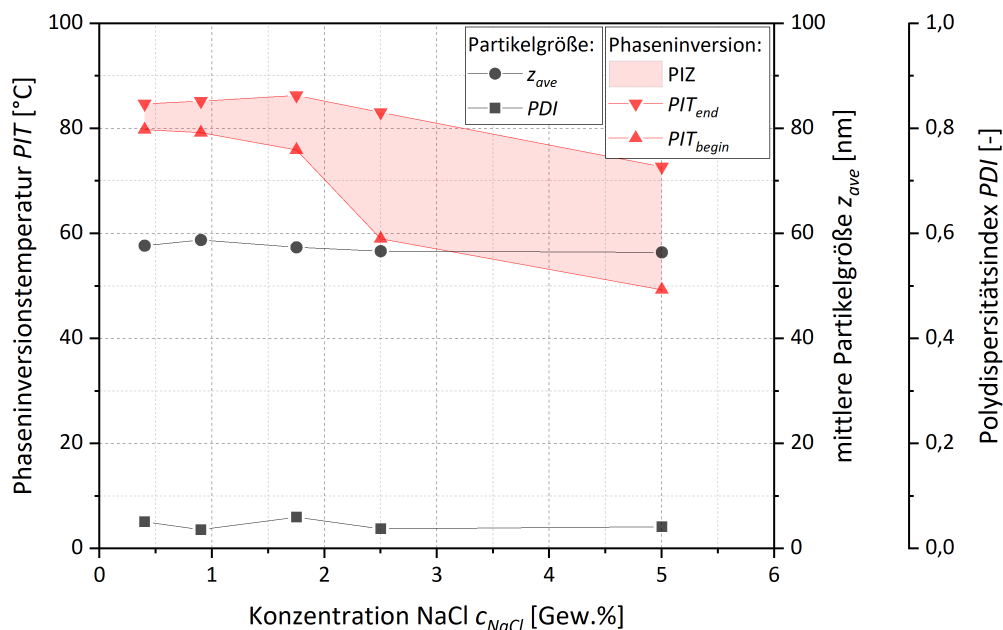


Abbildung 3.2. Einfluss der Salinität der wässrigen Phase auf die Phaseninversion von einer O/W zur W/O Emulsion für die Zusammensetzung MCT:MHS:NaCl-Lösung (20:20:60) mit nach der Schockverdünnung resultierenden mittleren Partikelgrößen und PDIs der Nanoemulsionen nach [112].

Durch eine Schockverdünnung mit eiskaltem bidestilliertem Wasser während der Phaseninversion wurde das System rapide abgekühlt und dabei gleichzeitig verdünnt. Die so entstehenden O/W Nanoemulsionen wurden dabei bis zu einem Massenanteil von 8 Gew.% MCT mit dem eiskaltem bidestilliertem Wasser verdünnt. Die resultierenden hydrodynamischen Partikeldurchmesser dieser Nanoemulsionen wurden mittels dynamischer Lichtstreuung ermittelt und werden folgend als allgemein gebräuchliche mittlere Partikelgröße z_{ave} ausgedrückt. Die Breite der Partikelgrößenverteilung wird ebenfalls für diese Messmethode gebräuchlichen dimensionslosen Polydispersitätsindex (PDI) angegeben (ISO 22412 und [134]). Die mittlere Partikelgröße dieser Nanoemulsionen lag unabhängig von der Salinität der wässrigen Phase zwischen 56 bis 59 nm mit sehr engen monomodalen Verteilungen bei PDIs zwischen 0,03 bis 0,06. So ermöglichte die steigende Salzkonzentration ein temperaturschonenderen Prozess zur Herstellung von Nanoemulsionen mit konstant bleibender Partikelgröße als potentielles Arzneistoffträgersystem hitzeempfindlicher Wirkstoffe.

In Screening-Versuchen wurde der Einfluss der Zusammensetzung der Edukte (NaCl-Lösung als wässrige Phase, MCT als lipide Phase, sowie MHS als nicht-ionisches Tensid) auf die Bildung von Nanoemulsionen mit neutraler Oberflächenladung untersucht. Die Salinität der wässrigen Phase vor der Schockverdünnung wurde dabei auf 1,75 Gew.% und auf 5 Gew.% eingestellt. Auch hier wurde die Schockverdünnung mit eiskaltem bidestilliertem Wasser bis zu einem Massenanteil von 8 Gew.% MCT während der Phaseninversion durchgeführt. Die Abbildung 3.3 zeigt ternäre Phasendiagramme bei denen die Zusammensetzung vor der Schockverdünnung mit den jeweiligen Anteilen NaCl-Lösung, MHS und MCT auf den drei Achsen aufgetragen sind. Die farbigen Bereiche stellen dabei den Bereich der Kompositionen dar, in denen erfolgreich Nanoemulsionen formuliert werden konnten. Die grauen Bereich zeigen die Kompositionen, in

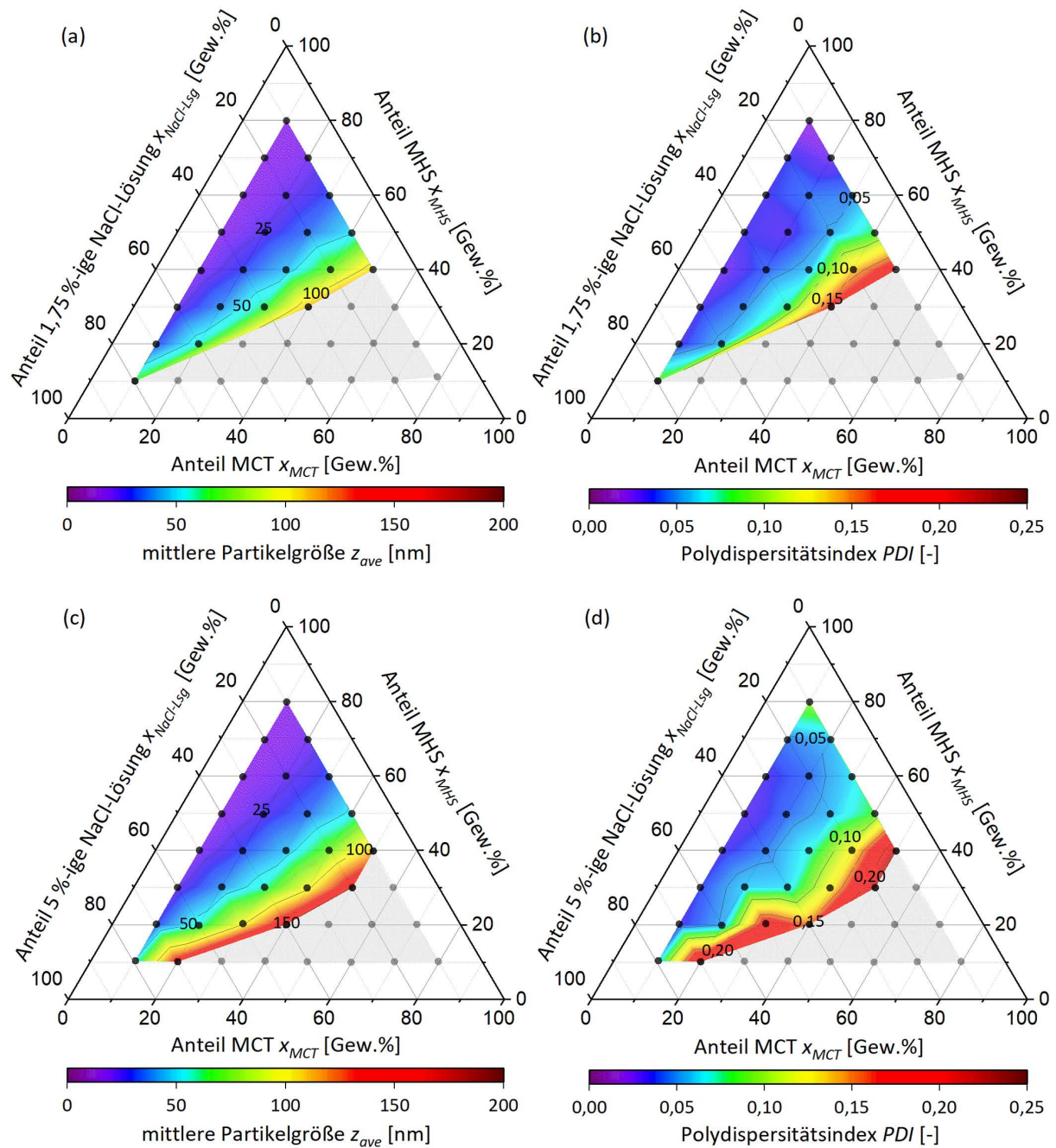


Abbildung 3.3. Ternäre Phasendiagramme zum Einfluss der Salinität der wässrigen Phase auf die Formulierung neutraler Nanoemulsionen mit (a,b) 1,75 %-iger NaCl-Lösung und (c,d) 5 %-iger NaCl-Lösung mit deren nach der Schockverdünnung resultierenden mittleren Partikelgrößen und PDIs (Punkte • : Zusammensetzung vor der Schockverdünnung; regenbogenfarbener Bereich: Bildung stabiler Nanoemulsionen; grauer Bereich: Instabilität oder keine Phaseninversion) nach [112].

dem die Nanoemulsionen entweder direkt nach der Schockverdünnung aufrahmten, koaleszierten, oder die PIT_{begin} beim Aufheizen nicht vor dem Siedepunkt erreicht wurde und somit keine Schockverdünnung innerhalb der PIZ zur Bildung von Nanoemulsionen möglich war. Die resultierenden Partikelgrößen der Nanoemulsionen nach der Schockverdünnung aus dem Screening mit der 1,75 %-igen NaCl-Lösung sowie deren korrespondierenden PDIs sind in den Abbildungen 3.3a und b dargestellt. Die Abbildungen 3.3c und d zeigen die resultierenden mittleren Partikelgrößen und PDIs des Screenings mit der 5 %-igen NaCl-Lösung.

Mit einer Salinität von 1,75 Gew.% waren in Abhängigkeit von dem MCT und MHS Massenanteil eine Produktion von Nanoemulsionen mit mittleren Partikelgrößen von 16 bis zu 113 nm und engen monomodalen Partikelgrößenverteilungen mit PDIs von 0,02 bis zu 0,19 möglich. Durch die Erhöhung der Salinität auf 5 Gew.% verringerte sich die PIT_{begin} und vergrößerte so den Bereich im ternären Phasendreieck, in welchem nun auch Kompositionen mit geringerer MHS-Konzentration die Phaseninversion beim Aufheizen auf 99 °C erreichten. Das ermöglichte das Formulieren weiterer stabiler Nanoemulsionen und die Spannbreite der produzierbaren mittleren Partikelgrößen erweiterte sich so von 16 bis zu 151 nm mit monomodalen Partikelgrößenverteilungen bei PDIs von 0,03 bis zu 0,23. Bei den beiden untersuchten Salzkonzentrationen der wässrigen Phase war die resultierende mittlere Partikelgröße der Nanoemulsionen ausschließlich vom Verhältnis Tensid zur lipiden Phase abhängig und konnte mittels eines Holliday Fits angepasst werden, wie in Abbildung A.1a im Anhang gezeigt. Die Salinität der wässrigen Phase hatte dabei keinen Einfluss auf die resultierende mittlere Partikelgröße, insofern die Phaseninversion beim Aufheizen erreicht wurde. Mit kleiner werdender mittlerer Partikelgröße wurden einhergehend kleiner werdende PDIs beobachtet.

3.1.2. Isotonisierung der Nanoemulsionen

Besonders für intravenöse Darreichungsformen ist die Osmolalität ein wichtiger Faktor, um deren komplikations- und schmerzfreie Applikation zu ermöglichen. Nicht-isotonische, intravenös applizierte Produkte können entweder zum Schrumpfen oder zur irreversiblen Hämolyse der Blutkörperchen führen. Ebenso können starke Schmerzen an der Einstichstelle oder gar eine Phlebitis, eine Entzündung der Venen, auftreten [65, 66]. Die Osmolalität $O(c)$ steigt in der Regel linear mit der Konzentration des gelösten Stoffes c in Abhängigkeit vom osmotischen Koeffizienten ϕ , der Anzahl Ionen oder Partikel n und dem Molekulargewicht M , was durch die van't Hoff Gleichung beschrieben wird [135]:

$$O(c) = \frac{\phi n}{M} \cdot c \quad (3.1)$$

Die Osmolalität von Vollblut beträgt 302 ± 5 mosmol/kg und von Plasma 291 ± 4 mosmol/kg [69], sodass für die Entwicklung der isotonischen Nanoemulsionen eine gezielte Osmolalität O_{isoton} von 300 mosmol/kg festgesetzt wurde. Die zur Isotonisierung notwendige NaCl Konzentration im finalen Produkt $c_{\text{NaCl,Produkt}}$ berechnete sich wie folgend aus der Differenz von der gezielten Osmolalität mit den konzentrationsabhängigen Osmolalitäten MHS $O_{\text{MHS}}(c_{\text{MHS}})$

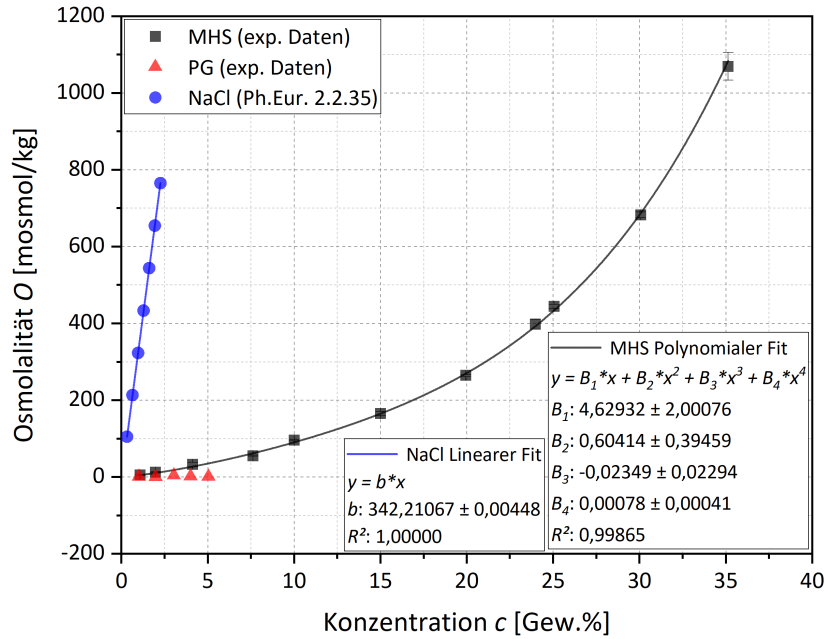


Abbildung 3.4. Ideale Osmolalität wässriger Salzlösungen nach Ph. Eur. 2.2.35 sowie experimentell ermittelte Osmolalität wässrig gelöstem/dispergiertem MHS und PG nach [112, 114].

und PG $O_{PG}(c_{PG})$:

$$c_{NaCl,Produkt} = (O_{isoton} - O_{MHS}(c_{MHS}) - O_{PG}(c_{PG})) \cdot \frac{M_{NaCl}}{\phi_{NaCl} n_{NaCl}} \quad (3.2)$$

Der Term $\frac{M_{NaCl}}{\phi_{NaCl} n_{NaCl}}$ entsprach dabei dem Kehrwert der Steigung b des linearen Fits der idealen Osmolalität wässriger Salzlösungen nach Europäischen Arzneibuch (Ph. Eur.) Kapitel 2.2.35, welche in Abbildung 3.4 dargestellt ist. Für die Berechnung der Osmolalität von MHS und PG wurde deren Einfluss auf die Osmolalität experimentell mittels Kryoskopie ermittelt. Die PG Konzentration zeigte keinen Einfluss auf die Osmolalität, sodass $O_{PG}(c_{PG})$ gleich Null gesetzt wurde. Die Osmolalität von MHS wies jedoch einen unerwartet überproportionalen Anstieg mit steigender Konzentration auf. In der Regel nähert sich die Osmolalität vieler Tenside einem Plateau oberhalb der kritischen Mizellbildungskonzentration. Die Bildung der separaten mizellaren Phase führt so zu einer konstanten Monomerkonzentration in der wässrigen Phase und damit zu einem thermodynamisch eingeschränkten System mit konstantem chemischen Potential und somit konstantem osmotischen Druck. Ausgiebige Literaturrecherche brachte nur eine einzige Publikation von Viegas und Henry hervor, die das Phänomen eines überproportionalen Anstiegs für stark interagierende nicht-ionische Tenside beschreibt: Aufgrund der Osmose beeinflussenden steigenden Anzahl von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Polymerkette des Tensids und Lösemittel steigt die Osmolalität dieser Tenside nicht-linear mit ihrer gelösten Konzentration. Dieses Verhalten wird durch eine modifizierte polynomiale van't Hoff Gleichung vierten Grades mit drei Assoziationskonstanten B_1 , B_2 und B_3 beschrieben, welche durch Huggins und

Flory eingeführt wurde [135]:

$$O(c) = \frac{\phi n}{M} \cdot c + \frac{\phi n B_1}{M} \cdot c^2 + \frac{\phi n B_2}{M} \cdot c^3 + \frac{\phi n B_3}{M} \cdot c^4 \quad (3.3)$$

Die experimentell erhobenen Messdaten der Osmolalität von MHS korrespondierten sehr gut mit der modifizierten polynomialen van't Hoff Gleichung vierten Grades. Ab einer MHS Konzentration von 21,1 Gew.% ergaben sich nach Gleichung 3.2 negative Werte für die zur Isotonisierung notwendige Salzkonzentration. Praktisch wurden diese negativ errechneten Salzkonzentrationen auf 0 Gew.% gesetzt, wie in Abbildung A.2a im Anhang gezeigt. Eine Isotonisierung dieser Formulierungen war so allerdings nicht möglich. Für sehr geringe MHS Konzentrationen wären vor der Schockverdünnung Salzkonzentrationen von bis zu 80 Gew.% NaCl nötig. Diese lägen allerdings oberhalb der Sättigungskonzentration von NaCl, sodass in der Praxis die wässrige Lösung vor der Schockverdünnung auf maximal 25 Gew.% NaCl eingestellt und das restliche Salz zur Isotonisierung erst im Nachhinein hinzugegeben wurde. Diese hohe Salinität von bis zu 25 Gew.% NaCl führte zur Absenkung der PIT_{begin} unterhalb des Siedepunktes für Formulierungen mit geringem MHS Anteil. Wie in Abbildung 3.5 gezeigt, wurde so der Bereich im ternären Phasendiagramm abermals vergrößert, in dem stabile Nanoemulsionen mittels Schockverdünnung während der thermotropen Phaseninversion formuliert werden konnten.

Eine Formulierung von Nanoemulsionen war nun mit resultierenden mittleren Partikelgrößen von 16 bis hin zu 175 nm mit monomodalen Partikelgrößenverteilungen bei PDIs von 0,02 bis 0,25 möglich, wie in den Abbildungen 3.6a und b dargestellt. Wie bei den nicht-isotonisch hergestellten Nanoemulsionen mit 1,75 %-igen oder 5 %-igen NaCl-Lösung war die mittlere Partikelgröße allein durch das Variieren des MCT:MHS Verhältnisses einstellbar. Auch hier eignete sich der Holliday Fit zur Anpassung der resultierenden mittleren Partikelgrößen, wie die Abbildung A.3a im Anhang zeigt. Mit kleiner werdender mittlerer Partikelgröße wurde der PDI ebenfalls geringer.

Das elektrokinetische Potential an der Scherebene der Nanoemulsionströpfchen wurde als Zeta Potential mittels elektrophoretischer Lichtstreuung in 0,1-fach verdünnter phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) bei physiologischem pH 7,4 bestimmt. Das Zeta Potential dieser Nanoemulsionen war unabhängig von der Zusammensetzung der Nanoemulsionen nahezu neutral zwischen -1,6 bis -4,6 mV, dargestellt in den Abbildung 3.5c und A.3c im Anhang.

Isotonizität wurde durch Anwendung der aufgestellten Gleichung 3.2 für die Formulierungen im blauen Bereich der Abbildung 3.5d erreicht. Die Formulierungen ab einem MHS:MCT Verhältnis von 2,5 in den grünen, gelben und roten Bereichen waren hyperton, obwohl diese in salzfreier wässriger Phase hergestellt wurden (vergleichend dazu Abbildungen A.3d und A.2a im Anhang). Eine Isotonisierung dieser Formulierungen war nach Gleichung 3.2 nicht mehr möglich, da die MHS Konzentration dieser Formulierungen bereits über 21,1 Gew.% lagen. Eine Isotonisierung dieser Formulierungen wäre nur durch eine höhere Schockverdünnung mit mehr bidestilliertem Wasser möglich. Das würde allerdings folgerichtig zu einem kleineren MCT Massenanteil führen, welcher als Matrix für die Inkorporation potentieller Wirkstoffe im Lipidkern der Nanoemulsionströpfchen zur Verfügung stände.

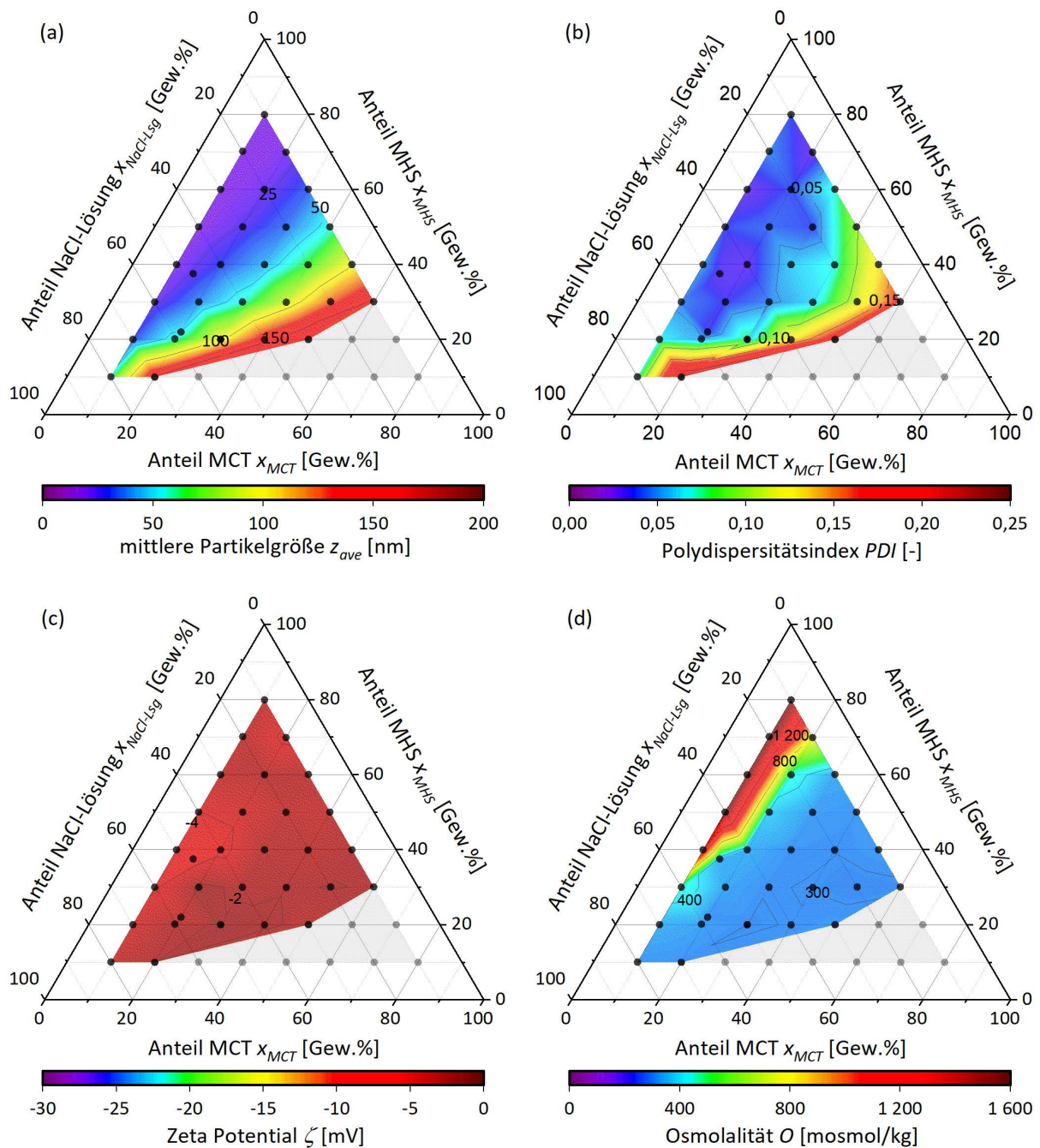


Abbildung 3.5. Ternäre Phasendiagramme zur Formulierung isotoner neutraler Nanoemulsionen mit deren nach der Schockverdünnung resultierenden (a) mittleren Partikelgrößen, (b) PDIs, (c) Zeta Potentialen und (d) Osmolalitäten (Punkte • : Zusammensetzung vor der Schockverdünnung; regenbogenfarbener Bereich: Bildung stabiler Nanoemulsionen; grauer Bereich: Instabilität oder keine Phaseninversion) nach [112].

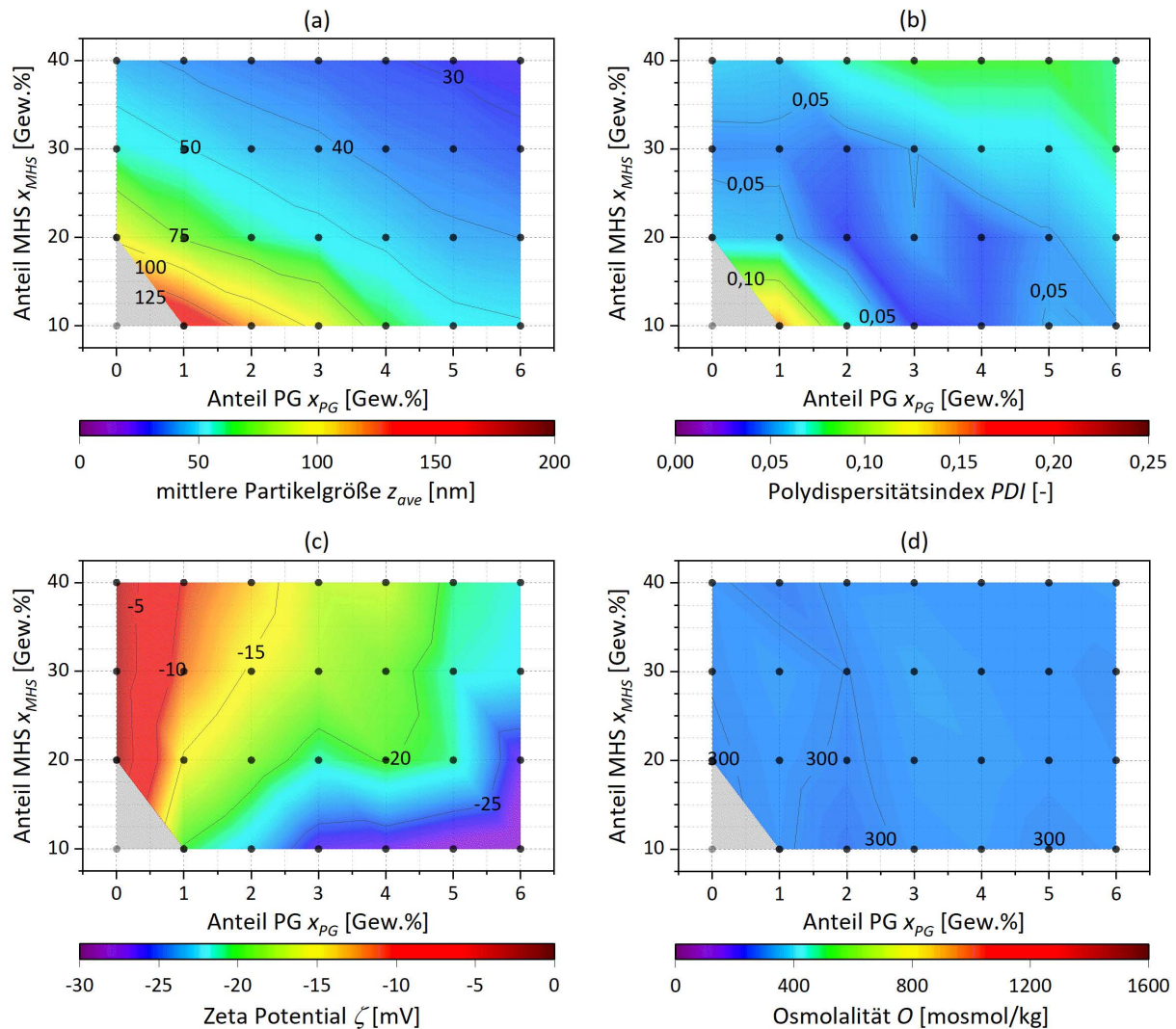


Abbildung 3.6. Konturdiagramme zur Formulierung isotoner negativer Nanoemulsionen mit deren nach der Schockverdünnung resultierenden (a) mittleren Partikelgrößen, (b) PDIs, (c) Zeta Potentialen und (d) Osmolalitäten (Punkte • : Zusammensetzung vor der Schockverdünnung; regenbogenfarbener Bereich: Bildung stabiler Nanoemulsionen; grauer Bereich: Instabilität oder keine Phaseninversion) nach [114].

3.1.3. Formulierung negativer Nanoemulsionen durch Oberflächenmodifikation

In weiteren Screening-Versuchen wurde die Oberfläche der Nanoemulsionen durch Integration des anionischen Phospholipids PG in die stabilisierende MHS-Schicht modifiziert, um so eine negative geladene Oberfläche der Emulsionströpfchen zu kreieren. Genau wie bei den Screening-Versuchen für die isotonen neutralen Nanoemulsionen wurde auch hier Isotonie durch die Berechnung der NaCl Konzentration der wässrigen Phase mittels der Gleichung 3.2 angestrebt. Der Massenanteil MCT betrug 30 Gew.% vor der Schockverdünnung und wurde wie die neutralen Nanoemulsionen ebenfalls auf 8 Gew.% mit eiskaltem bidestilliertem Wasser verdünnt. Abbildung 3.6 zeigt die resultierenden mittleren Partikelgrößen, PDIs, Zeta Potentiale, sowie Osmolalitäten der entstandenen Nanoemulsionen in den farblichen Bereichen. Äquivalent zur Darstellung in den vorherigen ternären Phasendiagrammen wurde in den grauen Bereichen ent-

weder die PIT_{begin} nicht vor dem Siedepunkt erreicht oder die Nanoemulsionen rahmten direkt auf bzw. koaleszierten.

Die Nanoemulsionen hatten mittlere Partikelgrößen von 27 bis zu 148 nm mit engen monomodalen Partikelgrößenverteilungen bei PDIs von 0,02 bis 0,15, wie in Abbildung 3.6a und b gezeigt. Sowohl der steigende MHS als auch PG Massenanteil verringerte die resultierende mittlere Partikelgröße der Nanoemulsionen. Im Kontrast zu den neutralen Nanoemulsionen durchlief der PDI ein Optimum mit sehr engen Partikelgrößenverteilungen für Nanoemulsionen von etwa 50 nm mittlerer Partikelgröße. Nanoemulsionen mit größeren sowie auch kleineren mittleren Partikelgrößen führten so zu einem Anstieg des PDIs und somit zu etwas breiteren Partikelgrößenverteilungen.

Wie in Abbildung 3.6c gezeigt, verringerte sich das Zeta Potential mit steigendem Massenanteil des anionischen PGs von nahezu neutral mit -2 mV bei 0 Gew.% PG und 20 - 40 Gew.% MHS bis hin zu fast -30 mV bei 6 Gew.% PG und 10 Gew.% MHS in 0,1-fach verdünntem PBS bei physiologischen pH 7,4. Das Zeta Potential war dabei nur vom Verhältnis PG zum MHS abhängig, wie in Abbildung A.4c im Anhang gezeigt. Eine Steigerung des PG:MHS Verhältnisses und damit einen zunehmenden Anteil an PG in der stabilisierenden MHS-Schicht der Emulsionströpfchen führte zu einer deutlichen Verringerung des Zeta Potentials ins Negative.

Die Abbildung 3.6d zeigt die Osmolalität der hergestellten und mit PG oberflächenmodifizierten negativen Nanoemulsionen. Unabhängig von deren Zusammensetzung waren alle Nanoemulsionen nahezu isoton mit Osmolalitäten zwischen 283 bis 318 mosmol/kg.

3.2. Physikochemische Eigenschaften der finalen Nanoemulsionen

Für die weitere *in vitro* sowie *in vivo* Charakterisierung der Nanoemulsionen mit unterschiedlichen Partikeleigenschaften wurden sieben Formulierungen ausgewählt, deren Kompositionen in Tabelle A.1 im Anhang aufgeführt sind. Jede einzelne Formulierung sollten dabei ein maßgeschneidertes Partikeldesign aufweisen mit anvisierten mittleren Partikelgrößen von 25, 50, 100 oder 150 nm, welche im folgenden mit den Abkürzungen NE25, NE50, NE100 und NE150 bezeichnet sind. Die Oberfläche sollte dabei für die erste Gruppe Nanoemulsionen neutral geladen sein, während für die zweite Gruppe mit den PG modifizierten Nanoemulsionen eine möglichst negative Oberflächenladung angestrebt wurde. Die partikeltechnologischen und physikochemischen Eigenschaften der ausgewählten Formulierungen sind in Abbildung 3.7 zusammengefasst.

Mit mittleren Partikelgrößen von 25,7, 50,5, 97,7 und 144,9 nm bei den neutralen, sowie mit 51,0, 95,7 und 147,5 nm bei den negativen Nanoemulsionen wurden die anvisierten mittleren Partikelgrößen reproduzierbar getroffen. Der PDI aller Nanoemulsionen war unter 0,15. Demnach wiesen alle Formulierungen eine enge monomodale Partikelgrößenverteilung auf, wie in den intensitätsgewichteten Partikelgrößenverteilungskurven in Abbildung 3.8 gezeigt. Bedingt durch die sehr engen monomodalen Partikelgrößenverteilungen der neutralen NE25 und NE50, sowie der negativen NE50 und NE100 waren die PDIs unter 0,05 bemerkenswert klein. Bei keiner Formulierung wurden Emulsionströpfchen größer als 5 μm im Durchmesser detektiert. Damit entsprachen alle sieben Formulierungen den USP Standards nach Kapitel 729 für eine sichere

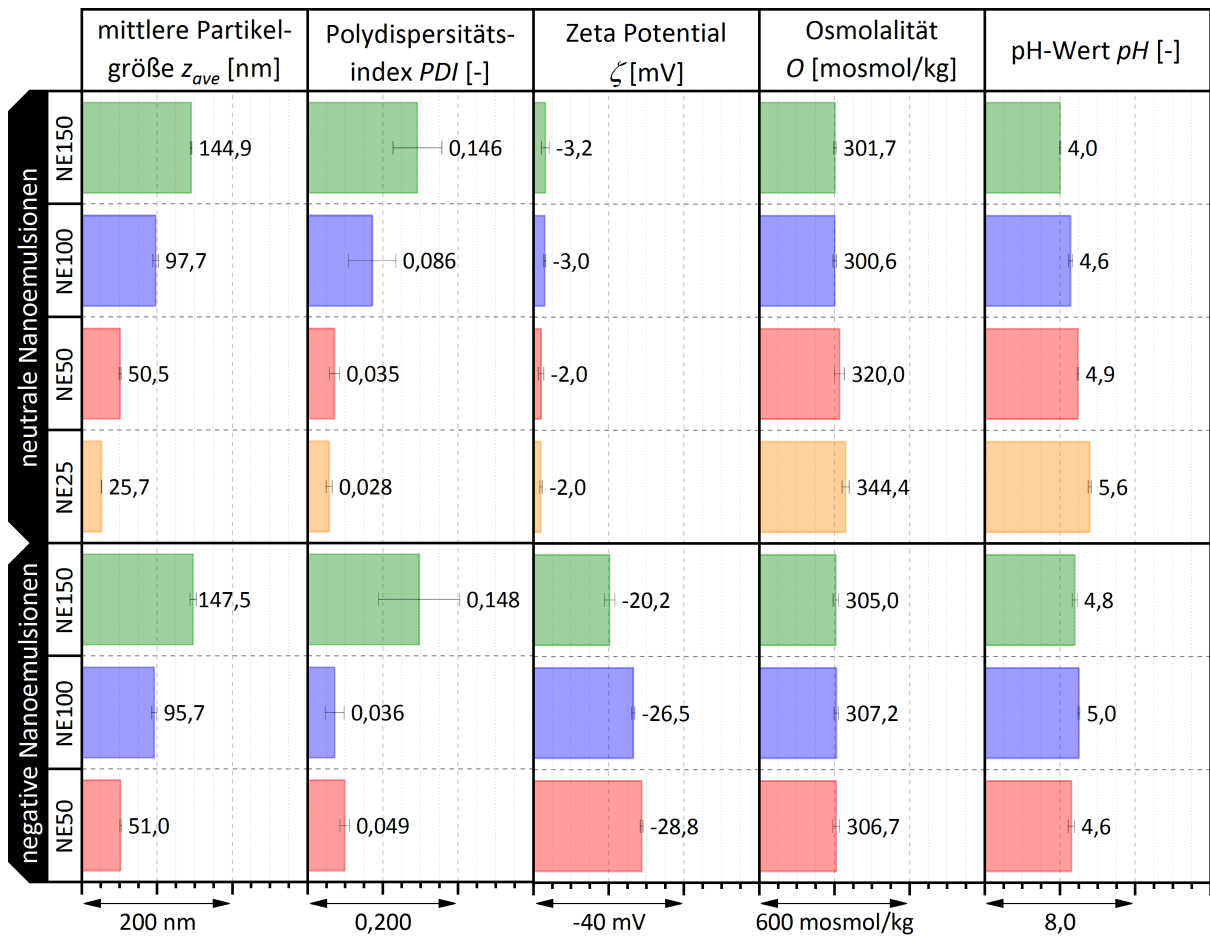


Abbildung 3.7. Physikochemische Eigenschaften der ausgewählten Nanoemulsionen nach [113, 114].

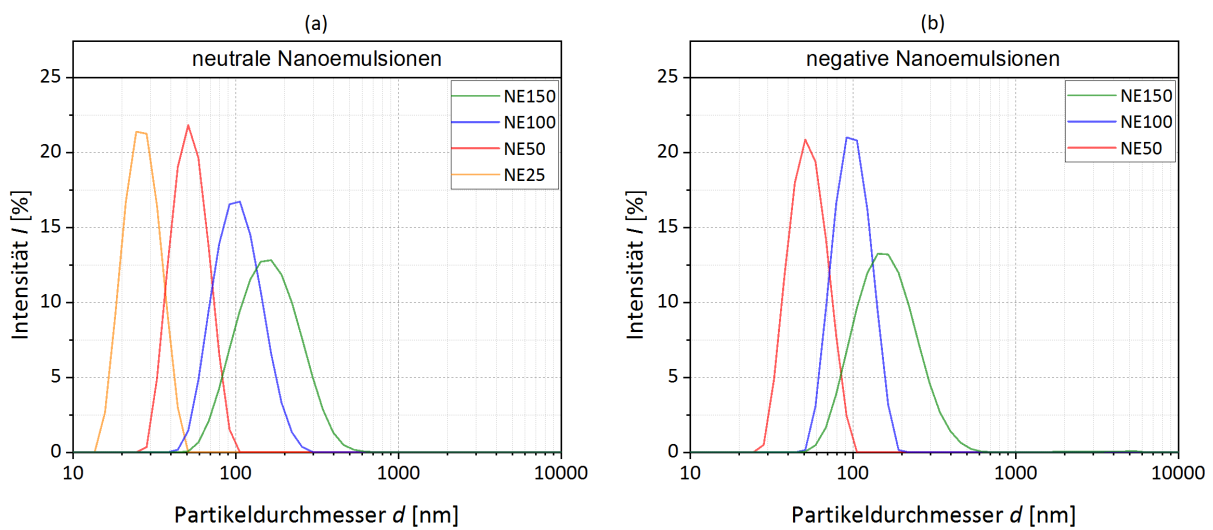


Abbildung 3.8. Intensitätsgewichtete Partikelgrößenverteilung der (a) neutralen und (b) negativen Nanoemulsionen.

intravenöse Applikation von Emulsionen [61,63]. Das Zeta Potential in 0,1-fach verdünntem PBS bei physiologischem pH 7,4 betrug für die neutralen Nanoemulsionen nahezu neutrale -2,0 bis -3,2 mV. Bei den negativen Nanoemulsionen mit der PG modifizierten Oberfläche wurden Zeta Potentiale von -20,2, -26,5 und -28,8 mV erreicht.

Die Osmolalität der drei negativen Nanoemulsionen NE50, NE100, NE150 sowie der zwei neutralen Nanoemulsionen NE100 und NE150 waren mit etwa 300 mosmol/kg isoton. Lediglich die beiden neutralen Nanoemulsionen NE25 und NE50 waren mit 344 und 320 mosmol/kg minimal hyperton, sodass für alle sieben Nanoemulsionen eine schmerzfreie intravenöse Injektion ohne Gefäßschäden sichergestellt sein sollte [65,66]. Mit pH-Werten zwischen 4,0 bis 5,6 waren die sieben verschiedenen Formulierungen leicht sauer und lagen damit im akzeptablen Bereich von pH 3 bis 11 für intravenöse Injektionen kleiner Volumina [65,68]. Innerhalb des gemessenen pH-Bereiches aller Nanoemulsionen und der kurzen Zeitspanne von der Herstellung der Nanoemulsionen ein bis zwei Tage vor der angestrebten intravenösen Applikation und dem Ende der Tierversuche einen Tag nach Applikation war eine säure-induzierte Degradierung des inkorporierten Fluoreszenzfarbstoffes DiR sehr unwahrscheinlich. Dieser wurde als chemisch stabil in einer Mikroumgebung mit pH-Werten über 4 beschrieben [136].

3.3. Sterilisation

Um eine sichere intravenöse Applikation der Nanoemulsionen zu gewährleisten, wurden drei verschiedene Sterilisationsverfahren charakterisiert: Eine Sterilisation durch Autoklavieren wurde bei 121 °C und 2 bar durchgeführt. Eine Strahlensterilisation erfolgte bei 25 kGy sowie 8 μ s-Pulsen von 10 MeV linear beschleunigter Elektronenstrahlen bei 460 Hz Wiederholrate und 3 Hz Abtastfrequenz. Für eine Sterilfiltration wurden die Nanoemulsionen durch 0,2 μ m Polyethersulfonfilter aseptisch gefiltert. Die Stabilität des in die Emulsionströpfchen inkorporierten Fluoreszenzfarbstoffes DiR wurde dabei mittels Fluoreszenzspektrometrie bei einer Anregungswellenlänge von 705 nm mit 10 nm Bandpass und einer Detektion des Emissionsspektrums von 740 bis 920 nm Wellenlänge mit 1 nm Schrittweite repräsentativ für alle Nanoemulsionen anhand der neutralen NE150 charakterisiert. Die ermittelten Fluoreszenzspektren der mit DiR gelabelten neutralen NE150 nach Produktion und den drei verschiedenen Sterilisationsverfahren sind in Abbildung 3.9 dargestellt.

Beim Autoklavieren sowie bei der Strahlensterilisation verlor der Fluoreszenzfarbstoff DiR seine fluoreszierenden Eigenschaften vollständig. Bei der aseptischen Sterilfiltration blieben die fluoreszierenden Eigenschaften des Fluoreszenzfarbstoffes DiR unverändert. Darüber hinaus kam es zu keinem Verlust der Nanoemulsion im Filtermaterial, da die Intensität der Fluoreszenz vor und nach dem Sterilfiltrieren gleich blieb. Für die Nanoemulsionen kleinerer Partikelgröße ist dementsprechend ein Verlust der Nanoemulsion im Filtermaterial ebenfalls ausgeschlossen. Folglich war lediglich die aseptische Sterilfiltration ein geeignetes Verfahren um eine sichere intravenöse Applikation in den folgenden Tierversuchen zu gewährleisten, ohne Verluste der Nanoemulsionen sowie der fluoreszierenden Eigenschaften vom DiR. Die Partikelgröße und der PDI blieb für alle Nanoemulsionen bei der Sterilfiltration unverändert.

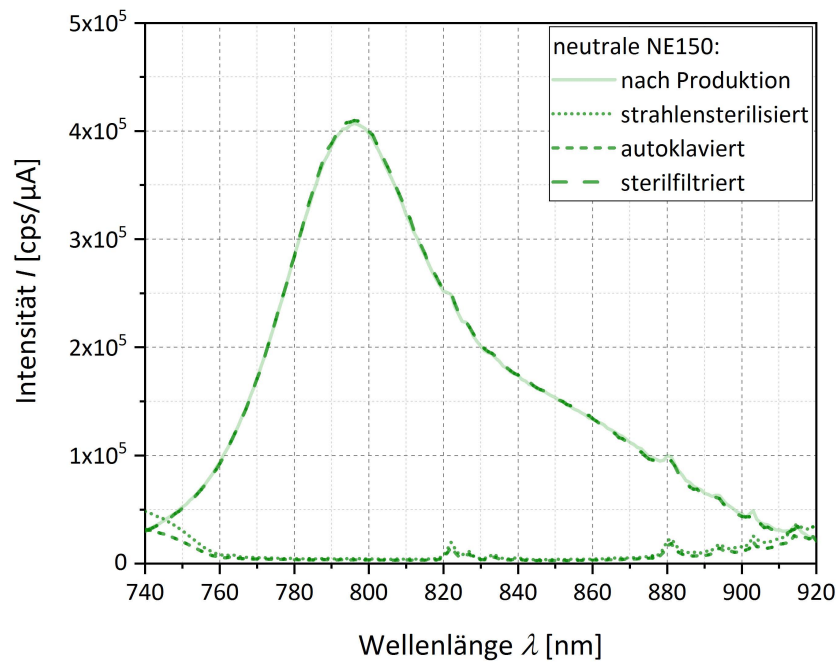


Abbildung 3.9. Fluoreszenzspektrometrie der neutralen NE150 nach Produktion, autoklaviert, strahlensterilisiert und sterilfiltriert.

3.4. Langzeitstabilität

Als metastabile Systeme neigen Nanoemulsionen zur physikalischen Destabilisierung durch Flokkulation, Koaleszenz, Ostwald-Reifung oder sogar Aufrahmen. Die Destabilisierung der Nanoemulsionen kann dabei über Zeiträume von bereits kurz nach deren Herstellung bis hin zu mehreren Monaten oder gar Jahre andauern [137, 138]. Daher wurden aseptisch sterilfiltrierte Nanoemulsionen auf ihre physikalische Destabilisierung untersucht und entsprechend der Richtlinie Q1A der International Conference for Harmonization (ICH) bei 5 ± 3 °C, Raumtemperatur sowie 40 ± 2 °C über einen Zeitraum von 12 Wochen gelagert. Der Einfluss der Lagerbedingungen auf die mittleren Partikelgrößen und deren Partikelgrößenverteilungen als PDI ist in Abbildung 3.10 dargestellt.

Bei der Lagertemperatur von 5 ± 3 °C sowie bei Raumtemperatur blieb die mittlere Partikelgröße aller Nanoemulsionen über den gesamten Messzeitraum von 12 Wochen nahezu konstant. Ebenso die PDIs blieben für fast alle Nanoemulsionen sowohl bei 5 ± 3 °C als auch bei Raumtemperatur nahezu konstant. Lediglich der PDI der neutralen NE25 war nach 12 Wochen Lagerung bei Raumtemperatur leicht erhöht sowie die PDIs der negativen NE50 in der achten Woche Lagerung bei 5 ± 3 °C und Raumtemperatur. Diese lagen allerdings in der zwölften Woche wieder auf dem Niveau der vorherigen Messungen bis zur vierten Woche, sodass es sich hier möglicherweise um Ausreißer handelte.

Bei größerer thermischer Belastung durch 40 ± 2 °C Lagertemperatur zeigte sich neben stark steigendem PDI sowohl bei der neutralen NE25 als auch bei der negativen NE50 ein deutlicher Anstieg der mittleren Partikelgröße bereits nach 8 Wochen Lagerung, die auch in der zwölften Woche weiter stiegen. Die neutrale NE50 wies in der zwölften Woche einen mäßigen Anstieg des

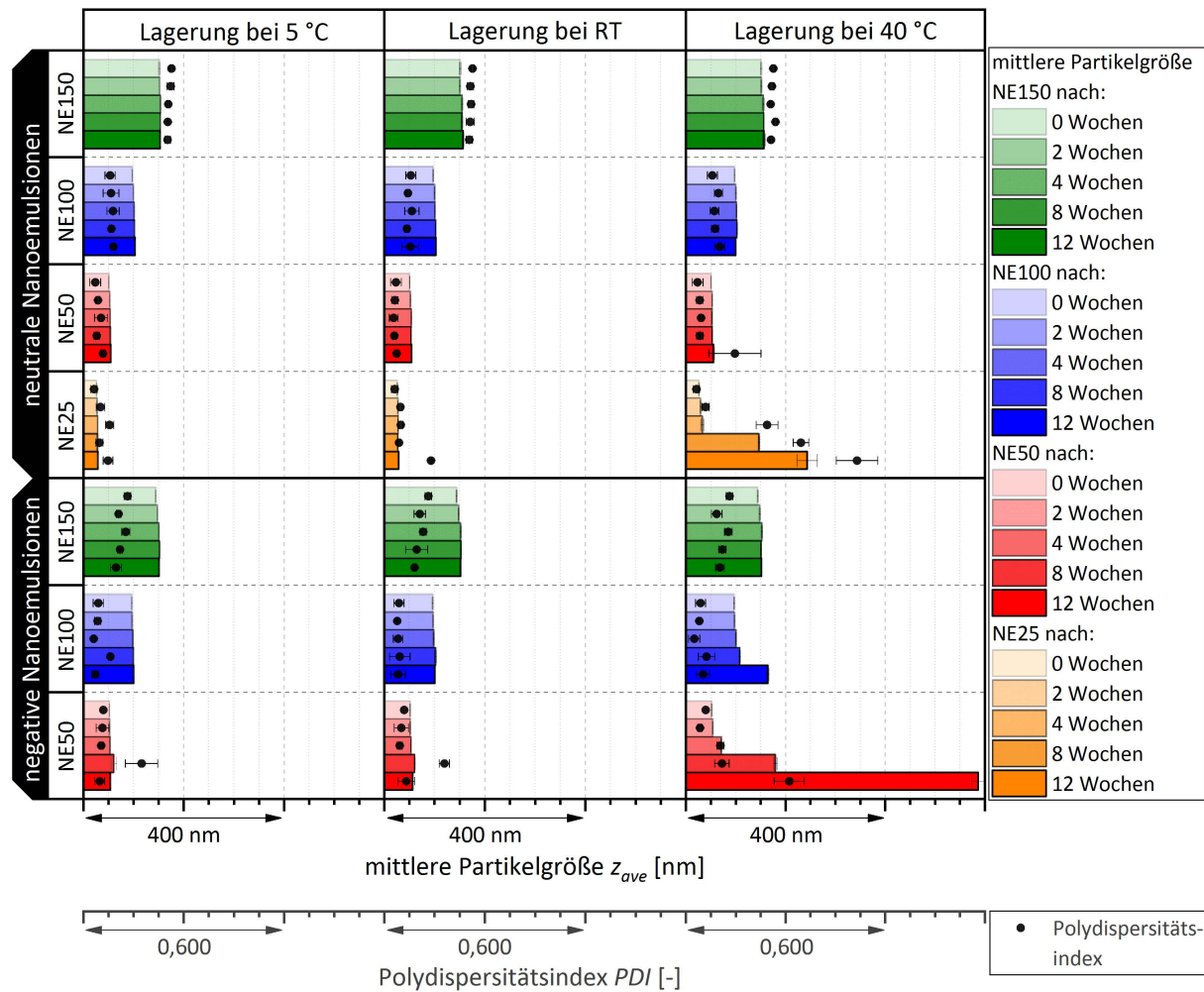


Abbildung 3.10. Langzeitstabilität der Nanoemulsionen bei den empfohlenen Lagerbedingungen nach ICH-Richtlinie Q1A bei $5 \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$, Raumtemperatur (RT) und $40 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ nach [112,114].

PDIs auf, während die mittlere Partikelgröße konstant blieb. Bei der negative NE100 zeigte sich ein leichter Anstieg der mittleren Partikelgröße, allerdings bei konstant verbleibenden PDI. Für die neutrale NE100, neutrale NE150 sowie negative NE150 blieben die mittlere Partikelgrößen und PDIs über den kompletten Messzeitraum von 12 Wochen auch bei der höheren thermischen Belastung von $40 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ konstant.

Die Abbildung 3.11 zeigt die intensitätsgewichteten Partikelgrößenverteilungen der Nanoemulsionen nach 12 Wochen Lagerung bei den drei untersuchten Lagerbedingungen. Diese bestätigen zusammen mit den oben diskutierten mittleren Partikelgrößen und PDIs, dass alle Nanoemulsionen bei gemäßigten Lagerbedingungen von $5 \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$ und Raumtemperatur ausreichend stabil gegenüber einer physikalischen Destabilisierung durch Flokkulation, Koaleszenz, Ostwald-Reifung oder Aufrahmen waren. Lediglich die neutrale NE150 wies einen zweiten, jedoch sehr kleinen Peak im unteren Mikrometerbereich auf. Bei der größeren thermischen Belastung von 12 Wochen bei $40 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ Lagertemperatur wiesen die Partikelgrößenverteilung der neutralen NE50, neutralen NE100, neutralen NE150 und negativen NE150 auf eine ausreichende Stabilität hin. Bei der neutralen NE25 bildete sich durch die physikalische Destabilisierung eine mehrmoda-

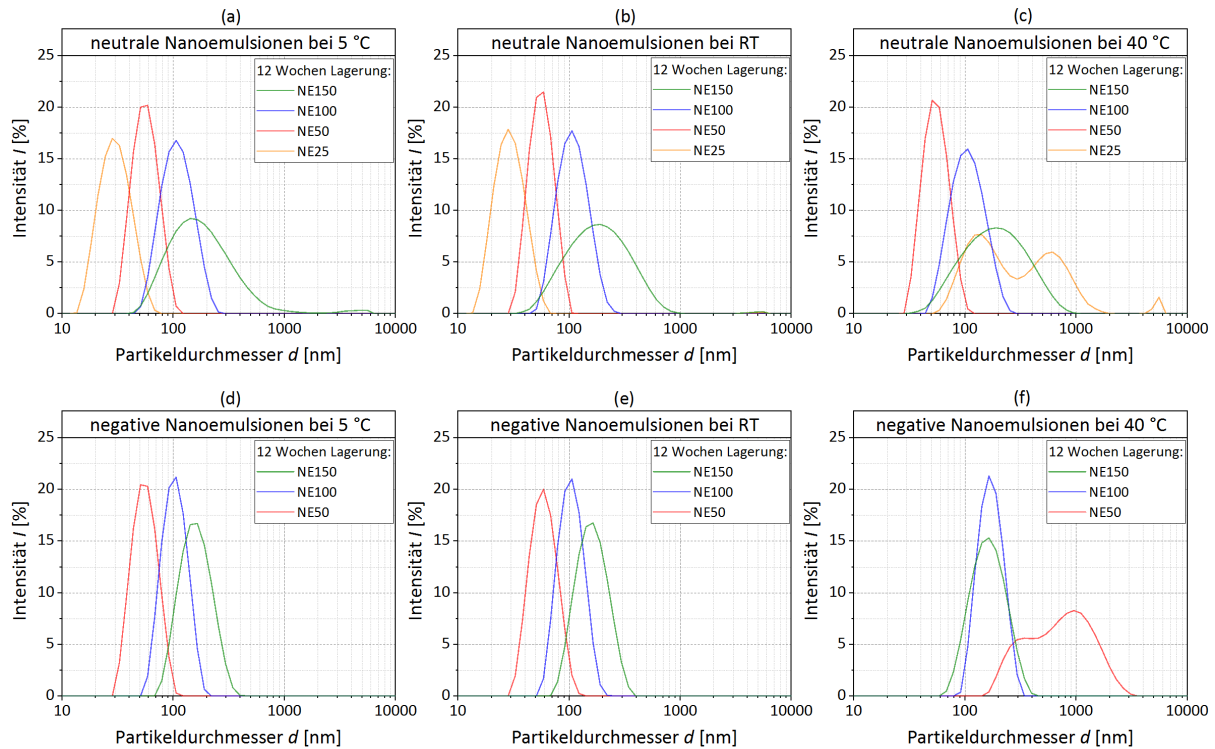


Abbildung 3.11. Intensitätsgewichtete Partikelgrößenverteilungen der (a-c) neutralen und (d-f) negativen Nanoemulsionen nach 12 Wochen Lagerung bei den empfohlenen Lagerbedingungen nach ICH-Richtlinie Q1A bei $5 \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$, Raumtemperatur (RT) und $40 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ nach [114].

le Partikelgrößenverteilung aus mit deutlicher Verschiebung zu größeren Partikeldurchmessern. Während die Partikelgrößenverteilung der negativen NE50 ein ähnliches Bild der physikalischen Destabilisierung zeigte, war die Partikelgrößenverteilung der negativen NE100 bei gleichbleibender Breite der Partikelgrößenverteilung deutlich zu größeren Partikeldurchmessern verschoben. Der Mechanismus der physikalischen Destabilisierung dieser drei Nanoemulsionen wurde nicht näher untersucht. Ein weiteres Fortschreiten der physikalischen Destabilisierung könnte schließlich zum Aufrahmen dieser Nanoemulsionen führen, dem Auftreiben der größer werdenden Emulsionstropfen an die Oberfläche aufgrund von Dichteunterschieden zwischen wässriger und lipider Phase. Schlussendlich empfahl sich für die Lagerung dieser Nanoemulsionen eine gemäßigte Temperatur, bestenfalls $5 \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$, um eine physikalische Destabilisierung vorzubeugen oder möglichst lange herauszuzögern.

3.5. Zelltoxizität auf Fibroblasten

Die Zelltoxizität der Nanoemulsionen sowie einer wässrigen 20 %-igen MHS-Lösung wurde mittels Resazurin-Reduktionsassays mit embryonalen Maus-Fibroblasten (3T3) und normalen menschlichen dermalen Fibroblasten (NHDF) nach 24 h Inkubation bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ ermittelt. Die Dosis-Wirkungs-Kurven der Zellviabilität gegen die aufgebene Konzentration aseptisch sterilfiltrierter Nanoemulsionen oder 20 %-iger MHS-Lösung sind in Abbildung 3.12 aufgeführt. Die Zellviabilität ist dabei prozentual zur negativen Kontrolle mit unbehandelten Zellen angegeben.

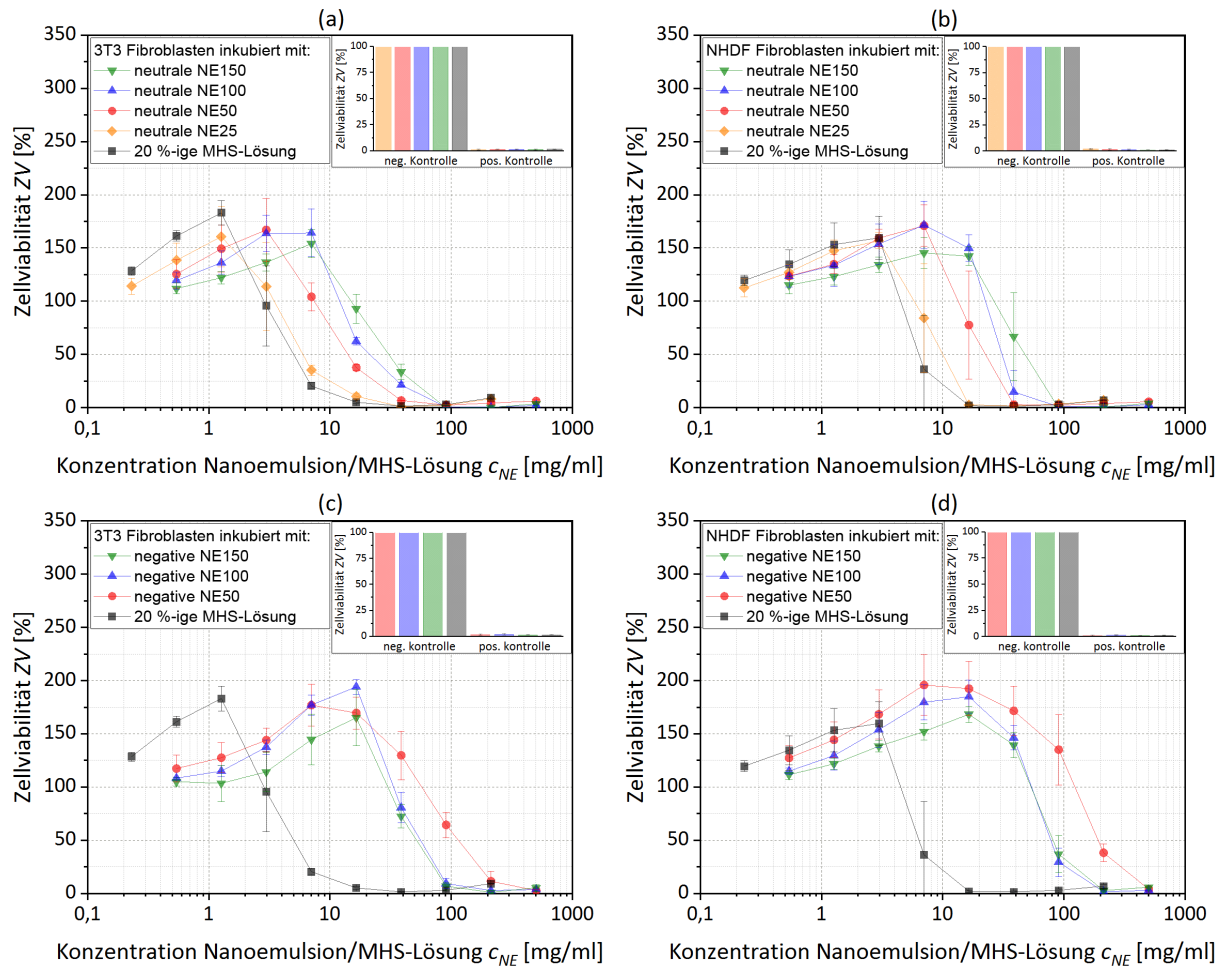


Abbildung 3.12. Dosis-Wirkungs-Kurven über die Konzentration der Nanoemulsionen (DiR beladenes MCT, MHS und NaCl-Lösung) per ml Zellkulturmedium für die (a,b) neutralen Nanoemulsionen und (c,d) negativen Nanoemulsionen auf 3T3 und NHDF Fibroblasten nach 24 h Inkubation nach [113, 114].

Mit steigender Konzentration der Nanoemulsionen sowie der 20 %-igen MHS-Lösung wurden wachstumsfördernde Effekte auf beide Zelllinien bis hin zu einer maximalen Zellviabilität von 150 bis 200 % festgestellt, vermutlich durch einen stimulierten Zellmetabolismus. Dabei verschob sich die maximale Zellviabilität mit steigender mittlerer Partikelgröße der Nanoemulsionen zu höheren aufgegebenen Konzentrationen. So lagen die maximale Zellviabilität der neutralen NE25 bei 1,7 mg/ml oder 3,0 mg/ml für die 3T3 bzw. NHDF Fibroblasten, während diese bei den neutralen NE100 und NE150 bei 7,0 mg/ml sowohl für die 3T3 als auch NHDF Fibroblasten lagen (vergleiche Abbildung 3.12a und b). Ähnlich verhielt es sich bei den negativen Nanoemulsionen, dort war die maximale Zellviabilität der negativen NE50 bei 7,0 mg/ml und die der negativen NE100 und NE150 bei 16,4 mg/ml sowohl für die 3T3 als auch NHDF Fibroblasten (vergleiche Abbildung 3.12c und d). Mit steigender Konzentration der Nanoemulsionen über die maximale Zellviabilität hinaus wurden zytotoxische Effekte dominant und führten zu einer starken Abnahme der Zellviabilität bis nahezu 0 %. Allerdings wies die abnehmende Zellviabilität der negativen NE50 eine geringere Steigung im Vergleich zu der negativen NE100 sowie NE150 auf, was von einer robusteren Tensidschicht durch größere elektrostatische Kräfte herrühren könnte. Denn bei

gleichem Anteil MHS wurde bei der negativen NE50 im Vergleich zu der negativen NE100 sowie NE150 ein mehr als doppelt bzw. sechsfach größerer Anteil anionisches PG in die Grenzfläche der Nanoemulsionströpfchen inkorporiert.

Zusätzlich zu den Nanoemulsionen wurde die Zelltoxizität von wässrigen 20 %-igen MHS-Lösungen auf die beiden verwendeten Zelllinien untersucht. Die Verläufe der Dosis-Wirkungs-Kurven der MHS-Lösungen ähnelten bei beiden Zelllinien den Kurvenverläufen der neutralen NE25, welche ebenfalls einen Massenanteil von 20 Gew.% MHS zur Stabilisierung der kleinen Nanoemulsionströpfchen enthielt. Durch das Auftragen der Dosis-Wirkungs-Kurven über die Konzentration des MHS Gehaltes in den Nanoemulsionen zeigte sich, dass die Viabilität der Zellen für fast alle Nanoemulsionen dem Verlauf der reinen MHS-Lösungen ähnelten, wie in Abbildung A.5 im Anhang gezeigt. Allerdings wich auch bei dieser Darstellung der Verlauf der negativen NE50 von dem Verlauf der reinen MHS-Lösungen deutlich ab und war zu größeren MHS Konzentrationen verschoben.

Wie in den Abbildungen 3.13 und 3.14 dargestellt, wurde die Morphologie der Fibroblasten mittels Phasenkontrastmikroskopie über die steigende Konzentration der Nanoemulsionen kontrolliert. In den unbehandelten negativ-Kontrollen sowie bei niedrigen Konzentrationen der Nanoemulsionen waren bei den 3T3 Fibroblasten kleine ovale, spindelförmige sowie größere Zellen erkennbar, während die NHDF Fibroblasten ausschließlich eine spindelförmige Morphologie zeigten. Somit entsprach die Morphologie beider Zelllinien der Morphologie gesunder Fibroblasten aus vergleichender Literatur [139, 140]. Mit steigender Konzentration der Nanoemulsionen und mit der abnehmenden Zellviabilität einhergehend wurden zunehmend vereinzelt vorliegende, inhibierte Fibroblasten beobachtet, welche eine kugelige bis ovale Form besaßen. Darüber hinaus wurde neben der morphologischen Änderung der inhibierten Fibroblasten eine zunehmende Bildung von nadelförmigen Kristallen beobachtet. Bei der 20 %-igen MHS-Lösung wurde ebenfalls mit abnehmender Zellviabilität zunehmend inhibierte Fibroblasten sowie nadelförmige Kristalle beobachtet, welche sich folgerichtig aus einem metabolischen Abbauprodukt von MHS bildeten - der 12-Hydroxystearinsäure.

Solch ein Auskristallisieren von 12-Hydroxystearinsäure als metabolisches Abbauprodukt von MHS ist allerdings *in vivo* unwahrscheinlich, aufgrund von anders herrschenden Transport- und Metabolismusbedingungen *in vivo*. Es wurde experimentell festgestellt, dass sich 12-Hydroxystearinsäure im Körperfett von Ratten, hauptsächlich im Bauchfett ablagerte, nach einer 12-Hydroxystearinsäure-haltigen Diät über einen Zeitraum von 16 Wochen. Darüber hinaus wurde die 12-Hydroxystearinsäure zu ihren Metaboliten 10-Hydroxypalmitinsäure und 8-Hydroxymyristinsäure durch sukzessiven Verlust von je zwei Kohlenstoffeinheiten am Carboxylende der Fettsäurekette abgebaut [141]. Eine weitere *in vivo* Studie zeigte einen schnellen Abbau der 12-Hydroxystearinsäure. So konnte 5 min nach intravenöser Injektion nur ein Fünftel der radioaktiv markierten 12-Hydroxystearinsäure aus dem Körper der gesamten Ratte zurückgewonnen werden [142].

Die mediane inhibitorische Konzentration (IC_{50}) auf die Zellviabilität wurde mittels linearer Interpolation zwischen den beiden Datenpunkten direkt ober- und unterhalb von 50 % Zellviabilität ermittelt, da die Dosis-Wirkungs-Kurven nicht einer sigmodialen Kurve entsprachen und

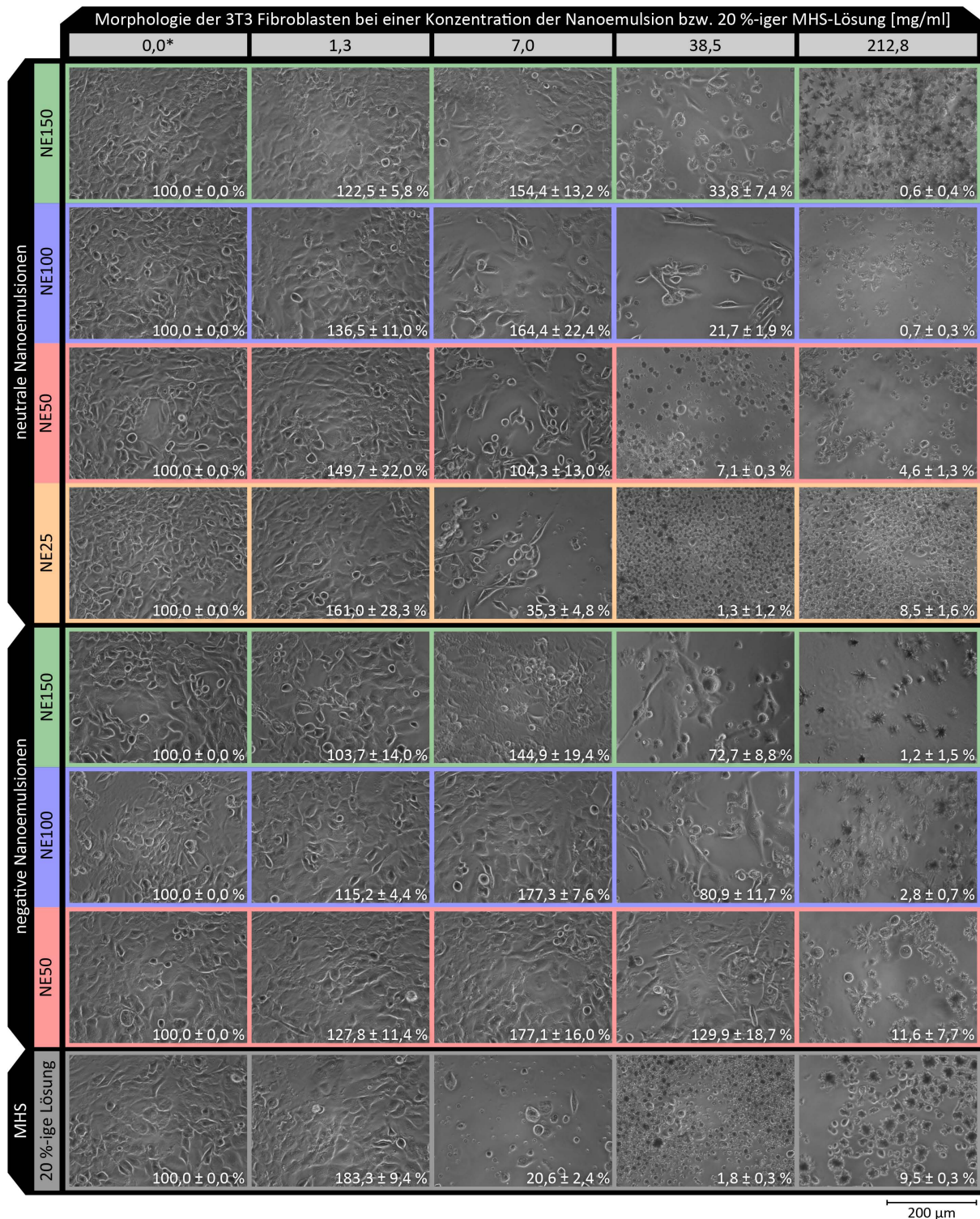


Abbildung 3.13. Phasenkontrastmikroskopiebilder bei 20-facher Vergrößerung mit den morphologischen Änderungen der 3T3 Fibroblasten sowie die Bildung nadelförmiger Kristalle aus 12-Hydroxystearinsäure bei steigender Konzentration der Nanoemulsionen sowie einer 20 Gew.% MHS Lösung nach 24 h Inkubation (*negative Kontrolle; gemittelte Zellviabilität ± Standardabweichung als Prozentzahl im jeweiligen Mikroskopiebild) nach [114].

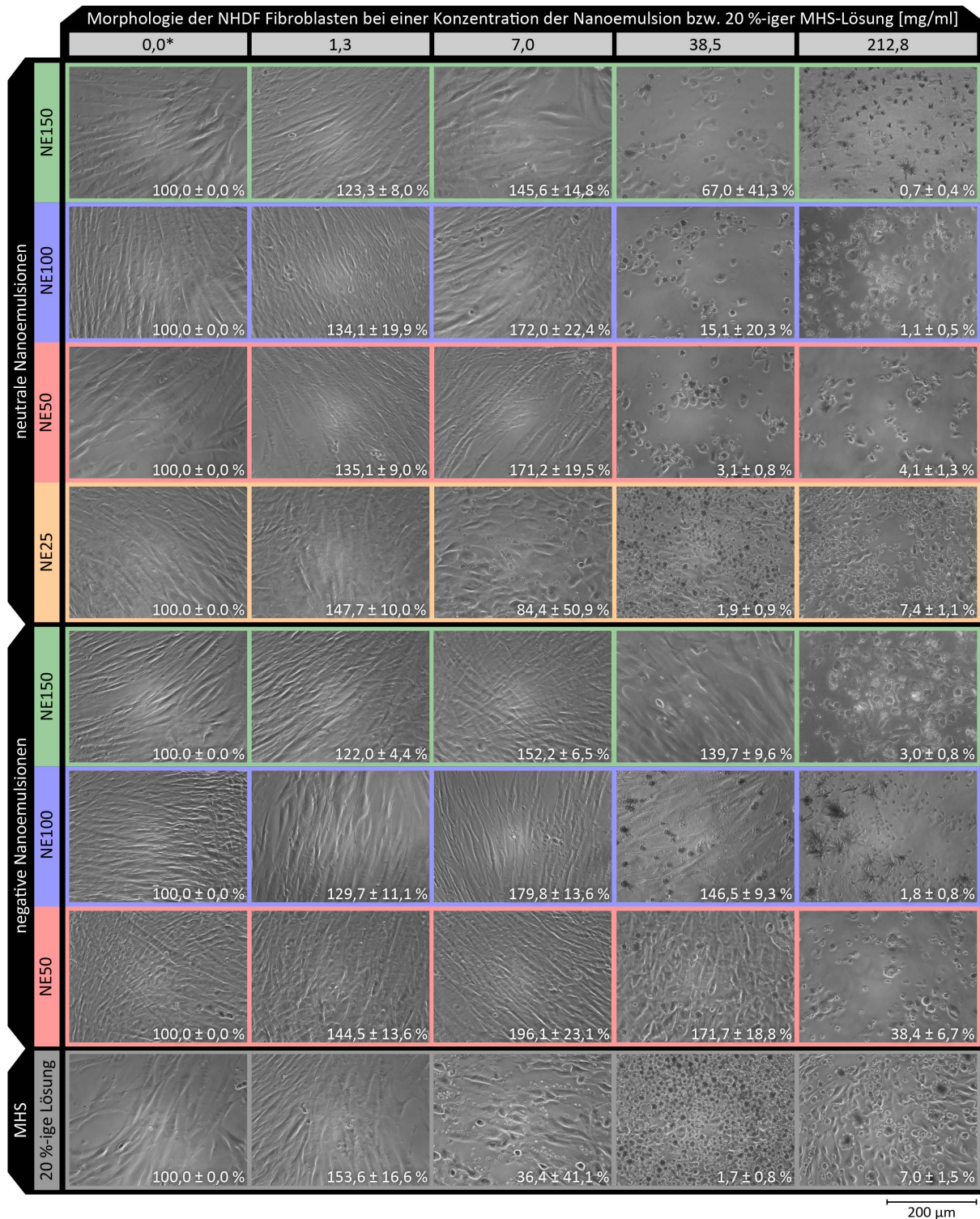


Abbildung 3.14. Phasenkontrastmikroskopiebilder bei 20-facher Vergrößerung mit den morphologischen Änderungen der NHDF Fibroblasten sowie die Bildung nadelförmiger Kristalle aus 12-Hydroxystearinsäure bei steigender Konzentration der Nanoemulsionen sowie einer 20 Gew.% MHS Lösung nach 24 h Inkubation (*negative Kontrolle; gemittelte Zellviabilität ± Standardabweichung als Prozentzahl im jeweiligen Mikroskopiebild) nach [114].

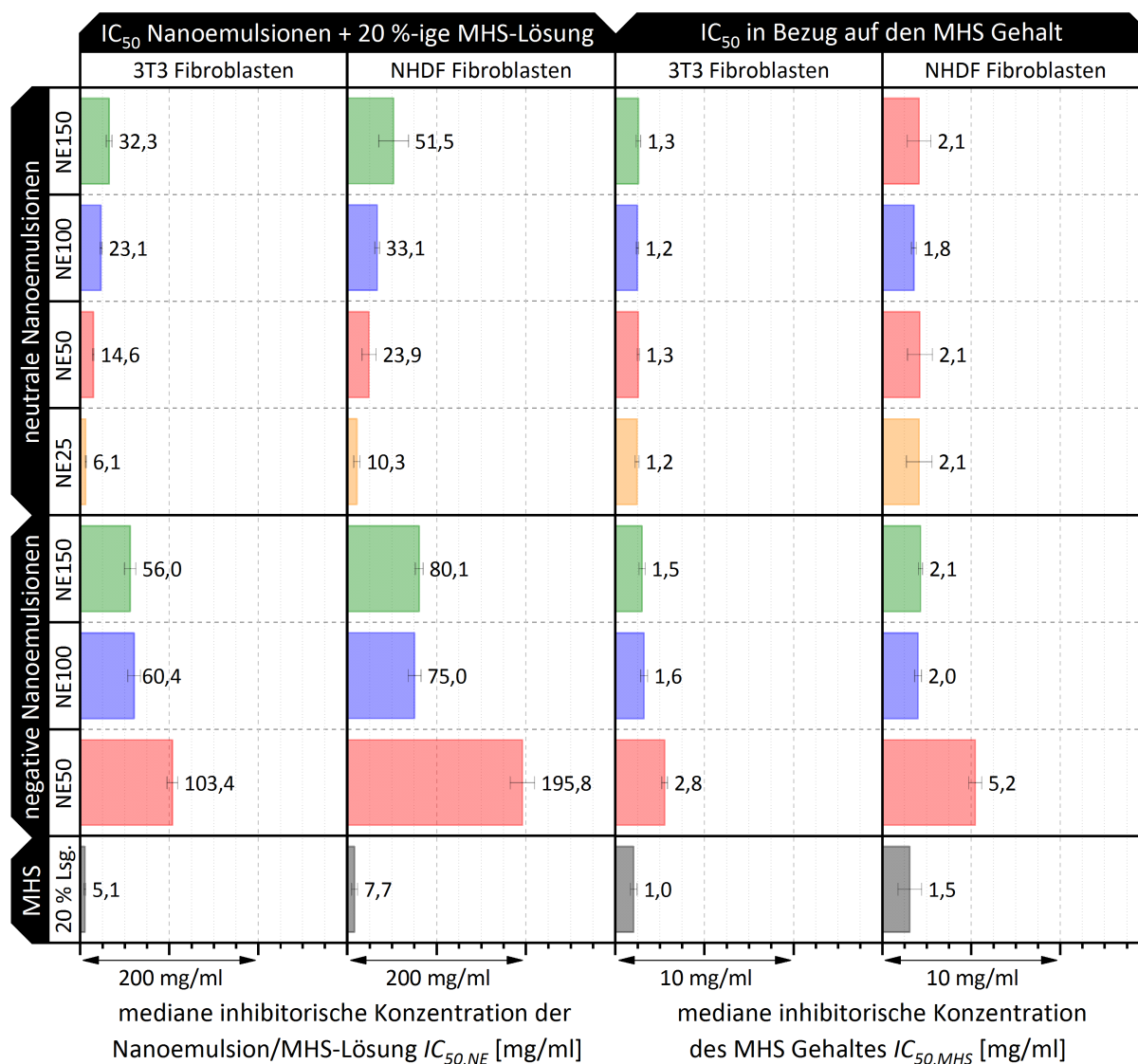


Abbildung 3.15. IC_{50} bezogen auf die Gesamtmasse der Nanoemulsionen (DiR beladenes MCT, MHS und NaCl-Lösung) per ml Zellkulturmedium nach [113,114] sowie zusätzlich bezogen auf den MHS Gehalt auf 3T3 und NHDF Fibroblasten nach 24 h Inkubation.

ein entsprechender Fit nicht möglich war. Die Abbildung 3.15 zeigt die ermittelten IC_{50} , zum einen bezogen auf die Gesamtmasse der auf die Fibroblasten aufgegebenen Nanoemulsionen und zum anderen bezogen auf den MHS Gehalt der Nanoemulsionen. Mit steigender Partikelgröße vergrößerte sich bei den neutralen Nanoemulsionen die IC_{50} von 6,1 mg/ml auf 32,3 mg/ml für die 3T3 Fibroblasten sowie von 10,3 mg/ml auf 51,5 mg/ml für die NHDF Fibroblasten. Bei den negativen Nanoemulsionen lagen die IC_{50} für die negative NE100 und NE150 nahezu identisch bei 60,4 bzw. 56,0 mg/ml für die 3T3 Fibroblasten sowie bei 75,0 bzw. 80,1 mg/ml für die NHDF Fibroblasten. Die IC_{50} der negativen NE50 lag deutlich höher bei 103,4 mg/ml für 3T3 Fibroblasten bzw. 195,8 mg/ml für die NHDF Fibroblasten. Bezogen auf den MHS Gehalt in den Nanoemulsionen waren alle IC_{50} fast gleich groß, bis auf die der negativen NE50. Darüber hinaus entsprachen sie nahezu der IC_{50} der reinen 20 %-igen MHS-Lösungen für beide Zelllinien.

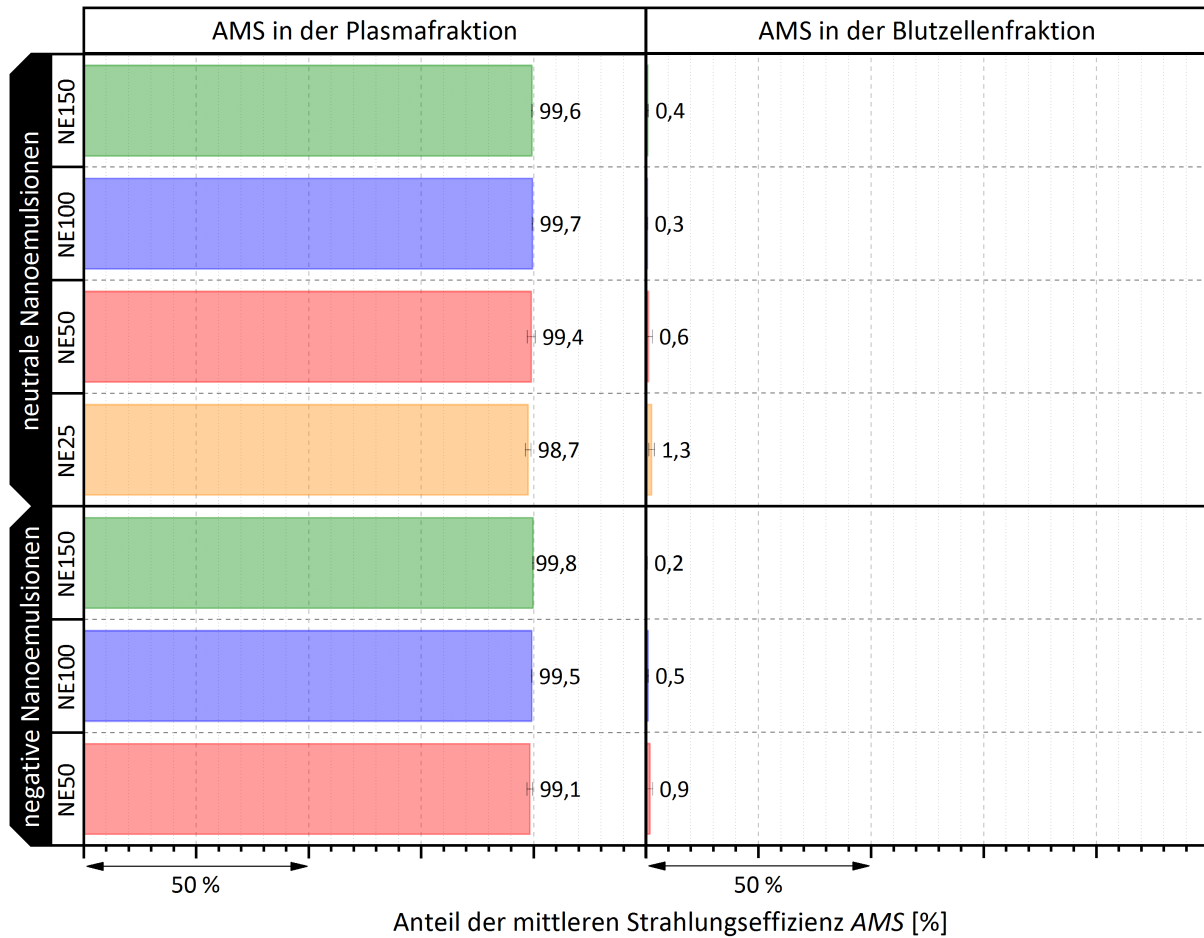


Abbildung 3.16. AMS der DiR gelabelten Nanoemulsionen in der Blutzellen- und Plasmafraktion nach 4 h Inkubation nach [113,114].

Aufgrund den nahezu identischen Dosis-Wirkungs-Kurven sowie den ermittelten IC_{50} bezogen auf den MHS Gehalt der Nanoemulsionen und der reinen 20 %-igen MHS-Lösung konnte dieses nicht-ionische Tensid als der maßgebende inhibitorische Inhaltsstoff der Nanoemulsionen auf die Zellviabilität der 3T3 und NHDF Fibroblasten identifiziert werden. Dabei verursachte möglicherweise die beobachtete Kristallbildung aus 12-Hydroxystearinsäure durch den metabolischen MHS-Abbau den Zelltod der Fibroblasten. Identisch zu dieser Schlussfolgerung wurde das zur Stabilisierung genutzte MHS ebenfalls bei lipiden Nanokapseln als maßgebendes zytotoxisches Tensid auf verschiedenen Zelllinien beschrieben [14,143,144].

3.6. Interaktion mit Blutzellen

Die Interaktion von aseptisch sterilfiltrierter und mit Fluoreszenzfarbstoff DiR beladener Nanoemulsionen mit Blutzellen wurde nach einer 4-stündigen Inkubation bei Raumtemperatur von 50 μ l jeder Formulierung in jeweils 100 μ l Vollblut von SKH1-*Hr^{Jur}* Elite Mäusen untersucht. Die AMS des Fluoreszenzsignals der voneinander separierten Plasma- und Blutzellenfraktionen wurde durch Fluoreszenzbildgebung ermittelt und sind in Abbildung 3.16 dargestellt.

Mit kleiner werdender mittlerer Partikelgröße stieg die sehr geringe AMS in der Blutzellenfraktion von 0,4 auf 1,3 % bei den neutralen sowie von 0,2 auf 0,9 % bei den negativen Nanoemulsionen an. Die kleineren Nanoemulsionen wurden demnach entweder bedingt durch ihre kleine Partikelgröße geringfügig besser in die Blutzellen aufgenommen oder die inkorporierten DiR-Moleküle transferierten im geringen Umfang aus dem Lipidkern der Nanoemulsionen durch die Zellmembran in die Blutzelle. Letztere Option resultierte möglicherweise aus der für solch einen Transfer zur Verfügung stehenden größeren spezifischen Oberfläche der kleineren Nanoemulsionen im Vergleich zu den größeren Nanoemulsionen. Im Großen und Ganzen zeigten die sehr niedrigen AMS-Werte der Blutzellenfraktion im Vergleich zu den nahezu bei 100 % liegenden AMS-Werte der Plasmafraktion jedoch, dass sowohl die neutralen als auch die negativen Nanoemulsionen aller mittleren Partikelgrößen nur marginal mit den Blutzellen interagierten und nahezu der gesamte stark lipophile Fluoreszenzfarbstoff DiR mit einem logP von 17,4 [128] inert im MCT-Kern aller Nanoemulsionen verblieb. Diese Ergebnisse deckten sich mit den Schlussfolgerungen einer Studie, bei der weniger als 5 % eines ähnlichen Dialkylcarbocyanin-Fluoreszenzfarbstoffes DiI (logP von 20,0) nur sehr langsam über einen Zeitraum von mehreren Wochen bei 23 sowie bei 37 °C von einer Donor- zu einer Akzeptor-Nanoemulsion transferierte [48].

3.7. Biodistribution in weiblichen Mäusen

Für die Tierversuche wurden die Nanoemulsionen mit zuvor sterilisierten Edukten, bis auf die DiR-Stammlösung in Ethanol, aseptisch hergestellt und sterilfiltriert. Die Biodistribution dieser Nanoemulsionen wurde nach intravenöser Einzeldosis in die Schwanzvene von je fünf immunkompetenten SKH1-*Hr^{hr}* Elite Mäusen pro Formulierung mittels Fluoreszenzbildgebung untersucht. Mit der Wahl der haarlosen immunkompetenten SKH1-*Hr^{hr}* Elite Mäuse, welche ihr Fell innerhalb der ersten drei Wochen nach Geburt wieder verlieren, konnten darüber hinaus Interferenzen zwischen Fell und dem anregenden sowie emittierten Licht des Fluoreszenzfarbstoffes DiR ausgeschlossen werden [130, 145, 146].

Das experimentelle Design mit den Versuchsgruppen der Mäuse unterschiedlichen Lebensalters sowie der generelle zeitliche Ablauf der Tierversuche sind in Abbildung 3.17 zusammengefasst. Wie in Abbildung 3.17a gezeigt, wurde der Einfluss des Partikeldesigns auf die Biodistributionsprofile in der Gruppe der adulten Mäuse mit einer Applikation von je 200 µl sterilfiltrierter negativer sowie neutraler Nanoemulsionen aller Partikelgrößen untersucht. Der Effekt des reproduktiven Alters auf die Biodistributionsprofile wurde mittels Applikation von je 100 µl der neutralen Nanoemulsionen aller Partikelgrößen in der Gruppe der juvenilen präpuberaler Mäuse und je 200 µl in den Gruppen der fruchtbaren adulten sowie der unter Fruchtbarkeitsverlust leidenden seneszenten Mäusen untersucht. *In vivo* Fluoreszenzbildgebung aller Mäuse wurde direkt nach der Applikation und nochmals nach 24 h unter Gasnarkose mit Isofluran durchgeführt, dargestellt in Abbildung 3.17b. Anschließend wurden die Mäuse noch in Narkose zur weiteren Organ- und Blutentnahme für die *ex vivo* Fluoreszenzbildgebung geopfert und die individuelle AMS für jedes entnommene Organ und Blut ermittelt. Die berechneten Mittelwerte

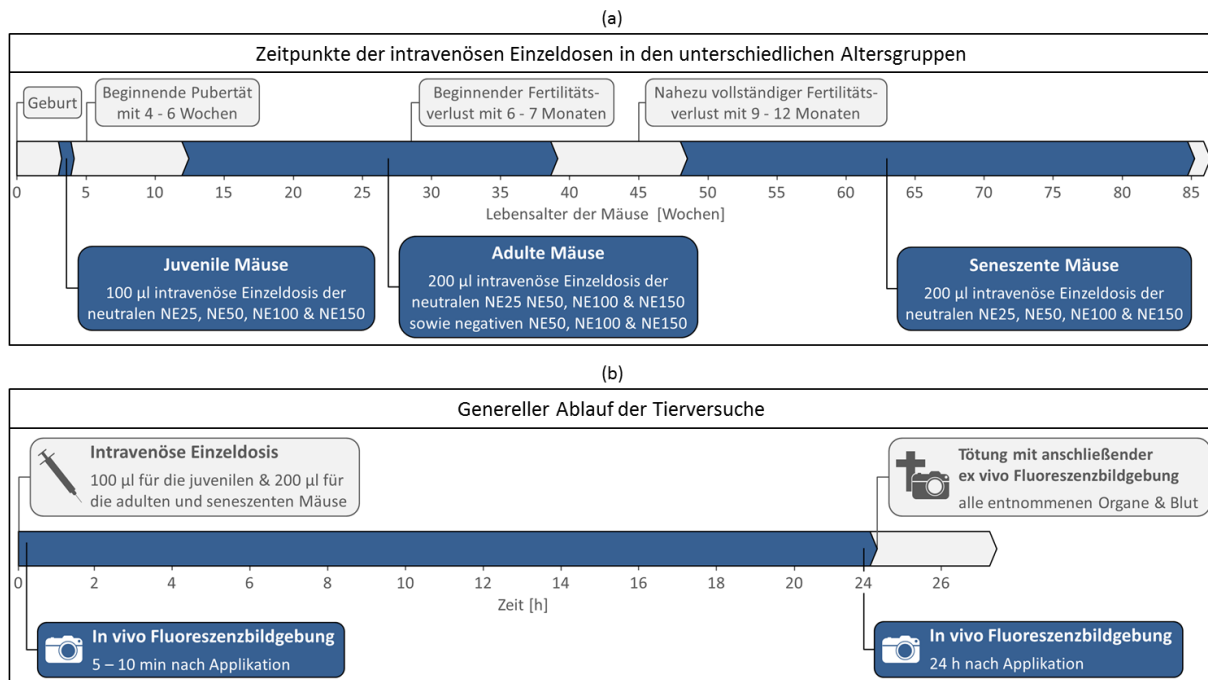


Abbildung 3.17. Experimentelles Design der Tierversuche: (a) Zeitpunkte der intravenösen Einzeldosen mit den verschiedenen Nanoemulsionen in den Altersgruppen juvenil, adult und seneszent, einschließlich dem Beginn der Pubertät [99–101], dem Beginn des Fruchtbarkeitsverlust und dem nahezu vollständigen Fruchtbarkeitsverlust weiblicher Mäuse [96, 98, 103–108]; (b) genereller Ablauf der Tierversuche nach [113, 114].

der AMS über die fünf Mäuse pro applizierter Formulierung sind der Tabelle A.2 im Anhang zu entnehmen. Eine dieser fünf Mäuse, dessen individuellen AMS-Werte in Summe die geringste Abweichung zu den berechneten AMS-Mittelwerten aufwies, wurde als repräsentative Maus für die im Folgenden dargestellten Fluoreszenzbilder ausgewählt. Zur Beurteilung des Einflusses des Partikeldesigns und des reproduktiven Alterns auf die Biodistributionsprofile erfolgte eine statistische Auswertung der gewonnenen AMS-Daten mittels Mann-Whitney-U-Tests, dessen Kennwerte in den Tabellen A.3 bis A.5 im Anhang aufgeführt sind. Dieser Test setzt keine Normalverteilung zweier unabhängigen Stichproben voraus und eignete sich somit für die kleine Gruppengröße von nur fünf Mäusen pro applizierter Formulierung.

3.7.1. Einfluss des Partikeldesigns

Zur Charakterisierung des Einflusses sowohl der Partikelgröße als auch der Oberflächenladung wurden die Biodistributionsprofile nach intravenöser Applikation der Nanoemulsionen in adulten weiblichen Mäusen (Lebensalter: 12 - 39 Wochen) untersucht. Die Abbildung 3.18 zeigt die lateralen, ventralen und dorsalen Ansichten der repräsentativen Mäuse aus der nichtinvasiven *in vivo* Fluoreszenzbildgebung direkt nach Applikation sowie nach weiteren 24 h.

Sowohl die negativen als auch die neutralen Nanoemulsionen akkumulierten sehr schnell in Körperregionen, die der Leber zuzuschreiben waren. Innerhalb der ersten 5 bis 10 min nach intravenösen Applikation bis zur ersten *in vivo* Fluoreszenzbildgebung wurde für alle repräsentativen

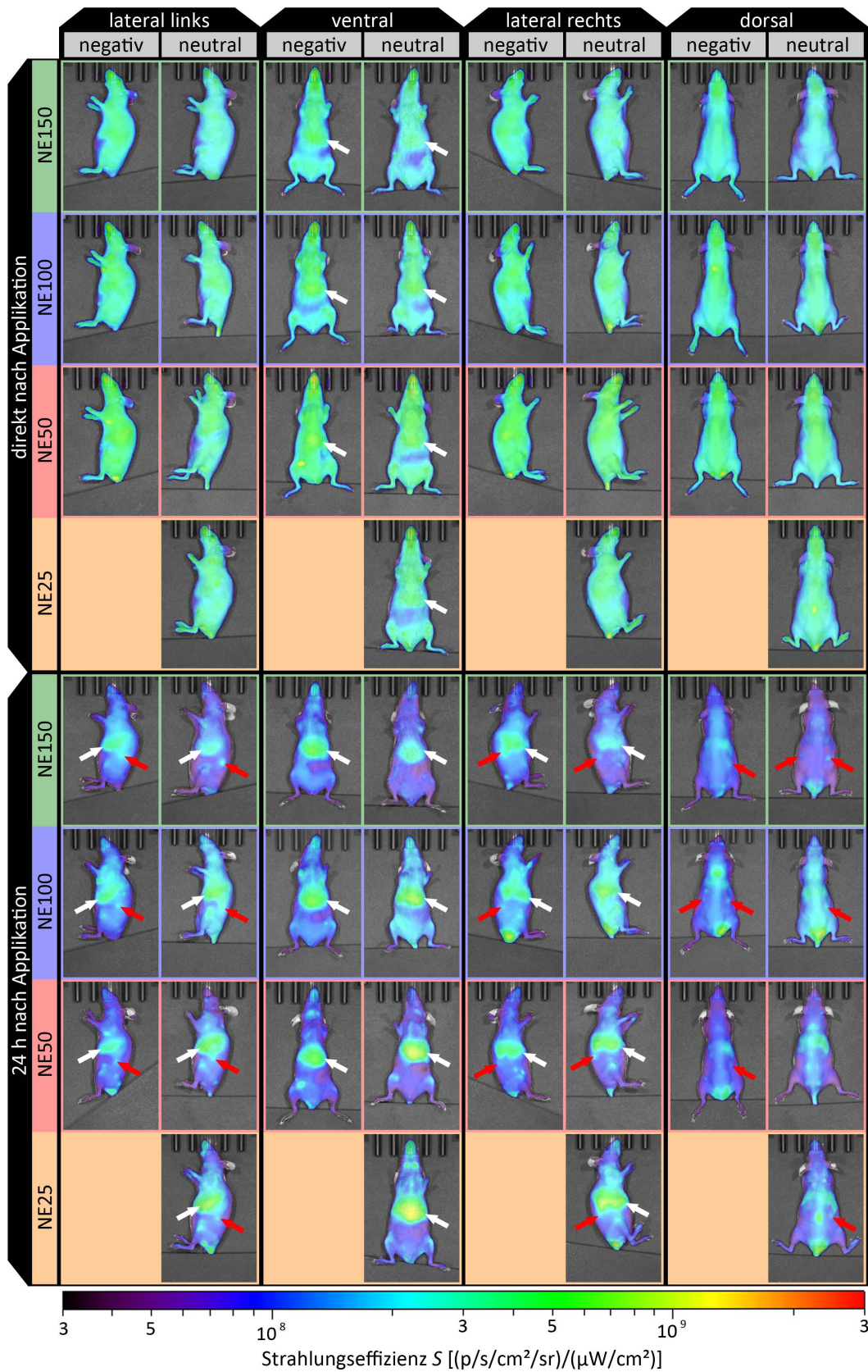


Abbildung 3.18. Nichtinvasive *in vivo* Fluoreszenzbilder der repräsentativen weiblichen adulten Mäuse direkt nach (5 - 10 min) und 24 h nach intravenöser Applikation der negativen und neutralen Nanoemulsionen (weiße Pfeile: Akkumulation in der Leber; rote Pfeile: Akkumulation in den Ovarien) nach [114].

Mäuse eine hohe Strahlungseffizienz des Fluoreszenzsignals in genau dieser Körperregion detektiert, wie in der ventralen Ansicht mit den weißen Pfeilen hervorgehoben. Dies deutete auf eine rapide hepatische Aufnahme aller Nanoemulsionen in das RES unter Beteiligung der Phagozytose in den Kupffer-Zellen der Leber hin, so wie es auch bei einer Vielzahl anderer nanopartikulären Formulierungen innerhalb weniger Minuten bis zu 1,5 h nach parenteraler Applikation beobachtet wurde [24, 91–93, 147]. Die Strahlungseffizienz stieg innerhalb der nächsten 24 h bis zur nächsten Fluoreszenzbildgebung in der Körperregion der Leber an. Der Anstieg der Strahlungseffizienz bei den negativen Nanoemulsionen war moderat und blieb unterhalb von 10^9 (p/s/cm²/sr)/(μW/cm²). Bei den neutralen Nanoemulsionen war ein Trend einer mit abnehmender Partikelgröße steigenden Strahlungseffizienz deutlich über 10^9 (p/s/cm²/sr)/(μW/cm²) zu erkennen, welcher sich durch die größer werdenden gelben Bereiche sowohl in der ventralen als auch in beiden lateralen Ansichten verdeutlichte. Die für die negativen Nanoemulsionen detektierte geringere Strahlungseffizienz in der Körperregion der Leber deutete darauf hin, dass durch die Inkorporation des anionischen Phospholipids PG erschaffene negative Oberflächenladung zu einer breiteren Biodistribution über andere Organe führen könnte. Ähnliches Verhalten wurde bereits für PG Liposomen mit ebenfalls negativer Oberflächenladung im Vergleich zu Liposomen mit neutraler Oberflächenladung aus Phosphatidylserin beobachtet [147].

Neben der deutlichen hepatischen Akkumulation wurde 24 h nach Applikation der Nanoemulsionen auch eine erhöhte Strahlungseffizienz in den Körperregionen beobachtet, die den Ovarien zuzuschreiben waren. Diese sind durch rote Pfeile in der dorsalen sowie beiden lateralen Ansichten in Abbildung 3.18 gekennzeichnet. Solch eine Akkumulation im Gewebe der weiblichen Geschlechtsorgane wurde ebenfalls bei mehreren Nanopartikeln mit unterschiedlichen Partikeleigenschaften beobachtet [17, 19, 20, 24, 25, 70–73], wovon manche zu Nebenwirkungen wie ovarielle Inflammation, Verstopfung, Fibrose, Extravasation von roten Blutkörperchen, Apoptose in den Eierstockzellen oder Abnahme der Follikelanzahl führten [17, 70, 71].

Die Abbildung 3.19 gibt einen Überblick über die Akkumulation der Nanoemulsionen in den entnommenen Organen oder deren Verbleib im Blut. Die gemittelte AMS der jeweiligen Organe über die fünf Mäuse pro Formulierung ist dabei als 3D-Säulendiagramm in Kombination mit den individuellen AMS-Werten der Organe jeder einzelnen Maus als 3D-Punktediagramm dargestellt. Abhängig von der anvisierten Partikelgröße der Nanoemulsionen sind die NE25 (orange Säulen und Punkte), NE50 (rot), NE100 (blau) und NE150 (grün) entsprechend ihrer neutralen oder negativen Oberflächenladung entlang der x-Achse aufgetragen. Die entnommenen Organe sowie das Blut sind entlang der y-Achse und die dazugehörigen gemittelten sowie individuellen AMS-Werte entlang der z-Achse aufgetragen. Für die sieben Organe mit der höchsten Akkumulation zeigt die Abbildung 3.20 ergänzend den Verlauf der gemittelten AMS über die mittlere Partikelgröße und das Zeta Potential der applizierten Nanoemulsionen als logarithmisches Konturdiagramm. Die schwarzen Punkte repräsentieren dabei die exakte mittlere Partikelgröße und das dazugehörige Zeta Potential der Nanoemulsionen.

Um eine vollständige Akkumulation der intravenös injizierten Nanoemulsionen zu verifizieren, wurde Vollblut durch eine Herzpunktion nach der Tötung der Mäuse entnommen. Mit allen mittleren AMS des Blutes unterhalb von 1 % zirkulierten für alle Formulierungen nahezu keine

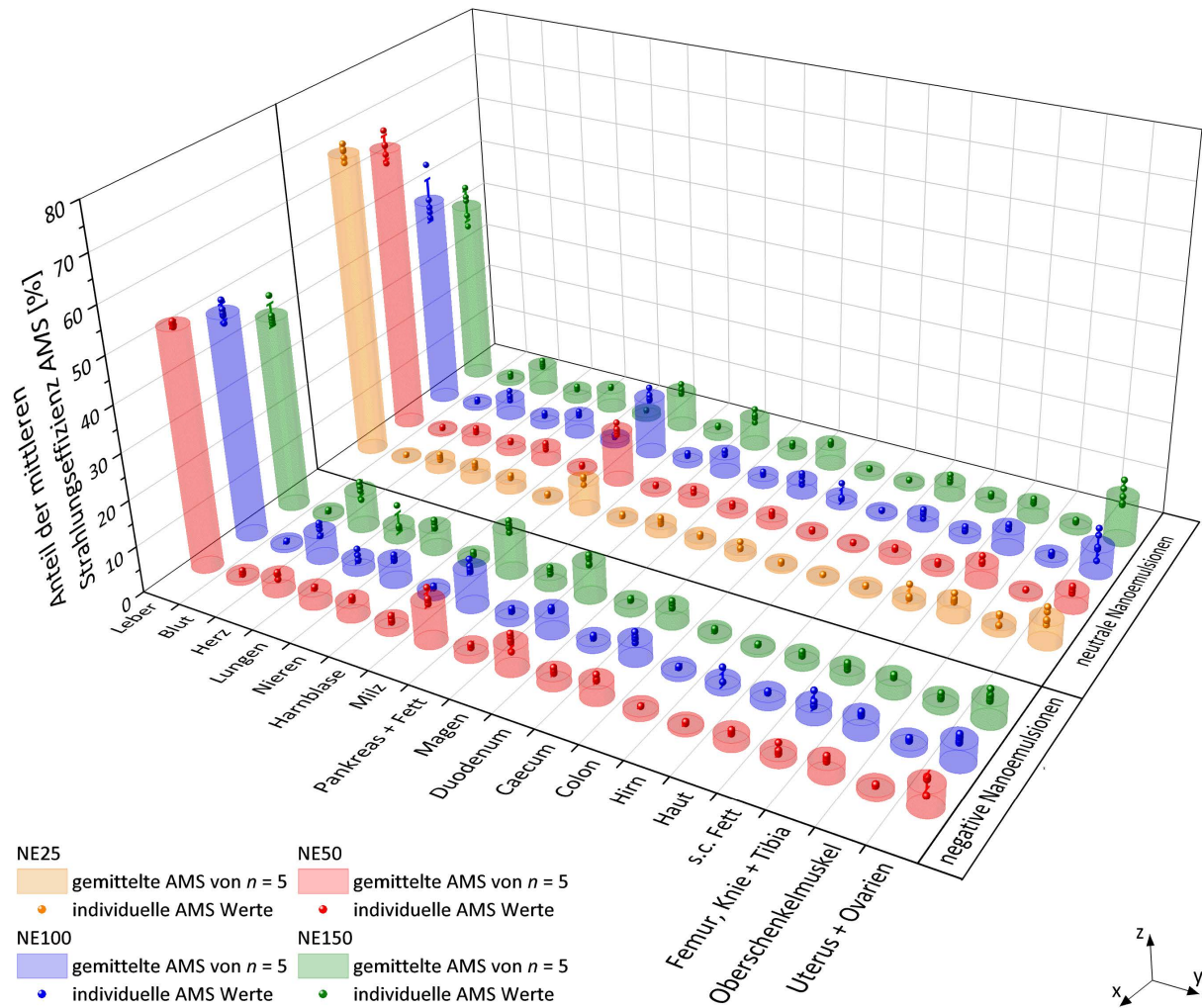


Abbildung 3.19. 3D Säulen- und Punktediagramm der AMS der entnommenen Organe und Blut 24 h nach intravenöser Applikation der negativen und neutralen Nanoemulsionen in adulten weiblichen Mäusen nach [114].

Emulsionströpfchen mehr im Blutkreislauf. Alle Nanoemulsionen reichert sich demnach entweder innerhalb von 24 h im Organ Gewebe an oder wurden bereits über den hepatischen Weg ausgeschieden.

Die höchste Akkumulation wurde für alle Nanoemulsionen erwartungsgemäß im Gewebe der Leber nachgewiesen, da diese in der Regel 80 - 90 % der Funktion des RES übernimmt [92,94,148]. Sowohl für die neutralen als auch negativen Nanoemulsionen nahm mit zunehmender mittlerer Partikelgröße die gemittelte AMS der Leber signifikant ab: von 51,8 zu 42,1 % für die negative NE50 zur NE150 und von 66,2 % zu 40,3 % für die neutrale NE25 zur NE150, dargestellt in Abbildung 3.20a. Sowohl bei den negativen als auch bei den neutralen Nanoemulsionen war diese Abnahme zwischen allen mittleren Partikelgrößen signifikant. Die Oberflächenladung von Nanoemulsionen gleicher mittlerer Partikelgröße war lediglich zwischen der negativen und neutralen NE50 signifikant, während keine signifikanten Unterschiede zwischen der negativen und neutralen NE100 sowie zwischen der negativen und neutralen NE150 festgestellt werden konnten.

Die Milz und das Knochenmark sind weitere Komponenten des RES, welche retikuläre Zellen

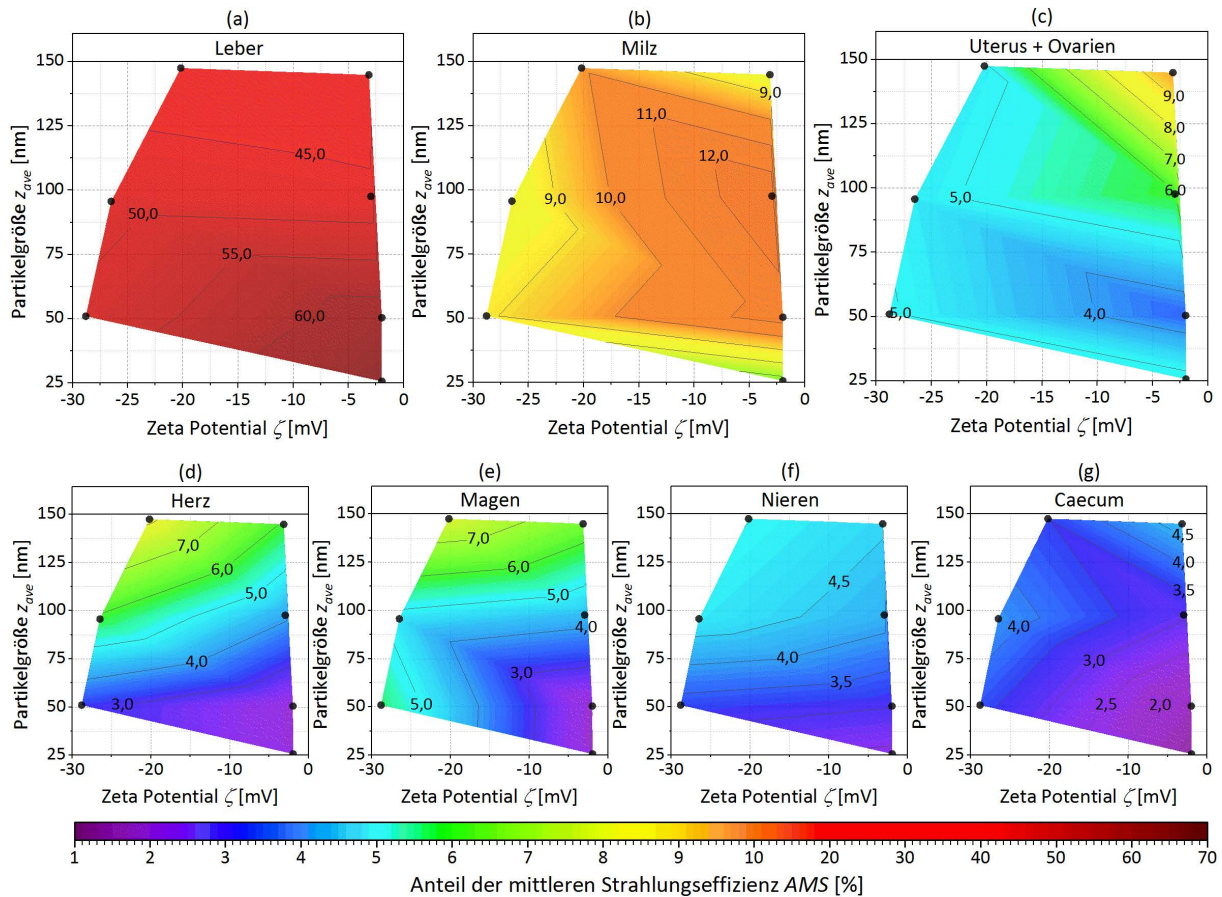


Abbildung 3.20. Logarithmische Konturdiagramme mit dem Verlauf der gemittelten AMS der Organe der weiblichen adulten Mäuse mit höchster Akkumulation (a) Leber, (b) Milz, (c) Uterus + Ovarien, (d) Herz, (e) Magen, (f) Nieren und (g) Caecum über die mittlere Partikelgröße und das Zeta Potential der intravenös injizierten neutralen und negativen Nanoemulsionen nach [114].

enthalten und so auch zur Aufnahme von Nanopartikeln neigen [91, 94]. Die mittlere Partikelgröße der negativen Nanoemulsionen hatte keinen signifikanten Effekt auf die Akkumulation in der Milz bei gemittelter AMS zwischen 8,2 und 9,9 %, wie in Abbildung 3.20b gezeigt. Konträr dazu hatte die Partikelgröße der neutralen Nanoemulsionen einen signifikanten Einfluss auf die Akkumulation in der Milz bei gemittelter AMS zwischen 6,7 und 12,9 %, abgesehen zwischen der neutralen NE50 und NE100. Das Maximum der gemittelten AMS lag dabei bei 100 nm mittlerer Partikelgröße. Bei gleicher mittlerer Partikelgröße hatte die Oberflächenladung einen signifikanten Einfluss auf die Akkumulation. Während die gemittelte AMS der negativen NE50 sowie NE100 signifikant geringer ausfielen als die der neutralen NE50 bzw. NE100, so war die AMS der negativen NE150 deutlich größer als die der neutralen NE150.

Die Akkumulation der Nanoemulsionen in Femur, Knie und Tibia zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den mittleren Partikelgrößen der negativen Nanoemulsionen bei gemittelter AMS zwischen 2,9 und 3,3 % (nicht im logarithmischen Konturdiagramm dargestellt). Bei den neutralen Nanoemulsionen war die neutrale NE100 mit 4,6 % AMS signifikant höher als die neutralen NE25 und NE150. Ähnlich zu der Akkumulation in der Milz fiel die Akkumulation der negativen NE50 sowie NE100 in Femur, Knie und Tibia signifikant geringer aus als bei der

neutralen NE50 bzw. NE100. Für die Akkumulation der NE150 gab es allerdings keine signifikanten Unterschiede aufgrund der Oberflächenladung der Nanoemulsionen. Die Akkumulation in Femur, Knie und Tibia resultierte wahrscheinlich aus der Aufnahme der Nanoemulsionen in das Knochenmark als Teil des RES.

So wie es sich in den *in vivo* Fluoreszenzbildern aus Abbildung 3.18 schon andeutete, konnte eine Akkumulation der Nanoemulsionen in den Geschlechtsorganen der adulten weiblichen Mäuse bestätigt werden. Während die negativen Nanoemulsionen unabhängig von der mittleren Partikelgröße nahezu identische moderate Akkumulation mit gemittelter AMS zwischen 4,8 und 5,1 % aufwiesen, so waren bei den neutralen Nanoemulsionen partikelgrößenabhängige Effekte auf die gemittelten AMS von 3,5 bis zu 9,8 % erkennbar, wie in Abbildung 3.20c gezeigt. Dabei akkumulierte die neutrale NE150 mit der signifikant höchsten gemittelten AMS von 9,8 % deutlich stärker in den weiblichen Geschlechtsorganen als die kleineren neutralen NE25 und NE50 sowie die gleichgroße aber negative NE150. Während sich die neutrale NE150 als Arzneistoffträgersystem zur Behandlung von ovariellen Erkrankungen oder Dysfunktionen eignen könnte, könnte mit den negativen Nanoemulsionen eine unbeabsichtigte Akkumulation in den weiblichen Geschlechtsorganen gering gehalten werden. Daraus resultierende mögliche Nebenwirkungen in den Ovarien könnten so mittels der negativen Oberflächenladung effektiv reduziert werden, während ein modifizierbares Biodistributionsprofil durch kontrolliert herstellbare Partikelgrößen der negativen Nanoemulsionen beibehalten wird.

Mit zunehmender Partikelgröße stieg sowohl bei den negativen als auch bei den neutralen Nanoemulsionen die gemittelte AMS im Herzen an, wie in Abbildung 3.20d gezeigt. Bei den negativen Nanoemulsionen war der Anstieg der gemittelten AMS von 3,2 bis zu 8,1 % signifikant zwischen der negativen NE50 und den beiden negativen NE100 und NE150. Der Anstieg von der negativen NE100 zur negativen NE150 war nicht signifikant. Jedoch deutete die fortlaufend steigende gemittelte AMS darauf hin, dass die kardiale Akkumulation auch hier mit zunehmender Partikelgröße weiter zunahm. Bei den neutralen Nanoemulsionen war die steigende mittlere AMS von 2,1 auf 5,9 % im Herzen ab einer Partikelgröße von 50 nm signifikant. Solch einen partikelgrößenabhängigen Effekt auf die Akkumulation im Herzen wurde ebenfalls mit intravenös applizierten Gold-Nanopartikeln und lipiden Nanokapseln in weiblichen Mäusen gefunden [22, 149]. Die Oberflächenladung dieser intravenös injizierten Nanoemulsion könnte bei der kardialen Akkumulation ebenfalls eine untergeordnete Rolle spielen, da die negative NE100 signifikant höhere gemittelte AMS aufwies als die neutrale NE100. Die Unterschied zwischen den gemittelten AMS-Werten der negativen NE50 sowie NE150 im Vergleich zu deren gleichgroßen Nanoemulsionen mit neutraler Oberflächenladung war nicht signifikant, aber dennoch dem Trend entsprechend größer.

In Teilen des Gastrointestinaltrakts wurde ebenfalls eine nennenswert hohe Akkumulation der Nanoemulsionen festgestellt. Wie in Abbildung 3.20e gezeigt, wurden im Magen eine gemittelte AMS bis zu 7,7 % für die negative NE150 festgestellt, welche damit signifikant höher war als die der negativen NE50 und NE100. Bei den neutralen Nanoemulsionen gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen der NE25 und NE50, jedoch stieg ab der neutralen NE50 die Akkumulation mit zunehmender Partikelgröße signifikant bis zu 6,4 % gemittelter AMS der

neutralen NE150 an. Darüber hinaus wurde im Caecum ein gemittelte AMS bis zu 4,7 % mit der neutralen NE150 festgestellt, wie in der Abbildung 3.20g gezeigt. Hierbei gab es wie im Magen keinen signifikanten Unterschied zwischen der neutralen NE25 und NE50, jedoch stieg auch hier ab der neutralen NE50 die gemittelte AMS im Caecum signifikant mit zunehmender Partikelgröße an. Bei den negativen Nanoemulsionen wurde dahingegen kein signifikanter Einfluss der Partikelgröße auf die Akkumulation festgestellt. So hatte die Partikelgröße der neutralen Nanoemulsionen für die Akkumulation im Magen und Caecum einen signifikanten Effekt, für die negativen Nanoemulsionen konnte allerdings kein eindeutiger Effekt der Partikelgröße festgestellt werden. Das detektierte Fluoreszenzsignal im Gastrointestinaltrakt könnte aus dem Ausüben von Koprophagie der adulten Mäuse resultieren, mit der Mäuse ab einem Lebensalter von etwa 2,5 Wochen beginnen [150]. So könnten die adulten Mäuse durch das Fressen von Kotpellets den Fluoreszenzfarbstoff DiR in ihren Gastrointestinaltrakt wieder aufgenommen haben, welcher den Körper über den hepatischen Weg eigentlich bereits verlassen hatte.

In der Niere wurde für die verschiedenen Formulierungen eine gemittelte AMS von 2,4 bis zu 5,0 % detektiert, wie in Abbildung 3.20f gezeigt. Sowohl bei den negativen als auch bei den neutralen Nanoemulsionen war die gemittelte AMS der kleinen Nanoemulsionen NE25 und NE50 signifikant kleiner als die der großen Nanoemulsionen NE100 oder NE150. Zwischen der NE25 und NE50, sowie zwischen der NE100 und NE150 waren die Unterschiede zwar nicht signifikant, allerdings war auch hier der Trend der steigenden gemittelten AMS mit zunehmender Partikelgröße erkennbar. Solch ein Einfluss der Partikelgröße auf die Akkumulation in der Niere wurde ebenfalls bei lipiden Nanokapseln beobachtet [149]. Die Oberflächenladung der Nanoemulsionen war allerdings nicht signifikant.

In allen anderen Organen wurde sowohl für die negativen als auch neutralen Nanoemulsionen nur eine geringe Akkumulation festgestellt in folgender abnehmender Reihenfolge der gemittelten AMS-Bereiche: Haut (0,8 - 3,3 %), Lunge (1,6 - 3,0 %), subkutanes Fett (1,2 - 2,8 %), Pankreas und Fett (0,9 - 2,5 %), Duodenum (1,2 - 2,2 %), Blase (0,6 - 1,7 %), Oberschenkelmuskel (0,6 - 1,6 %), Colon (0,5 - 1,6 %) und Gehirn (0,4 - 1,4 %).

Die Abbildung 3.21 zeigt *ex vivo* Fluoreszenzbilder der sieben Organe mit der höchsten Akkumulation der Nanoemulsionen, welche von den repräsentativen Mäuse stammen. Die zuvor diskutierten Verläufe der gemittelten AMS wurden durch diese *ex vivo* Aufnahmen bestätigt. Die Strahlungseffizienz war dabei größtenteils gleichmäßig ohne ausgeprägte Hotspots im Organ verteilt, ausgenommen bei den weiblichen Geschlechtsorganen. Sowohl bei den negativen als auch bei den neutralen Nanoemulsionen waren deutliche Hotspots mit hoher Strahlungseffizienz in den Ovarien erkennbar. Die Hotspots in den Ovarien von den neutralen Nanoemulsionen erreichten dabei teilweise eine Strahlungseffizienz über 10^9 (p/s/cm²/sr)/(μ W/cm²), insbesondere bei der neutralen NE150. Solch eine Akkumulation in den Ovarien wurde ebenfalls bei mehreren verschiedenen Lipid- oder Polymernanopartikeln durch Nuklear- oder Fluoreszenzbildgebungsverfahren nach intravenöser Injektion beobachtet [19, 20, 24, 25, 72, 73].

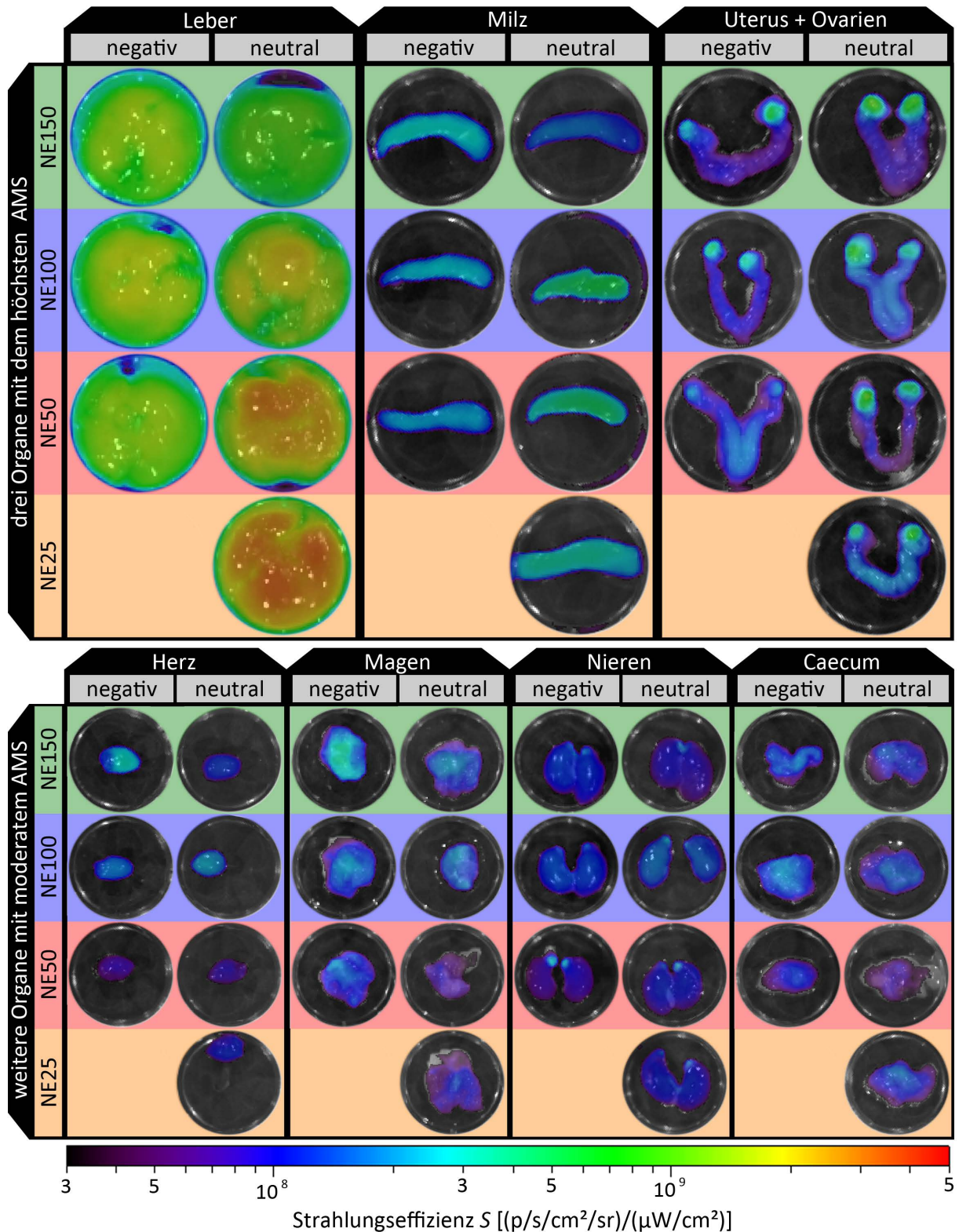


Abbildung 3.21. *Ex vivo* Fluoreszenzbilder der entnommenen Organe der repräsentativen weiblichen adulten Mäuse mit der höchsten Akkumulation der neutralen und negativen Nanoemulsionen (Leber, Milz, Uterus + Ovarien, Herz, Magen, Nieren und Caecum) nach [113,114].

3.7.2. Einfluss des reproduktiven Alterns

Wie beim Menschen verändert sich mit dem Altern auch bei Mäusen die Kapazität des RES, in dem mehrere Organe wie die Leber, Milz, Lymphknoten und das Knochenmark involviert sind [91–95]. Bei Frauen spielen zudem die sich mit dem Altern ändernden Sexualsteroidhormonspiegel eine wichtige Rolle: Sie leiten die Pubertät ein, regulieren den Sexualzyklus innerhalb ihres fruchtbaren Lebensabschnittes und führen mit fortschreitendem Alter schließlich zur Menopause, der allmählich abnehmenden Fruchtbarkeit bis zum vollständigen Verlust. Während dieser Phase sinkt der Ovarialhormonspiegel sowie der Blutfluss im ovariellen Stroma deutlich [96,97]. Folglich könnten die altersbedingten Änderungen des RES, des Sexualsteroidhormonspiegels und des Blutflusses im ovariellen Stroma eine wichtige Rolle für die Akkumulation von nanoskalierten Arzneistoffträgern in den sich entwickelnden, geschlechtsreifen und alternden weiblichen Geschlechtsorganen spielen.

Dieser Einfluss des reproduktiven Alterns wurde anhand der vier verschiedenen großen neutralen Nanoemulsionen nach intravenöser Applikation in juvenilen präpuberalen (Lebensalter: 3 - 4 Wochen), adulten (12 - 39 Wochen) und seneszenten (> 48 Wochen) weiblichen Mäusen untersucht. Nach intravenöser Applikation von 100 μl der neutralen NE25 in die Schwanzvene einer juvenilen Maus litt diese leider nach 2 - 3 min unter Nasen- oder Rachenblutungen sowie Krämpfen. Diese Maus wurde sofort mittels CO_2 vom Leiden erlöst. Bei einem Körpergewicht von 11,3 g betrug die applizierte Dosis des MCT-Anteils 0,71 g/kg und des MHS-Anteils 1,77 g/kg. Diese lagen deutlich unterhalb der angegebenen LD_{50} für MCT mit 3,7 g/kg sowie für MHS mit 3,16 g/kg nach intravenöser Applikation [119]. Nichtsdestotrotz wurde darauf verzichtet, den Tierversuch mit der neutralen NE25 in juvenilen Mäusen fortzusetzen, da diese Formulierung mit dem höchsten MHS-Anteil von 20 Gew.% im Vergleich zu allen anderen Formulierungen die höchste Zelltoxizität aufwies. Die anschließende Obduktion dieser juvenilen Maus ergab keine Befunde für die Mundhöhle, Zunge und Zähne. In Teilen der Lunge wurden Blutungen sowie Blutgerinnsel in der Luftröhre gefunden. Eine durch Emulsionströpfchen hervorgerufene Lungenembolie war sehr unwahrscheinlich, da bei der neutralen NE25 alle Partikel kleiner als 50 nm waren (vergleiche Abbildung 3.8), welche nicht zu einer Verstopfen der Lungenblutkapillare führen dürften. Eine toxikologische Wirkung auf das Lungengewebe weiblicher Mäuse wurde allerdings auch nach intravenöser Applikation von Goldnanopartikeln entdeckt, insbesondere bei ähnlich großen Partikelgrößen von 30 nm. Histologische Untersuchungen der Lungenschnitte dieser Mäuse ergaben mehrere morphologische Veränderungen wie vergrößerte Hohlräume der Atemwege, Epithelhyperplasie, Verdünnung der Alveolarzellschicht inklusive Elastizitätsverlust, Läsionen und Emphyseme, die zu Atemnot, Müdigkeit, Gewichtsverlust und schließlich zum Tod führten [22, 151]. Die adulten und seneszenten Mäuse zeigten nach Applikation der neutralen NE25 keine Anomalien.

Die Abbildung 3.22 zeigt laterale, ventrale und dorsale Ansichten der repräsentativen Mäuse aus der nichtinvasiven *in vivo* Fluoreszenzbildgebung direkt sowie 24 h nach der intravenösen Applikation der neutralen Nanoemulsionen in den drei Altersklassen juvenil, adult und seneszent. Wie in der ventralen Ansicht mit den weißen Pfeilen hervorgehoben, kam es in allen

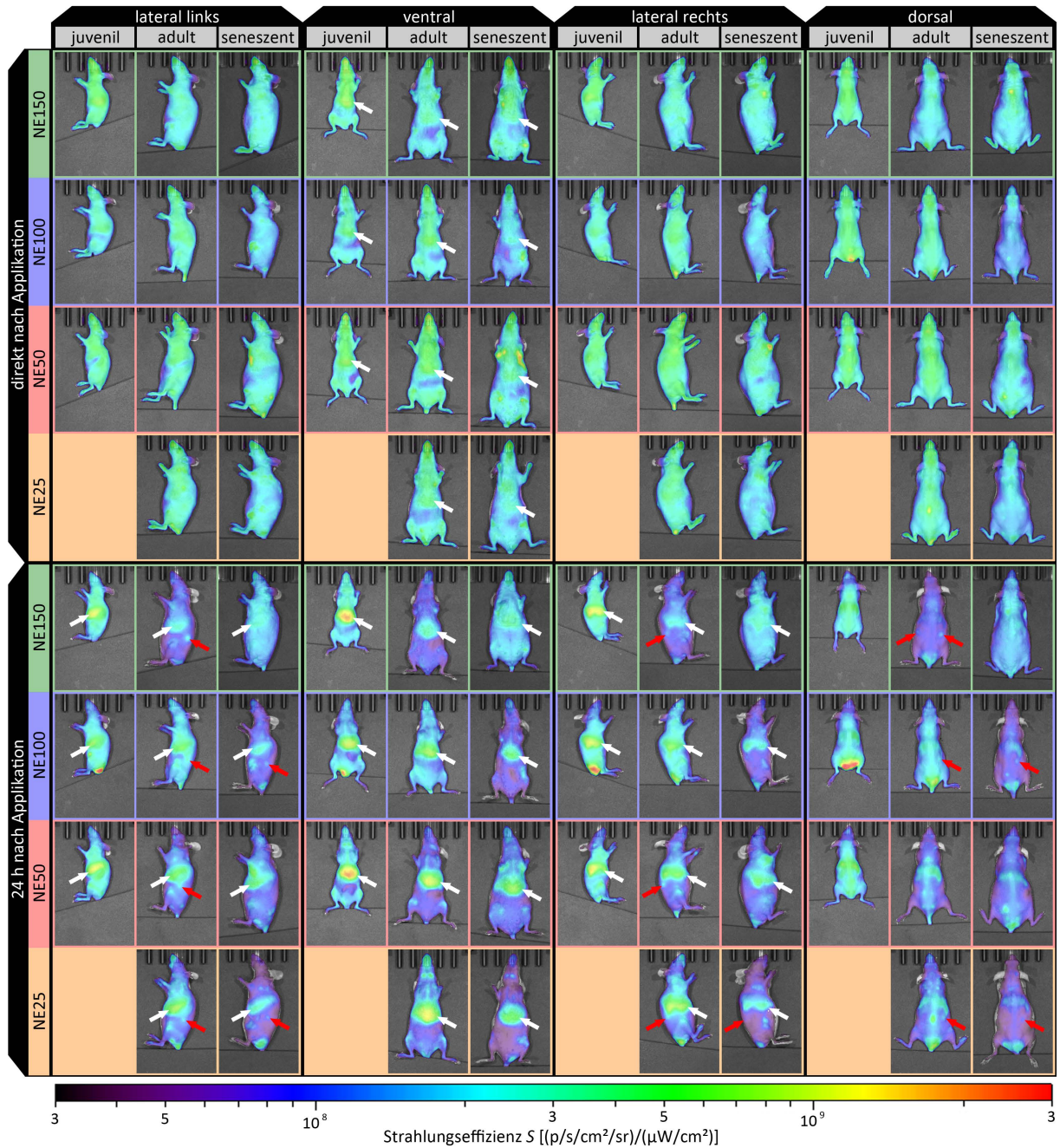


Abbildung 3.22. Nichtinvasive *in vivo* Fluoreszenzbilder der repräsentativen weiblichen Mäuse unterschiedlicher Altersklassen direkt nach (5 - 10 min) und 24 h nach intravenöser Applikation der neutralen Nanoemulsionen (weiße Pfeile: Akkumulation in der Leber; rote Pfeile: Akkumulation in den Ovarien) nach [113, 114].

drei Altersklassen zu einer schnellen hepatischen Akkumulation direkt nach der intravenösen Applikation. Dies deutete für alle Altersklassen auf eine rapide Aufnahme der neutralen Nanoemulsionen in das RES unter Beteiligung der Phagozytose in den Kupffer-Zellen der Leber hin. Die Strahlungseffizienz in der Körperregion der Leber stieg innerhalb der 24 h nach Applikation deutlich an. Unabhängig von der Partikelgröße der neutralen Nanoemulsionen wurde die höchste Strahlungseffizienz mit bis zu $2 \cdot 10^9$ (p/s/cm²/sr)/(μW/cm²) in der Altersklasse der juvenilen Mäuse detektiert. In der Altersklasse der adulten Mäuse wurden mit abnehmender Partikelgröße eine steigende Strahleneffizienz deutlich über 10^9 (p/s/cm²/sr)/(μW/cm²) detektiert. In der Altersklasse der seneszenten Mäuse wurde mit abnehmender Partikelgröße eine Strahleneffizienz bis zu 10^9 (p/s/cm²/sr)/(μW/cm²) erreicht. Bei den adulten Mäusen sowie teils bei den seneszenten Mäusen wurde 24 h nach Applikation der neutralen Nanoemulsionen eine erhöhte Strahleneffizienz in der Körperregion der Ovarien detektiert, welche durch rote Pfeile in der dorsalen und den beiden lateralen Ansichten in Abbildung 3.22 gekennzeichnet sind. Während die ovarielle Akkumulation in den adulten Mäusen bei allen Partikelgrößen der neutralen Nanoemulsionen festgestellt wurde, wurde diese in der Altersklasse der seneszenten Mäuse lediglich für die neutrale NE25 und NE100 beobachtet. Diese waren mit einem Alter von 64 bzw. 49 Wochen allerdings deutlich jünger als die Mäuse mit der intravenös injizierten neutralen NE50 und NE150 im Alter von 85 bzw. 80 Wochen. Eine ovarielle Akkumulation der neutralen Nanoemulsionen konnte in der Altersklasse der präpuberal juvenilen Mäuse mittels der nichtinvasiven *in vivo* Fluoreszenzbildgebung nicht festgestellt werden.

Ein Überblick der Akkumulation der neutralen Nanoemulsionen in den entnommenen Organen oder deren Verbleib im Blut ist in Abbildung 3.23 gezeigt. Die Altersklassen der Mäuse sind mit der Partikelgröße der applizierten Nanoemulsionen entlang der x-Achse aufgetragen, die entnommenen Organe und das Blut entlang der y-Achse und die individuellen sowie gemittelten AMS-Werte sind als Punkte bzw. Säulen über die z-Achse aufgetragen. Für die sieben Organe mit der höchsten Akkumulation zeigt die Abbildung 3.24 den Verlauf der gemittelten AMS über die mittlere Partikelgröße und das Lebensalter der Mäuse ergänzend als logarithmisches Konturdiagramm. Die schwarzen Punkte repräsentieren dabei das exakte Lebensalter der Mäuse sowie die exakte mittlere Partikelgrößen der neutralen Nanoemulsionen.

Für jede intravenös applizierte neutrale Nanoemulsion war in allen Altersklassen die mittlere AMS des entnommenen Blutes unterhalb von 1 %. So zirkulierten unabhängig von Lebensalter der Mäuse nahezu keine Emulsionströpfchen der neutralen Nanoemulsionen mehr im Blutkreislauf. Folglich reichert sich die Nanoemulsionen innerhalb von 24 h im Organgewebe an oder wurden bereits über den hepatischen Weg ausgeschieden.

In allen Altersklassen wurde die höchste Akkumulation der neutralen Nanoemulsionen im Lebergewebe detektiert, dem Hauptakteur in der Funktion des RES. Mit gemittelten AMS zwischen 60,8 und 65,6 % hatte die mittlere Partikelgröße keinen signifikanten Effekt auf die hepatische Akkumulation in den juvenilen Mäusen, wie in Abbildung 3.24a gezeigt. Hingegen verringerte sich mit der steigender mittlerer Partikelgröße die gemittelte AMS signifikant von 66,2 bis 40,3 % bei den adulten und von 65,9 bis 42,8 % bei den seneszenten Mäusen. Die abnehmende gemittelte AMS war bei den adulten Mäusen zwischen allen mittleren Partikelgrößen signifikant. Auch bei

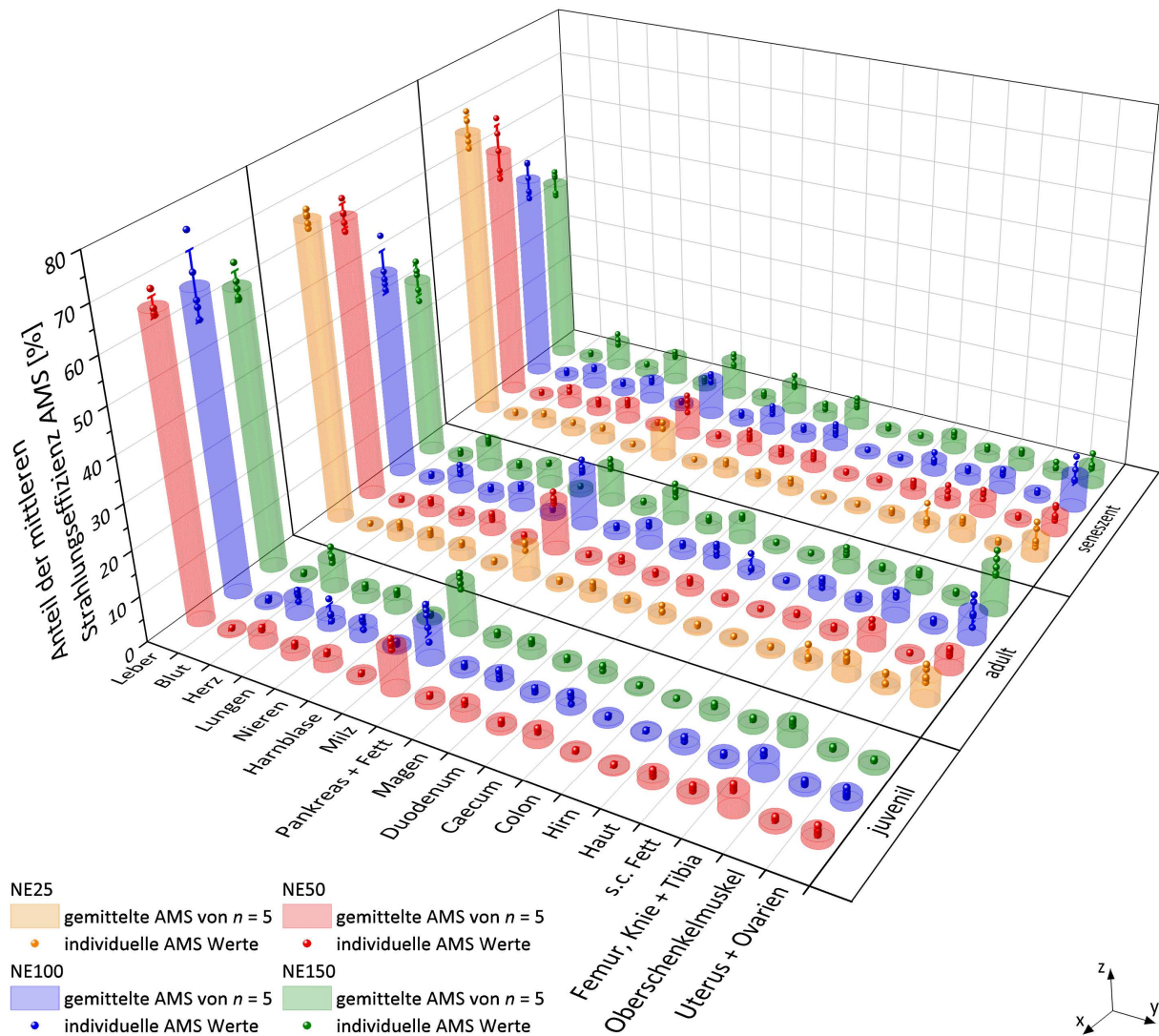


Abbildung 3.23. 3D Säulen- und Punktediagramm der AMS der entnommenen Organen und Blut, 24 h nach intravenöser Injektion mit den neutralen Nanoemulsionen in juvenilen, adulten und seneszenten weiblichen Mäusen nach [113].

den seneszenten Mäusen war die abnehmende AMS zwischen fast allen mittleren Partikelgrößen signifikant, bis auf zwischen den beiden Paaren neutrale NE25 und NE50, sowie NE100 und NE150. Jedoch deutete auch bei diesen beiden Paaren die durchgehend abnehmende gemittelte AMS darauf hin, dass die hepatische Akkumulation durchweg mit zunehmender Partikelgröße abnahm. Die gemittelte AMS der Leber nahm mit dem Altern von juvenil zu adult für die neutralen NE100 sowie NE150 signifikant ab. Eine geringe jedoch nicht signifikante Abnahme der gemittelten AMS mit dem Altern von der juvenilen zur adulten Altersklasse war ebenfalls für die neutralen NE50 zu beobachten. Mit dem weiteren Altern von adult zu senescent kam es für alle neutralen Nanoemulsionen zu keiner weiteren signifikanten Abnahme der gemittelten AMS. Diese rapide Abnahme der gemittelten AMS der Leber nur innerhalb der ersten Lebenswochen, welche mit weiteren Altern dann auf nahezu konstantem Niveau verblieb, deckte sich mit anderen experimentellen Untersuchungen zur altersabhängigen Clearance-Kapazität des RES. Dort

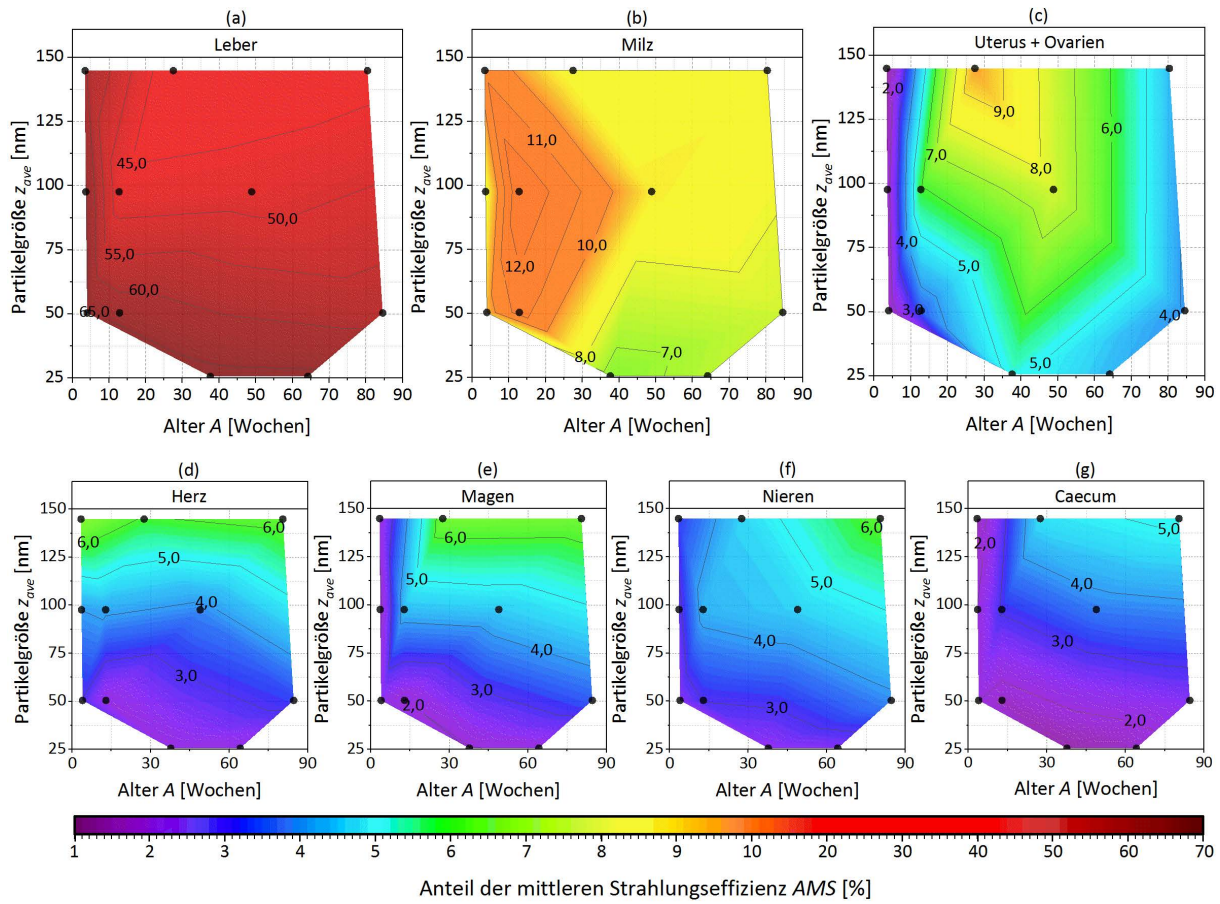


Abbildung 3.24. Logarithmisches Konturdiagramm mit dem Verlauf der gemittelten AMS der Organe weiblicher Mäuse unterschiedlicher Altersklassen mit höchster Akkumulation (a) Leber, (b) Milz, (c) Uterus + Ovarien, (d) Herz, (e) Magen, (f) Nieren und (g) Caecum über die mittlere Partikelgröße und dem Alter der Mäuse nach [113].

nahm die Clearance-Kapazität in den ersten 14 Lebenswochen nach Geburt der Mäuse ebenfalls deutlich ab und erreichte danach ein konstantes Niveau in adulten und seneszenten Mäusen bis zu einem Lebensalter von 128 Wochen [94,95]. Diese verminderte Clearance-Kapazität des RES war möglicherweise die Ursache für die signifikant geringere hepatische Aufnahme der größeren neutralen Nanoemulsionen NE100 und NE150 im adulten und seneszenten Alter der Mäuse.

In dem an der RES-Funktion beteiligtem Organ Milz kam es zur zweithöchsten Akkumulation der neutralen Nanoemulsionen, wie in Abbildung 3.24b gezeigt. Die gemittelte AMS lag für die juvenilen Mäuse zwischen 8,3 und 10,8 % ohne signifikanten Effekt der Partikelgröße innerhalb dieser Altersgruppe. Bei den adulten Mäusen erreichte die gemittelte AMS ein Maximum von 12,9 % mit der neutralen NE100 und einem Alter von 13 Wochen. Die Akkumulation in der Milz mit der neutralen NE25 und NE150 fielen in dieser Altersgruppe signifikant geringer aus. In der Altersklasse der seneszenten Mäuse war die gemittelte AMS der Milz zwischen 7,3 und 8,8 % wieder ohne signifikanten Einfluss der Partikelgröße der neutralen Nanoemulsionen. Im Falle der neutralen NE50 und der NE100 hatte das Altern einen signifikanten Einfluss auf die Akkumulation in der Milz, so war die gemittelte AMS der adulten Mäusen im Alter von 13 Wochen signifikant höher als bei den juvenilen und seneszenten Mäusen. Im Falle der neutralen NE150

nahm die gemittelte AMS von den juvenilen zu den adulten Mäusen im Alter von 38 Wochen signifikant ab. Es war tendenziell im höheren adulten sowie seneszenten Alter eine geringere Akkumulation in der Milz als im juvenilen sowie jungen adulten Alter ersichtlich. Auch hier könnte die altersbedingte Abnahme der Clearance-Kapazität des RES die mögliche Ursache für die Abnahme der Akkumulation in der Milz bei den älteren Mäusen sein.

In den entnommenen Femora, Knien und Tibiaen wurden gemittelte AMS-Werte zwischen 3,0 bis 4,6 % detektiert, was nicht als Konturdiagramm dargestellt ist. In der adulten Altersklasse war nur die gemittelte AMS der neutralen NE50 und NE100 signifikant höher als die der neutralen NE150 bzw. NE25 und NE50. Und im Altersvergleich war nur die gemittelte AMS der neutralen NE100 in adulten Mäusen signifikant höher als bei den juvenilen sowie seneszenten Mäusen. Es konnte allerdings weder ein allgemein gültiges partikelgrößen- noch altersabhängiges Muster auf die Akkumulation in Femur, Knie und Tibia erkannt werden. Die geringe Akkumulation im Femur, Knie und Tibia erfolgte wahrscheinlich im Knochenmark als Teil des RES. Insgesamt jedoch nahm die Akkumulation der Nanoemulsionen in den am RES beteiligten Organen während des Alterns der Mäuse ab. Das wiederum führte folglich zu einer breiteren Biodistribution der intravenös injizierten Nanoemulsionen über weitere, nicht am RES beteiligte Organe.

Je nach Alter und Partikelgröße wurde eine deutliche Akkumulation der neutralen Nanoemulsionen in den weiblichen Geschlechtsorganen Uterus und Ovarien festgestellt, wie in Abbildung 3.24c dargestellt. Mit gemittelten AMS-Werten zwischen 1,2 und 1,7 % war für alle drei intravenös applizierten neutralen Nanoemulsionen NE50, NE100 und NE150 nahezu keine Akkumulation in den Geschlechtsorganen der präpuberalen juvenilen Mäuse zu verzeichnen. Die fehlende Akkumulation in den weiblichen Geschlechtsorganen war wahrscheinlich auf die fehlende Geschlechtsreife der Mäuse jünger als 4 Wochen zurückzuführen. Die zur Geschlechtsreife nötigen Progesteron- und Östradiolhormonspiegel im Serum von Mäusen steigen erst mit dem Einsetzen der Pubertät im Alter von 4 bis 6 Wochen deutlich an [99, 100]. Im Vergleich zu den juvenilen präpuberalen Mäusen wurde bei den geschlechtsreifen adulten Mäusen eine signifikant höhere Akkumulation aller neutralen Nanoemulsionen in den Geschlechtsorganen festgestellt. Dabei hatte auch die Partikelgröße der Nanoemulsionen innerhalb der Altersgruppe der adulten Mäuse einen deutlichen Einfluss auf deren Akkumulation in den weiblichen Geschlechtsorganen. So war mit der höchsten gemittelten AMS von 9,8 % die Akkumulation der neutralen NE150 signifikant höher als bei der neutralen NE25 und NE50 mit nur 5,2 bzw. 3,5 % gemittelter AMS. Die Akkumulation der neutralen NE150 nahm mit dem weiteren Altern in der Gruppe der seneszenten Mäuse wieder signifikant auf 4,3 % gemittelter AMS ab. Auch der Einfluss der Partikelgröße nahm innerhalb der Altersklasse der seneszenten Mäuse wieder ab. So gab es zwischen den drei neutralen Nanoemulsionen NE25, NE50 und NE150 keine signifikanten Unterschiede innerhalb der seneszenten Altersklasse bei gemittelten AMS-Werten zwischen 3,9 und 4,3 %. Lediglich die gemittelte AMS der neutralen NE100 war mit 7,6 % in dieser Altersklasse signifikant höher als bei der neutralen NE50. Allerdings war dieser einzelne signifikante Unterschied vermutlich auf das für die seneszente Altersklasse relativ junge Alter von nur 49 Wochen zurückzuführen, während die anderen seneszenten Mäuse mit 64 bis 85 Wochen deutlich älter waren. In der Literatur wird je nach Mausstamm der Beginn der Fruchtbarkeitsabnahme ab

einem Alter von 6 bis 7 Monaten beschrieben sowie dessen nahezu vollständigen Verlust im Alter von 9 bis 12 Monaten. Dieser Fruchtbarkeitsverlust wird dabei durch eine allmählichen Abnahme der Eizellen, der Wurfgröße, sowie kürzer und unregelmäßig werdende Steroidhormon-Zyklen bis hin zur Azyklizität begleitet [96, 98, 103–108]. Vermutlich hatten diese Mäuse in der 49. Lebenswoche ihre Fruchtbarkeit noch nicht vollständig verloren, was zu dieser höheren Akkumulation der neutralen NE100 führte. Dieser höhere gemittelte AMS-Wert passte jedoch zu dem im Konturdiagramm ersichtlichen Trend der abnehmenden Akkumulation der neutralen Nanoemulsionen mit fortschreitendem Altern der Mäuse, korrelierend zu dem beschriebenen Fruchtbarkeitsverlust der weiblichen Mäuse.

Mit zunehmender Partikelgröße der neutralen Nanoemulsionen wurde eine steigende gemittelte AMS im Herzen von 2,1 bis zu 6,7 % detektiert, wie in Abbildung 3.24d gezeigt. Dabei war der Anstieg der gemittelten AMS in allen drei Altersklassen zwischen nahezu jeder Partikelgröße der neutralen Nanoemulsionen signifikant. Lediglich die Anstiege zwischen der neutralen NE50 und NE100 bei den juvenilen und seneszenten, sowie zwischen der neutralen NE25 und NE50 bei den adulten Mäusen waren nicht signifikant. Allerdings war der fortlaufende Trend der steigenden Akkumulation mit zunehmender Partikelgröße auch bei den nicht signifikanten Anstiegen deutlich erkennbar. Das Alter der Mäuse spielte bei der Akkumulation der neutralen Nanoemulsion im Herzen nahezu keine Rolle. So wurden bei gleicher Partikelgröße der neutralen Nanoemulsionen überwiegend keine signifikanten Unterschiede in der kardialen Akkumulation zwischen den drei Altersklassen ermittelt. Mit nur 1 % Unterschied in der gemittelten AMS akkumulierte lediglich die neutrale NE50 bei den adulten Mäusen signifikant geringer als bei den juvenilen und seneszenten Mäusen.

Abhängig vom Alter der Mäuse sowie der Partikelgröße wurde in Teilen des Gastrointestinaltrakts eine nennenswert hohe Akkumulation der neutralen Nanoemulsionen detektiert. Wie in Abbildung 3.24e gezeigt, kam es bei den Mäusen in der juvenilen Altersklasse noch zu nahezu keiner Akkumulation der neutralen Nanoemulsionen im Magen bei gemittelten AMS-Werten kleiner als 2,3 %. In den beiden Altersklassen adult und seneszent wurde mit zunehmender Partikelgröße gemittelte AMS-Werte von 2,0 bis zu 6,4 % ermittelt. Der Anstieg der gemittelten AMS in diesen beiden Altersklassen war dabei zwischen nahezu allen Partikelgrößen signifikant, bis auf zwischen der neutralen NE25 und NE50 bei den adulten, sowie der neutralen NE50 und NE100 bei den seneszenten Mäusen. Der fortlaufende Trend der steigenden Akkumulation mit zunehmender Partikelgröße war allerdings durchweg erkennbar. Zu einer altersbedingten signifikanten Steigung der gemittelte AMS kam es bei der neutralen NE50, NE100 und NE150. Lediglich bei den neutralen NE25 hatte das Altern keinen signifikanten Einfluss auf die Akkumulation im Magen. Bei der Akkumulation der Nanoemulsionen im Caecum ergab sich ein ähnlicher Verlauf der detektierten gemittelten AMS, wie in Abbildung 3.24g dargestellt. Auch hier kam es bei den juvenilen Mäusen zu nahezu keiner Akkumulation bei gemittelten AMS-Werten kleiner als 2,0 %. Bei den adulten Mäusen wurde mit zunehmender Partikelgröße der neutralen Nanoemulsionen eine signifikant steigende Akkumulation im Caecum detektiert mit gemittelten AMS-Werten von 1,4 bis 4,7 %. Lediglich zwischen der neutralen NE25 und NE50 wurde kein signifikanter Unterschied ermittelt. Insgesamt war der Trend der mit der Partikelgröße steigenden

Akkumulation im Caecum auch bei den seneszenten Mäusen deutlich erkennbar. Zu einer altersbedingten signifikanten Steigung der gemittelten AMS kam es bei der neutralen NE100 sowie NE150. Bei der neutralen NE25 sowie NE50 gab es keinen signifikanten Einfluss des Alterns auf die Akkumulation im Caecum. Ein Teil des Fluoreszenzsignals in diesen beiden Organen des Gastrointestinaltrakts könnte wie bereits vermutet auf die Koprophagie der Mäuse zurückzuführen sein. So könnten die Mäuse durch die Wiederaufnahme von Kotpellets bereits ausgeschiedenen Fluoreszenzfarbstoff DiR wieder in den Magen-Darm-Trakt aufgenommen haben. Der Beginn der Koprophagie von Mäusen wurde im Alter von etwa 2,5 Wochen festgestellt, wenige Tage nachdem sie selbständig Kot ausscheiden. Die Anzahl der aufgenommenen Kotpellets erreichte im Alter von 5 bis 6 Wochen mit bis zu 13 Pellets am Tag ihren Höhepunkt und nahm dann mit zunehmendem Alter allmählich auf 2,1 Pellets am Tag im Alter von 78 Wochen ab [150]. Folglich beginnt die Koprophagie bei Mäusen in einem Alter kurz bevor den juvenilen präpuberalen Mäusen ihre intravenös injizierten neutralen Nanoemulsionen verabreicht wurden. Diese wiesen allerdings nur sehr geringe gemittelte AMS-Werte im gesamten Gastrointestinaltrakt auf. Darüber hinaus stand die festgestellte hohe gemittelte AMS in den beiden Altersklassen adult und seneszent im Gegensatz zur abnehmenden Koprophagie-Aktivität alternder Mäuse. So ist es unwahrscheinlich, dass die Koprophagie der alleinige Faktor für die Zunahme des Fluoreszenzsignals im Magen und Caecum innerhalb der adulten und seneszenten Altersklassen war. Sondern die geringere Kapazität des RES bei adulten und seneszenten Mäusen könnte dazu beigetragen haben, dass die neutralen Nanoemulsionen auch in einigen anderen Organen akkumulierten, welche nicht am RES beteiligt sind.

Wie in Abbildung 3.24f gezeigt, kam es je nach Alter der Mäuse sowie der Partikelgröße zu einer unterschiedlich hohen Akkumulation der neutralen Nanoemulsion in den Nieren mit gemittelten AMS-Werten von 2,4 bis zu 6,2 %. Zwar war bei den juvenilen Mäusen lediglich die gemittelte AMS der neutralen NE150 signifikant höher als die der neutralen NE50, jedoch war bereits in dieser Altersklasse ein leichter Trend zur steigenden Akkumulation in den Nieren mit zunehmender Partikelgröße zu erkennen. Dieser Trend wurde innerhalb der adulten sowie seneszenten Altersklasse deutlicher, bei der die steigende Akkumulation mit zunehmender Partikelgröße zwischen nahezu allen Paaren unterschiedlicher Partikelgröße signifikant war. Lediglich zwischen der neutralen NE50 und NE100 bei den adulten und seneszenten Mäusen sowie der neutralen NE100 und NE150 bei den adulten Mäusen wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt. Eine mit dem Altern signifikant steigende Akkumulation wurde bei der neutralen NE50, NE100 und NE150 detektiert. Nur bei der neutralen NE25 hatte das Altern der Mäuse keinen signifikanten Einfluss auf die Akkumulation in den Nieren.

In allen anderen entnommenen Organen wurde bei den Mäusen in allen Altersklassen nur eine geringe Akkumulation festgestellt mit folgender abnehmender Reihenfolge der gemittelte AMS-Bereiche: Haut (0,8 - 3,4 %), Lunge (1,6 - 2,6 %), subkutanes Fett (1,0 - 2,3 %), Duodenum (0,9 - 2,2 %), Pankreas und Fett (0,8 - 1,7 %), Oberschenkelmuskel (0,8 - 1,7 %), Colon (0,4 - 1,6 %), Harnblase (0,6 - 1,3 %) und Gehirn (0,3 - 1,1 %).

Die *ex vivo* Fluoreszenzbilder der sieben Organe mit der höchsten Akkumulation der neutralen Nanoemulsionen in der Abbildung 3.25 stammen von den repräsentativen Mäusen der

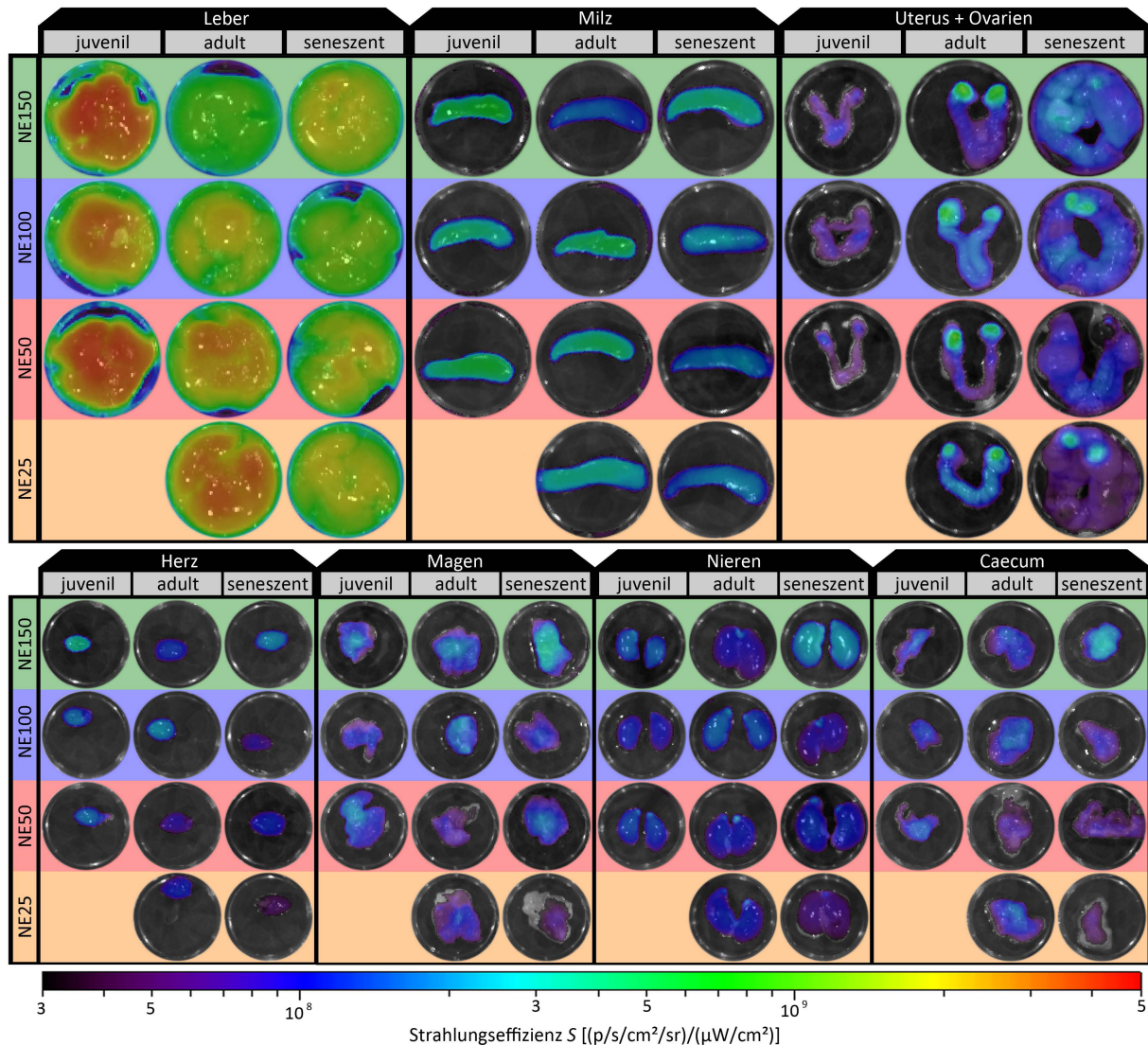


Abbildung 3.25. *Ex vivo* Fluoreszenzbilder der entnommenen Organe repräsentativer Mäuse unterschiedlicher Altersklassen mit höchster Akkumulation der neutralen Nanoemulsionen (Leber, Milz, Uterus + Ovarien, Herz, Magen, Nieren und Caecum) nach [113,114].

unterschiedlichen drei Altersklassen. Die zuvor beschriebenen Verläufe der gemittelten AMS wurden durch diese Aufnahmen bestätigt. Auch hier war die Strahlungseffizienz größtenteils gleichmäßig ohne ausgeprägte Hotspots in den Organen verteilt, ausgenommen bei den weiblichen Geschlechtsorganen der Mäuse im adulten und seneszenten Alter. Bei den adulten Mäusen waren deutliche Hotspots mit hoher Strahlungseffizienz in den Ovarien erkennbar, welche teilweise mehr als 10^9 $(p/s/cm^2/sr)/(\mu W/cm^2)$ aufwiesen, insbesondere bei der neutralen NE150 und NE100. Bei den seneszenten Mäusen waren diese ovariellen Hotspots mit hoher Strahlungseffizienz nur bei der neutralen NE25 und NE100 zu erkennen, welche zum Zeitpunkt der Applikation 64 bzw. 49 Wochen alt waren. So könnten die Mäuse in diesem jüngeren Alter innerhalb der seneszenten Altersklasse noch nicht komplett ihre Fruchtbarkeit verloren haben, was in diesen beiden Fällen zu einer erhöhten Akkumulation in den Ovarien geführt haben könnte. Bei den neutralen NE50 und NE150 gab es keine solchen Hotspots in den Ovarien der seneszenten

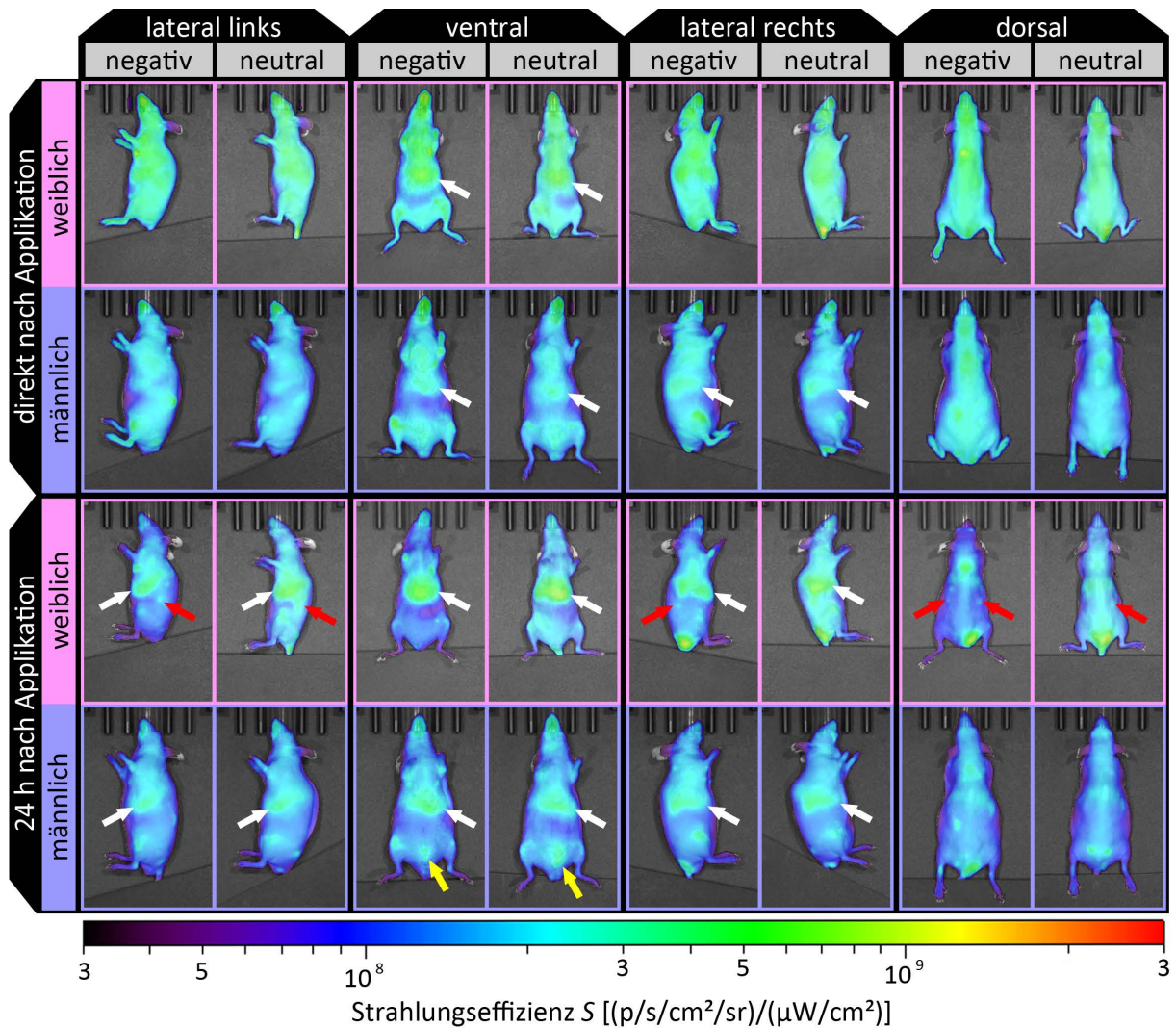


Abbildung 3.26. Nichtinvasive *in vivo* Fluoreszenzbilder der repräsentativen adulten weiblichen und männlichen Mäuse direkt nach (5 - 10 min) und 24 h nach intravenöser Applikation der negativen und neutralen NE100 (weiße Pfeile: Akkumulation in der Leber; rote Pfeile: Akkumulation in den Ovarien; gelbe Pfeile: Akkumulation in den männlichen Geschlechtsorganen).

Mäuse, welche mit 85 bzw. 80 Wochen deutlich älter waren und vermutlich einen durchaus weiter fortgeschrittenen Fruchtbarkeitsverlust erlitten hatten.

3.8. Vergleich zur Biodistribution in männlichen Mäusen

Für einen Vergleich von der Biodistribution in weiblichen mit der Biodistribution in männlichen Mäusen wurde die negative sowie die neutrale NE100 intravenös in adulte männliche Mäuse injiziert. Die Abbildung 3.26 zeigt laterale, ventrale und dorsale Ansichten der repräsentativen weiblichen und männlichen Mäuse aus der nichtinvasiven Fluoreszenzbildgebung direkt sowie 24 h nach der Applikation der beiden Nanoemulsionen. Sowohl bei den weiblichen als auch bei den männlichen Mäusen kam es bereits direkt nach Applikation zu einer schnellen Akkumulation der neutralen sowie negativen NE100 in der Leber, wie in der dorsalen und lateral rechten Ansicht

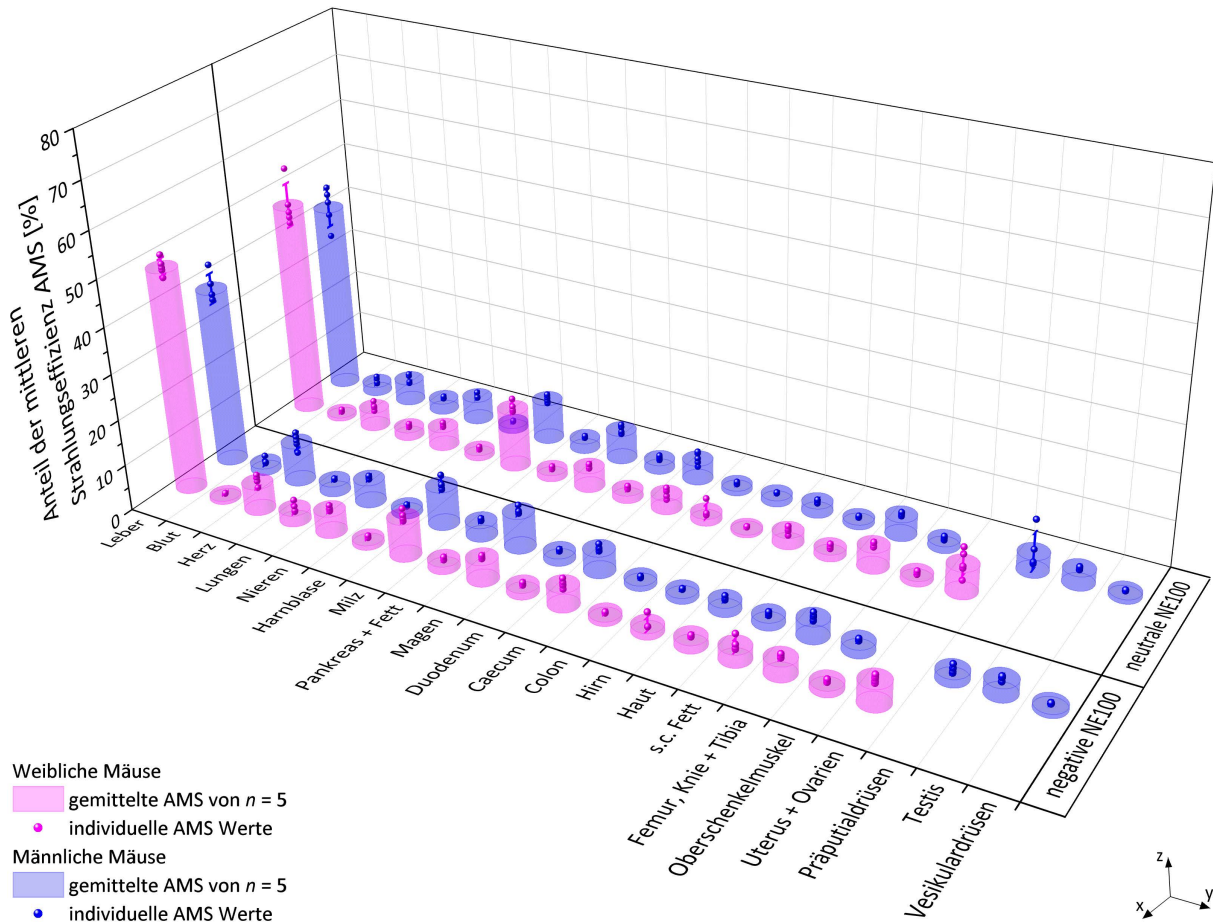


Abbildung 3.27. 3D Säulen- und Punktediagramm der AMS von den *ex vivo* entnommenen Organen und Blut, 24 h nach intravenöser Injektion mit der negativen und neutralen NE100 in adulten weiblichen sowie männlichen Mäusen.

mit weißen Pfeilen hervorgehoben. Dementsprechend kam es auch bei den männlichen Mäusen zu einer rapiden Aufnahme der neutralen und negativen NE100 in das RES unter Beteiligung der Kupffer-Zellen in der Leber. Die Strahleneffizienz in der Körperregion der Leber stieg sowohl bei den Männchen als auch bei den Weibchen innerhalb der 24 h nach Applikation bis zu 10^9 (p/s/cm²/sr)/(μW/cm²) an. Während bei den Weibchen eine erhöhte Strahleneffizienz in den Körperregionen der Ovarien festgestellt wurde, welche durch rote Pfeile in lateraler und dorsaler Ansicht hervorgehoben sind, so wurde bei den Männchen eine erhöhte Strahleneffizienz in den Körperregionen der männlichen Geschlechtsorgane festgestellt, welche durch gelbe Pfeile in ventraler Ansicht hervorgehoben sind.

Die Abbildung 3.27 zeigt einen Überblick der Akkumulation der neutralen und negativen NE100 in den entnommenen Organen oder deren Verbleib im Blut. Die je nach Oberflächenladung gruppierte neutrale sowie negative NE100 sind entlang der x-Achse aufgetragen und die entnommenen Organe und das Blut entlang der y-Achse. Die individuellen sowie gemittelten AMS-Werte sind als Punkte bzw. Säulen über die z-Achse in magenta für die weiblichen oder in blau für die männlichen Mäuse aufgetragen. Die berechneten Mittelwerte der AMS sind in der Tabelle A.2 aufgeführt. Auch hier erfolgte für die folgende Diskussion eine statistische Auswertung der

gewonnen AMS-Daten mittels Mann-Whitney-U-Tests, dessen Kennwerte den Tabellen A.4 und A.6 zu entnehmen sind.

Mit einer gemittelten AMS von 1,5 und 2,0 % war bei den Männchen der noch im Blut zirkulierende Anteil negativer bzw. neutraler NE100 geringfügig größer als bei den Weibchen, deren gemittelte AMS im Blut bei 0,7 bzw. 0,8 % lag. Nichtsdestotrotz reicherte sich bei den Männchen ebenfalls nahezu die komplette Menge der injizierten Nanoemulsionen innerhalb von 24 h nach Applikation im Organgewebe an oder wurde bereits über den hepatischen Weg ausgeschieden.

Die höchste Akkumulation der negativen sowie der neutralen NE100 wurde bei den Männchen wie auch bei den Weibchen in der am RES beteiligten Leber nachgewiesen. Mit einer gemittelten AMS von 38,3 % fiel die hepatische Akkumulation der negativen NE100 bei den Männchen signifikant geringer aus als bei den Weibchen mit 48,3 % gemittelter AMS. Bei der neutralen NE100 war die gemittelte AMS von 41,0 % bei den Männchen allerdings nicht signifikant kleiner als bei den Weibchen mit 46,4 % gemittelter AMS. Die Oberflächenladung der Nanoemulsionen hatte sowohl bei den männlichen als auch bei den weiblichen Mäusen keinen signifikanten Einfluss.

In der Milz, welche wie die Leber ebenfalls am RES beteiligt ist, wurde bei den Männchen eine gemittelte AMS von 8,4 und 8,9 % für die negative bzw. neutrale NE100 detektiert. Die Oberflächenladung der Nanoemulsion hatte demnach keinen signifikanten Einfluss auf die Akkumulation der Nanoemulsion in der Milz bei den Männchen. Bei den Weibchen wurde mit 12,9 % gemittelter AMS bei der neutralen NE100 eine signifikant höhere Akkumulation als bei der negativen NE100 mit 8,2 % gemittelter AMS festgestellt. Während das Geschlecht keinen signifikanten Einfluss bei der Akkumulation der negativen NE100 hatte, war der Unterschied der Akkumulation mit der neutralen NE100 zwischen den Männchen und Weibchen signifikant.

Bei der Akkumulation im Femur, Knie und Tibia gab es bei den Männchen mit einer gemittelten AMS von 3,8 und 4,2 % für die negative bzw. neutrale NE100 keinen signifikanten Unterschied aufgrund der Oberflächenladung der Nanoemulsionen. Bei den Weibchen war jedoch mit einer gemittelten AMS von 4,3 % die Akkumulation der neutralen NE100 signifikant höher als bei der negativen NE100 mit 3,3 % gemittelter AMS. Sowohl bei der negativen als auch bei der neutralen NE100 konnte kein signifikanter Unterschied in der Akkumulation der Nanoemulsionen aufgrund des Geschlechts der Mäuse festgestellt werden. Die Akkumulation der negativen sowie neutralen NE100 im Femur, Knie und Tibia der Mäuse war vermutlich auf das am RES beteiligte Knochenmark zurückzuführen.

Eine Akkumulation sowohl der negativen als auch neutralen NE100 wurde in den Geschlechtsorganen der Mäuse festgestellt. Bei den Weibchen wurde in den entnommenen Uteri und Ovarien eine gemittelte AMS von 4,8 % für die negative NE100 und eine leicht höhere gemittelte AMS von 5,9 % für die neutrale NE100 detektiert. Ein signifikanter Effekt aufgrund der Oberflächenladung der NE100 wurde dabei allerdings nicht festgestellt. Bei den Geschlechtsorganen der Männchen wurden die Präputialdrüsen, Testis und Vesikulardrüsen entnommen. Bei den Präputialdrüsen wurde eine gemittelte AMS von 1,8 % für die negativen und 3,9 % für die neutralen NE100 ermittelt. Aufgrund der hohen Standardabweichung von $\pm 4,1$ % bei 3,9 % gemittelter AMS der neutralen NE100 war der deutliche Unterschied zur negativen NE100 allerdings nicht signifikant. Die gemittelte AMS der Testis betrug 3,0 und 3,1 % bei der negativen bzw. neutralen NE100,

die gemittelte AMS der Vesikulardrüsen 0,9 und 1,0 %. Demnach hatte die Oberflächenladung im Falle der NE100 keine signifikanten Effekte auf die Akkumulation in den weiblichen wie auch in den männlichen Geschlechtsorganen.

Abhängig von der Oberflächenladung der NE100 wurde eine deutliche Akkumulation der Nanoemulsionen im Herzen festgestellt. Mit 8,5 % gemittelter AMS bei den Männchen sowie 5,9 % gemittelter AMS bei den Weibchen war die Akkumulation der negativen NE100 signifikant höher als die der neutralen NE100 mit 4,8 bzw. 4,1 % gemittelter AMS. Die höhere kardiale Akkumulation beider Nanoemulsionen bei den Männchen im Vergleich zu den Weibchen war allerdings nicht signifikant.

In Teilen des Gastrointestinaltrakts wurde auch bei den männlichen Mäusen eine nennenswerte hohe Akkumulation der beiden Nanoemulsionen detektiert. Im Magen der Männchen war die Akkumulation bei der negativen NE100 mit 7,7 % gemittelter AMS signifikant höher als bei der neutralen NE100 mit 6,4 % gemittelter AMS. Bei den Weibchen gab es allerdings keine signifikanten Effekte aufgrund der Oberflächenladung mit 4,7 % und 4,3 % gemittelter AMS für die negative bzw. neutrale NE100. Das Geschlecht der Mäuse hatte dabei einen signifikanten Effekt, so war die Akkumulation sowohl der negativen als auch der neutralen NE100 bei den Männchen signifikant höher als bei den Weibchen. Bei der Akkumulation der beiden Nanoemulsionen im Caecum wurden keine signifikanten Effekte weder aufgrund der Oberflächenladung noch aufgrund des Geschlechts der Mäuse festgestellt. Die gemittelte AMS im Caecum lag bei den Männchen zwischen 4,7 und 4,3 % für die negative bzw. neutrale NE100 und bei den Weibchen zwischen 4,3 und 3,1 %.

Bei der Akkumulation der beiden Nanoemulsionen in den Nieren wurde weder für die Oberflächenladung noch für das Geschlecht der Mäuse ein signifikanter Effekt festgestellt. Die gemittelte AMS der Nieren hatte dabei Werte zwischen 4,2 und 5,1 %.

In allen anderen entnommenen Organen wurde in den weiblichen sowie männlichen Mäusen nur eine geringe Akkumulation der negativen sowie neutralen NE100 festgestellt mit folgender abnehmender Reihenfolge der gemittelten AMS-Bereiche: Pankreas und Fett (1,4 - 3,1 %), subkutanes Fett (1,1 - 2,8 %), Haut (1,8 - 2,5 %), Lunge (1,8 - 2,5 %), Duodenum (1,5 - 2,0 %), Oberschenkelmuskel (1,2 - 1,9 %), Colon (1,0 - 1,6 %), Gehirn (0,6 - 1,4 %) und Harnblase (1,0 - 1,2 %).

Die Abbildung 3.28 zeigt die *ex vivo* Fluoreszenzbilder der entnommenen Organe mit der höchsten Akkumulation der negativen sowie neutralen NE100 sowie der Geschlechtsorgane von den repräsentativen adulten weiblichen und männlichen Mäusen. Die zuvor beschriebenen Verläufe der gemittelten AMS wurden durch diese Aufnahmen bestätigt. Die Strahlungseffizienz war auch hier größtenteils gleichmäßig in den Organen verteilt, abgesehen von den erkennbaren Hotspots in den Geschlechtsorganen. Bei den Weibchen gab es Hotspots in den Ovarien, welche bei der neutralen NE100 mit bis zu 10^9 (p/s/cm²/sr)/(μW/cm²) deutlich stärker ausfiel. Bei den Männchen wurden sowohl bei der negativen als auch bei der neutralen NE100 eine ungleichmäßige Verteilung der Strahlungseffizienz in den Präputialdrüsen festgestellt, welche bis zu $3 \cdot 10^8$ (p/s/cm²/sr)/(μW/cm²) erreichte.

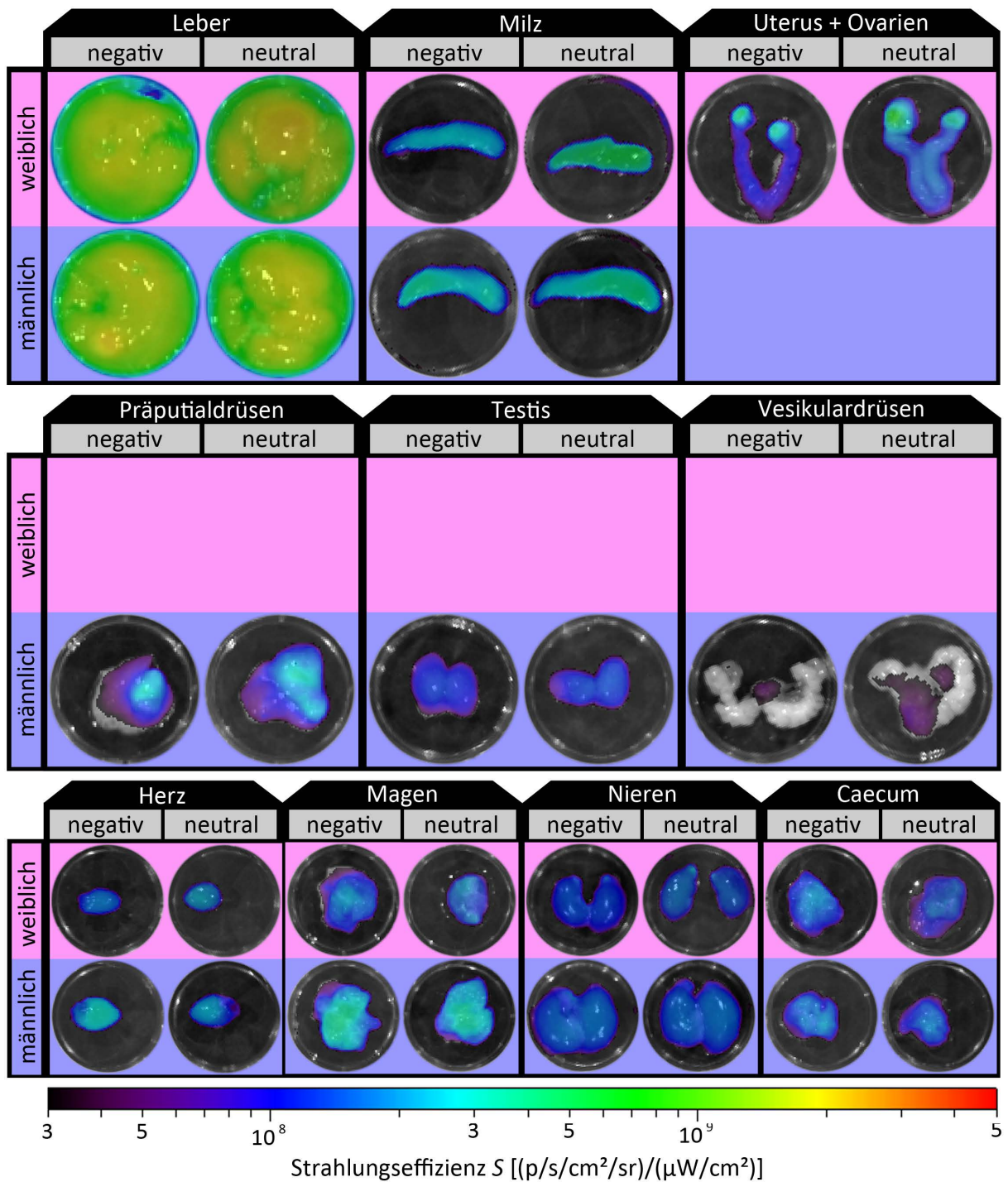


Abbildung 3.28. *Ex vivo* Fluoreszenzbilder der entnommenen Organe mit der höchsten Akkumulation der negativen und neutralen NE100 sowie der Geschlechtsorgane (Leber, Milz, Uterus + Ovarien, Präputialdrüsen, Testis, Vesikulardrüsen, Herz, Magen, Nieren und Caecum).

4. Zusammenfassung und Ausblick

Eine grafische Zusammenfassung dieser Arbeit ist in Abbildung 4.1 schematisch dargestellt. Mittels eines thermotropen Herstellungsprozesses über eine Schockverdünnung mit eiskaltem bidestilliertem Wasser während der Phaseninversion wurden erfolgreich MCT Nanoemulsionen mit unterschiedlichen Partikeleigenschaften zur parenteralen Applikation formuliert. Das dabei verwendete nicht-ionische Tensid MHS zeigte eine nichtlinear steigende Osmolalität mit zunehmender MHS Konzentration, welche der von Huggins und Flory eingeführten modifizierten polynomialen van't Hoff Gleichung 4. Grades entsprach. Die Berücksichtigung dieses Effekts bei der Berechnung des Salzgehaltes der wässrigen Phase vor der Schockverdünnung

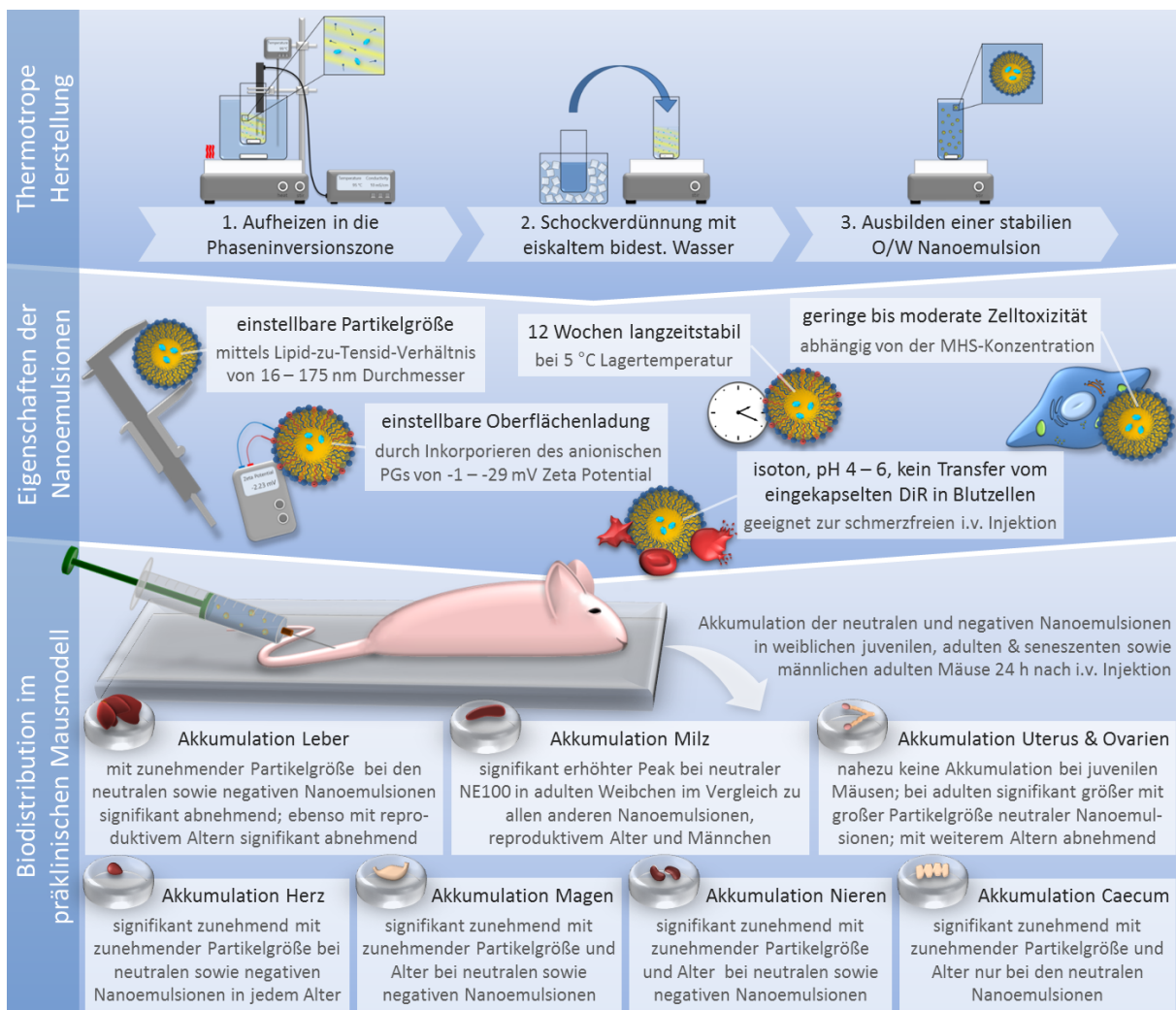


Abbildung 4.1. Grafische Zusammenfassung der Ergebnisse dieser Arbeit.

ermöglichte die Isotonisierung der Nanoemulsionen bereits während des Herstellungsprozesses, um eine schmerzfreie intravenöse Injektion ohne Gefäßschäden sicherzustellen. Mit nahezu neutraler Oberflächenladung war die Partikelgröße dieser Nanoemulsionen zwischen 16 und 175 nm mit enger monomodaler Partikelgrößenverteilung durch das Lipid-zu-Tensid-Verhältnis einstellbar. Zur weiteren Formulierungsentwicklung der parenteralen Nanoemulsionen wurde das anionische Phospholipid PG in die stabilisierende MHS-Schicht der Emulsionströpfchen erfolgreich eingearbeitet. So wurden neben der einstellbaren Partikelgröße eine einstellbare negative Oberflächenladung bis nahezu -30 mV Zeta Potential erreicht. Das Sterilisieren der Nanoemulsionen für die angestrebte parenterale Applikation war durch aseptische Sterilfiltration verlustfrei möglich. Sowohl die isotonischen Nanoemulsionen mit neutraler als auch negativer Oberflächenladung waren über den gesamten untersuchten Zeitraum von 12 Wochen bei 5 °C Lagertemperatur stabil.

Mit *in vitro* Versuchen wurde MHS als maßgeblich inhibitorischer Inhaltsstoff der Nanoemulsionen auf die Zellviabilität von 3T3 und NHDF Fibroblasten identifiziert. Einhergehend mit der abnehmenden MHS Konzentration zur Herstellung der größeren neutralen Nanoemulsionen, nahm so die Zelltoxizität mit zunehmender Partikelgröße deutlich ab. Durch die Inkorporation des Phospholipids PG bei den negativen Nanoemulsionen konnte der MHS Anteil in stabilisierenden Tensidschicht der Emulsionströpfchen reduziert werden, sodass die Zelltoxizität im Vergleich zu den neutralen Nanoemulsionen deutlich geringer war. Die *in vitro* Inkubation der neutralen sowie negativen Nanoemulsionen mit Vollblut zeigte, dass es nahezu keinen Transfer des inkorporierten Fluoreszenzfarbstoffes DiR aus dem Kern der Emulsionströpfchen in die Blutzellen gab. Folglich verblieb der Fluoreszenzfarbstoff inert im Kern der Emulsionströpfchen und eignete sich so für die nachfolgende Charakterisierung der Biodistributionsprofile der verschiedenen Nanoemulsionen im präklinischen Mausmodell.

In vivo wurde die Biodistribution der maßgeschneiderten Nanoemulsionen im präklinischen Mausmodell durch Fluoreszenzbildgebung in alternden Mäusen untersucht. Bei der Akkumulation der Nanoemulsionen in den Organen wurde folgendes Muster beobachtet: Die höchste Akkumulation wurde erwartungsgemäß in den Organen des RES detektiert, insbesondere in der Leber mit 38,3 - 66,2 % gemittelter AMS. Im juvenilen präpuberalen Alter hatte die Partikelgröße der neutralen Nanoemulsionen keinen signifikanten Einfluss auf die sehr hohe hepatische Akkumulation. Im adulten sowie im seneszenten Alter nahm diese mit zunehmender Partikelgröße deutlich ab. Der Effekt des Alterns auf die hepatische Akkumulation war dabei vom juvenilen zum adulten Alter für neutrale NE100 und NE150 signifikant. Die Abnahme der hepatischen Akkumulation mit zunehmender Partikelgröße wurde ebenfalls mit den negativen Nanoemulsionen im adulten Alter beobachtet. Im Vergleich mit den Männchen war lediglich die Akkumulation der negativen NE100 signifikant geringer als bei den Weibchen. In der Milz kam es zur zweithöchsten Akkumulation der Nanoemulsionen mit 6,7 - 12,9 % gemittelter AMS, welche ebenfalls durch das Partikeldesign und das Alter beeinflusst wurde. So akkumulierte die neutrale NE100 in den adulten Mäusen signifikant höher als andere Partikelgrößen der neutralen Nanoemulsionen sowie im Vergleich zur negativen NE100. Auch im Vergleich zu den präpuberalen juvenilen und seneszenten Weibchen sowie den adulten Männchen war die Akkumulation der neutralen NE100

in den adulten Weibchen signifikant höher. Auch im Femur, Knie und Tibia wurde eine moderate Akkumulation der Nanoemulsionen mit 2,9 - 4,6 % gemittelter AMS detektiert, welche vermutlich auf das am RES beteiligte Knochenmark zurückzuführen war.

Zu einer nennenswert hohen Akkumulation der Nanoemulsionen kam es ebenfalls im Herzen mit 2,1 - 8,5 %, in den Nieren mit 2,4 - 6,2 % sowie im Gastrointestinaltrakt im Magen mit 1,9 - 7,7 % und Caecum mit 1,4 - 5,2 % gemittelter AMS. Im Herzen nahm die Akkumulation signifikant mit zunehmender Partikelgröße zu, wobei die Akkumulation mit negativer höher als mit neutraler Oberflächenladung ausfiel. Das Altern sowie das Geschlecht der Mäuse hatten allerdings keinen signifikanten Effekt auf die kardiale Akkumulation. Die Akkumulation in der Niere nahm ebenfalls signifikant mit der Partikelgröße zu, wobei die Oberflächenladung der Nanoemulsionen hier keinen signifikanten Effekt hatte. Das Altern der Mäuse führte zu einer signifikant steigenden Akkumulation der neutralen Nanoemulsionen. Das Geschlecht hatte allerdings keinen signifikanten Effekt. Im Magen und im Caecum nahm die Akkumulation der neutralen Nanoemulsionen signifikant mit zunehmender Partikelgröße zu. Bei den negativen Nanoemulsionen war dieser Effekt der Partikelgröße jedoch nur bei der Akkumulation im Magen signifikant. Mit dem Altern nahm die Akkumulation im Magen und Caecum trotz abnehmender Koprophagie-Aktivität signifikant zu. Folglich war das detektierte Fluoreszenzsignal in diesen beiden Organen nicht alleinig auf die Wiederaufnahme von bereits über den hepatischen Weg ausgeschiedenen Fluoreszenzfarbstoff DiR zurückzuführen. Während beim Caecum das Geschlecht keinen signifikanten Effekt auf die Akkumulation der Nanoemulsionen hatte, fiel die Akkumulation im Magen bei den Männchen signifikant höher aus als bei den Weibchen.

Von besonderem Interesse im Rahmen dieser Studie waren die signifikanten Effekte des Partikeldesigns der Nanoemulsionen sowie des reproduktiven Alterns auf die Akkumulation in den weiblichen Geschlechtsorganen mit 1,2 - 9,8 % gemittelter AMS. Während in der adulten Altersklasse die negativen Nanoemulsionen unabhängig von deren Partikelgröße nahezu identisch im Uterus und den Ovarien mit 4,8 - 5,1 % gemittelter AMS akkumulierten, so war bei den neutralen Nanoemulsionen die Akkumulation abhängig von der Partikelgröße mit 3,5 - 9,8 % gemittelter AMS. Dabei unterschied sich die neutrale NE150 mit der höchsten Akkumulation signifikant von neutralen Nanoemulsionen mit kleineren mittleren Partikelgrößen. Im präpuberalen juvenilen Alter kam es zu nahezu keiner Akkumulation für alle neutrale Nanoemulsionen unterschiedlicher Partikelgröße mit nur 1,2 - 1,7 % gemittelter AMS. Mit zunehmenden Alter der seneszenten Mäuse und damit abnehmender Fruchtbarkeit nahm die Akkumulation der neutralen Nanoemulsionen in den weiblichen Geschlechtsorganen wieder ab mit 3,9 - 7,6 % gemittelter AMS. Insbesondere im adulten und somit fruchtbaren Alter der Mäuse wurden in den *ex vivo* Fluoreszenzbildern der entnommenen weiblichen Geschlechtsorganen deutliche Hotspots in den Ovarien der akkumulierenden neutralen Nanoemulsionen festgestellt. Bei adulten Männchen akkumulierten die neutrale sowie negative NE100 moderat in den männlichen Geschlechtsorganen mit gemittelter AMS von 3,9 bzw. 1,8 % in den Präputialdrüsen, 3,1 bzw. 3,0 % in den Testis und 1,0 bzw. 0,9 % in den Vesikulardrüsen.

Diese systematische Arbeit bietet aufgrund des identifizierten Musters der ovariellen Akkumulation dieser Nanoemulsionen in Abhängigkeit des Partikeldesigns sowie des Alterns eine

Grundlage für die zukünftige Entwicklung von Nanoemulsionen als Arzneistoffträger zur intravenösen Applikation:

Zum Einen wurden für die potentielle Behandlung ovarieller Dysfunktionen oder Krankheiten durch passives Targeting vorteilhafte partikeltechnologische Eigenschaften identifiziert, welche die ovarielle Akkumulation signifikant erhöhten. So könnte die signifikant höhere ovarielle Akkumulation maßgeschneiderter Nanoemulsionen den Therapieerfolg deutlich erhöhen, wie beispielsweise bei ovariellen Karzinomen durch eine Beladung mit Chemotherapeutika oder bereits *in vitro* getesteten alternativen Wirkstoffen wie Tocotrienol und Curcumin. Folgerichtig wären mit fast 10 % gemittelter AMS in den Ovarien die neutralen Nanoemulsionen mit 150 nm Partikelgröße die bestmögliche Wahl als Arzneistoffträger für lipophile Wirkstoffe zur Behandlung in den Ovarien. Nach erfolgreicher Inkorporation des lipophilen Wirkstoffs in den lipophilen Kern der neutralen NE150 müsste die Wirksamkeit des Arzneistoffträgersystems zunächst *in vitro* auf ovariellen (Karzinom-)Zelllinien sowie *in vivo* in (prä-)klinischen Versuchen charakterisiert werden.

Zum Anderen bietet dieses Portfolio der in Partikelgröße und Oberflächenladung maßgeschneiderten Nanoemulsionen ein Arzneistoffträgersystem zur intravenösen Applikation, welche nebst einer hohen Akkumulation im Zielorgan eine unerwünschte ovarielle Akkumulation sehr gering halten kann. So bieten die negativen Nanoemulsionen ein durch die Partikelgröße modifizierbares Biodistributionsprofil bei gleichbleibend geringer ovarieller Akkumulation. Eine potentielle, durch eine unerwünschte Wirkstofffreisetzung hervorgerufene nanotoxikologische Nebenwirkungen auf die Hauptfunktion der Ovarien, wie die Sexualsteroidhormonsynthese, Follikelentwicklung oder Meiose der Eizelle, könnten durch solch eine geringe ovarielle Akkumulation verringert werden. Demnach könnten Wirkstoffe mit einem bereits hohen bekannten toxikologischen Potential auf die Ovarien in den lipiden Kern dieser negativen Nanoemulsionen inkorporiert werden. Die ovariellen Nebenwirkungen sowie der Therapieerfolg am Wirkort dieser Nanoemulsionen könnte folglich mit den derzeit auf dem Markt verfügbaren Präparaten zunächst *in vitro* auf gesunden ovariellen Zelllinien und folglich ebenfalls *in vivo* in (prä-)klinischen Versuchen vergleichend charakterisiert werden.

Darüber hinaus könnte dieses erarbeitete Portfolio aus maßgeschneiderten Nanoemulsionen unterschiedlichen Partikeldesigns neben dem bereits erfolgreich in die Oberfläche inkorporierten anionischem PG um weitere neutral geladene oder kationische Phospholipide ausgeweitet werden. Hierzu wäre neben den Screeningversuchen zur Charakterisierung der resultierenden Partikelgröße und Oberflächenladung ebenfalls zu überprüfen, ob die Osmolalität sowie der pH-Wert den Anforderungen für eine intravenöse Applikation entspricht. Ebenso wäre die Langzeitstabilität bei verschiedenen Lagerungsbedingungen, die Sterilisierbarkeit, sowie die Zelltoxizität auf gesunde Zelllinien *in vitro* zu bewerten. Für die Charakterisierung der Biodistributionsprofile wären Nanoemulsionen mit Partikelgrößen von 25, 50, 100 und 150 nm für den direkten Vergleich mit den in dieser Arbeit charakterisierten neutralen und negativen Nanoemulsionen empfehlenswert.

Literaturverzeichnis

- [1] J. Di, X. Gao, Y. Du, H. Zhang, J. Gao und A. Zheng. Size, shape, charge and “stealthy” surface: Carrier properties affect the drug circulation time in vivo. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 16(4):444–458, 2021.
- [2] T. Loftsson und M. E. Brewster. Pharmaceutical applications of cyclodextrins: basic science and product development. *Journal of pharmacy and pharmacology*, 62(11):1607–1621, 2010.
- [3] N. M. Yukuyama, T. M. E. Kato, R. Lobenberg und A. N. Bou-Chacra. Challenges and future prospects of nanoemulsion as a drug delivery system. *Current pharmaceutical design*, 23(3):495–508, 2017.
- [4] S. Ganta, M. Talekar, A. Singh, T. P. Coleman und M. M. Amiji. Nanoemulsions in translational research—opportunities and challenges in targeted cancer therapy. *AAPS pharmscitech*, 15(3):694–708, 2014.
- [5] S. Kalepu und V. Nekkanti. Insoluble drug delivery strategies: review of recent advances and business prospects. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 5(5):442–453, 2015.
- [6] Y. Shi, W. Porter, T. Merdan und L. C. Li. Recent advances in intravenous delivery of poorly water-soluble compounds. *Expert opinion on drug delivery*, 6(12):1261–1282, 2009.
- [7] J. Medina, A. Salvadó und A. del Pozo. Use of ultrasound to prepare lipid emulsions of lorazepam for intravenous injection. *International Journal of Pharmaceutics*, 216(1-2):1–8, 2001.
- [8] V. M. Weiss, T. Naolou, G. Hause, J. Kuntsche, J. Kressler und K. Mäder. Poly (glycerol adipate)-fatty acid esters as versatile nanocarriers: From nanocubes over ellipsoids to nanospheres. *Journal of controlled release*, 158(1):156–164, 2012.
- [9] M. A. Barkat, M. Rizwanullah, F. H. Pottou, S. Beg, S. Akhter und F. J. Ahmad. Therapeutic nanoemulsion: concept to delivery. *Current Pharmaceutical Design*, 26(11):1145–1166, 2020.
- [10] M. Barani, M. Bilal, F. Sabir, A. Rahdar und G. Z. Kyzas. Nanotechnology in ovarian cancer: Diagnosis and treatment. *Life Sciences*, 266:118914, 2021.
- [11] M. Satpathy, L. Wang, R. J. Zielinski, W. Qian, Y. A. Wang, A. M. Mohs, B. A. Kairdolf, X. Ji, J. Capala und M. Lipowska. Targeted drug delivery and image-guided therapy of heterogeneous ovarian cancer using her2-targeted theranostic nanoparticles. *Theranostics*, 9(3):778, 2019.
- [12] T. Mangeolle, I. Yakavets, S. Marchal, M. Debayle, T. Pons, L. Bezdnetnaya und F. Marchal. Fluorescent nanoparticles for the guided surgery of ovarian peritoneal carcinomatosis. *Nanomaterials*, 8(8):572, 2018.
- [13] N. R. Patel, A. Piroyan, S. Ganta, A. B. Morse, K. M. Candiloro, A. L. Solon, A. H. Nack, C. A. Galati, C. Bora, M. A. Maglaty, S. W. O’Brien, S. Litwin, B. Davis, D. C. Connolly und T. P. Coleman. In vitro and in vivo evaluation of a novel folate-targeted theranostic nanoemulsion of docetaxel for imaging and improved anticancer activity against ovarian cancers. *Cancer biology & therapy*, 19(7):554–564, 2018.
- [14] C. Maupas, B. Moulari, A. Béduneau, A. Lamprecht und Y. Pellequer. Surfactant dependent toxicity of lipid nanocapsules in hacat cells. *International journal of pharmaceutics*, 411(1-2):136–141, 2011.
- [15] J. H. Finke, C. Richter, T. Gothsch, A. Kwade, S. Büttgenbach und C. C. Müller-Goymann. Coumarin 6 as a fluorescent model drug: How to identify properties of lipid colloidal drug delivery systems via fluorescence spectroscopy? *European journal of lipid science and technology*, 116(9):1234–1246, 2014.
- [16] B. Mukherjee, R. Maji, S. Roychowdhury und S. Ghosh. Toxicological concerns of engineered nanosize drug delivery systems. *American journal of therapeutics*, 23(1):e139–e150, 2016.
- [17] M. Ema, H. Okuda, M. Gamo und K. Honda. A review of reproductive and developmental toxicity of silver nanoparticles in laboratory animals. *Reproductive Toxicology*, 67:149–164, 2017.
- [18] P. N. Navya und H. K. Daima. Rational engineering of physicochemical properties of nanomaterials for biomedical applications with nanotoxicological perspectives. *Nano Convergence*, 3(1):1–14, 2016.
- [19] A. Schädlich, S. Hoffmann, T. Mueller, H. Caysa, C. Rose, A. Göpferich, J. Li, J. Kuntsche und K. Mäder. Accumulation of nanocarriers in the ovary: A neglected toxicity risk? *Journal of controlled release*, 160(1):105–112, 2012.
- [20] W. Fan, Z. Yu, H. Peng, H. He, Y. Lu, J. Qi, X. Dong, W. Zhao und W. Wu. Effect of particle size on the pharmacokinetics and biodistribution of parenteral nanoemulsions. *International journal of pharmaceutics*, 586:119551, 2020.

- [21] K. Hörmann und A. Zimmer. Drug delivery and drug targeting with parenteral lipid nanoemulsions - a review. *Journal of controlled release*, 223:85–98, 2016.
- [22] H. Yang, L. Du, X. Tian, Z. Fan, C. Sun, Y. Liu, J. A. Keelan und G. Nie. Effects of nanoparticle size and gestational age on maternal biodistribution and toxicity of gold nanoparticles in pregnant mice. *Toxicology letters*, 230(1):10–18, 2014.
- [23] T. C. Yih und C. Wei. Nanomedicine in cancer treatment. *Nanomedicine: nanotechnology, biology, and medicine*, 2(1):191–192, 2005.
- [24] S. Hirsjärvi, L. Sancey, S. Dufort, C. Belloche, C. Vanpouille-Box, E. Garcion, J.-L. Coll, F. Hindré und J.-P. Benoit. Effect of particle size on the biodistribution of lipid nanocapsules: comparison between nuclear and fluorescence imaging and counting. *International journal of pharmaceutics*, 453(2):594–600, 2013.
- [25] A.-L. Lainé, J. Gravier, M. Henry, L. Sancey, J. Bejaud, E. Pancani, M. Wiber, I. Texier, J.-L. Coll und J.-P. Benoit. Conventional versus stealth lipid nanoparticles: formulation and in vivo fate prediction through fret monitoring. *Journal of Controlled Release*, 188:1–8, 2014.
- [26] N. A. N. Azmi, A. A. M. Elgharbawy, S. R. Motlagh, N. Samsudin und H. M. Salleh. Nanoemulsions: factory for food, pharmaceutical and cosmetics. *Processes*, 7(9):617, 2019.
- [27] D. J. McClements und J. Rao. Food-grade nanoemulsions: formulation, fabrication, properties, performance, biological fate, and potential toxicity. *Critical reviews in food science and nutrition*, 51(4):285–330, 2011.
- [28] A. Gupta, H. B. Eral, T. A. Hatton und P. S. Doyle. Controlling and predicting droplet size of nanoemulsions: scaling relations with experimental validation. *Soft Matter*, 12(5):1452–1458, 2016.
- [29] H. T. Davis. Factors determining emulsion type: Hydrophile—lipophile balance and beyond. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 91:9–24, 1994.
- [30] J. P. F. Macedo, L. L. Fernandes, F. R. Formiga, M. F. Reis, T. Nagashima Júnior, L. A. L. Soares und E. Egito. Micro-emultocrit technique: a valuable tool for determination of critical hlb value of emulsions. *Aaps Pharmscitech*, 7(1):E146–E152, 2006.
- [31] P. L. Klassen, Z. George, J. Warwick und S. Georgiadou. Pit tuning effects of hydrophobic co-surfactants and drugs. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 455:1–10, 2014.
- [32] M. O. Bachynsky, N. H. Shah, C. I. Patel und A. W. Malick. Factors affecting the efficiency of a self-emulsifying oral delivery system. *Drug development and industrial pharmacy*, 23(8):809–816, 1997.
- [33] Y. An, X. Yan, B. Li und Y. Li. Microencapsulation of capsanthin by self-emulsifying nanoemulsions and stability evaluation. *European Food Research and Technology*, 239(6):1077–1085, 2014.
- [34] G. Lefebvre, J. Riou, G. Bastiat, E. Roger, K. Frombach, J.-C. Gimel, P. Saulnier und B. Calvignac. Spontaneous nano-emulsification: Process optimization and modeling for the prediction of the nanoemulsion’s size and polydispersity. *International Journal of Pharmaceutics*, 534(1-2):220–228, 2017.
- [35] M. Y. Koroleva und E. V. Yurtov. Nanoemulsions: the properties, methods of preparation and promising applications. *Russian Chemical Reviews*, 81(1):21, 2012.
- [36] P. Fernandez, V. André, J. Rieger und A. Kühnle. Nano-emulsion formation by emulsion phase inversion. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 251(1-3):53–58, 2004.
- [37] C. Solans, P. Izquierdo, J. Nolla, N. Azemar und M. J. Garcia-Celma. Nano-emulsions. *Current opinion in colloid & interface science*, 10(3-4):102–110, 2005.
- [38] P. Izquierdo, J. Feng, J. Esquena, T. F. Tadros, J. C. Dederen, M. J. Garcia, N. Azemar und C. Solans. The influence of surfactant mixing ratio on nano-emulsion formation by the pit method. *Journal of colloid and interface science*, 285(1):388–394, 2005.
- [39] Z. Mei, J. Xu und D. Sun. O/w nano-emulsions with tunable pit induced by inorganic salts. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 375(1-3):102–108, 2011.
- [40] R. K. Thakur, C. Villette, J. M. Aubry und G. Delaplace. Dynamic emulsification and catastrophic phase inversion of lecithin-based emulsions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and engineering aspects*, 315(1-3):285–293, 2008.
- [41] Shahriar Sajjadi. Nanoemulsion formation by phase inversion emulsification: on the nature of inversion. *Langmuir*, 22(13):5597–5603, 2006.
- [42] Shahriar Sajjadi. Formation of fine emulsions by emulsification at high viscosity or low interfacial tension; a comparative study. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 299(1-3):73–78, 2007.
- [43] N. Sadurní, C. Solans, N. Azemar und M. J. García-Celma. Studies on the formation of o/w nano-emulsions, by low-energy emulsification methods, suitable for pharmaceutical applications. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 26(5):438–445, 2005.

- [44] R. Pons, I. Carrera, J. Caelles, J. Rouch und P. Panizza. Formation and properties of miniemulsions formed by microemulsions dilution. *Advances in Colloid and Interface Science*, 106(1-3):129–146, 2003.
- [45] B. Heurtault, P. Saulnier, B. Pech, J.-E. Proust und J.-P. Benoit. A novel phase inversion-based process for the preparation of lipid nanocarriers. *Pharmaceutical research*, 19(6):875–880, 2002.
- [46] S. E. Friberg, R. W. Corkery und I. A. Blute. Phase inversion temperature (pit) emulsification process. *Journal of Chemical & Engineering Data*, 56(12):4282–4290, 2011.
- [47] B. Heurtault, P. Saulnier, B. Pech, M.-C. Venier-Julienne, J.-E. Proust, R. Phan-Tan-Luu und J.-P. Benoit. The influence of lipid nanocapsule composition on their size distribution. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 18(1):55–61, 2003.
- [48] S. Petersen, A. Fahr und H. Bunjes. Flow cytometry as a new approach to investigate drug transfer between lipid particles. *Molecular pharmaceutics*, 7(2):350–363, 2010.
- [49] Pubmed timeline „nanoemulsion“. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/?term=nanoemulsion&timeline=expanded>. Aufgerufen: 15.05.2023.
- [50] Pubmed timeline „drug nanoemulsion“. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/?term=drug%20nanoemulsion&timeline=expanded>. Aufgerufen: 15.05.2023.
- [51] Pubmed timeline „diagnostic nanoemulsion“. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/?term=diagnostic%20nanoemulsion&timeline=expanded>. Aufgerufen: 15.05.2023.
- [52] Pubmed timeline „theranostic nanoemulsion“. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/?term=theranostic%20nanoemulsion&timeline=expanded>. Aufgerufen: 15.05.2023.
- [53] L. Séguy, A.-C. Groo, D. Goux, A. Hennequin und D. Malzert-Fréon. Design of non-haemolytic nanoemulsions for intravenous administration of hydrophobic apis. *Pharmaceutics*, 12(12):1141, 2020.
- [54] J. Wong, A. Brugger, A. Khare, M. Chaubal, P. Papadopoulos, B. Rabinow, J. Kipp und J. Ning. Suspensions for intravenous (iv) injection: a review of development, preclinical and clinical aspects. *Advanced drug delivery reviews*, 60(8):939–954, 2008.
- [55] F. Lallemand, P. Daull, S. Benita, R. Buggage und J.-S. Garrigue. Successfully improving ocular drug delivery using the cationic nanoemulsion, novasorb. *Journal of drug delivery*, 2012, 2012.
- [56] A. Maquille, J.-L. H. Jivan und B. Tilquin. Radiosterilization of drugs in aqueous solutions may be achieved by the use of radioprotective excipients. *International journal of pharmaceutics*, 349(1-2):74–82, 2008.
- [57] F. Hasanain, K. Guenther, W. M. Mullett und E. Craven. Gamma sterilization of pharmaceuticals—a review of the irradiation of excipients, active pharmaceutical ingredients, and final drug product formulations. *PDA journal of pharmaceutical science and technology*, 68(2):113–137, 2014.
- [58] M. A. Vetten, C. S. Yah, T. Singh und M. Gulumian. Challenges facing sterilization and depyrogenation of nanoparticles: Effects on structural stability and biomedical applications. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 10(7):1391–1399, 2014.
- [59] A. Zielińska, B. B. Soles, A. R. Lopes, B. F. Vaz, C. M. Rodrigues, T. F. R. Alves, D. Klensporf-Pawlik, A. Durazzo, M. Lucarini, P. Severino, A. Santini, M. V. Chaud und E. B. Souto. Nanopharmaceuticals for eye administration: Sterilization, depyrogenation and clinical applications. *Biology*, 9(10):336, 2020.
- [60] H. Vallhov, J. Qin, S. M. Johansson, N. Ahlberg, M. A. Muhammed, A. Scheynius und S. Gabrielsson. The importance of an endotoxin-free environment during the production of nanoparticles used in medical applications. *Nano letters*, 6(8):1682–1686, 2006.
- [61] P. Worthington, K. M. Gura, M. D. Kraft, R. Nishikawa, P. Guenter, G. S. Sacks und ASPEN PN Safety Committee. Update on the use of filters for parenteral nutrition: an aspen position paper. *Nutrition in Clinical Practice*, 36(1):29–39, 2021.
- [62] M. I. Townsley. Structure and composition of pulmonary arteries, capillaries and veins. *Comprehensive Physiology*, 2:675, 2012.
- [63] M. G. Klang. Pfat5 and the evolution of lipid admixture stability. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, 39:67S–71S, 2015.
- [64] D. F. Driscoll. Pharmaceutical and clinical aspects of lipid injectable emulsions. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, 41(1):125–134, 2017.
- [65] D. Roethlisberger, H.-C. Mahler, U. Altenburger und A. Pappenberger. If euhydric and isotonic do not work, what are acceptable ph and osmolality for parenteral drug dosage forms? *Journal of pharmaceutical sciences*, 106(2):446–456, 2017.
- [66] M. Stranz und E. S. Kastango. A review of ph and osmolality. *International journal of pharmaceutical Compounding*, 6(3):216–220, 2002.

- [67] W. Wang. Tolerability of hypertonic injectables. *International journal of pharmaceutics*, 490(1-2):308–315, 2015.
- [68] P. Simamora, S. Pinsuwan, J. M. Alvarez, P. B. Myrdal und S. H. Yalkowsky. Effect of ph on injection phlebitis. *Journal of pharmaceutical sciences*, 84(4):520–522, 1995.
- [69] S. N. Chevront, R. W. Kenefick, K. R. Heavens und M. G. Spitz. A comparison of whole blood and plasma osmolality and osmolarity. *Journal of clinical laboratory analysis*, 28(5):368–373, 2014.
- [70] M. A. H. Elnoury, O. M. Azmy, A. O. I. Elshal, A. Mohamed, H. Ragab und E. Elsherbini. Study of the effects of silver nanoparticles exposure on the ovary of rats. *Life Science Journal*, 10(2):1887–1894, 2013.
- [71] J. W. Han, J.-K. Jeong, S. Gurunathan, Y.-J. Choi, J. Das, D.-N. Kwon, S.-G. Cho, C. Park, H. G. Seo und J.-K. Park. Male-and female-derived somatic and germ cell-specific toxicity of silver nanoparticles in mouse. *Nanotoxicology*, 10(3):361–373, 2016.
- [72] J. Mérian, R. Boisgard, X. Decleves, B. Thezé, I. Texier und B. Tavitian. Synthetic lipid nanoparticles targeting steroid organs. *Journal of Nuclear Medicine*, 54(11):1996–2003, 2013.
- [73] V. M. Weiss, H. Lucas, T. Mueller, P. Chytil, T. Etrych, T. Naolou, J. Kressler und K. Mäder. Intended and unintended targeting of polymeric nanocarriers: the case of modified poly (glycerol adipate) nanoparticles. *Macromolecular bioscience*, 18(1):1700240, 2018.
- [74] R. Santacruz-Márquez, M. González-De los Santos und I. Hernández-Ochoa. Ovarian toxicity of nanoparticles. *Reproductive Toxicology*, 103:79–95, 2021.
- [75] G. Xu, S. Lin, W.-C. Law, I. Roy, X. Lin, S. Mei, H. Ma, S. Chen, H. Niu und X. Wang. The invasion and reproductive toxicity of qds-transferrin bioconjugates on preantral follicle in vitro. *Theranostics*, 2(7):734, 2012.
- [76] V. Simon, C. Avet, V. Grange-Messent, R. Wargnier, C. Denoyelle, A. Pierre, J. Dairou, J.-M. Dupret und J. Cohen-Tannoudji. Carbon black nanoparticles inhibit aromatase expression and estradiol secretion in human granulosa cells through the erk1/2 pathway. *Endocrinology*, 158(10):3200–3211, 2017.
- [77] X. Liu, D. Qin, Y. Cui, L. Chen, H. Li, Z. Chen, L. Gao, Y. Li und J. Liu. The effect of calcium phosphate nanoparticles on hormone production and apoptosis in human granulosa cells. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 8(1):1–8, 2010.
- [78] B. Courbiere, M. Auffan, R. Rollais, V. Tassistro, A. Bonnefoy, A. Botta, J. Rose, T. Orsière und J. Perrin. Ultrastructural interactions and genotoxicity assay of cerium dioxide nanoparticles on mouse oocytes. *International journal of molecular sciences*, 14(11):21613–21628, 2013.
- [79] A. M. Khalifa, M. A. Elsheikh, A. M. Khalifa und Y. S. R. Elnaggar. Current strategies for different paclitaxel-loaded nano-delivery systems towards therapeutic applications for ovarian carcinoma: A review article. *Journal of Controlled Release*, 311:125–137, 2019.
- [80] F. Perche, N. R. Patel und V. P. Torchilin. Accumulation and toxicity of antibody-targeted doxorubicin-loaded peg-pe micelles in ovarian cancer cell spheroid model. *Journal of controlled release*, 164(1):95–102, 2012.
- [81] N. Steuber, K. Vo, R. Wadhwa, J. Birch, P. Iacoban, P. Chavez und T. A. Elbayoumi. Tocotrienol nanoemulsion platform of curcumin elicit elevated apoptosis and augmentation of anticancer efficacy against breast and ovarian carcinomas. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(11):1792, 2016.
- [82] D. Wildemeersch, D. Janssens und S. Weyers. Continuous combined parenteral estrogen substitution and intrauterine progestogen delivery: the ideal hst combination? *Maturitas*, 51(2):207–214, 2005.
- [83] S. D. Sullivan, P. M. Sarrel und L. M. Nelson. Hormone replacement therapy in young women with primary ovarian insufficiency and early menopause. *Fertility and sterility*, 106(7):1588–1599, 2016.
- [84] K. S. Snima, R. Jayakumar und V.-K. Lakshmanan. In vitro and in vivo biological evaluation of o-carboxymethyl chitosan encapsulated metformin nanoparticles for pancreatic cancer therapy. *Pharmaceutical research*, 31(12):3361–3370, 2014.
- [85] M. Parihar. Role of metformin in management of pcos. *The Polycystic Ovary Syndrome*, page 197, 2004.
- [86] M. Cetin und S. Sahin. Microparticulate and nanoparticulate drug delivery systems for metformin hydrochloride. *Drug delivery*, 23(8):2796–2805, 2016.
- [87] Pubmed timeline „ovarian toxicity“. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/?term=ovarian%20toxicity&timeline=expanded>. Aufgerufen: 15.05.2023.
- [88] Pubmed timeline „ovarian accumulation“. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/?term=ovarian%20accumulation&timeline=expanded>. Aufgerufen: 15.05.2023.

- [89] Pubmed timeline „ovarian drug delivery“. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/?term=ovarian%20drug%20delivery&timeline=expanded>. Aufgerufen: 15.05.2023.
- [90] Pubmed timeline „ovarian nanoparticle“. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/?term=ovarian%20nanoparticle&timeline=expanded>. Aufgerufen: 15.05.2023.
- [91] D. V. Bazile, C. Ropert, P. Huve, T. Verrecchia, M. Mariard, A. Frydman, M. Veillard und G. Spenlehauer. Body distribution of fully biodegradable [14c]-poly (lactic acid) nanoparticles coated with albumin after parenteral administration to rats. *Biomaterials*, 13(15):1093–1102, 1992.
- [92] T. Liu, H. Choi, R. Zhou und I.-W. Chen. Quantitative evaluation of the reticuloendothelial system function with dynamic mri. *PloS one*, 9(8):e103576, 2014.
- [93] K.-i. Ogawara, K. Furumoto, Y. Takakura, M. Hashida, K. Higaki und T. Kimura. Surface hydrophobicity of particles is not necessarily the most important determinant in their in vivo disposition after intravenous administration in rats. *Journal of controlled release*, 77(3):191–198, 2001.
- [94] A. Brouwer und D. L. Knook. The reticuloendothelial system and aging: a review. *Mechanisms of ageing and development*, 21(3-4):205–228, 1983.
- [95] B. N. Jaroslow und J. W. Larrick. Clearance of foreign red cells from the blood of aging mice. *Mechanisms of ageing and development*, 2:23–32, 1973.
- [96] K. M. Frick. Estrogens and age-related memory decline in rodents: what have we learned and where do we go from here? *Hormones and behavior*, 55(1):2–23, 2009.
- [97] E. H. Y. Ng, C. C. W. Chan, W. S. B. Yeung und P. C. Ho. Effect of age on ovarian stromal flow measured by three-dimensional ultrasound with power doppler in chinese women with proven fertility. *Human reproduction*, 19(9):2132–2137, 2004.
- [98] L. R. Bernstein, A. C. L. Mackenzie, D. C. Kraemer, J. E. Morley, S. Farr, C. L. Chaffin und I. Merchenthaler. Shortened estrous cycle length, increased fsh levels, fsh variance, oocyte spindle aberrations, and early declining fertility in aging senescence-accelerated mouse prone-8 (samp8) mice: concomitant characteristics of human midlife female reproductive aging. *Endocrinology*, 155(6):2287–2300, 2014.
- [99] D. R. Garris, S. K. Williams und L. West. Morphometric evaluation of diabetes-associated ovarian atrophy in the c57bl/ksj mouse: relationship to age and ovarian function. *The Anatomical Record*, 211(4):434–443, 1985.
- [100] J. L. Fendrick, A. M. Raafat und S. Z. Haslam. Mammary gland growth and development from the postnatal period to postmenopause: ovarian steroid receptor ontogeny and regulation in the mouse. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*, 3(1):7–22, 1998.
- [101] S. Ben-Or. Morphological and functional development of the ovary of the mouse: I. morphology and histochemistry of the developing ovary in normal conditions and after fsh treatment. *Development*, 1963.
- [102] S. L. Byers, M. V. Wiles, S. L. Dunn und R. A. Taft. Mouse estrous cycle identification tool and images. *PloS one*, 7(4):e35538, 2012.
- [103] J. F. Nelson, L. S. Felicio, H. H. Osterburg und C. E. Finch. Differential contributions of ovarian and extraovarian factors to age-related reductions in plasma estradiol and progesterone during the estrous cycle of c57bl/6j mice. *Endocrinology*, 130(2):805–810, 1992.
- [104] C. Kopp, V. Ressel, E. Wigger und I. Tobler. Influence of estrus cycle and ageing on activity patterns in two inbred mouse strains. *Behavioural brain research*, 167(1):165–174, 2006.
- [105] C. E. Finch und D. J. Holmes. Ovarian aging in developmental and evolutionary contexts. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1204(1):82–94, 2010.
- [106] L. M. Franks und J. Payne. The influence of age on reproductive capacity in c57bl mice. *Reproduction*, 21(3):563–565, 1970.
- [107] H. Suzuki, M. Togashi, Y. Moriguchi und J. Adachi. Relationship between age-related decline in fertility and in vitro fertilization rate in ivcs mice. *Journal of Reproduction and Development*, 40(2):107–116, 1994.
- [108] M. Yuan, Z. Wen-Xia, C. Jun-Ping und Z. Yong-Xiang. Age-related changes in the oestrous cycle and reproductive hormones in senescence-accelerated mouse. *Reproduction, Fertility and Development*, 17(5):507–512, 2005.
- [109] Beilstein journal of nanotechnology statistics. <https://www.beilstein-journals.org/bjnano/statistics>, 2023. Aufgerufen: 15.05.2023.
- [110] International journal of molecular sciences statistics. <https://www.mdpi.com/journal/ijms/stats>. Aufgerufen: 15.05.2023.
- [111] Pharmaceutics statistics. <https://www.mdpi.com/journal/pharmaceutics/stats>. Aufgerufen: 15.05.2023.

- [112] E. F. Busmann, D. García Martínez, H. Lucas und K. Mäder. Phase inversion-based nanoemulsions of medium chain triglyceride as potential drug delivery system for parenteral applications. *Beilstein journal of nanotechnology*, 11(1):213–224, 2020.
- [113] E. F. Busmann, J. Kollan, K. Mäder und H. Lucas. Ovarian accumulation of nanoemulsions: Impact of mice age and particle size. *International journal of molecular sciences*, 22(15):8283, 2021.
- [114] E. F. Busmann und H. Lucas. Particle engineering of innovative nanoemulsion designs to modify the accumulation in female sex organs by particle size and surface charge. *Pharmaceutics*, 14(2):301, 2022.
- [115] P. C. Calder, D. L. Waitzberg, S. Klek und R. G. Martindale. Lipids in parenteral nutrition: biological aspects. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, 44:S21–S27, 2020.
- [116] V. K. Babayan. Medium chain triglycerides and structured lipids. *Lipids*, 22(6):417–420, 1987.
- [117] C. Hu, H. Ding, Q. Zhuang, P. Llanos, T. Pillay, C. Hernandez, Y. A. Carpentier, R. J. Deckelbaum und C. L. Chang. Blood clearance kinetics and organ delivery of medium-chain triglyceride and fish oil-containing lipid emulsions: Comparing different animal species. *Clinical Nutrition*, 40(3):987–996, 2021.
- [118] P. C. Calder, G. L. Jensen, B. V. Koletzko, P. Singer und G. J. A. Wanten. Lipid emulsions in parenteral nutrition of intensive care patients: current thinking and future directions. *Intensive care medicine*, 36(5):735–749, 2010.
- [119] R. C. Rowe, P. Sheskey und M. Quinn. *Handbook of pharmaceutical excipients*. Libros Digitales-Pharmaceutical Press, 2009.
- [120] I. Matsaridou, P. Barmpalexis, A. Salis und I. Nikolakakis. The influence of surfactant hlb and oil/surfactant ratio on the formation and properties of self-emulsifying pellets and microemulsion reconstitution. *Aaps Pharmscitech*, 13(4):1319–1330, 2012.
- [121] A. Shaukat und K. Kolter. Kolliphor hs 15—an enabler for parenteral and oral formulations. *Am. Pharm. Rev.*, 22:22–34, 2019.
- [122] S. Furse. Is phosphatidylglycerol essential for terrestrial life? *Journal of chemical biology*, 10(1):1–9, 2017.
- [123] O. Quehenberger, A. M. Armando, A. H. Brown, S. B. Milne, D. S. Myers, A. H. Merrill, S. Bandyopadhyay, K. N. Jones, S. Kelly und R. L. Shaner. Lipidomics reveals a remarkable diversity of lipids in human plasma. *Journal of lipid research*, 51(11):3299–3305, 2010.
- [124] R. Veldhuizen, K. Nag, S. Orgeig und F. Possmayer. The role of lipids in pulmonary surfactant. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1408(2-3):90–108, 1998.
- [125] M. E. Klein, M. Rieckmann, H. Lucas, A. Meister, H. Loppnow und K. Mäder. Phosphatidylserine (ps) and phosphatidylglycerol (pg) enriched mixed micelles (mm): A new nano-drug delivery system with anti-inflammatory potential? *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 152:105451, 2020.
- [126] M. E. Klein, S. Mauch, M. Rieckmann, D. García Martínez, G. Hause, M. Noutsias, U. Hofmann, H. Lucas, A. Meister, G. Ramos, H. Loppnow und K. Mäder. Phosphatidylserine (ps) and phosphatidylglycerol (pg) nanodispersions as potential anti-inflammatory therapeutics: Comparison of in vitro activity and impact of pegylation. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 23:102096, 2020.
- [127] W.-W. Chen, Y.-J. Chao, W.-H. Chang, J.-F. Chan und Y.-H. H. Hsu. Phosphatidylglycerol incorporates into cardiolipin to improve mitochondrial activity and inhibits inflammation. *Scientific reports*, 8(1):1–14, 2018.
- [128] J. Mérian, J. Gravier, F. Navarro und I. Texier. Fluorescent nanoprobe dedicated to in vivo imaging: from preclinical validations to clinical translation. *Molecules*, 17(5):5564–5591, 2012.
- [129] F. Leblond, S. C. Davis, P. A. Valdés und B. W. Pogue. Pre-clinical whole-body fluorescence imaging: Review of instruments, methods and applications. *Journal of photochemistry and photobiology B: Biology*, 98(1):77–94, 2010.
- [130] T. Etrych, H. Lucas, O. Janoušková, P. Chytil, T. Mueller und K. Mäder. Fluorescence optical imaging in anticancer drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 226:168–181, 2016.
- [131] M. Riehl, M. Harms, H. Lucas, T. Ebsen, C. A. Guzmán und K. Mäder. Dual dye in-vivo imaging of differentially charged plga carriers reveals antigen-depot effect, leading to improved immune responses in preclinical models. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 117:88–97, 2018.
- [132] I. Texier, M. Goutayer, A. Da Silva, L. Guyon, N. Djaker, V. Jossierand, E. Neumann, J. Bibette und F. Vinet. Cyanine-loaded lipid nanoparticles for improved in vivo fluorescence imaging. *Journal of biomedical optics*, 14(5):054005, 2009.
- [133] M. Eisenblätter, J. Ehrchen, G. Varga, C. Sunderkötter, W. Heindel, J. Roth, C. Bremer und A. Wall. In vivo optical imaging of cellular inflammatory response in granuloma formation using fluorescence-labeled macrophages. *Journal of Nuclear Medicine*, 50(10):1676–1682, 2009.

- [134] J. C. Thomas. The determination of log normal particle size distributions by dynamic light scattering. *Journal of colloid and interface science*, 117(1):187–192, 1987.
- [135] T. X. Viegas und R. L. Henry. Osmotic behavior of poloxamer 407 and other non-ionic surfactants in aqueous solutions. *International journal of pharmaceutics*, 160(2):157–162, 1998.
- [136] M. Riehl, M. Harms, B. Göttel, H. Kubas, D. Schiroky und K. Mäder. Acid-induced degradation of widely used nir dye dir causes hypsochromic shift in fluorescence properties. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 132:27–33, 2019.
- [137] C. C. Berton-Carabin, L. Sagis und K. Schroën. Formation, structure, and functionality of interfacial layers in food emulsions. *Annual review of food science and technology*, 9:551–587, 2018.
- [138] T. G. Mason, J. N. Wilking, K. Meleson, C. B. Chang und S. M. Graves. Nanoemulsions: formation, structure, and physical properties. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 18:635–666, 2006.
- [139] A. Śmieszek, A. Czyrek, K. Basinska, J. Trynda, A. Skaradzinska, A. Siudzinska, M. Mareziak und K. Marycz. Effect of metformin on viability, morphology, and ultrastructure of mouse bone marrow-derived multipotent mesenchymal stromal cells and balb/3t3 embryonic fibroblast cell line. *BioMed Research International*, 2015, 2015.
- [140] C. Buken, J. Sahana, T. J. Corydon, D. Melnik, J. Bauer, M. Wehland, M. Krüger, S. Balk, N. Abuagela, M. Infanger und D. Grimm. Morphological and molecular changes in juvenile normal human fibroblasts exposed to simulated microgravity. *Scientific reports*, 9(1):1–22, 2019.
- [141] R. G. Binder, A. N. Booth, D. J. Robbins und G. Fuller. Hydroxystearic acid deposition and metabolism in rats fed hydrogenated castor oil. *Lipids*, 5(10):832–837, 1970.
- [142] J. Elovson. Metabolism of some mono-hydroxystearic acids in the intact rat. *Biochimica et Biophysica Acta*, 84:275–293, 1964.
- [143] G. Le Roux, H. Moche, A. Nieto, J.-P. Benoit, F. Nessler und F. Lagarce. Cytotoxicity and genotoxicity of lipid nanocapsules. *Toxicology in Vitro*, 41:189–199, 2017.
- [144] M. Szwed, M. L. Torgersen, R. V. Kumari, S. K. Yadava, S. Pust, T. G. Iversen, T. Skotland, J. Giri und K. Sandvig. Biological response and cytotoxicity induced by lipid nanocapsules. *Journal of nanobiotechnology*, 18(1):1–19, 2020.
- [145] F. Benavides, T. M. Oberyszyn, A. M. VanBuskirk, V. E. Reeve und D. F. Kusewitt. The hairless mouse in skin research. *Journal of dermatological science*, 53(1):10–18, 2009.
- [146] B. S. Schaffer, M. H. Grayson, J. M. Wortham, C. B. Kubicek, A. T. McCleish, S. I. Prajapati, L. D. Nelson, M. M. Brady, I. Jung und T. Hosoyama. Immune competency of a hairless mouse strain for improved preclinical studies in genetically engineered mice. *Molecular cancer therapeutics*, 9(8):2354–2364, 2010.
- [147] M. E. Klein, M. Rieckmann, D. Sedding, G. Hause, A. Meister, K. Mäder und H. Lucas. Towards the development of long circulating phosphatidylserine (ps)-and phosphatidylglycerol (pg)-enriched anti-inflammatory liposomes: Is pegylation effective? *Pharmaceutics*, 13(2):282, 2021.
- [148] J. Baas, N. Senninger und H. Elser. The reticuloendothelial system. an overview of function, pathology and recent methods of measurement. *Zeitschrift fur Gastroenterologie*, 32(2):117–123, 1994.
- [149] S. Hirsjärvi, S. Dufort, J. Gravier, I. Texier, Q. Yan, J. Bibette, L. Sancey, V. Josserand, C. Passirani und J.-P. Benoit. Influence of size, surface coating and fine chemical composition on the in vitro reactivity and in vivo biodistribution of lipid nanocapsules versus lipid nanoemulsions in cancer models. *Nanomedicine: Nanotechnology, biology and medicine*, 9(3):375–387, 2013.
- [150] K. Y. Ebino. Studies on coprophagy in experimental animals. *Experimental Animals*, 42(1):1–9, 1993.
- [151] Y.-S. Chen, Y.-C. Hung, I. Liao und G. S. Huang. Assessment of the in vivo toxicity of gold nanoparticles. *Nanoscale research letters*, 4(8):858–864, 2009.

A. Anhang

Zusätzliche Materialien

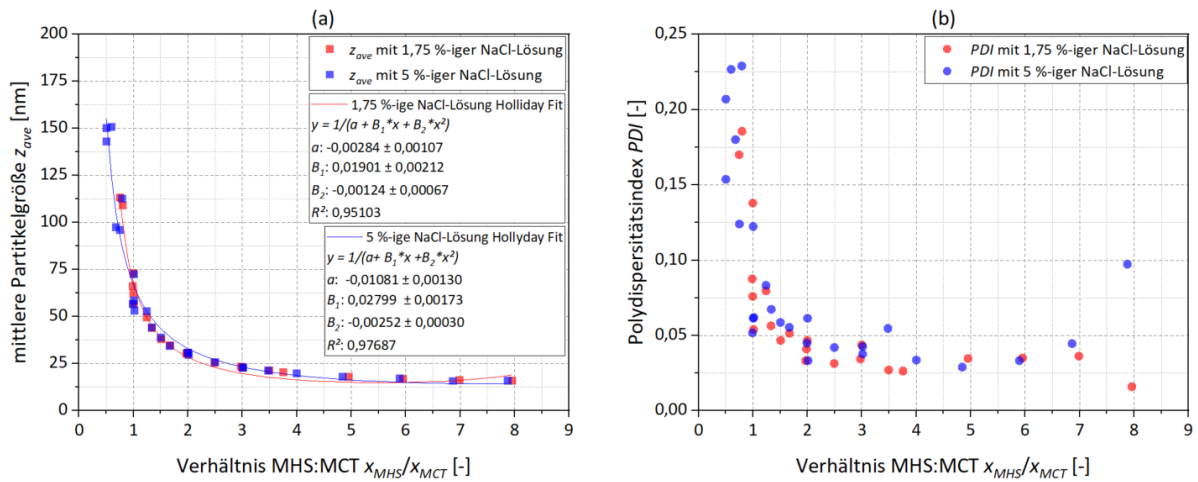


Abbildung A.1. Einfluss der Salinität der wässrigen Phase auf (a) die mittlere Partikelgröße und (b) den PDI der formulierten Nanoemulsionen abhängig vom MHS:MCT Verhältnis.

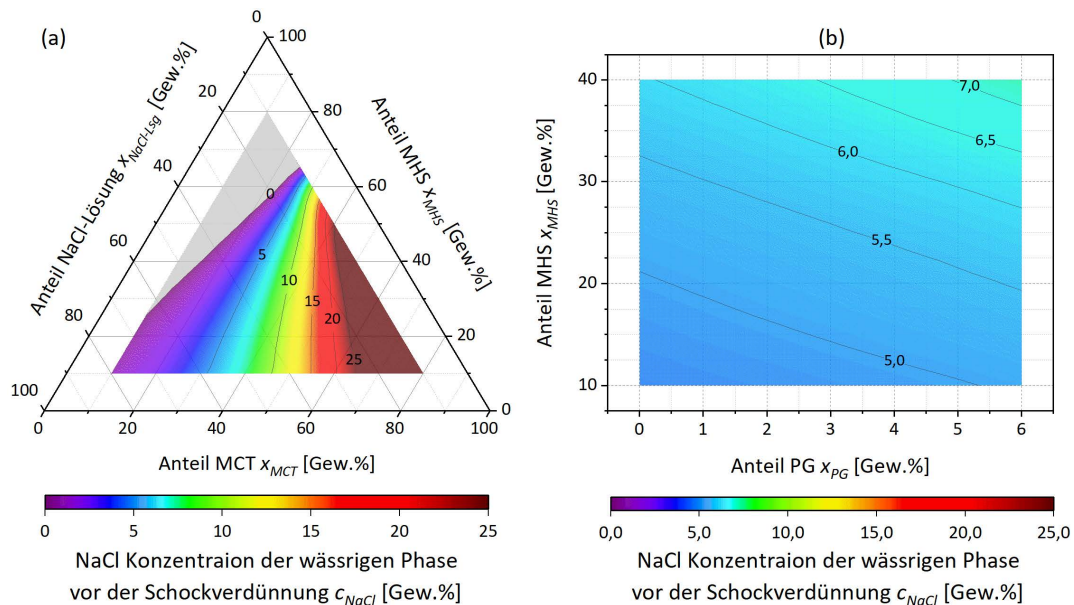


Abbildung A.2. Salinität der wässrigen Phase vor der Schockverdünnung zur Herstellung von (a) neutralen Nanoemulsionen nach [112] und (b) negativen Nanoemulsionen (grauer Bereich: berechnete negative Konzentration auf 0 Gew.-% gesetzt; regenbogenfarbener Bereich: berechnete NaCl Konzentration; dunkelroter Bereich: berechnete Konzentration über der Sättigungskonzentration auf 25 Gew.-% gesetzt).

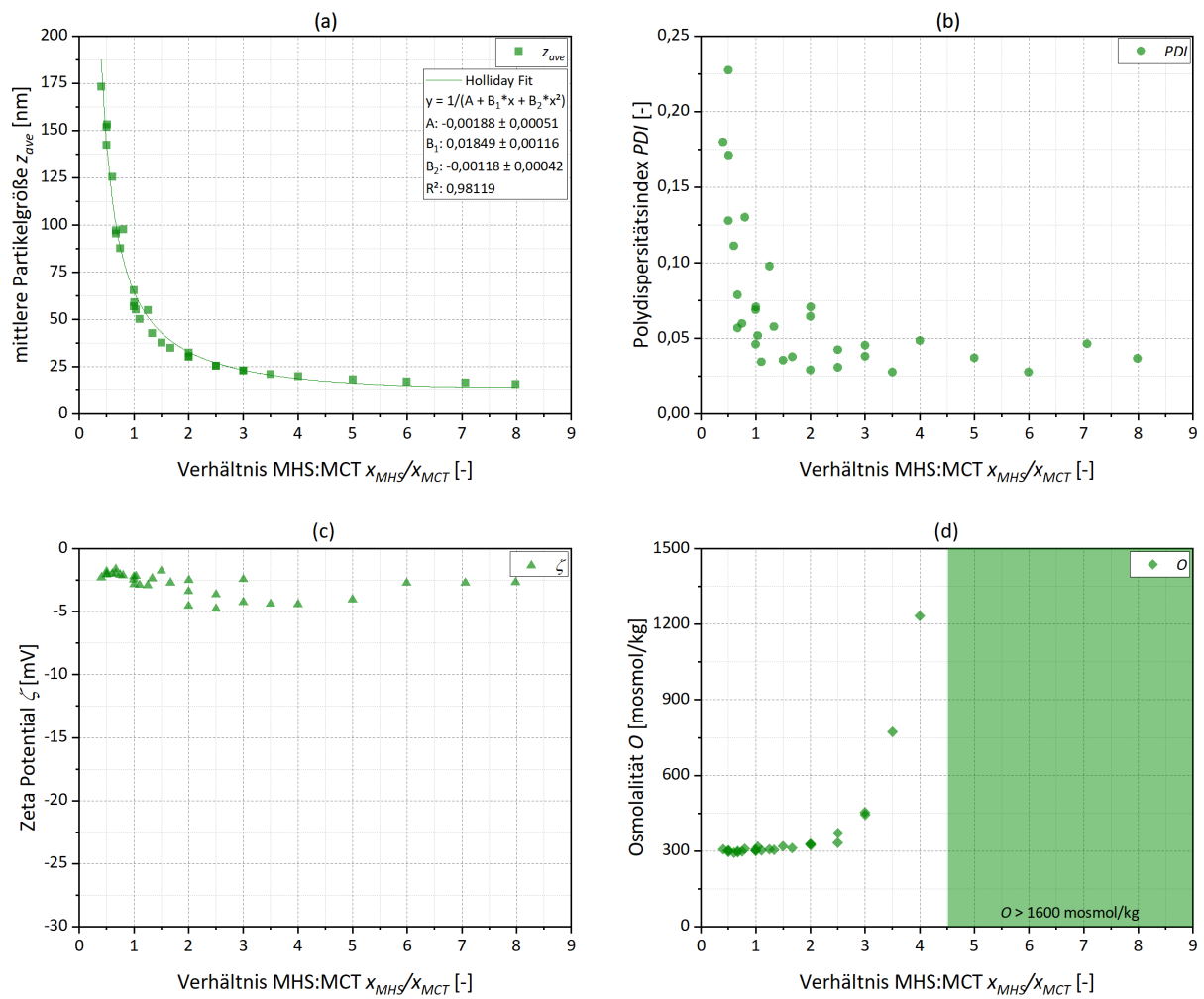


Abbildung A.3. Eigenschaften der isotonen neutralen Nanoemulsionen abhängig vom MHS:MCT Verhältnis mit (a) mittlerer Partikelgröße, (b) PDI, (c) Zeta Potential und (d) Osmolalität (grüner Bereich: Formulierungen mit Osmolalität außerhalb des maximalen Messbereichs von 1600 mosmol/kg des verwendeten Osmometers) nach [112].

Tabelle A.1. Kompositionen der ausgewählten sieben Formulierungen nach [113,114].

Substanzen in Gew. %	neutrale Nanoemulsionen				negative Nanoemulsionen		
	NE25	NE50	NE100	NE150	NE50	NE100	NE150
DiR beladenes MCT ¹	8,00	8,00	8,00	8,00	8,00	8,00	8,00
MHS	20,00	8,80	5,33	4,00	2,67	2,67	2,67
PG	-	-	-	-	1,60	0,80	0,27
NaCl-Lösung	25,33 ²	23,20 ³	13,33 ⁴	8,00 ⁵	14,40 ⁶	15,20 ⁷	15,73 ⁸
eiskaltes Wasser	46,67	60,00	73,33	80,00	73,33	73,33	73,33

¹ DiR beladenes MCT bei einer Konzentration von 0,1 mg/g; NaCl-Lösungen mit NaCl Konzentrationen von ² 0,24 Gew.%, ³ 2,35 Gew.%, ⁴ 4,96 Gew.%, ⁵ 8,78 Gew.%, ⁶ 5,05 Gew.%, ⁷ 4,83 Gew.% und ⁸ 4,69 Gew.%

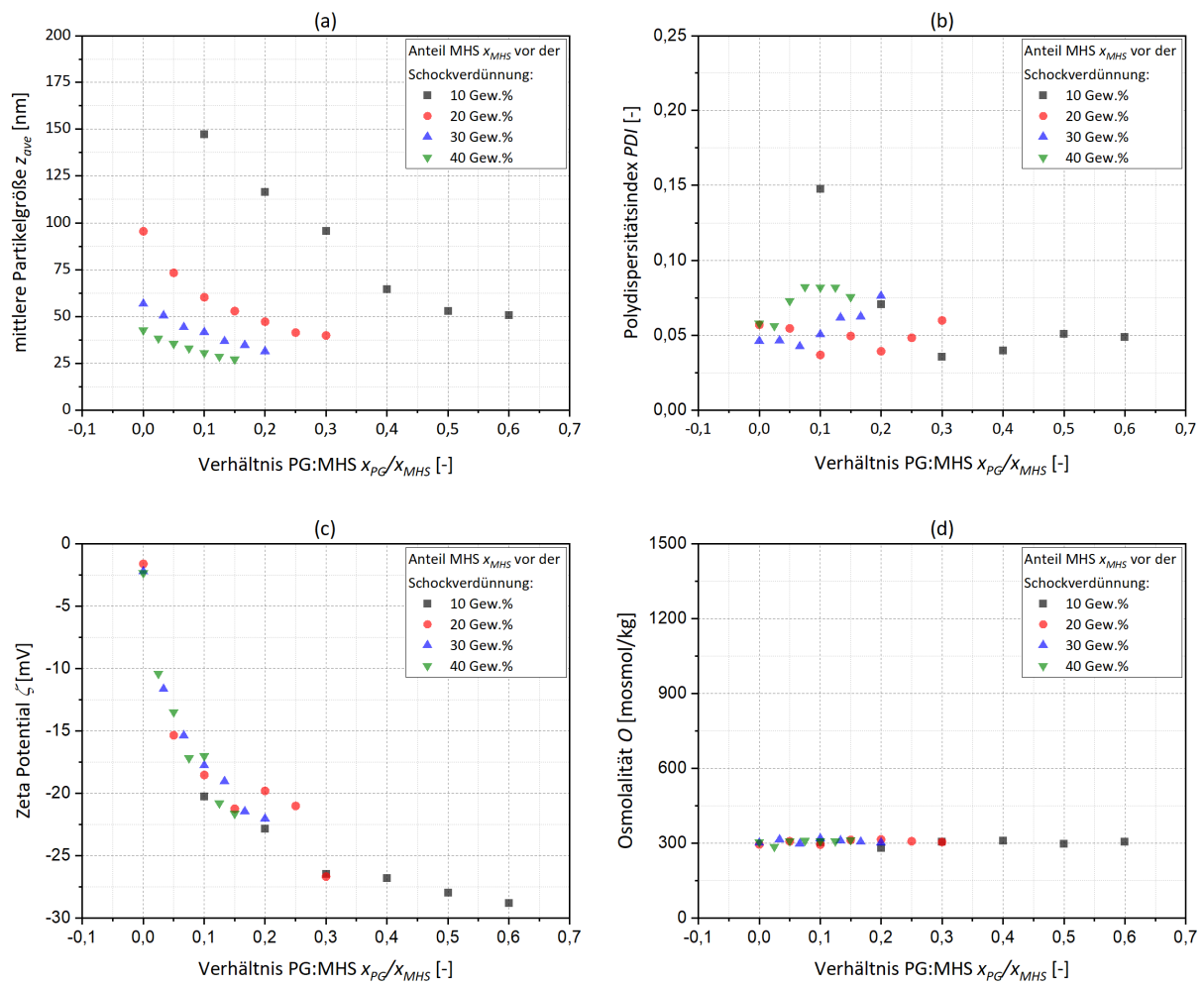


Abbildung A.4. Eigenschaften der isotonen negativen Nanoemulsionen abhängig vom MHS:MCT Verhältnis mit (a) mittlerer Partikelgröße, (b) PDI, (c) Zeta Potential und (d) Osmolalität nach [114].

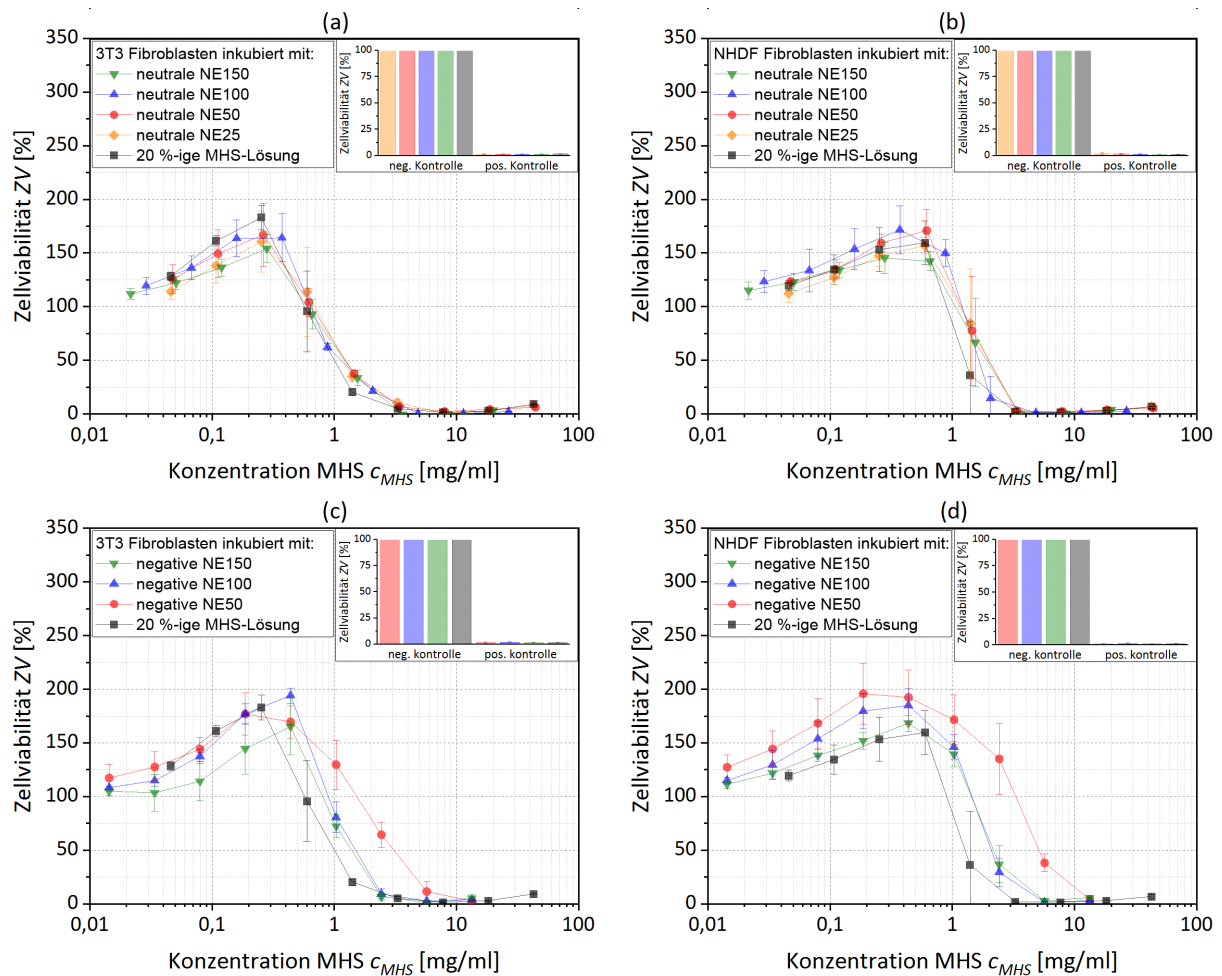


Abbildung A.5. Dosis-Wirkungs-Kurven über die Konzentration des MHS-Gehaltes der Nanoemulsionen per ml Zellkulturmedium für die (a,b) neutralen Nanoemulsionen und (c,d) negativen Nanoemulsionen auf 3T3 und NHDF Fibroblasten nach 24 h Inkubation.

Tabelle A.2. Gemittelte AMS der entnommenen Organe und Blut nach [113,114].

gemittelte AMS [%]	intravenös applizierte neutrale Nanoemulsionen							
	weibliche juvenile Mäuse			weibliche adulte Mäuse			männliche adulte Mäuse	
	NE50	NE100	NE150	NE25	NE50	NE100	NE150	NE100
Leber	65,6 ± 2,0	65,2 ± 7,1	60,8 ± 3,0	66,2 ± 1,6	62,8 ± 2,6	46,4 ± 4,7	40,3 ± 3,6	41,0 ± 4,3
Blut	0,4 ± 0,1	0,6 ± 0,2	0,5 ± 0,2	0,3 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,8 ± 0,2	0,9 ± 0,3	2,0 ± 0,7
Herz	3,0 ± 0,3	4,0 ± 1,0	6,7 ± 1,3	2,1 ± 0,5	2,1 ± 0,4	4,1 ± 0,8	5,9 ± 0,6	4,8 ± 1,0
Lunge	1,8 ± 0,3	2,4 ± 1,9	2,2 ± 0,4	2,6 ± 0,4	1,6 ± 0,2	1,8 ± 0,3	2,1 ± 0,3	2,5 ± 0,2
Nieren	2,5 ± 0,2	2,9 ± 1,0	3,2 ± 0,4	2,4 ± 0,3	3,0 ± 0,6	4,2 ± 0,4	4,6 ± 0,2	5,1 ± 0,6
Harnblase	0,6 ± 0,1	0,7 ± 0,3	0,7 ± 0,2	0,6 ± 0,1	0,7 ± 0,2	1,2 ± 0,2	1,1 ± 0,1	1,2 ± 0,1
Milz	9,5 ± 0,9	8,3 ± 3,3	10,8 ± 1,4	6,7 ± 0,8	11,4 ± 1,0	12,9 ± 1,2	8,3 ± 0,9	8,9 ± 0,8
Pankreas + Fett	1,1 ± 0,1	1,1 ± 0,3	1,4 ± 0,3	0,8 ± 0,2	0,9 ± 0,1	1,4 ± 0,3	1,7 ± 0,2	2,2 ± 0,2
Magen	2,3 ± 0,4	1,9 ± 0,9	2,1 ± 0,3	2,0 ± 0,6	2,0 ± 0,5	4,3 ± 0,5	6,4 ± 1,2	6,4 ± 0,9
Duodenum	0,9 ± 0,2	0,9 ± 0,3	0,9 ± 0,2	1,4 ± 0,2	1,2 ± 0,3	1,7 ± 0,3	2,1 ± 0,4	2,0 ± 0,4
Caecum	2,0 ± 0,3	2,0 ± 1,0	1,6 ± 0,6	1,4 ± 0,6	1,7 ± 0,4	3,1 ± 1,1	4,7 ± 0,3	4,3 ± 1,4
Colon	0,4 ± 0,1	0,6 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,6 ± 0,2	0,5 ± 0,2	1,6 ± 1,6	1,0 ± 0,1	1,1 ± 0,3
Hirn	0,3 ± 0,1	0,3 ± 0,0	0,3 ± 0,0	0,5 ± 0,0	0,4 ± 0,1	0,6 ± 0,1	0,8 ± 0,1	1,4 ± 0,1
Haut	1,4 ± 0,5	1,5 ± 0,4	1,4 ± 0,3	0,8 ± 0,1	1,6 ± 0,2	2,5 ± 0,8	3,3 ± 0,7	2,1 ± 0,3
subkutanes Fett	1,2 ± 0,4	1,0 ± 0,2	1,3 ± 0,2	1,6 ± 1,3	1,2 ± 0,3	1,5 ± 0,4	2,3 ± 0,3	1,1 ± 0,2
Femur, Knie + Tibia	4,4 ± 0,6	3,9 ± 0,4	3,5 ± 0,5	3,4 ± 0,8	4,3 ± 0,6	4,6 ± 0,5	3,3 ± 0,4	4,2 ± 0,4
Oberschenkelmuskel	0,9 ± 0,3	0,9 ± 0,4	0,9 ± 0,2	1,5 ± 1,2	0,6 ± 0,1	1,2 ± 0,3	1,4 ± 0,2	1,5 ± 0,3
Uterus + Ovarien	1,6 ± 0,8	1,7 ± 0,7	1,2 ± 0,1	5,2 ± 1,6	3,5 ± 0,4	5,9 ± 2,8	9,8 ± 2,3	-
Präputialdrüsen	-	-	-	-	-	-	-	3,9 ± 4,1
Testis	-	-	-	-	-	-	-	3,1 ± 0,3
Vesikulardrüsen	-	-	-	-	-	-	-	1,0 ± 0,1

Fortsetzung Tabelle A.2.

gemittelte AMS [%]	intravenös applizierte neutrale Nanoemulsionen				intravenös applizierte negative Nanoemulsionen			
	weibliche seneszente Mäuse				weibliche adulte Mäuse			männliche adulte Mäuse
	NE25	NE50	NE100	NE150	NE50	NE100	NE150	NE100
Leber	65,9 ± 3,4	58,0 ± 5,8	47,6 ± 3,8	42,8 ± 2,6	51,5 ± 0,5	48,3 ± 1,8	42,1 ± 2,4	38,3 ± 3,2
Blut	0,5 ± 0,2	0,7 ± 0,2	1,0 ± 0,3	1,0 ± 0,2	0,9 ± 0,4	0,7 ± 0,1	0,7 ± 0,1	1,5 ± 0,7
Herz	2,1 ± 0,2	3,2 ± 0,6	3,8 ± 0,3	6,3 ± 1,1	3,2 ± 0,6	5,9 ± 1,3	8,1 ± 1,5	8,5 ± 1,7
Lunge	2,0 ± 0,1	2,0 ± 0,5	1,9 ± 0,3	1,9 ± 0,2	3,0 ± 0,1	2,5 ± 1,1	3,0 ± 2,2	2,3 ± 0,1
Nieren	2,6 ± 0,2	3,9 ± 0,6	4,5 ± 0,5	6,2 ± 0,5	3,3 ± 0,3	4,8 ± 0,5	5,0 ± 0,8	5,0 ± 0,4
Harnblase	0,6 ± 0,1	0,8 ± 0,2	0,9 ± 0,2	1,3 ± 0,5	1,7 ± 0,6	1,0 ± 0,2	1,0 ± 0,3	1,2 ± 0,2
Milz	7,3 ± 0,9	7,6 ± 1,6	8,8 ± 0,9	8,6 ± 1,4	8,9 ± 1,4	8,2 ± 1,1	9,9 ± 1,0	8,4 ± 1,3
Pankreas + Fett	0,9 ± 0,1	1,5 ± 0,2	1,6 ± 0,3	1,7 ± 0,4	1,8 ± 0,3	1,7 ± 0,3	2,5 ± 0,6	3,1 ± 0,2
Magen	2,1 ± 0,4	3,4 ± 0,9	4,5 ± 0,8	6,4 ± 1,1	5,7 ± 1,5	4,7 ± 0,3	7,7 ± 0,9	7,7 ± 0,7
Duodenum	1,4 ± 0,4	1,8 ± 0,7	2,1 ± 0,3	2,2 ± 0,7	2,2 ± 0,5	1,5 ± 0,3	1,8 ± 0,2	1,6 ± 0,2
Caecum	1,7 ± 0,4	2,5 ± 0,7	3,7 ± 1,1	5,2 ± 0,9	3,7 ± 0,5	4,3 ± 0,9	3,5 ± 0,6	4,7 ± 0,6
Colon	0,4 ± 0,1	0,8 ± 0,1	0,8 ± 0,1	1,0 ± 0,3	1,0 ± 0,1	1,0 ± 0,1	0,9 ± 0,2	1,2 ± 0,2
Hirn	0,8 ± 0,1	1,1 ± 0,2	0,9 ± 0,1	1,1 ± 0,1	0,6 ± 0,1	1,4 ± 1,4	0,7 ± 0,1	1,3 ± 0,1
Haut	1,2 ± 0,4	2,0 ± 0,6	3,0 ± 1,2	3,4 ± 0,6	2,0 ± 0,3	1,8 ± 0,2	1,6 ± 0,5	2,0 ± 0,4
subkutanes Fett	1,9 ± 2,0	2,0 ± 1,3	2,2 ± 0,3	1,9 ± 0,3	1,5 ± 0,9	2,8 ± 1,4	2,0 ± 0,6	1,7 ± 0,4
Femur, Knie + Tibia	3,4 ± 0,5	3,8 ± 0,9	3,7 ± 0,5	3,0 ± 0,4	3,0 ± 0,5	3,3 ± 0,4	2,9 ± 0,2	3,8 ± 0,8
Oberschenkelmuskel	0,8 ± 0,2	1,0 ± 0,3	1,2 ± 0,3	1,7 ± 0,7	0,9 ± 0,1	1,4 ± 0,3	1,6 ± 0,5	1,9 ± 0,2
Uterus + Ovarien	4,3 ± 2,5	3,9 ± 1,5	7,6 ± 2,4	4,3 ± 1,5	5,1 ± 1,6	4,8 ± 0,7	4,9 ± 1,0	-
Präputialdrüsen	-	-	-	-	-	-	-	1,8 ± 0,8
Testis	-	-	-	-	-	-	-	3,0 ± 0,4
Vesikulardrüsen	-	-	-	-	-	-	-	0,9 ± 0,1

Tabelle A.3. 2-seitige exakte Signifikanz und U-Wert nach Mann-Whitney-U-Tests, die den Effekt der Partikelgröße auf die AMS zeigen nach [114].

	neutrale Nanoemulsionen in weiblichen juvenilen Mäusen						neutrale Nanoemulsionen in weiblichen adulten Mäusen					
	NE50 vs. NE100		NE50 vs. NE150		NE100 vs. NE150		NE25 vs. NE50		NE25 vs. NE100		NE25 vs. NE150	
	p [-]	U [-]	p [-]	U [-]	p [-]	U [-]	p [-]	U [-]	p [-]	U [-]	p [-]	U [-]
Leber	0,548	9,000	0,095	4,000	0,310	7,000	0,032*	2,000	0,008**	0,000	0,008**	0,000
Blut	0,421	8,000	1,000	12,000	0,421	8,000	0,095	4,000	0,008**	0,000	0,008**	0,000
Herz	0,095	4,000	0,008**	0,000	0,008**	0,000	1,000	12,000	0,008**	0,000	0,008**	0,000
Lunge	0,421	8,000	0,222	6,000	0,841	11,000	0,008**	0,000	0,016*	1,000	0,095	4,000
Niere	0,151	5,000	0,032*	2,000	0,841	11,000	0,095	4,000	0,008**	0,000	0,008**	0,000
Blase	0,841	11,000	0,690	10,000	0,690	10,000	0,548	9,000	0,008**	0,000	0,008**	0,000
Milz	0,841	11,000	0,151	5,000	0,310	7,000	0,008**	0,000	0,008**	0,000	0,008**	0,000
Pankreas + Fett	0,690	10,000	0,095	4,000	0,151	5,000	0,690	10,000	0,008**	0,000	0,008**	0,000
Magen	0,421	8,000	0,421	8,000	0,841	11,000	0,841	11,000	0,008**	0,000	0,008**	0,000
Duodenum	0,841	11,000	1,000	12,000	0,841	11,000	0,421	8,000	0,095	4,000	0,016*	1,000
Caecum	0,841	11,000	0,310	7,000	0,310	7,000	0,151	5,000	0,032*	2,000	0,008**	0,000
Colon	0,151	5,000	0,690	10,000	0,095	4,000	1,000	12,000	0,032*	2,000	0,008**	0,000
Hirn	0,310	7,000	0,421	8,000	0,056	3,000	0,008**	0,000	0,056	3,000	0,008**	0,000
Haut	0,548	9,000	0,841	11,000	0,548	9,000	0,008**	0,000	0,008**	0,000	0,008**	0,000
subkutanes Fett	0,421	8,000	0,548	9,000	0,032*	2,000	0,690	10,000	0,310	7,000	0,151	5,000
Femur, Knie + Tibia	0,222	6,000	0,095	4,000	0,421	8,000	0,095	4,000	0,032*	2,000	1,000	12,000
Oberschenkelmuskel	1,000	12,000	0,690	10,000	1,000	12,000	0,841	11,000	0,690	10,000	0,690	10,000
Uterus + Ovarien	0,841	11,000	0,690	10,000	0,151	5,000	0,056	3,000	0,548	9,000	0,008**	0,000
Präputialdrüsen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Testis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Vesikulardrüsen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Fortsetzung Tabelle A.3.

	neutrale Nanoemulsionen in weiblichen adulten Mäusen						negative Nanoemulsionen in weiblichen adulten Mäusen					
	NE50 vs. NE100		NE50 vs. NE150		NE100 vs. NE150		NE50 vs. NE100		NE50 vs. NE150		NE100 vs. NE150	
	p [-]	U [-]	p [-]	U [-]	p [-]	U [-]	p [-]	U [-]	p [-]	U [-]	p [-]	U [-]
Leber	0,008**	0,000	0,008**	0,000	0,032*	2,000	0,008**	0,000	0,008**	0,000	0,016*	1,000
Blut	0,016*	1,000	0,016*	1,000	0,421	8,000	0,690	10,000	0,421	8,000	1,000	12,000
Herz	0,008**	0,000	0,008**	0,000	0,016*	1,000	0,008**	0,000	0,008**	0,000	0,056	3,000
Lunge	0,421	8,000	0,016*	1,000	0,151	5,000	0,151	5,000	0,151	5,000	0,690	10,000
Niere	0,008**	0,000	0,008**	0,000	0,151	5,000	0,008**	0,000	0,008**	0,000	1,000	12,000
Blase	0,008**	0,000	0,008**	0,000	0,841	11,000	0,032*	2,000	0,056	3,000	1,000	12,000
Milz	0,056	3,000	0,008**	0,000	0,008**	0,000	0,222	6,000	0,310	7,000	0,056	3,000
Pankreas + Fett	0,008**	0,000	0,008**	0,000	0,095	4,000	0,548	9,000	0,032*	2,000	0,008**	0,000
Magen	0,008**	0,000	0,008**	0,000	0,008**	0,000	0,151	5,000	0,032*	2,000	0,008**	0,000
Duodenum	0,056	3,000	0,016*	1,000	0,095	4,000	0,032*	2,000	0,222	6,000	0,056	3,000
Caecum	0,032*	2,000	0,008**	0,000	0,008**	0,000	0,310	7,000	1,000	12,000	0,151	5,000
Colon	0,032*	2,000	0,008**	0,000	0,548	9,000	0,841	11,000	0,310	7,000	0,690	10,000
Hirn	0,008**	0,000	0,008**	0,000	0,008**	0,000	0,095	4,000	0,421	8,000	0,016*	1,000
Haut	0,151	5,000	0,008**	0,000	0,222	6,000	0,421	8,000	0,095	4,000	0,690	10,000
subkutanes Fett	0,310	7,000	0,008**	0,000	0,032*	2,000	0,095	4,000	0,222	6,000	0,421	8,000
Femur, Knie + Tibia	0,548	9,000	0,016*	1,000	0,008**	0,000	0,310	7,000	1,000	12,000	0,151	5,000
Oberschenkelmuskel	0,008**	0,000	0,008**	0,000	0,548	9,000	0,016*	1,000	0,008**	0,000	0,690	10,000
Uterus + Ovarien	0,151	5,000	0,008**	0,000	0,095	4,000	0,310	7,000	0,548	9,000	0,841	11,000
Präputialdrüsen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Testis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Vesikulardrüsen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Fortsetzung Tabelle A.3.

	neutrale Nanoemulsionen in weiblichen seneszenten Mäusen											
	NE25 vs. NE50		NE25 vs. NE100		NE25 vs. NE150		NE50 vs. NE100		NE50 vs. NE150		NE100 vs. NE150	
	p [-]	U [-]	p [-]	U [-]	p [-]	U [-]	p [-]	U [-]	p [-]	U [-]	p [-]	U [-]
Leber	0,056	3,000	0,008**	0,000	0,008**	0,000	0,008**	0,000	0,009**	0,000	0,151	5,000
Blut	0,222	6,000	0,032*	2,000	0,032*	2,000	0,151	5,000	0,028*	2,000	1,000	12,000
Herz	0,008**	0,000	0,008**	0,000	0,008**	0,000	0,222	6,000	0,009**	0,000	0,008**	0,000
Lunge	0,421	8,000	0,841	11,000	0,690	10,000	0,548	9,000	0,251	7,000	1,000	12,000
Niere	0,008**	0,000	0,008**	0,000	0,008**	0,000	0,095	4,000	0,009**	0,000	0,008**	0,000
Blase	0,222	6,000	0,032*	2,000	0,008**	0,000	0,310	7,000	0,009**	0,000	0,095	4,000
Milz	0,421	8,000	0,056	3,000	0,222	6,000	0,310	7,000	0,347	8,000	1,000	12,000
Pankreas + Fett	0,008**	0,000	0,008**	0,000	0,008**	0,000	0,690	10,000	0,347	8,000	0,548	9,000
Magen	0,016*	1,000	0,008**	0,000	0,008**	0,000	0,151	5,000	0,009**	0,000	0,016*	1,000
Duodenum	0,548	9,000	0,056	3,000	0,095	4,000	0,548	9,000	0,465	9,000	1,000	12,000
Caecum	0,056	3,000	0,016*	1,000	0,008**	0,000	0,056	3,000	0,009**	0,000	0,056	3,000
Colon	0,008**	0,000	0,008**	0,000	0,008**	0,000	0,310	7,000	0,251	7,000	0,421	8,000
Hirn	0,032*	2,000	0,056	3,000	0,008**	0,000	0,421	8,000	0,917	12,000	0,151	5,000
Haut	0,032*	2,000	0,008**	0,000	0,008**	0,000	0,222	6,000	0,028*	2,000	0,690	10,000
subkutanes Fett	0,690	10,000	0,151	5,000	0,222	6,000	0,548	9,000	0,602	10,000	0,151	5,000
Femur, Knie + Tibia	0,548	9,000	0,548	9,000	0,151	5,000	1,000	12,000	0,076	4,000	0,056	3,000
Oberschenkelmuskel	0,095	4,000	0,032*	2,000	0,008**	0,000	0,222	6,000	0,009**	0,000	0,310	7,000
Uterus + Ovarien	1,000	12,000	0,095	4,000	0,548	9,000	0,008**	0,000	0,465	9,000	0,056	3,000
Präputialdrüsen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Testis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Vesikulardrüsen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabelle A.4. 2-seitige exakte Signifikanz und U-Wert nach Mann-Whitney-U-Tests, die den Effekt der Oberflächenladung auf die AMS zeigen nach [114].

	in weiblichen adulten Mäusen						in adulten männlichen Mäusen	
	negative vs. neutrale NE50		negative vs. neutrale NE100		negative vs. neutrale NE150		negative vs. neutrale NE100	
	p [-]	U [-]	p [-]	U [-]	p [-]	U [-]	p [-]	U [-]
Leber	0,008**	0,000	0,222	6,000	0,841	11,000	0,421	8,000
Blut	0,032*	2,000	0,690	10,000	0,548	9,000	0,151	5,000
Herz	0,056	3,000	0,032*	2,000	0,056	3,000	0,008**	0,000
Lunge	0,008**	0,000	0,421	8,000	1,000	12,000	0,151	5,000
Niere	0,690	10,000	0,056	3,000	0,548	9,000	1,000	12,000
Blase	0,008**	0,000	0,310	7,000	0,151	5,000	0,548	9,000
Milz	0,032*	2,000	0,008**	0,000	0,032*	2,000	0,421	8,000
Pankreas + Fett	0,008**	0,000	0,151	5,000	0,008**	0,000	0,008**	0,000
Magen	0,008**	0,000	0,222	6,000	0,095	4,000	0,032*	2,000
Duodenum	0,008**	0,000	0,222	6,000	0,310	7,000	0,151	5,000
Caecum	0,008**	0,000	0,151	5,000	0,016*	1,000	0,690	10,000
Colon	0,008**	0,000	0,690	10,000	0,310	7,000	0,690	10,000
Hirn	0,008**	0,000	0,008**	0,000	0,032*	2,000	0,151	5,000
Haut	0,095	4,000	0,151	5,000	0,008**	0,000	0,548	9,000
subkutanes Fett	1,000	12,000	0,095	4,000	0,548	9,000	0,016*	1,000
Femur, Knie + Tibia	0,008**	0,000	0,008**	0,000	0,151	5,000	0,548	9,000
Oberschenkelmuskel	0,008**	0,000	0,421	8,000	0,690	10,000	0,151	5,000
Uterus + Ovarien	0,151	5,000	0,548	9,000	0,008**	0,000	-	-
Präputialdrüsen	-	-	-	-	-	-	0,548	9,000
Testis	-	-	-	-	-	-	0,548	9,000
Vesikulardrüsen	-	-	-	-	-	-	0,310	7,000

Tabelle A.5. 2-seitige exakte Signifikanz und U-Wert nach Mann-Whitney-U-Tests, die den Effekt des Alters auf die AMS zeigen.

	neutrale NE25		neutrale NE50				neutrale NE100			
	adult vs. seneszent		juvenil vs. adult		juvenil vs. seneszent		adult vs. seneszent		juvenil vs. adult	
	p [-]	U [-]	p [-]	U [-]	p [-]	U [-]	p [-]	U [-]	p [-]	U [-]
Leber	0,841	11,000	0,095	4,000	0,095	4,000	0,222	6,000	0,008**	0,000
Blut	0,056	3,000	0,841	11,000	0,095	4,000	0,056	3,000	0,548	9,000
Herz	0,841	11,000	0,016*	1,000	1,000	12,000	0,008**	0,000	1,000	12,000
Lunge	0,016*	1,000	0,548	9,000	0,222	6,000	0,151	5,000	0,690	10,000
Niere	0,421	8,000	0,222	6,000	0,008**	0,000	0,056	3,000	0,016*	1,000
Blase	0,548	9,000	1,000	12,000	0,222	6,000	0,310	7,000	0,032*	2,000
Milz	0,421	8,000	0,016*	1,000	0,056	3,000	0,008**	0,000	0,008**	0,000
Pankreas + Fett	0,548	9,000	0,095	4,000	0,008**	0,000	0,008**	0,000	0,222	6,000
Magen	0,690	10,000	0,222	6,000	0,032*	2,000	0,008**	0,000	0,008**	0,000
Duodenum	0,841	11,000	0,548	9,000	0,095	4,000	0,310	7,000	0,008**	0,000
Caecum	0,151	5,000	0,310	7,000	0,310	7,000	0,056	3,000	0,222	6,000
Colon	0,548	9,000	0,421	8,000	0,008**	0,000	0,222	6,000	0,016*	1,000
Hirn	0,008**	0,000	0,310	7,000	0,008**	0,000	0,008**	0,000	0,008**	0,000
Haut	0,095	4,000	0,421	8,000	0,151	5,000	0,548	9,000	0,095	4,000
subkutanes Fett	1,000	12,000	0,841	11,000	0,310	7,000	0,310	7,000	0,032*	2,000
Femur, Knie + Tibia	0,841	11,000	0,841	11,000	0,421	8,000	0,421	8,000	0,032*	2,000
Oberschenkelmuskel	0,690	10,000	0,008**	0,000	0,841	11,000	0,032*	2,000	0,151	5,000
Uterus + Ovarien	0,421	8,000	0,016*	1,000	0,016*	1,000	1,000	12,000	0,016*	1,000
Präputialdrüsen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Testis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Vesikulardrüsen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Fortsetzung Tabelle A.5.

	neutrale NE100				neutrale NE150					
	juvenil vs. seneszent		adult vs. seneszent		juvenil vs. adult		juvenil vs. seneszent		adult vs. seneszent	
	p [-]	U [-]	p [-]	U [-]	p [-]	U [-]	p [-]	U [-]	p [-]	U [-]
Leber	0,008**	0,000	0,690	10,000	0,008**	0,000	0,008**	0,000	0,310	7,000
Blut	0,095	4,000	0,548	9,000	0,032*	2,000	0,008**	0,000	0,222	6,000
Herz	0,421	8,000	0,548	9,000	0,421	8,000	0,841	11,000	0,841	11,000
Lunge	1,000	12,000	1,000	12,000	0,841	11,000	0,421	8,000	0,421	8,000
Niere	0,016*	1,000	0,310	7,000	0,008**	0,000	0,008**	0,000	0,008**	0,000
Blase	0,151	5,000	0,151	5,000	0,008**	0,000	0,008**	0,000	0,690	10,000
Milz	0,841	11,000	0,008**	0,000	0,016*	1,000	0,056	3,000	0,690	10,000
Pankreas + Fett	0,016*	1,000	0,421	8,000	0,151	5,000	0,421	8,000	1,000	12,000
Magen	0,008**	0,000	1,000	12,000	0,008**	0,000	0,008**	0,000	0,841	11,000
Duodenum	0,008**	0,000	0,151	5,000	0,008**	0,000	0,008**	0,000	1,000	12,000
Caecum	0,032*	2,000	0,548	9,000	0,008**	0,000	0,008**	0,000	0,421	8,000
Colon	0,016*	1,000	0,548	9,000	0,008**	0,000	0,008**	0,000	0,310	7,000
Hirn	0,008**	0,000	0,008**	0,000	0,008**	0,000	0,008**	0,000	0,008**	0,000
Haut	0,016*	1,000	0,841	11,000	0,008**	0,000	0,008**	0,000	1,000	12,000
subkutanes Fett	0,008**	0,000	0,032*	2,000	0,008**	0,000	0,008**	0,000	0,095	4,000
Femur, Knie + Tibia	1,000	12,000	0,032*	2,000	0,421	8,000	0,310	7,000	0,310	7,000
Oberschenkelmuskel	0,222	6,000	1,000	12,000	0,016*	1,000	0,008**	0,000	0,690	10,000
Uterus + Ovarien	0,008**	0,000	0,310	7,000	0,008**	0,000	0,008**	0,000	0,008**	0,000
Präputialdrüsen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Testis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Vesikulardrüsen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabelle A.6. 2-seitige exakte Signifikanz und U-Wert nach Mann-Whitney-U-Tests, die den Effekt des Geschlechts auf die AMS zeigen.

	neutrale NE100		negative NE100	
	weiblich vs. männlich		weiblich vs. männlich	
	p [-]	U [-]	p [-]	U [-]
Leber	0,151	5,000	0,008**	0,000
Blut	0,008**	0,000	0,008**	0,000
Herz	0,548	9,000	0,056	3,000
Lunge	0,016*	1,000	0,690	10,000
Niere	0,056	3,000	0,841	11,000
Blase	0,548	9,000	0,095	4,000
Milz	0,008**	0,000	1,000	12,000
Pankreas + Fett	0,008**	0,000	0,008**	0,000
Magen	0,008**	0,000	0,008**	0,000
Duodenum	0,222	6,000	0,310	7,000
Caecum	0,151	5,000	0,421	8,000
Colon	0,690	10,000	0,056	3,000
Hirn	0,008**	0,000	0,151	5,000
Haut	0,421	8,000	1,000	12,000
subkutanes Fett	0,056	3,000	0,095	4,000
Femur, Knie + Tibia	0,222	6,000	0,421	8,000
Oberschenkelmuskel	0,310	7,000	0,016*	1,000
Uterus + Ovarien	0,008**	0,000	0,008**	0,000
Präputialdrüsen	0,008**	0,000	0,008**	0,000
Testis	0,008**	0,000	0,008**	0,000
Vesikulardrüsen	0,008**	0,000	0,008**	0,000

Publikationsliste

Artikel

1. A. Bitterlich, C. Laabs, **E. Busmann**, A. Graundeury, M. Juhnke, H. Bunjes und A. Kwade. Challenges in Nanogrinding of Active Pharmaceutical Ingredients. *Chemical Engineering & Technology*, 2014 (37), 840-846
Die Ergebnisse dieser Arbeit fanden keine Anwendung in der vorliegenden Dissertation.
2. **E. F. Busmann**, D. García Martínez, H. Lucas und K. Mäder. Phase inversion-based nanoemulsions of medium chain triglyceride as potential drug delivery system for parenteral applications. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 11(1):213-224, 2020.
3. **E. F. Busmann**, J. Kollan, K. Mäder und H. Lucas. Ovarian Accumulation of Nanoemulsions: Impact of Mice Age and Particle Size. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(15):8283, 2021.
4. **E. F. Busmann** und H. Lucas. Particle engineering of innovative nanoemulsion designs to modify the accumulation in female sex organs by particle size and surface charge. *Pharmaceutics*, 14(2):301, 2022.

Konferenzbeiträge

1. A. Bitterlich, C. Komoss, M. Dengler, **E. F. Busmann**, H. Bunjes, A. Kwade. Growth Phenomena During the Fine Grinding of Active Pharmaceutical Ingredients. *AIChE Annual Meeting*, San Francisco, 2013.
Die Ergebnisse dieser Arbeit fanden keine Anwendung in der vorliegenden Dissertation.
2. **E. F. Busmann**, H. Lucas, K. Mäder. Influence of the Salinity on the Production of MCT Nanoemulsions as potential parenteral Nanocarriers by an organic solvent free Phase Inversion Process. *The Controlled Release Society Germany Local Chapter*, Halle (Saale), 2018.
3. **E. F. Busmann**, H. Lucas, K. Mäder. Investigation of Liquid MCT Nanoemulsions as a potential Nanocarrier produced by a Phase Inversion Process. *11th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology*, Granada, 2018.
4. **E. F. Busmann**, H. Lucas, K. Mäder. Production and Characterization of isotonic MCT Nanoemulsions as potential parenteral Drug Delivery System. *The Controlled Release Society Germany Local Chapter*, Leipzig, 2019.
5. **E. F. Busmann**, D. García Martínez, H. Lucas, K. Mäder. Phase Inversion Method for the Production of isotonic MCT Nanoemulsions as potential parenteral Drug Delivery System. *The Controlled Release Society Annual Meeting & Exposition*, Valencia, 2019.
Ausgezeichnet mit einem Great Scientific Communication Award.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei all jenen bedanken, die mich bei der Anfertigung dieser Dissertation mit Rat und Tat unterstützt haben. Meinem Doktorvater Prof. Dr. Karsten Mäder gilt ein besonders großer Dank für die Betreuung meiner Promotion, für sein entgegengebrachtes Vertrauen und für die vielen Freiheiten, mit derer ich mich in der Forschung zu diesem interessanten Thema entfalten durfte.

Des Weiteren bedanke ich mich insbesondere bei:

- Dr. Henrike Lucas für ihre organisatorische und tatkräftige Hilfe bei den vielen Tierversuchen, den Publikationen und dem außerordentlichem Engagement für die gesamte Arbeitsgruppe.
- Julia Kollan für ihre vorbereitenden Arbeiten in der Zellkultur und der Präparation bei einigen Tierversuchen.
- Birgit Kunst und dem kompletten Team der Tierpfleger/innen des Zentrums für medizinische Grundlagenforschung für die Zucht der Mäuse und deren Haltung.
- Dailén García Martínez für Etablierung des Zellviabilitätsassays im Rahmen ihrer Masterarbeit und die Durchführung einiger Experimente zur Zelltoxizität.
- Dr. Wolfgang Knolle für die Strahlensterilisation der Nanoemulsionen.
- der gesamten Arbeitsgruppe Pharmazeutische Technologie für die vielen fachlichen und privaten Diskussionsrunden beim Kaffee, für die schöne Zeit auf den Konferenzen und für die geselligen Feiern abseits des Arbeitsalltags.
- Anastassios Nalbadis, Anne Dümichen, Johannes Albrecht, Dr. Benedikt Göttel, Dr. Jonas Steiner, Dr. Martin Kirchberg und Dr. Eric Lehner für die ganzen privaten Unternehmungen und entstandene Freundschaft.
- meinen Eltern Günter und Gisela für die finanzielle und mentale Unterstützung während meines Studiums, welches mir die Promotion überhaupt ermöglichte. Euch beiden sowie meinen Brüdern Arne und Helge danke ich für all die schönen Momente bei jedem Zusammenkommen in der Heimat und den Familienfesten.
- meinen Freunden Rutger Beverdam, Lou Wellendorf, Sebastian Rosner, Philipp Schröder, Tobias Rott und Alexander Rosner aus der Heimat für die langjährige Freundschaft sowie (Kurz-)Urlaube, welche der Doktoranden-Work-Life-Balance gut taten.
- meiner Partnerin Jessica für deine äußerst liebevolle Unterstützung, dein offenes Ohr und die Geduld, die du mir in dieser Zeit entgegengebracht hast. Darüber hinaus danke ich dir für deinen Schnellkurs Statistik und deiner Hilfe bei der statistischen Auswertung meiner Tierversuche.

Vielen lieben Dank!

Curriculum Vitae

Name, Vorname: Busmann, Eike Folker

Bildungsweg und Berufserfahrung

- seit 04.2023 **Spezialist Kontinuierliche Verbesserung**
Sanofi-Aventis Deutschland GmbH, Frankfurt am Main
- 05.2022 - 03.2023 **Betriebsassistent**
Sanofi-Aventis Deutschland GmbH, Frankfurt am Main
- in Arbeitnehmerüberlassung über BS Wutow GmbH (05.2022 - 11.2022)
- 05.2017 - 10.2021 **Wissenschaftlicher Mitarbeiter**
Institut für Pharmazie, MLU Halle-Wittenberg
- 05.2016 - 03.2017 **Weltreise mit Work and Travel in Neuseeland**
- 04.2014 - 03.2016 **Master of Science Maschinenbau - Verfahrenstechnik**
TU Braunschweig
- Praktikum Novartis Pharma AG, Basel, Schweiz (10.2014 - 12.2015)
- 10.2009 - 03.2014 **Bachelor of Science Bioingenieurwesen**
TU Braunschweig
- Studentische Hilfskraft Institut für Partikeltechnik, Braunschweig (01.2011 - 03.2014)
- Praktikum Schott AG, Mainz (09.2011 - 10.2011)
- Vorpraktikum Bentec Oilfield and Drilling GmbH, Bad Bentheim (08.2009 - 09.2009)
- 04.2009 - 07.2009 **Au-Pair in Frankreich**
- 07.2008 - 03.2009 **Zivildienst**
Paulinenkrankenhaus, Bad Bentheim
- 06.2008 **Abitur**
Burg-Gymnasium, Bad Bentheim

Ort, Datum

Unterschrift

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Eike Folker Busmann, gemäß § 5 der Promotionsordnung der Naturwissenschaftlichen Fakultät I (Biowissenschaften) der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift selbstständig und ohne fremde Hilfe angefertigt habe. Weiterhin habe ich keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet und die daraus wörtlich und inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht.

Die Dissertation wurde ausschließlich der Naturwissenschaftlichen Fakultät I der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg vorgelegt und an keiner anderen universitären Einrichtung weder im In- noch im Ausland zur Erlangung des Doktorgrades eingereicht.

Ort, Datum

Unterschrift



Phase inversion-based nanoemulsions of medium chain triglyceride as potential drug delivery system for parenteral applications

Eike Folker Busmann, Dailén García Martínez, Henrike Lucas and Karsten Mäder*

Full Research Paper

Open Access

Address:
Institute of Pharmacy, Martin Luther University Halle-Wittenberg,
Halle (Saale), Germany

Email:
Karsten Mäder* - karsten.maeder@pharmazie.uni-halle.de

* Corresponding author

Keywords:
cellular toxicity; isotonicity; nanoemulsion; phase inversion; solvent
free; surface properties

Beilstein J. Nanotechnol. **2020**, *11*, 213–224.
doi:10.3762/bjnano.11.16

Received: 30 June 2019
Accepted: 05 December 2019
Published: 17 January 2020

This article is part of the thematic issue "Frontiers in pharmaceutical nanotechnology".

Guest Editor: M. G. Wacker

© 2020 Busmann et al.; licensee Beilstein-Institut.
License and terms: see end of document.

Abstract

Lipid nanoemulsions are attractive drug delivery systems for lipophilic drugs. To produce nanoemulsions with droplets of very small diameter (<100 nm), we investigated thermotropic phase transitions as an alternative to the standard procedure of high-pressure homogenization. Employing shock dilution with ice-cold water during the phase inversion gives the opportunity to produce nanoemulsions without any use of potentially toxic organic solvents. The systematic investigation of the relation of the three involved components surfactant, aqueous phase and lipid phase showed that depending on the ratio of surfactant to lipid the emulsions contained particles of diameters between 16 and 175 nm with narrow polydispersity index distributions and uncharged surfaces. Nanoemulsions with particles of 50 and 100 nm in diameter showed very little toxicity to fibroblast cells in vitro. An unusual, exponential-like nonlinear increase in osmolality was observed with increasing concentration of the nonionic surfactant Kolliphor HS 15. The experimental results indicate, that nanoemulsions with particles of small and tunable size can be easily formed without homogenization by thermal cycling.

Introduction

Nanoscaled drug delivery systems such as solid lipid or polymeric nanoparticles, nanocapsules, liquid nanoemulsions, liposomes and micelles can be used to carry poorly water soluble ingredients of pharmaceuticals for parenteral applications [1-3]. Thereby, the physical entrapment of the active ingredients into

the core of the nanoparticles gives the possibility to solubilize and protect the sensitive drugs or contrast agents [2,4,5]. Their pharmacokinetics, including the distribution from the blood stream into the tissue, depend mainly on the size and shape, the surface composition, the charge as well as the flexibility of the

nanoparticles [6-9]. Shock dilution with ice-cold water during phase inversion of the emulsion gives the opportunity to produce nanocapsules without the use of any potentially toxic organic solvent at low energy cost [10,11]. The choice and the amount of the surfactant show different effects on the final product. For example, these factors influence the feasibility of forming stable nanostructures, they affect the phase inversion zone, the in vitro cellular toxicity and the above mentioned particle and surface properties [3,4,12].

There are marketed drug products with significant hyperosmolality up to 2000 mOsmol/kg [13]. However, parenteral products should aim at isotonicity to reduce the risk of possible crenation (shriveling) or hemolysis of the red blood cells as well as significant pain at the site of injection or even phlebitis [13,14]. Therefore, a balance of increasing osmolality and the concentration of the dissolved educts needs to be considered to achieve isotonic nanoemulsions ensuring a painless intravenous application. The osmolality $O(c)$ increases usually linearly with the solute concentration c , depending on the osmotic coefficient ϕ , the number of ions or particles n and the molecular weight M [15]:

$$O(c) = \frac{\phi n}{M} \cdot c \quad (1)$$

However, the osmolality of many surfactants approaches a plateau above the critical micelle concentration. The formation of a separate micellar phase leads to a constant monomer con-

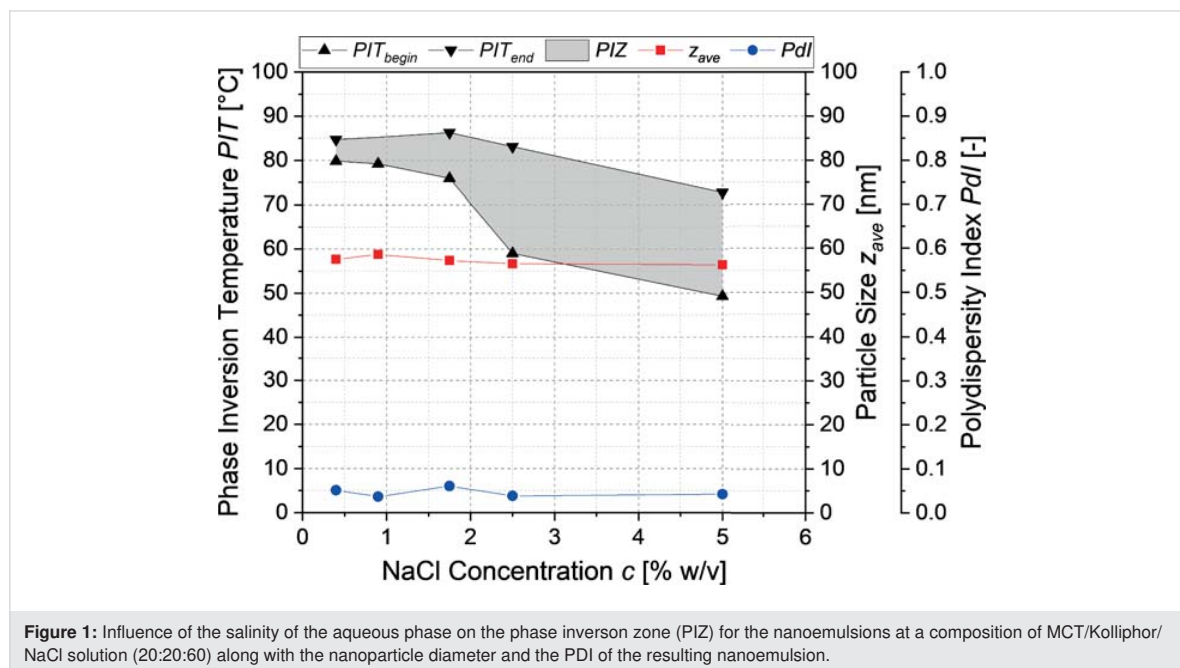
centration, therefore to a thermodynamically constrained system with a constant chemical potential and hence a constant osmotic pressure [16].

The aim of this study was to investigate the phase inversion-based production of a lipid nanocarrier without using phospholipids. Thus, instead of solid shelled nanocapsules, flexible nanoemulsions should be formed. Therefore, we systematically investigated the impact of the sodium chloride concentration on the phase inversion and the influence of the three involved components surfactant, aqueous phase and lipid phase on the formation of stable isotonic nanoemulsions. Furthermore, the relation of the particle composition, the particle size and the in vitro toxicity to fibroblasts was investigated.

Results and Discussion

Influence of the salinity on the phase inversion and the formation of nanoemulsions

To investigate the influence of the salinity of the aqueous phase on the incipient phase inversion and hence on the point of forming stable but nonisotonic nanoemulsions, the conductivity of a medium chain triglyceride (MCT)/Kolliphor® HS 15/NaCl solution (20:20:60) was measured as shown in Figure 1. Increasing the salinity of the aqueous phase resulted in a significant decrease of the temperature at the incipient phase inversion from 81.5 °C at 0.4 wt % NaCl concentration to 65.4 °C at 5 wt % NaCl concentration. The particles in the nanoemulsion had an average diameter (z_{ave}) of 56–59 nm and a remarkably narrow polydispersity index (PDI) distribution of 0.03–0.06.



The salinity did not have a significant influence on the particle diameter and the PDI of the nanoemulsion formed by shock dilution.

Figure 2 shows the particle diameters and the PDIs of different nanoemulsions prepared using 1.75 wt % and 5 wt % NaCl solutions. Nanoemulsions were successfully formed using solu-

tions of the compositions indicated by the colored zones. The solutions corresponding to the grey zones did not yield any stable nanoemulsions because they (1) resulted in creaming and/or coalescence directly after the shock dilution, or (2) the phase inversion temperature was higher than the boiling point of the aqueous phase. For solutions of higher salinity the area in which nanoemulsions were formed is enlarged, because the

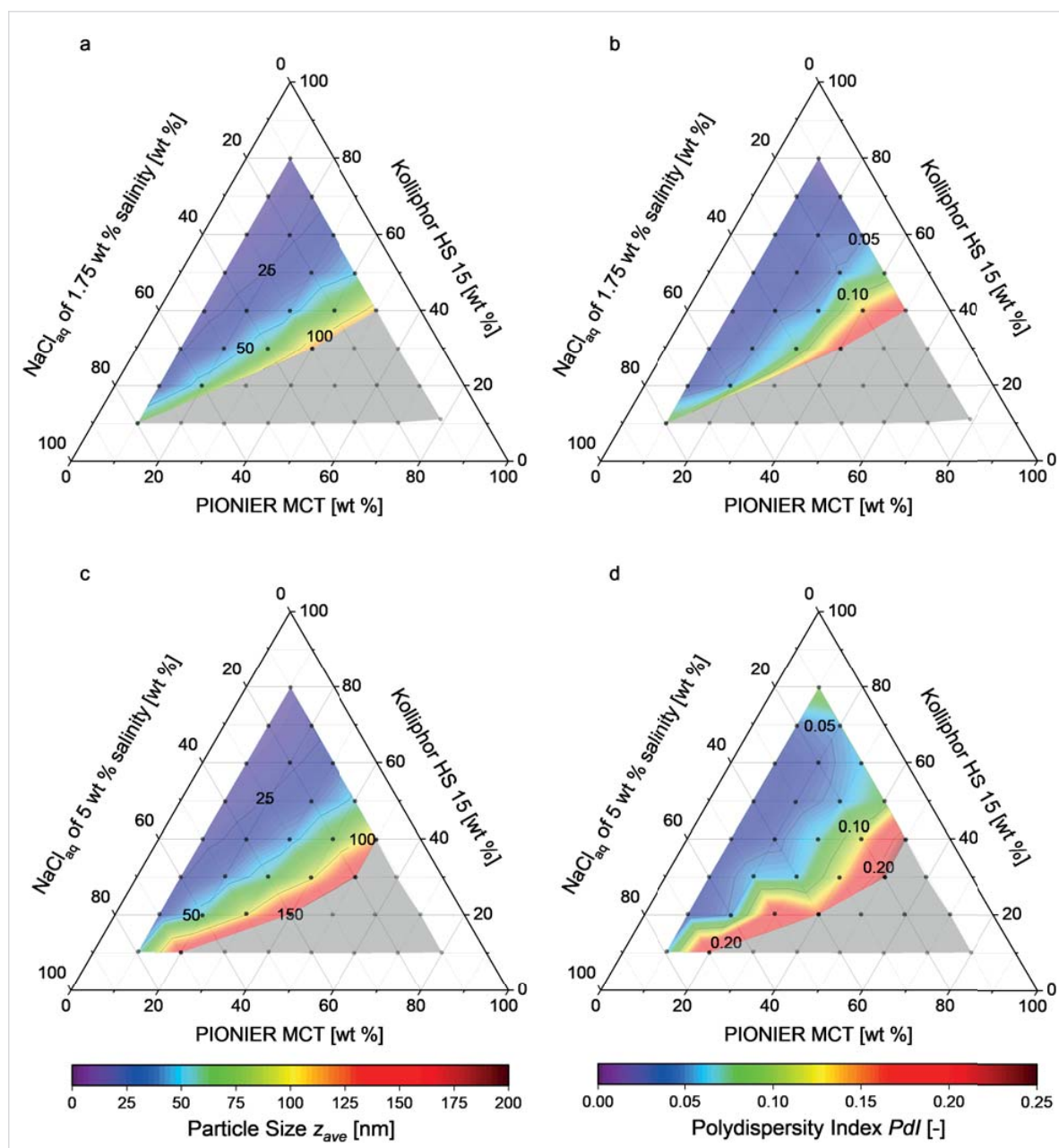


Figure 2: Ternary phase diagrams giving the particle diameter and the PDI of the nonisotonic nanoemulsions produced in (a, b) 1.75 wt % and (c, d) 5 wt % NaCl aqueous solution. Each dot represents the composition of the solution prepared for shock dilution. Formation of stable nanoemulsions occurs in the colored zone. Creaming coalescence or no phase inversion were observed in the grey zone.

phase inversion temperature lies further below the boiling point of the aqueous phase. This facilitated producing stable nanoemulsions with particles of 16–150 nm in diameter with narrow PDI distributions of 0.02–0.23. Increasing the mass share of the surfactant Kolliphor HS 15 led to smaller particles and narrower PDI distributions.

Influence of the nonionic surfactant Kolliphor HS 15 on the osmolality

The osmolality is an important parameter of the toxicity of parenteral dosage forms. The ideal osmolality values of an aqueous sodium chloride solution according to Ph. Eur. 2.2.35 and the experimentally determined osmolality of aqueous Kolliphor HS 15 are shown in Figure 3.

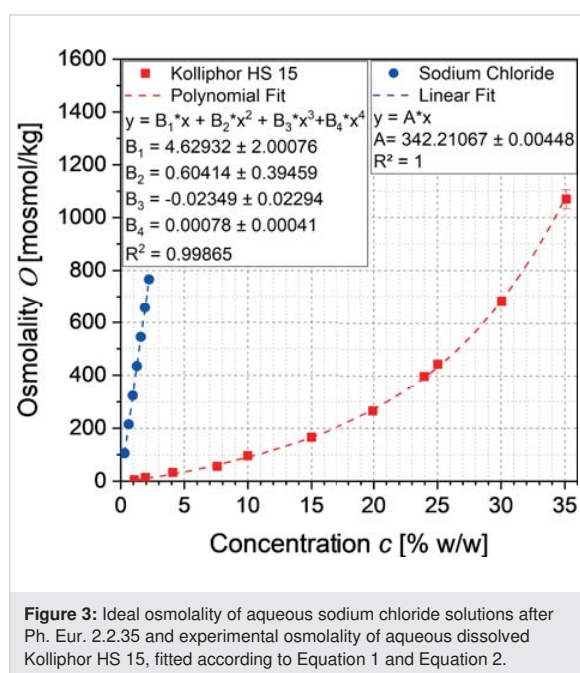


Figure 3: Ideal osmolality of aqueous sodium chloride solutions after Ph. Eur. 2.2.35 and experimental osmolality of aqueous dissolved Kolliphor HS 15, fitted according to Equation 1 and Equation 2.

The linearly increasing osmolality of the aqueous solution of sodium chloride was fitted with the linear van't Hoff law (Equation 1) at a coefficient of determination of 100%, and the reciprocal slope A was used for the term

$$\frac{M_{\text{NaCl}}}{\phi_{\text{NaCl}} n_{\text{NaCl}}}$$

(see Equation 8) for the calculation of the salinity of isotonic nanoemulsions.

With increasing the concentration of the nonionic surfactant Kolliphor HS 15 the osmolality of the aqueous solution increased unexpectedly exponential-like instead of approaching the expected plateau above the critical micelle concentration.

Intense literature research revealed only a single publication by Viegas and Henry [15] describing such a phenomenon for strongly interacting nonionic surfactants. The osmolality of solutions of such surfactants increases nonlinearly with the solute concentration due to increasing polymer–solvent hydrogen bonding at low temperatures, which prevents the flow of solvent molecules in the solution and thus affects osmosis. This phenomenon is described by a modified polynomial van't Hoff equation of 4th degree introduced by Huggins and Flory with the association or interacting constants b_1 , b_2 and b_3 :

$$O(c) = \frac{\phi n}{M} \cdot c + \frac{\phi n b_1}{M} \cdot c^2 + \frac{\phi n b_2}{M} \cdot c^3 + \frac{\phi n b_3}{M} \cdot c^4 \quad (2)$$

The experimental data corresponded well to the modified polynomial van't Hoff equation of 4th degree with a coefficient of determination of 99.865%. Thus, the equation was used for the calculation of the osmolality $O_{\text{Kol}}(c_{\text{Kol,p}})$.

Preparation of isotonic nanoemulsions

Given an osmolality of whole blood of 302 ± 5 mOsmol/kg and of blood plasma of 291 ± 4 mOsmol/kg [17], it was decided to produce nanoemulsions with a target osmolality of 300 mOsmol/kg. The necessary salinity of the aqueous phase for shock dilution was calculated according to Equations 8 to 11 for a product MCT mass share $x_{\text{MCT,p}}$ of 8 wt %, which resulted in solutions of varying NaCl concentration (see Figure S1 in Supporting Information File 1).

Using this equation system for the production of isotonic nanoemulsions led to high salinities of up to 25 wt % in the aqueous phase before shock dilution. Increasing the salinity of the aqueous phase decreased the phase inversion temperature. In ternary phase diagrams, this decrease of the phase inversion temperature enlarged the area in which stable nanoemulsions were formed compared to the nonisotonic nanoemulsions produced in aqueous solutions of 1.75 wt % and 5 wt % NaCl concentration, as shown in Figure 4.

Nanoemulsions with particles of 16–175 nm in diameter were formed with narrow PDI distributions of 0.02–0.25, as illustrated in Figure 4a and Figure 4b. All nanoemulsions were stable over one month at room temperature. The sizes of the particles within the nanoemulsions depended only on the ratio of Kolliphor HS 15 to MCT. The dependence depicted in Figure 5 agrees well with a Holliday fit yielding a coefficient of determination of 98.86%. The increase of the concentration of the surfactant Kolliphor HS 15 and hence the increase of the ratio of Kolliphor HS 15 to MCT resulted in a prompt decrease of the particle diameter. The constant limit is reached at ratios above three.

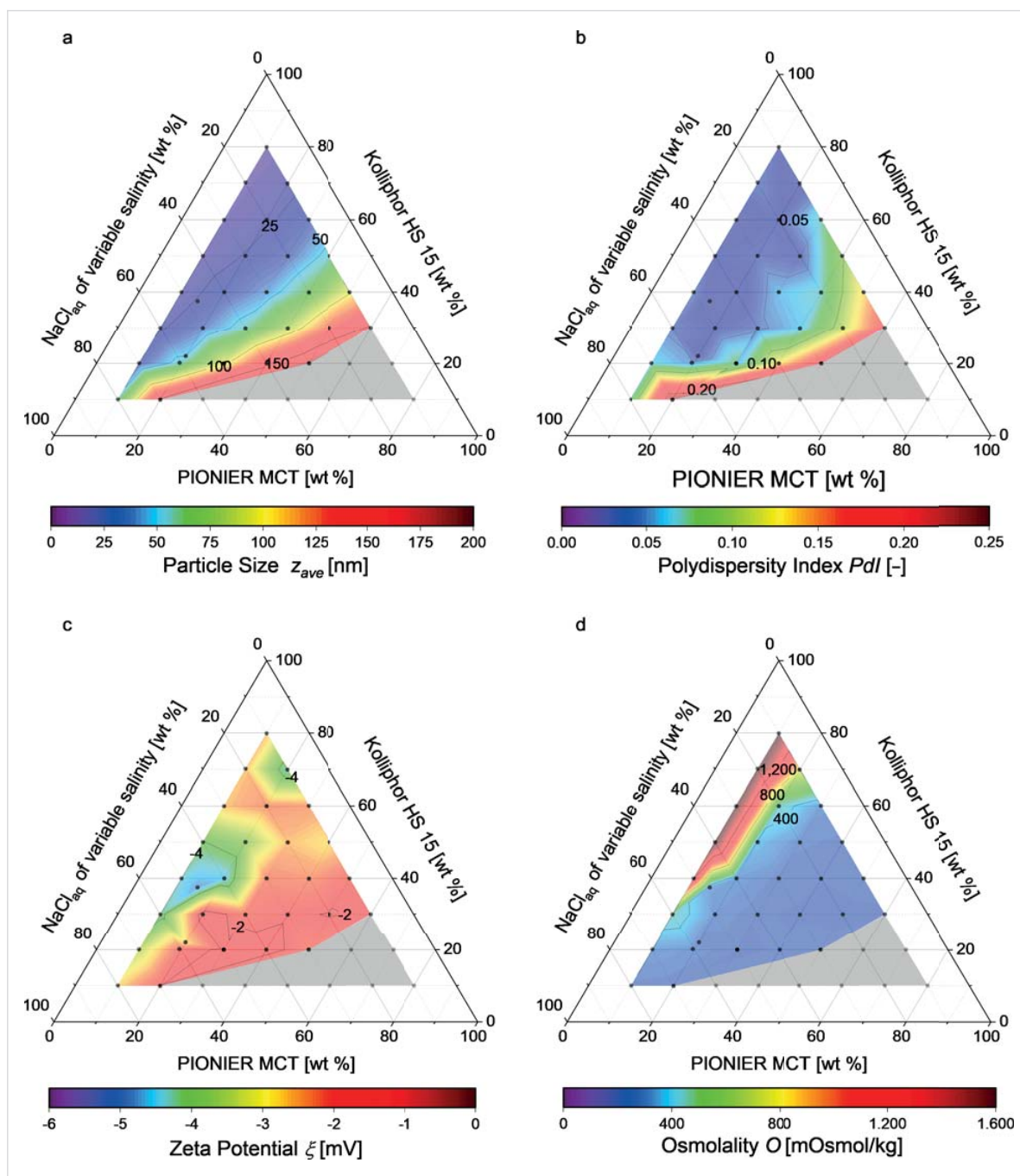


Figure 4: Ternary phase diagrams showing (a) the resulting particle diameter, (b) the PDI, (c) the zeta potential and (d) the osmolality. Each dot represents a certain solution composition. The formation of stable nanoemulsions occurs in the colored zone, while creaming coalescence or no phase inversion were observed in the grey zone.

The zeta potential of all nanoemulsions shown in Figure 4c was slightly negative between -1.6 and -4.6 mV, measured in $0.1 \times$ PBS at physiological pH 7.4. Thus, the composition of the nanoemulsion had no clear influence on the surface charge. Furthermore, isotonicity was nearly achieved for the formula-

tions in the blue zone of Figure 4d. Formulations shown in the green, yellow and red zones resulted in hypertonicity although they were prepared in an NaCl free aqueous phase (compare Figure S1 in Supporting Information File 1) due to a final Kolliphor HS 15 concentration above 21 wt %. In these zones,

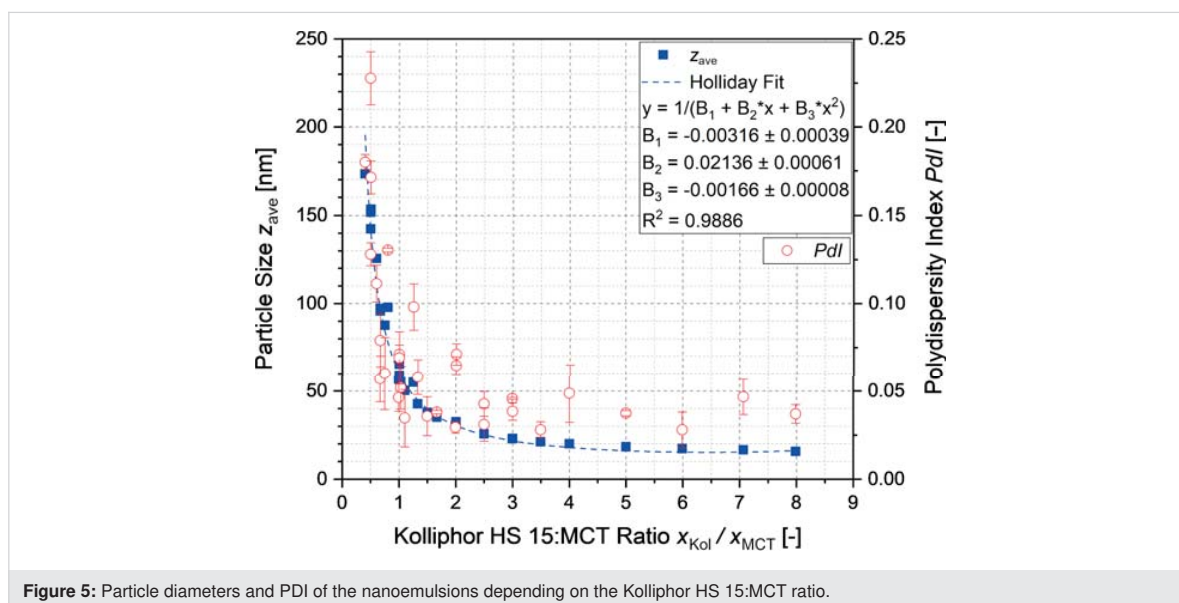


Figure 5: Particle diameters and PDI of the nanoemulsions depending on the Kolliphor HS 15:MCT ratio.

isotonicity may be achieved by producing nanoemulsions using a larger amount of aqueous solution for the shock dilution, which would also lead to a smaller MCT mass share in the product nanoemulsion.

Stability of the isotonic nanoemulsions

To investigate the stability of the nanoemulsions, four emulsions with particles of approximately 25 (NE25), 50 (NE50), 100 (NE100) and 150 nm (NE150) in diameter were chosen. Their composition and the final particle diameters observed in nine independently produced batches are listed in Table 1. Four selected nanoemulsions were stored at 5 ± 3 °C, room temperature (RT) and 40 ± 2 °C according to the ICH Guidelines Q1A. The impact of the storage conditions on the particle diameter is illustrated in Figure 6. With the exception of emulsion NE25, all nanoemulsions were stable over the course of eight weeks at the three storage conditions. Only NE25 underwent creaming and coalescence at 40 °C resulting in a significant increase of the particle diameter up to 146 nm and a high PDI of 0.35 within 8 weeks of storage. Hence, it is strongly recommended

to store the nanoemulsions with particles of very small size at chilled conditions.

Cellular toxicity of the isotonic nanoemulsions

The cellular toxicity of the nanoemulsions NE25, NE50 and NE100 as well as the aqueous Kolliphor HS 15 solution to normal human dermal fibroblasts (NHDF) and mouse embryonic fibroblasts (3T3) was investigated. The impact of the nanoemulsions and the surfactant solution on the cell viability of the two cell lines after 4 and 24 h is illustrated in Figure 7. The viability of the cells treated with the different nanoemulsions is depicted as a function of the concentration of the surfactant Kolliphor HS 15. The resulting graphs indicate a similar behavior of all three nanoemulsions and the aqueous Kolliphor HS 15 solution, namely a decrease of the cell viability at a certain concentration c_{Kol} . The 3T3 cells responded more sensitively to the nanoemulsions and the pure surfactant solution. Furthermore, the long incubation time of 24 h led to cell toxicity at slightly lower concentrations for both cell lines. For com-

Table 1: Composition of the nanoemulsions NE25, NE50, NE100 and NE150 after shock dilution along with the particle diameters and PDI values of nine independently produced batches, c_{NaCl} describes the salinity of the aqueous phase of the final product.

	NE25	NE50	NE100	NE150
MCT [wt %]	8	8	8	8
Kolliphor HS 15 [wt %]	20	8.8	5.33	4
NaCl solution [wt %]	72	83.2	86.67	88
at c_{NaCl} [wt %]	0.084	0.654	0.763	0.798
particle diameter [nm]	26.2 ± 0.3	51.4 ± 0.7	99.4 ± 2.3	145.9 ± 4.7
polydispersity index [-]	0.046 ± 0.014	0.038 ± 0.006	0.092 ± 0.021	0.251 ± 0.091

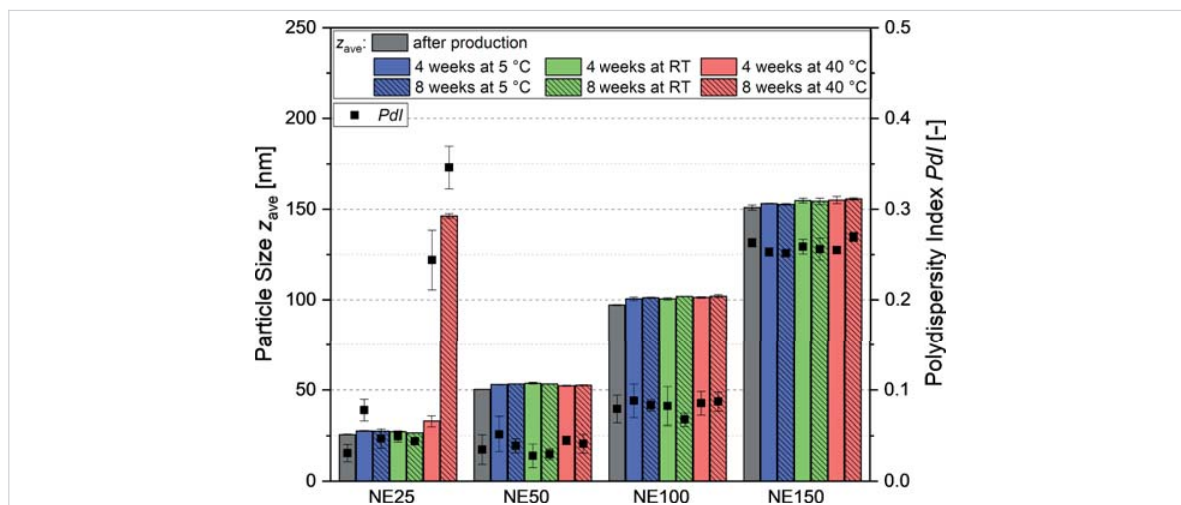


Figure 6: Long-term stability of four selected nanoemulsions with particles of approximately 25 (NE25), 50 (NE50), 100 (NE100) and 150 nm (NE150) in diameter at the recommended storage conditions according to the ICH guidelines Q1A of 5 ± 3 °C, room temperature (RT) and 40 ± 2 °C.

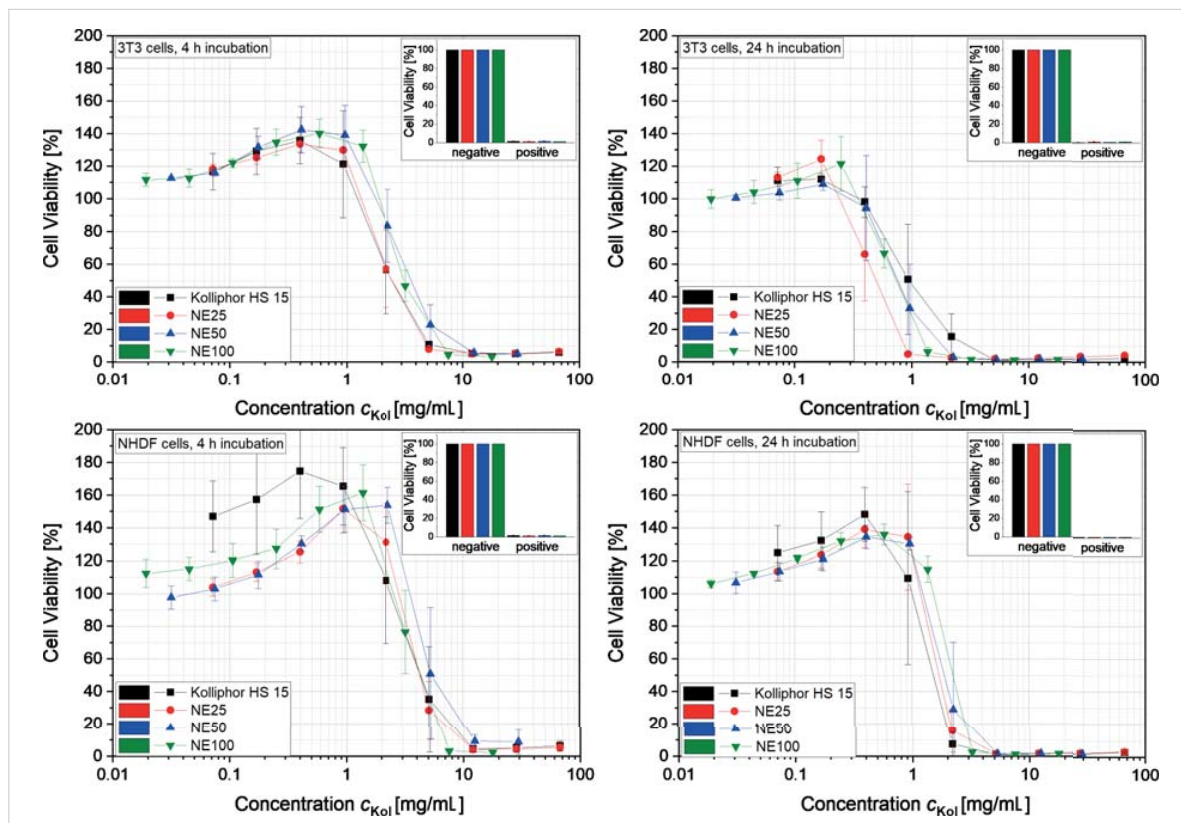


Figure 7: Viability of the cells of lines 3T3 and NHDF as a function of the Kolliphor HS 15 concentration c_{Kol} in the nanoemulsions NE25, NE50 and NE100 as well as the aqueous Kolliphor HS 15 solution ($n = 3$).

parison, for the current nanoemulsions, the cell viability began to decrease at values of the Kolliphor HS 15 concentration about 5 to 10 times higher than observed for a similar system

with nanocapsules containing phospholipids as shells and Solutol HS 15 (also called Kolliphor HS 15) as surfactant which were tested on HaCaT cells [4]. At a concentration slightly

lower than the inhibiting Kolliphor HS 15 concentration, an increased cell viability was observed, which might be caused by a stimulated metabolism of the cells.

Table 2 lists the mean inhibitory concentration (IC_{50}) of Kolliphor HS 15 in an aqueous solution of Kolliphor HS 15 (second column) and the IC_{50} values of Kolliphor HS 15 in the nanoemulsions NE25, NE50 and NE100 (third, fourth and fifth column). The values in brackets refer to the concentration of MCT + Kolliphor HS15 in the nanoemulsions NE25, NE50 and NE100. The corresponding cell viability graphs are shown in Figure S2 in Supporting Information File 1. The IC_{50} values of

Kolliphor HS 15 in the different nanoemulsions and the pure surfactant solution were similar for the different cell lines and incubation times employed. Thus, mainly the surfactant Kolliphor HS 15 inhibited cell viability at high concentration, since all remaining components are considered nontoxic. The IC_{50} values of the nanoemulsions (MCT + Kolliphor HS15) increased slightly with increasing particle diameter due to the lower Kolliphor HS 15 concentration in the nanoemulsions containing larger nanoparticles.

Figure 8 shows the morphology of the 3T3 and NHDF cells incubated for 24 h in a nontoxic solution with a concentration of

Table 2: Mean inhibitory concentration (IC_{50} in mg/mL) of Kolliphor HS 15 in an aqueous solution of Kolliphor HS 15 and IC_{50} of Kolliphor HS 15 in the nanoemulsions NE25, NE50 and NE100. The values in brackets refer to the concentration of MCT + Kolliphor HS15 in NE25, NE50 and NE100.

IC_{50} in mg/mL of:	Kolliphor HS 15	NE25	NE50	NE100
3T3, 4 h incubation	2.7 ± 0.9	2.6 ± 0.8 (3.6 ± 1.1)	3.8 ± 0.9 (7.3 ± 1.7)	3.3 ± 0.5 (8.2 ± 1.2)
NHDF, 4 h incubation	4.9 ± 2.2	4.5 ± 0.6 (6.3 ± 0.8)	6.2 ± 2.5 (11.9 ± 4.8)	4.6 ± 0.9 (11.5 ± 2.2)
3T3, 24 h incubation	1.2 ± 0.5	0.5 ± 0.2 (0.7 ± 0.2)	0.8 ± 0.3 (1.6 ± 0.6)	0.8 ± 0.1 (2.0 ± 0.2)
NHDF, 24 h incubation	1.5 ± 0.4	1.8 ± 0.2 (2.5 ± 0.3)	2.3 ± 0.9 (4.4 ± 1.7)	2.4 ± 0.1 (6.1 ± 0.2)

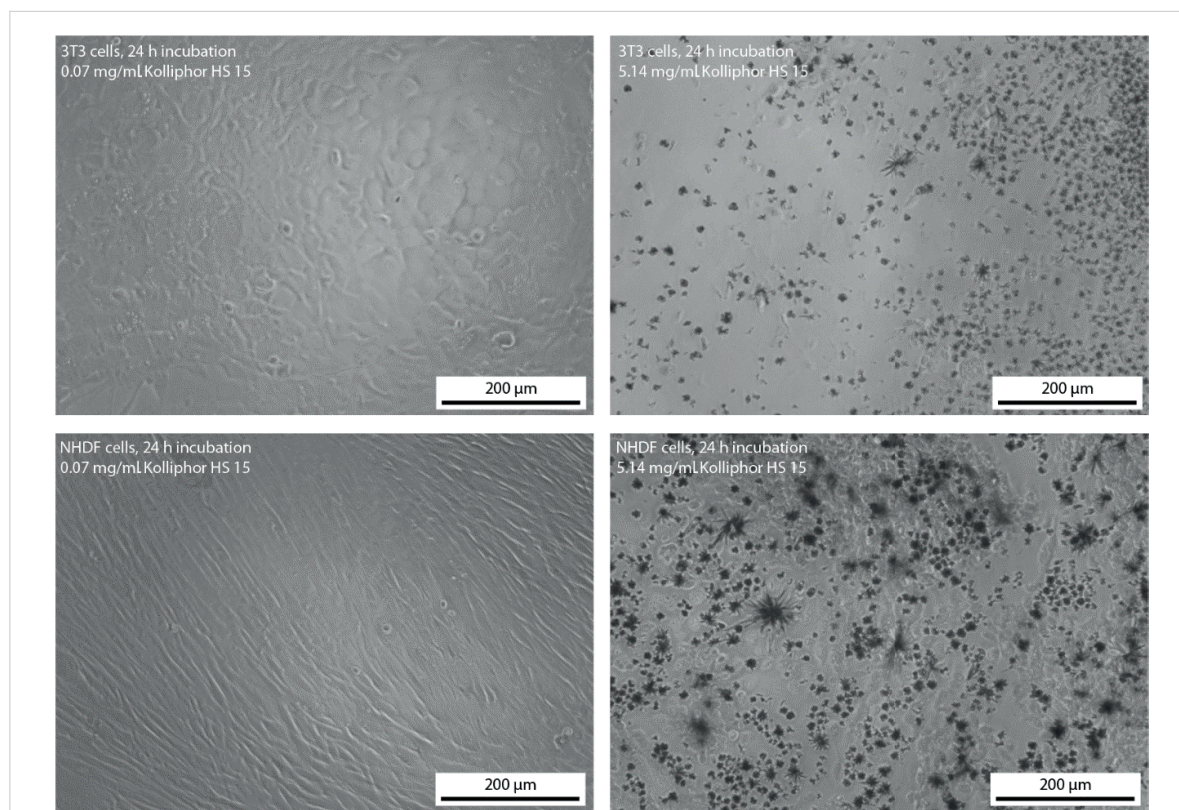


Figure 8: Morphology of the 3T3 and NHDF cells after 24 h incubation in solutions with a concentration of the surfactant Kolliphor HS 15 of 0.07 and 5.14 mg/mL.

Kolliphor HS 15 of 0.07 mg/mL and a highly toxic solution with a concentration of Kolliphor HS 15 of 5.14 mg/mL. The microscopic pictures confirm the toxicity of the surfactant Kolliphor HS 15 at high concentration. The cells did not show any change in their morphology when dissolved in solutions of low surfactant concentration. However, the cells showed a shriveled morphology at high surfactant concentration. Furthermore, the formation of crystals was observed, which might consist of poorly water soluble 12-hydroxystearic acid as a metabolic degradation product of Kolliphor HS 15 at toxic and high surfactant concentration. 12-Hydroxystearic acid is known to form needle like structures. The formation of these crystals of 12-hydroxystearic acid might have caused the cell death in vitro for both cell lines. We assume, that the formation of 12-hydroxystearic acid-based precipitates is unlikely to occur in vivo because of the different transport and metabolic conditions.

Conclusion

The experimental results indicate that nanoemulsions with small particles of tunable size can be easily formed without homogenization by thermal cycling. Solutions of the nonionic surfactant Kolliphor HS 15 showed a nonlinear increase of osmolality with increasing Kolliphor HS 15 concentration, which corresponds well to the modified polynomial van't Hoff equation of 4th degree introduced by Huggins and Flory. This led to the hypertonicity of solutions with Kolliphor HS 15 concentration higher than 21 wt %. Considering this effect when calculating the salinity of the aqueous phase, stable isotonic and phospholipid-free MCT nanoemulsions were successfully produced with particles of tunable diameters between 16 to 175 nm and narrow PDI distributions depending on their lipid:surfactant ratio. Using a nonionic surfactant resulted in an uncharged surface of the emulsion droplets. The nanoemulsion with small particles of 25 nm in diameter showed a slightly increased cytotoxicity in comparison to the barely toxic nanoemulsions with particles of 50 and 100 nm in diameter. This effect is mainly caused by the very high amount of Kolliphor HS 15 in the nanoemulsion with the smallest particles. By choosing nanoemulsions with particles larger than 50 nm in diameter or by dilution of the nanoemulsions containing smaller particles with ice-cold water, very high surfactant concentrations could be avoided and the resulting MCT nanoemulsions might be suitable as potential drug delivery systems for intravenous applications. The presented phase inversion-based process offers a suitable alternative to the production of nanoemulsions based on high pressure homogenization. Particularly, nanoemulsions of particles with diameters smaller than 100 nm can be produced with remarkably narrow PDI distributions while reducing the demand of equipment, the process expenditure as well as the production volume.

Experimental Materials

PIONIER MCT (medium chain triglyceride) was provided by Hansen & Rosenthal KG (Hamburg, Germany). Kolliphor HS 15 (macrogol 15 hydroxystearate) was provided by BASF SE (Ludwigshafen, Germany). Sodium chloride was purchased from Grüssing GmbH (Filsum, Germany), the components for the cell culture medium Dulbecco's Modified Eagle Medium – high glucose (DMEM), fetal calf serum (FCS), penicillin-streptomycin, L-glutamine solution and sodium pyruvate solution as well as the fluorescent dye resazurin sodium salt were purchased from Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Germany, Steinheim). The near infrared fluorescent dye DiR was purchased from Invitrogen/Thermo Fisher Scientific Inc. (Carlsbad, USA). 0.2 µm sterile filtered water was used in all experiments and analytics and was double distilled.

Preparation of nanoemulsions

All nanoemulsions were prepared by a modified phase inversion-based process, which was initially developed by Heurtault et al. [10]. For the encapsulation of the fluorescent dye DiR as a potential label for noninvasive optical in vivo imaging, the solvent ethanol was evaporated from the dye stock solution and the remaining DiR was dissolved in MCT at a concentration of 0.3 mg/g. Kolliphor HS 15, which was molten at 50 °C, and MCT were dispersed in aqueous NaCl solution under magnetic stirring at ≈750 rpm. The emulsion was heated to 99 °C undergoing a phase inversion from an o/w to a w/o emulsion. The emulsion then was cooled back into its phase inversion zone, in which the mixtures turned transparent, and shock diluted with ice-cold water, as shown in Figure 9.

The amount of the respective educts was calculated with the following equations. The mass of MCT m_{MCT} is the product of its desired mass share $x_{MCT,p}$ in the nanoemulsion after shock dilution, which was set to 8 wt % in this study, and the desired total amount of the nanoemulsion m_{tot} :

$$m_{MCT} = m_{tot} \cdot x_{MCT,p} \quad (3)$$

The product of m_{MCT} and the desired ratio of the mass share of Kolliphor HS 15 $x_{Kol,0}$ and MCT $x_{MCT,0}$ results in the mass of Kolliphor HS 15 m_{Kol} :

$$m_{Kol} = m_{MCT} \cdot \frac{x_{Kol,0}}{x_{MCT,0}} = m_{tot} \cdot x_{MCT,p} \cdot \frac{x_{Kol,0}}{x_{MCT,0}} \quad (4)$$

The mass of the aqueous NaCl solution $m_{NaCl-Sol}$ is calculated by multiplying m_{MCT} and the ratio of $x_{Kol,0}$ and the mass share of the NaCl solution $x_{NaCl,0}$:

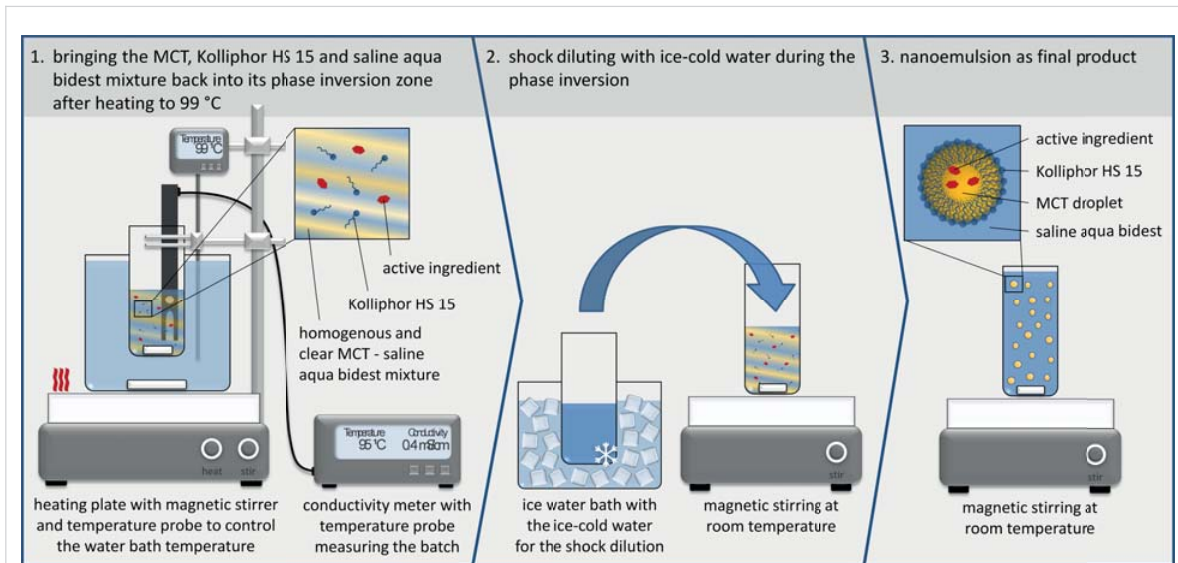


Figure 9: Scheme of the experimental set-up and the method of phase inversion-based production of the nanoemulsions.

$$m_{\text{NaCl-Sol}} = m_{\text{MCT}} \cdot \frac{x_{\text{NaCl-Sol},0}}{x_{\text{MCT},0}} \quad (5)$$

$$= m_{\text{tot}} \cdot x_{\text{MCT},p} \cdot \frac{1 - x_{\text{MCT},0} - x_{\text{Kol},0}}{x_{\text{MCT},0}}$$

The mass of the ice-cold water $m_{\text{ice water}}$ for shock dilution is the difference between the desired total mass of the nanoemulsion and the components calculated beforehand:

$$m_{\text{ice water}} = m_{\text{tot}} - m_{\text{MCT}} - m_{\text{Kol}} - m_{\text{NaCl-Sol}} \quad (6)$$

$$= m_{\text{tot}} - m_{\text{tot}} \cdot x_{\text{MCT},p} \cdot \left(1 + \frac{x_{\text{Kol},0}}{x_{\text{MCT},0}} + \frac{1 - x_{\text{MCT},0} - x_{\text{Kol},0}}{x_{\text{MCT},0}} \right)$$

To achieve isotonic nanoemulsions after shock dilution, the targeted osmolality of the saline aqueous phase $O_{\text{NaCl-Sol},p}(c_{\text{NaCl},p})$ is calculated as the difference of the osmolality of blood O_{blood} and the osmolality of the dissolved Kolliphor HS 15 $O_{\text{Kol},p}(c_{\text{Kol},p})$:

$$O_{\text{NaCl-Sol},p}(c_{\text{NaCl},p}) = O_{\text{blood}} - O_{\text{Kol},p}(c_{\text{Kol},p}) \quad (7)$$

Combining Equation 7 with Equation 1 and Equation 2 leads to the necessary sodium chloride concentration $c_{\text{NaCl},p}$ to achieve the osmolality of blood and hence isotonicity:

$$c_{\text{NaCl},p} = \left(O_{\text{blood}} - O_{\text{Kol}}(c_{\text{Kol},p}) \right) \cdot \frac{M_{\text{NaCl}}}{\phi_{\text{NaCl}} \mu_{\text{NaCl}}} \quad (8)$$

Here, the concentration of Kolliphor HS 15 equals its mass share in the final product and is calculated by multiplying $x_{\text{MCT},p}$ and the desired ratio of $x_{\text{Kol},0}$ and $x_{\text{MCT},0}$:

$$c_{\text{Kol},p} = x_{\text{Kol},p} = x_{\text{MCT},p} \cdot \frac{x_{\text{Kol},0}}{x_{\text{MCT},0}} \quad (9)$$

Finally, the sodium chloride concentration $c_{\text{NaCl},0}$ before shock dilution is calculated by:

$$c_{\text{NaCl},0} = c_{\text{NaCl},p} \cdot \frac{m_{\text{NaCl-Sol}} + m_{\text{ice water}}}{m_{\text{NaCl-Sol}}} \quad (10)$$

In case the calculated sodium chloride concentration exceeded 25 wt %, $c_{\text{NaCl},0}$ was set to 25 wt % and the residual salt was added to the ice-cold water at the following concentration:

$$c_{\text{NaCl,ice water}} = \frac{(m_{\text{NaCl-Sol}} + m_{\text{ice water}}) \cdot c_{\text{NaCl},p}}{m_{\text{ice water}}} \quad (11)$$

$$- \frac{m_{\text{NaCl-Sol}} \cdot c_{\text{NaCl},0}}{m_{\text{ice water}}}$$

Characterization of the phase inversion

The temperature of the phase inversion from an o/w to a w/o emulsion was determined by measuring the significant conduc-

tivity decrease during the heating process with the Mettler Toledo S230 SevenCompact conductivity meter.

Characterization of the osmolality

The osmolality was determined in triplicate with the KNAUER Semi-Mikro Osmometer. The osmolality of the sodium chloride solution (according to Ph. Eur. 2.2.35) was fitted linearly, and the experimentally determined osmolality of the aqueous solutions of Kolliphor HS 15 with different concentration were fitted with a polynomial function of 4th degree using the program Origin 2018G both with the intersection of the y-axis fixed at 0.

Particle size and zeta potential measurement

Particle diameters and zeta potentials were determined with the Malvern Instruments Zetasizer Nano ZS. To determine the particle diameters, the samples were diluted 1:100 in water and three measurements of 15 runs were conducted at 25 °C in the backscattering mode. The zeta potential was determined in triplicate with samples diluted 1:10 in 0.1× PBS with pH 7.4 at 25 °C with 10 to 50 runs per measurement.

Investigation of the stability

The samples were stored at 5 ± 3 °C, room temperature and at 40 ± 2 °C according to the storage conditions of the ICH guidelines Q1A.

Toxicity on NHDF and 3T3 cells

Approximately 20,000 NHDF cells and 10,000 3T3 cells were seeded in 96 well plates and grown for 24 h at 37 °C and 5% CO₂ in 100 µL of the corresponding cell culture media shown in Table 3. After adding 50 µL aseptic and 0.2 µm of the sterile, filtered and differently diluted nanoemulsions, the cells were incubated for 4 or 24 h. The cell viability was determined by a resazurin reduction assay. Therefore, 30 µL of a 0.15 mg/mL resazurin solution was added and the mixture was incubated for 2 h. Then, the fluorescence intensity was determined with the Cytation™ 5 imaging reader (BioTek Instruments) using the RFP 531(excitation)/593(emission) filter set. The cell viability was expressed as a percentage of the negative controls (untreated cells) after subtraction of the blank.

Table 3: Composition of the cell culture media.

compounds in vol %	3T3 cell medium	NHDF cell medium
DMEM	86.80	87.63
FCS	9.55	9.64
penicillin-streptomycin	0.95	0.96
L-glutamine solution	1.75	1.77
sodium pyruvate solution	0.95	–

All experiments were conducted in triplicate. The mean inhibitory concentration IC₅₀ was determined by linear interpolation.

Supporting Information

Supporting Information File 1

Additional figures.

[<https://www.beilstein-journals.org/bjnano/content/supplementary/2190-4286-11-16-S1.pdf>]

ORCID® iDs

Henrike Lucas - <https://orcid.org/0000-0002-2494-5303>

Karsten Mäder - <https://orcid.org/0000-0003-1613-6976>

References

- Medina, J.; Salvadó, A.; del Pozo, A. *Int. J. Pharm.* **2001**, *216*, 1–8. doi:10.1016/s0378-5173(00)00664-5
- Weiss, V. M.; Naolou, T.; Hause, G.; Kuntsche, J.; Kressler, J.; Mäder, K. *J. Controlled Release* **2012**, *158*, 156–164. doi:10.1016/j.jconrel.2011.09.077
- Lefebvre, G.; Riou, J.; Bastiat, G.; Roger, E.; Frombach, K.; Gimel, J.-C.; Saulnier, P.; Calvignac, B. *Int. J. Pharm.* **2017**, *534*, 220–228. doi:10.1016/j.ijpharm.2017.10.017
- Maupas, C.; Moulari, B.; Béduneau, A.; Lamprecht, A.; Pellequer, Y. *Int. J. Pharm.* **2011**, *411*, 136–141. doi:10.1016/j.ijpharm.2011.03.056
- Harun, S.; Amin Nordin, S.; Abd Gani, S. S.; Shamsuddin, A. F.; Basri, M.; Bin Basri, H. *Int. J. Nanomed.* **2018**, *Volume 13*, 2571–2584. doi:10.2147/ijn.s151788
- Schädlich, A.; Hoffmann, S.; Mueller, T.; Caysa, H.; Rose, C.; Göpferich, A.; Li, J.; Kuntsche, J.; Mäder, K. *J. Controlled Release* **2012**, *160*, 105–112. doi:10.1016/j.jconrel.2012.02.012
- Hirsjärvi, S.; Sancey, L.; Dufort, S.; Belloche, C.; Vanpouille-Box, C.; Garcion, E.; Coll, J.-L.; Hindré, F.; Benoît, J.-P. *Int. J. Pharm.* **2013**, *453*, 594–600. doi:10.1016/j.ijpharm.2013.05.057
- Hirsjärvi, S.; Dufort, S.; Gravier, J.; Texier, I.; Yan, Q.; Bibette, J.; Sancey, L.; Josserand, V.; Passirani, C.; Benoît, J.-P.; Coll, J.-L. *Nanomedicine (N. Y., NY, U. S.)* **2013**, *9*, 375–387. doi:10.1016/j.nano.2012.08.005
- Lainé, A.-L.; Gravier, J.; Henry, M.; Sancey, L.; Béjaud, J.; Pancani, E.; Wiber, M.; Texier, I.; Coll, J.-L.; Benoît, J.-P.; Passirani, C. *J. Controlled Release* **2014**, *188*, 1–8. doi:10.1016/j.jconrel.2014.05.042
- Heurtault, B.; Saulnier, P.; Pech, B.; Proust, J.-E.; Benoît, J.-P. *Pharm. Res.* **2002**, *19*, 875–880. doi:10.1023/a:1016121319668
- Friberg, S. E.; Corkery, R. W.; Blute, I. A. *J. Chem. Eng. Data* **2011**, *56*, 4282–4290. doi:10.1021/je101179s
- Heurtault, B.; Saulnier, P.; Pech, B.; Venier-Julienne, M.-C. C.; Proust, J.-E. E.; Phan-Tan-Luu, R.; Benoît, J.-P. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2003**, *18*, 55–61. doi:10.1016/s0928-0987(02)00241-5
- Roethlisberger, D.; Mahler, H.-C.; Altenburger, U.; Pappenberger, A. *J. Pharm. Sci.* **2016**, *106*, 446–456. doi:10.1016/j.xphs.2016.09.034
- Stranz, M.; Kastango, E. S. *Int. J. Pharm. Compd.* **2002**, *6*, 216–220.
- Viegas, T. X.; Henry, R. L. *Int. J. Pharm.* **1998**, *160*, 157–162. doi:10.1016/s0378-5173(97)00316-5

16. Gadelha, G.; Nawaz, M. S.; Hankins, N. P.; Khan, S. J.; Wang, R.; Tang, C. Y. *Desalination* **2014**, *354*, 97–106.
doi:10.1016/j.desal.2014.09.009
17. Chevront, S. N.; Kenefick, R. W.; Heavens, K. R.; Spitz, M. G. *J. Clin. Lab. Anal.* **2014**, *28*, 368–373. doi:10.1002/jcla.21695

License and Terms

This is an Open Access article under the terms of the Creative Commons Attribution License (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0>). Please note that the reuse, redistribution and reproduction in particular requires that the authors and source are credited.

The license is subject to the *Beilstein Journal of Nanotechnology* terms and conditions: (<https://www.beilstein-journals.org/bjnano>)

The definitive version of this article is the electronic one which can be found at:
[doi:10.3762/bjnano.11.16](https://doi.org/10.3762/bjnano.11.16)



Article

Ovarian Accumulation of Nanoemulsions: Impact of Mice Age and Particle Size

Eike Folker Busmann, Julia Kollan, Karsten Mäder and Henrike Lucas *

Faculty of Natural Sciences 1—Biosciences, Department of Pharmaceutical Technology and Biopharmaceutics, Institute of Pharmacy, Martin-Luther-University Halle-Wittenberg, 06120 Halle, Germany; eike.busmann@pharmazie.uni-halle.de (E.F.B.); julia.kollan@pharmazie.uni-halle.de (J.K.); karsten.maeder@pharmazie.uni-halle.de (K.M.)

* Correspondence: henrike.lucas@pharmazie.uni-halle.de; Tel.: +49-345-55-23133

Abstract: Nanotechnology in the field of drug delivery comes with great benefits due to the unique physicochemical properties of newly developed nanocarriers. However, they may come as well with severe toxicological side effects because of unwanted accumulation in organs outside of their targeted site of actions. Several studies showed an unintended accumulation of various nanocarriers in female sex organs, especially in the ovaries. Some led to inflammation, fibrosis, or decreasing follicle numbers. However, none of these studies investigated ovarian accumulation in context to both reproductive aging and particle size. Besides the influences of particle size, the biodistribution profile may be altered as well by reproductive aging because of reduced capacities of the reticulo-endothelial system (RES), changes in sex steroid hormone levels as well as altering ovarian stromal blood flow. This systematic investigation of the biodistribution of intravenously (i.v.) injected nanoemulsions revealed significant dependencies on the two parameters particle size and age starting from juvenile prepubescent to senescent mice. Using fluorescent in vivo and ex vivo imaging, prepubescent mice showed nearly no accumulation of nanoemulsion in their uteri and ovaries, but high accumulations in the organs of the RES liver and spleen independently of the particle size. In fertile adult mice, the accumulation increased significantly in the ovaries with an increased particle size of the nanoemulsions by nearly doubling the portion of the average radiant efficiency (PARE) to ~10% of the total measured signal of all excised organs. With reproductive aging and hence loss of fertility in senescent mice, the accumulation decreased again to moderate levels, again independently of the particle size. In conclusion, the ovarian accumulation of these nanocarriers depended on both the age plus the particle size during maturity.

Citation: Busmann, E.F.; Kollan, J.; Mäder, K.; Lucas, H. Ovarian Accumulation of Nanoemulsions: Impact of Mice Age and Particle Size. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 8283. <https://doi.org/10.3390/ijms22158283>

Academic Editor: Ying-Jan Wang

Received: 26 May 2021

Accepted: 27 July 2021

Published: 31 July 2021

Keywords: nanotoxicology; ovaries; nanoemulsion; biodistribution; optical imaging; accumulation; reproductive aging

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Nanosized drug-delivery systems (DDS) are increasingly used as drug carriers, diagnostics, or theranostic agents. Due to their very small size, their physicochemical properties might differ substantially from the properties of micron-sized or larger sized (bulk) materials. For example, they possess increased uptake rates and higher interaction with biological tissue, improved targeting to their site of action, or increased reactivity due to their significantly higher specific surface area. For this reason, nanotechnology in drug delivery often surpasses the kinetics, absorption, distribution, and metabolism properties in comparison to congeneric bulk materials. However, admittedly, all these properties can as well lead to concerns about nanotoxicological side effects [1–4].

The particle size and shape of nanomaterials play an important role in the fate and interaction of nanosized particles with biological tissue, affecting the adhesion on the cell

surface/membrane, the mode of cellular uptake or direct penetration through the membrane as well as the processing of the nanoparticles by endocytic pathways [3,5]. Withal, the smaller the size, the more rapidly and easily nanoparticles can penetrate capillary walls. With a particle size of less than 50 nm, they can enter cells and those smaller than 20 nm are even more rapidly taken from the circulating bloodstream into cells out of blood vessels, exhibiting a similar size of biomolecules such as viruses, proteins, enzymes, and receptors [6,7]. Various nanosized DDS such as solid nanoparticles, lipid nanocapsules, and nanoemulsions of various particle sizes were found to accumulate in the tissue of reproductive organs of rodents such as rats and mice [2,4,7–11]. On the one hand, the accumulation in the ovaries may be desired for the treatment of ovarian dysfunctions and diseases such as ovarian cancers. For example, recent *in vitro* studies showed induced cellular apoptosis of human ovarian carcinoma cells OVCAR 8 using tocotrienol and curcumin-loaded nanoemulsions [12]. Other studies suggested constant parenteral low dose hormone infusion mimicking the daily hormonal ovarian production throughout the menstrual cycle for the therapy of primary ovarian insufficiency, overcoming the first-pass effect of oral DDS as well as reducing breast cancer risk by decreasing the necessary dose [13,14]. Metformin hydrochloride-loaded nanoparticles were successfully *i.v.* administered in mice causing no adverse effects on the major organs [15], which may be used as an administration route for the treatment of polycystic ovary syndrome to increase insulin sensitivity and overcome insulin resistance in the ovaries [16,17]. On the other hand, the accumulation of nanosized DDS in the ovaries may exhibit high toxicity risk. Besides the unintended release of active pharmaceutical ingredients through an unwanted ovarian accumulation of the DDS, some nanoparticles were reported to cause toxic harms already by themselves: Some led to inflammation, congestion, extravasations of red blood cells, fibrosis, and apoptosis in ovarian cells of rats [2,8] and others decreased the number of follicles in the ovaries after *i.v.* application in female mice [2,9].

However, none of these studies investigated both the influence of particle size and aging effects on the accumulation of nanoparticles in ovarian tissue. Therefore, aging alters the capacity of the RES involving multiple organs such as liver, spleen, lymph nodes, and bone marrow in humans as well as in mice [18–20] and therefore might change the distribution profile of nanosized DDS over aging. Furthermore, the change of sex steroid hormone levels plays a major role during the aging of females: inducing puberty, regulate the estrous cycle during maturity, and leading to menopause, gradually decreasing the fertility of women over 2–7 years until its complete loss. During that period, the ovarian hormone level and the ovarian stromal blood flow decline significantly [21,22]. Up to today, no single mouse strain has been reported exhibiting all the same reproductive aging effects as human women but still exhibits several similarities [21,23]. At the age of 4–6 weeks, progesterone and estradiol levels increase significantly in mouse serum with the onset of puberty and the first ovulation can be detected [24–26]. Adult mice then undergo repeatedly the estrous cycle predominantly within 4–5 days, including the cycling of the ovarian hormone levels [27–29]. During reproductive aging, mice however do not undergo complete menopause as humans do, but depending on the mouse strain, their fertility declines after 6–7 months with declining litter size and then ceases nearly completely after 9–12 months of age. During that period, the estrous cycle becomes irregular until complete termination, and therefore the steroid hormone cycle ceases with a decline of estradiol and progesterone level [21,23,28–33]. Hence the age and therewith the state of sex steroid hormones and ovarian stromal blood flow may play a major role in the accumulation of nanosized DDS in developing, mature, and aging sex organs of females.

For this study, previously investigated phase inversion-based produced nanoemulsions of medium-chain triglyceride (MCT) were chosen as a suitable formulation for the investigation of their biodistribution *in vivo*. These nanoemulsions turned out to be easily tunable in particle size from 16 to 175 nm at remarkably narrow distributions by solely changing their lipid:surfactant ratio. As illustrated in schematic Figure 1, it was possible to load these nanoemulsions with the near-infrared fluorescent dye DiR (DiLC18(7)) as a

label for in vivo fluorescence imaging [34]. Choosing a near-infrared fluorescent dye as a label allowed probing significantly larger tissue depths since various cell components in the tissue absorb light in ultraviolet and visible wavelengths limiting light penetration to a few hundred microns [35]. For further improvement of the in vivo fluorescent imaging, the immunocompetent hairless SKH1-*Hr^{hr}* Elite mouse strain was chosen, which lose their hair within 3 weeks after birth excluding interferences between fur and emitted fluorescence light [36,37]. The chosen dialkylcarbocyanine DiR was already deployed for in vivo imaging and was reported as a non-irritant [38–42]. Because of its long C18 alkyl chains, DiR is highly lipophilic and insoluble in water with a reported logP of 17.4 [43], thus a transfer of such a lipophilic dye out of the lipid nanoemulsion core is highly unlikely, which was described for the similar fluorescent dialkylcarbocyanine dye DiLC18(3) at 37 °C with less than 5% over several weeks for lipid nanoemulsions [44]. However, caution should be taken, when using the near-infrared fluorescent dye DiR for the labeling of DDSs which develop an acidic microenvironment, since DiR might be degraded at pH values below 4 to fluorescent molecules with different properties [45].

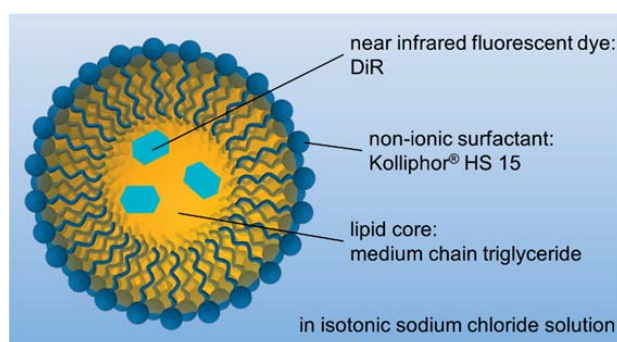


Figure 1. Composition of the chosen nanoemulsion for this in vivo study.

2. Results and Discussion

2.1. Physicochemical Properties of the Nanoemulsions

Particle size analysis, zeta potential, osmolality, and pH measurements were performed to obtain an overview of the physicochemical properties of the four different nanoemulsion formulations. Hydrodynamic particle diameters were determined by dynamic light scattering and expressed as the commonly used Z average (Z_{ave}), which is defined as the scattered light intensity-weighted harmonic mean diameter. Furthermore, the width of the overall particle size distribution was expressed as the dimensionless and commonly used polydispersity index (PDI) (ISO 22412 and [46]). Both calculated mean values of three individually produced batches are shown in Figure 2 for the four different sized nanoemulsions. Therefore, the targeted particle sizes of 25, 50, 100, and 150 nm in droplet diameter were reproducibly achieved for the nanoemulsions NE25 (orange bars) with 25.7 nm and NE50 (red bars) with 50.5 nm Z_{ave} with very low PDI values of 0.028 and 0.035, indicating a very narrow distributed monomodal size distribution. The nanoemulsions NE100 (blue bars) with 97.7 nm and NE150 (green bars) with 144.9 nm Z_{ave} were slightly below the targeted droplet diameter. Both respective PDI values of 0.086 and 0.146 indicate still narrow size distributions. Furthermore, the electrokinetic potentials at the slipping plane of the nanoemulsion droplets were determined as zeta potential by electrophoretic light scattering in 0.1x phosphate-buffered saline (PBS) at pH 7.4. The zeta potentials of the four different nanoemulsions were nearly neutral between -3.15 to -1.98 mV.

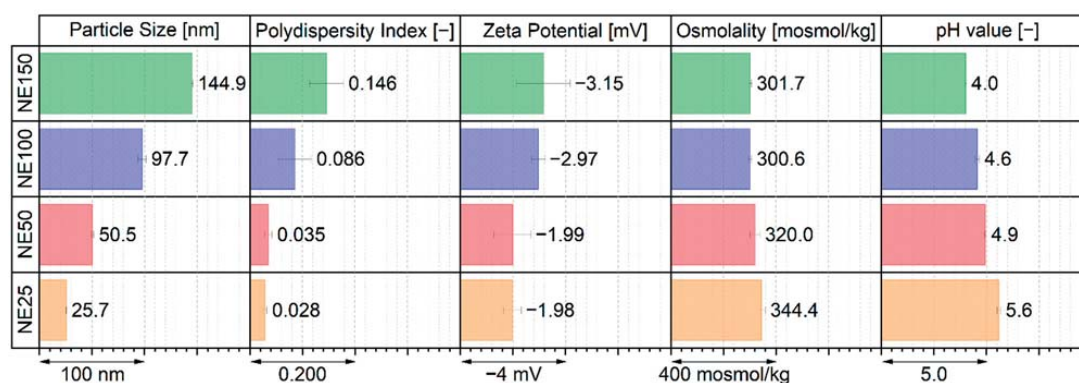


Figure 2. Physicochemical properties of the four different sized nanoemulsions, determined by three individual produced batches.

The osmolalities of the nanoemulsions were measured by cryoscopy. They were isotonic for the nanoemulsions NE100 and NE150 and nearly isotonic for the nanoemulsions NE25 and NE50 so that a painless i.v. application without any vascular damage was ensured [47,48]. With a decreasing pH value from 5.6 to 4.0 for increasing particle size, the nanoemulsions were slightly acidic and therewith lied as well in an acceptable range for small volume i.v. injections between pH 3–11 [47,49]. Furthermore, within this measured pH range of the nanoemulsions and for the short period between production one or two days before i.v. application until the end of the animal trials one day after application, an acid-induced degradation of the incorporated fluorescent dye DiR was very unlikely, which was described as chemically stable for pH values above 4.0 [45].

2.2. Cytotoxic Properties of the Nanoemulsions

For the determination of the cytotoxic properties of the four different sized nanoemulsions, cellular toxicity assays by resazurin reduction were performed with mouse embryonic fibroblasts (3T3) and normal human dermal fibroblasts (NHDF) after 24 h of incubation with the nanoemulsions. The resulting dose-response curves are shown in the supplementary Figure S1. The median inhibitory concentration (IC₅₀), at which the cells possess half the viability of untreated cells, is displayed in Figure 3 for both cell lines.

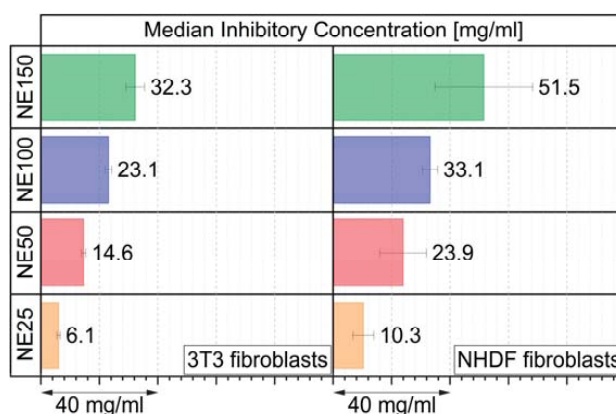


Figure 3. IC₅₀ as total mass nanoemulsion (DiR loaded MCT, Kolliphor® HS 15 + aqueous phase) per ml cell culture media on 3T3 and NHDF fibroblasts after 24 h of incubation, determined by three individual incubated batches (eight replicates per run).

For both investigated cell lines, the IC₅₀ value increased up to five times from the NE25 to the NE150 nanoemulsion, indicating decreasing cytotoxicity with increasing particle size of the nanoemulsion. Overall, the 3T3 fibroblasts reacted more sensitively to the nanoemulsions than the NHDF fibroblasts, with significantly higher IC₅₀ values. The lower cell viability with decreasing particle size can be explained by the increasing amount of the surfactant Kolliphor® HS 15 to achieve smaller particle sizes. This non-ionic surfactant was already detected in previous research as the main cell viability inhibiting ingredient [34,50]. Therefore, it was likely that insoluble 12-hydroxystearic acid as a metabolic degradation product of Kolliphor® HS 15 formed needle-like crystals and thus caused cell death *in vitro* for both cell lines [34].

2.3. Nanoemulsion Interaction with the Blood Cells

To investigate the interaction of the DiR fluorescent dye-loaded nanoemulsions with blood cells, a volume of 50 µL of each nanoemulsion was incubated for 4 h in 100 µL whole mouse blood. The average radiant efficiency (ARE) of the fluorescence signal was determined of the separated plasma and blood cells by fluorescence imaging. Their calculated PAREs for both separated fractions are displayed in Figure 4. For the nanoemulsions NE50, NE100, and NE150, solely 0.3% to 0.6% PARE was detected in the fraction with the blood cells, indicating that nearly no nanoemulsion droplets underwent a cellular uptake into the blood cells, nor fluorescent dye was transferred from the lipid core into the blood cells. For the smaller-sized nanoemulsion NE25 1.3% PARE was detected in the blood cell fraction. Hence, either solely a marginal amount of nanoemulsion droplets entered the blood cells through cellular uptake or transferred the fluorescent dye DiR into the blood cells, due to a highly increased specific surface area of smaller-sized nanoemulsion droplets available for such a transfer. Overall, all four nanoemulsions and their incorporated fluorescent dye merely interacted with the blood cells and stayed inert in the plasma fraction.

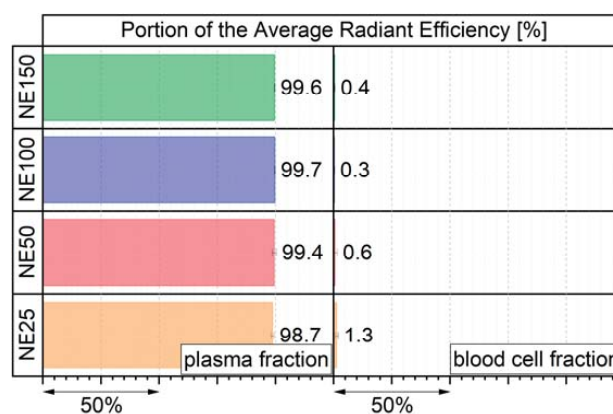


Figure 4. PARE in plasma and blood cell fractions after 4 h of incubation, determined by three individual incubated batches.

2.4. *In Vivo* Fluorescence Imaging

For the detection of an accumulation in the deep tissue of the mice, the near-infrared fluorescent dye DiR was incorporated into the lipid phase of the nanoemulsions. The accumulation of the four different sized nanoemulsions was investigated *in vivo* by non-invasive fluorescence imaging in juvenile prepubescent (age: 3–4 weeks), adult (age: 12–39 weeks), and senescent (age: > 48 weeks) female hairless immunocompetent SKH1-*H^{hr}* Elite mice. Unfortunately, 2–3 min after the *i.v.* application of 100 µL NE25 nanoemulsion into the tail vein, the juvenile mouse suffered from nose- or throat bleeding as well as

cramps. This mouse was redeemed immediately with CO₂. The necropsy revealed no findings in the oral cavity, tongue, and teeth, but partially bleedings in the lungs and a blood clot in the trachea. Other studies reported toxicological effects for parenteral injected gold nanoparticles in the lung tissue of female mice especially for particle size of around 30 nm, whereas smaller-sized (1.5–13 nm) and bigger-sized (70 nm) nanoparticles showed less severe effects. Histological examination of the lung sections revealed several morphological changes such as enlarged airway cavities, epithelial hyperplasia, thinning of alveolar cell layer plus loss of elasticity, lesions, and emphysema leading to struggling for breath, fatigue, weight loss, and eventually death [5,51]. Since the suffering of that single mouse might be caused by the higher toxicity of the similar-sized nanoemulsion NE25, it was refrained to continue the animal trials with this formulation in juvenile mice. The adult and senescent mice showed no abnormalities after the application of the NE25 formulation, as well as all age groups with the other three formulations NE50, NE100, and NE150.

Figure 5 shows lateral, ventral, and dorsal *in vivo* fluorescence images of representative mice (one for each nanoemulsion and age group according to Equation (2) directly after the application (5–10 min) and 24 h after application). Already 5 to 10 min after the application, a slight accumulation of all nanoemulsions was observed in the liver in the ventral view, as shown by white arrows. This indicated a rapid hepatic uptake of the nanoemulsions from the circulating bloodstream as part of the hepatic clearance through the RES, involving the Kupffer cell-mediated phagocytosis in the liver, which was described as well for other nanoparticulate formulations within a few minutes or less than 1.5 h after parenteral applications [7,18–20]. The fluorescence signal intensity stated as radiant efficiency, increased significantly for the liver 24 h after application. Therefore, the highest radiant efficiencies were detected in the livers of the juvenile mice, followed by the adult mice with the formulations NE25 and NE50. The lowest radiant efficiency for the liver was found in senescent mice with the formulation NE150. However, these senescent mice with the NE150 formulation showed still a very broad distribution after 24 h spread over the whole body. Furthermore, an accumulation of all nanoemulsion formulation was detected in the ovaries of the adult mice 24 h after application, as shown with the red arrows. For the senescent group, solely the formulations NE25 and NE100 led to a visible accumulation in the ovaries, which were with a respective age of 64 and 49 weeks younger than the other senescent mice for the formulations NE50 and NE150 at respective ages of 85 and 80 weeks.

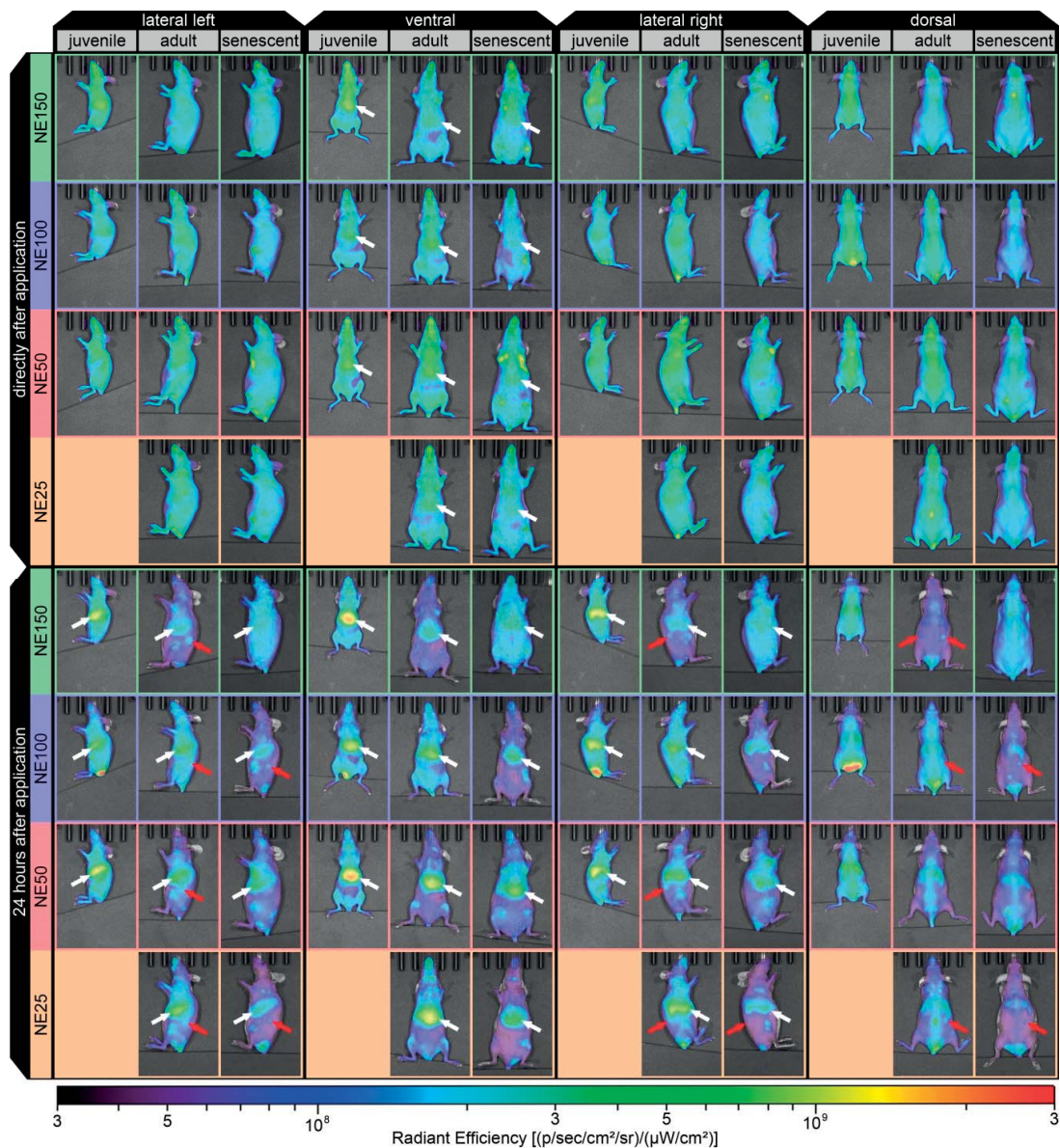


Figure 5. Noninvasive in vivo fluorescence images of representative mice directly after (5–10 min) and 24 h after i.v. injection in the tail vein of the four nanoemulsions in juvenile prepubescent (age 3–4 weeks), adult (age 12–39 weeks), and senescent mice (age > 48 weeks).

2.5. Ex Vivo Fluorescence Imaging and Biodistribution of the Nanoemulsions

For a more detailed overview of the accumulation of the four different sized nanoemulsions, ex vivo fluorescence imaging was conducted with 17 excised organs plus withdrawn blood by heart puncture of all sacrificed mice 24 h after i.v. injection. A region of interest (ROI) was drawn around the outlines of every single organ to determine their ARE. The PARE was then calculated for every single organ of each mouse according to (1) as well as the mean PARE for the five mice per group (nanoemulsion and age), which are provided in the supplementary Table S1 The mean PARE and the individual PARE values

of each mouse are plotted as combined 3D bar chart and 3D scatter chart in Figure 6, respectively. Therefore, the nanoemulsion formulations NE25 (orange bars and scatter), NE50 (red), NE100 (blue), and NE150 (green) are plotted according to their age group on the x-axis. The ex vivo excised organs plus blood are plotted along the y-axis. The mean and individual PARE of the mice are plotted along the z-axis.

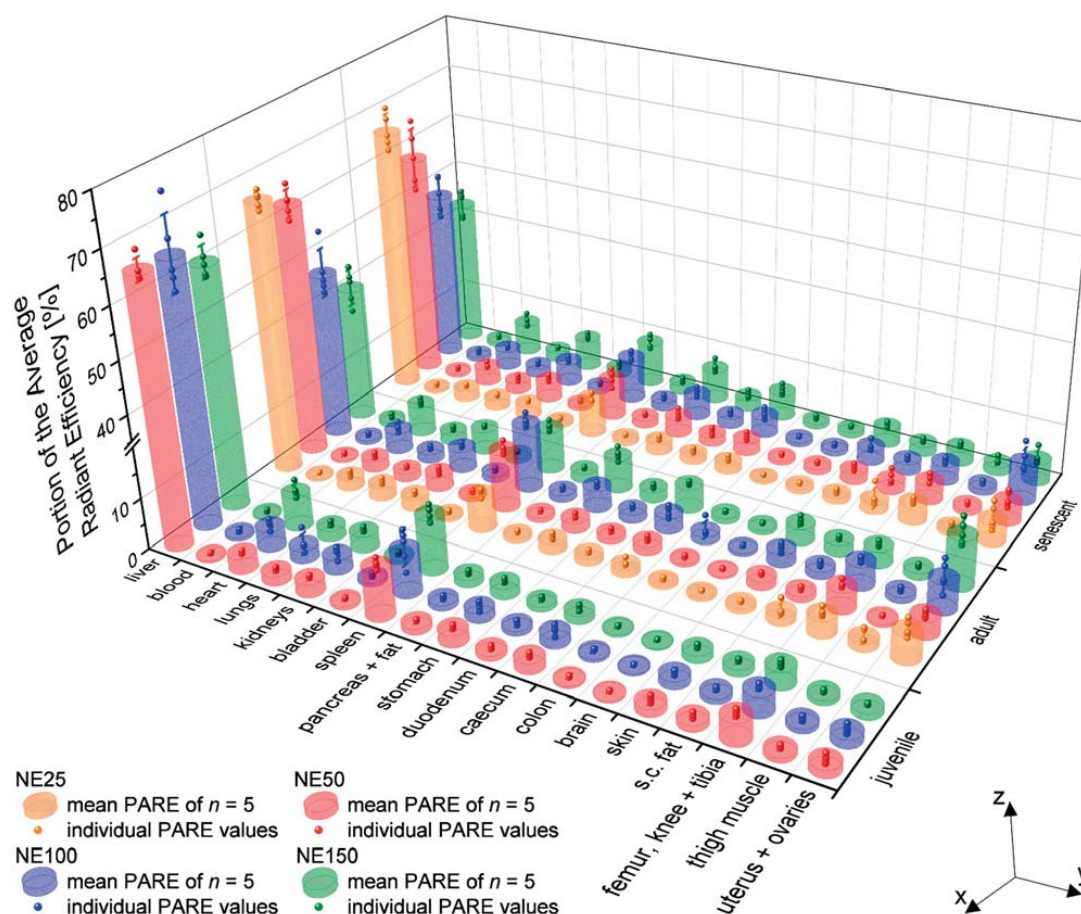


Figure 6. Combined 3D bar chart (mean PARE of the five mice per group) and scatter chart (individual PARE values of each mouse) of the ex vivo excised organs and blood, 24 h after i.v. injection of the four nanoemulsions in juvenile prepubescent (age 3–4 weeks), adult (age 12–39 weeks), and senescent mice (age > 48 weeks).

In addition to the overview of all excised organs, the mean PARE of the three organs with the highest accumulation (liver, spleen, and uterus + ovaries) plus four other organs with a mean PARE above 5% (heart, stomach, kidneys, and caecum) are plotted as contour plot against the particle size of the nanoemulsions and the age of the mice in Figure 7. Therefore, each black dot represents the exact age of the mice and the particle size of the nanoemulsions.

To verify the complete accumulation from the bloodstream into the organ tissue of the i.v. injected nanoemulsions, blood was withdrawn by heart puncture after scarification. The mean PARE of the blood was below 1% for each group, indicating that almost the whole formulation did not circulate in the bloodstream anymore. It either accumulated in the organ tissue within 24 h or was already excreted via the hepatic way.

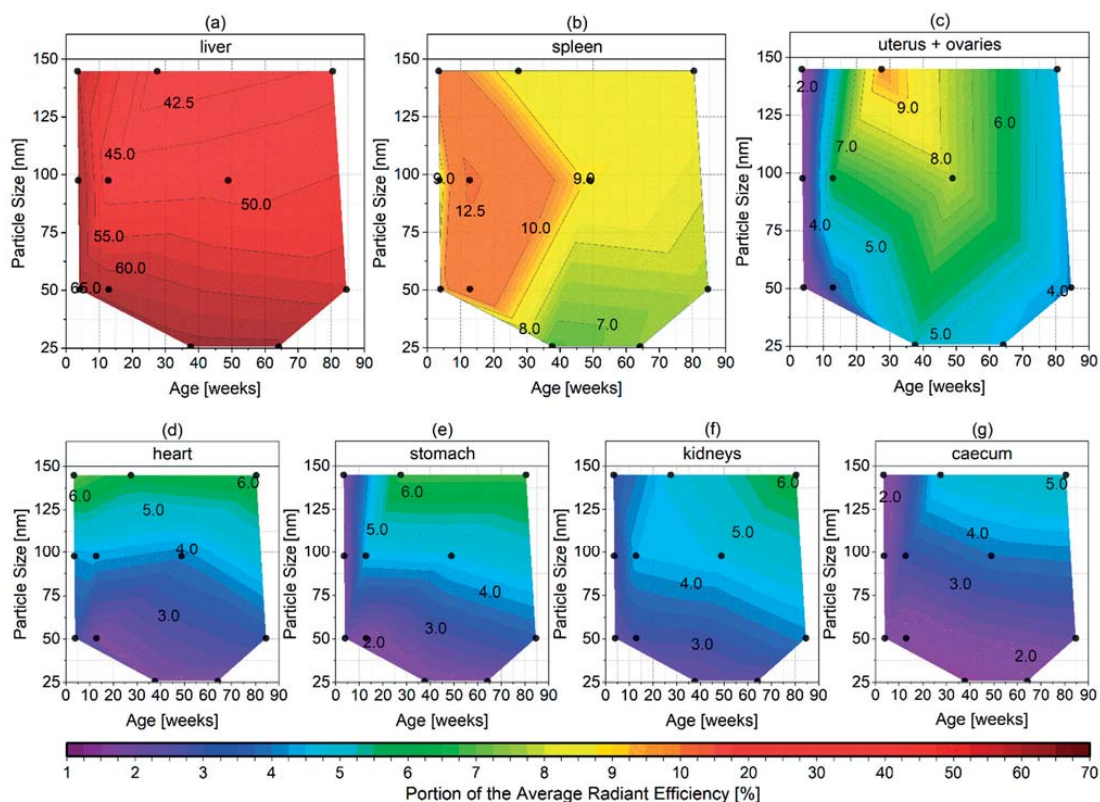


Figure 7. Logarithmic contour plots of the mean PARE for the organs with the highest accumulations ((a) liver, (b) spleen, (c) uterus + ovaries, (d) heart, (e) stomach, (f) kidneys, and (g) caecum) plotted against the particle size of the i.v. injected nanoemulsions and the exact age of the mice displayed as ●.

As expected, the highest amount of the nanoemulsions accumulated in the liver tissue, as this organ is the main constituent in the RES accounting for up to 80–90% of its function [19,52,53]. Therefore, the particle size of the nanoemulsions had solely a marginal effect for the juvenile mice at the age of 3–4 weeks with a mean PARE between 60.8–65.6%, as shown in Figure 7a. The accumulation in the liver of adult and senescent mice however depended significantly on the particle size of the nanoemulsion, where the mean PARE decreased for both from around 66% to nearly 40% with increasing particle size. The clearance capacity of the RES in mice was found to decline significantly within the first 14 weeks after birth but then reached a constant level during further aging up to 128 weeks in mature and senescent mice [54,55], which may have caused the significant lower uptake of the bigger-sized nanoemulsions NE100 and NE150. For the smallest nanoemulsion NE25, the hepatic uptake might remain high, since the smaller the particle size, the better the uptake from the bloodstream into the cells for particles below 50 nm in size [6].

Besides the liver, the spleen and bone marrow play a vital role in the RES as well, containing reticular cells [54]. The spleen showed the second-highest accumulation of the four nanoemulsions. Therefore, the mean PARE was between 8.3–10.8% for the juvenile mice with an age of 3–4 weeks and showed a maximum peak of the mean PARE of 12.9% for adult mice at the age of 13 weeks with the 100 nm-sized nanoemulsion (Figure 7b). The accumulation in the spleen then declined with the age of the mice down to 7.3–8.8% indicating a decrease of the RES capacity as well with the age. The excised femur, knee, and tibia (not displayed as contour diagram) showed no dependency of neither the age nor the particle size of the nanoemulsions, as shown in Figure 6. Therefore, the small amount

of accumulation with mean PARE between 3.0–4.6% was probably in the bone marrow as part of the RES. Overall the accumulation of the nanoemulsions decreased in the RES participating organs during the aging of the mice, which consequently led to a spreading of the accumulation over other non-RES organs.

A significant accumulation of the nanoemulsions was detected in the uterus and ovaries depending on their age and particle size (Figure 7c). The juvenile prepubescent mice younger than 4 weeks showed nearly no accumulation with a mean PARE between 1.2–1.7%. The apparent absence of the accumulation in the juvenile and immature mice probably derived from very low amounts of ovarian steroid hormones during that age and hence their non-fertility, since serum progesterone and estradiol levels significantly increase after 4–6 weeks of age with the onset of puberty [24,25]. The adult and hence fertile mice showed an increased accumulation of the nanoemulsions depending on particle size, where the highest mean PARE of 9.8% was detected for the biggest particle size of the NE150 at the age of 27 weeks. The mean PARE signal decreased with decreasing particle size down to 5.2% for the nanoemulsion NE25. With increasing age, the accumulation in the uterus and ovaries decreased to low mean PARE between 3.9–4.3% at the age of over 80 weeks. The decrease of accumulation correlated as well to the loss of fertility with increasing age, which is described with a gradual decrease of oocytes, shortening, and irregularities of the reproductive cycle until acyclicity and therewith cessation of steroid hormone cycling as well as a decline in litter size [21,23,30]. The slightly higher mean PARE 7.6% of the senescent mice with the NE100 nanoemulsion in Figure 6 was caused by the youngest age within the senescent group at an age of 49 weeks, compared to the other injections time points of 64.1 (NE25), 84.5 (NE50) and 80.4 weeks (NE150). However, this value fits in the decrease of accumulation over age, displayed in the contour plot (Figure 7c).

Independently of the age, the mean PARE of the heart increased from 2.1 to 5.9–6.7% with increasing particle size (Figure 7d), which was reported similarly for i.v. injected gold nanoparticles in female mice [5]. For the juvenile mice, there was nearly no accumulation detected in the stomach, kidneys, and caecum with mean PARE below 2.5%, as shown in Figure 7e–g. With aging and increasing particle size of the nanoemulsions, the mean PARE increased up to 6.4% in the stomach and kidneys and 5.2% in the caecum. Eventually, a small portion of the detected fluorescence signal in the stomach and caecum might derive from coprophagy. So, the mice might reuptake the fluorescence dye DiR into the gastrointestinal tract, which probably left the body already through the hepatic way. Coprophagy of mice was found to begin at the age of around 2.5 weeks after birth, a few days after beginning to excrete feces autonomously [56]. Hence, coprophagy began shortly before the i.v. injection of the nanoemulsions in the juvenile mice, which showed low fluorescence signals in the stomach and caecum with a PARE below 2.4%. The number of ingested fecal pellets was reported to peak at age of 5–6 weeks up to 13 pellets per day and then to decrease gradually with aging to 2.1 pellets per day at 78 weeks of age [56]. Therewith, the described increase of fluorescence signal in the stomach and caecum with aging stood in contrast to the decreasing coprophagy activity. Hence, coprophagy is unlikely the single factor for the increasing fluorescence signal in the stomach and caecum with aging, which might derive as well from the lower capacity of the RES in adult and senescent mice. So, in consequence, the accumulation of the nanoemulsion is distributed more widely across some other non-RES organs. All other excised organs (skin, lungs, s. c. fat, duodenum, pancreas and fat, thigh muscle, colon, bladder, and the brain) had mean PARE below 3.5% in declining order to the listing and therefore just a marginal accumulation of the nanoemulsions.

Ex vivo fluorescent images of the seven organs with the highest accumulations of the representative mice are displayed in Figure 8. The course of the previously discussed PARE data was confirmed by these ex vivo fluorescent images. Therefore, the radiant efficiency was mostly evenly distributed over the imaged organs with no distinctive hot spots, except for the uterus and ovaries. There, hot spots with high radiant efficiency were

detected in the ovaries of all adult mice, as well for the senescent mice with NE25 and NE100 nanoemulsions, which were the younger ones of the senescent groups and probably did not lose their fertility as much as the other older senescent mice. In contrast, the uteri showed solely a moderate radiant efficiency for all age groups and nanoemulsions.

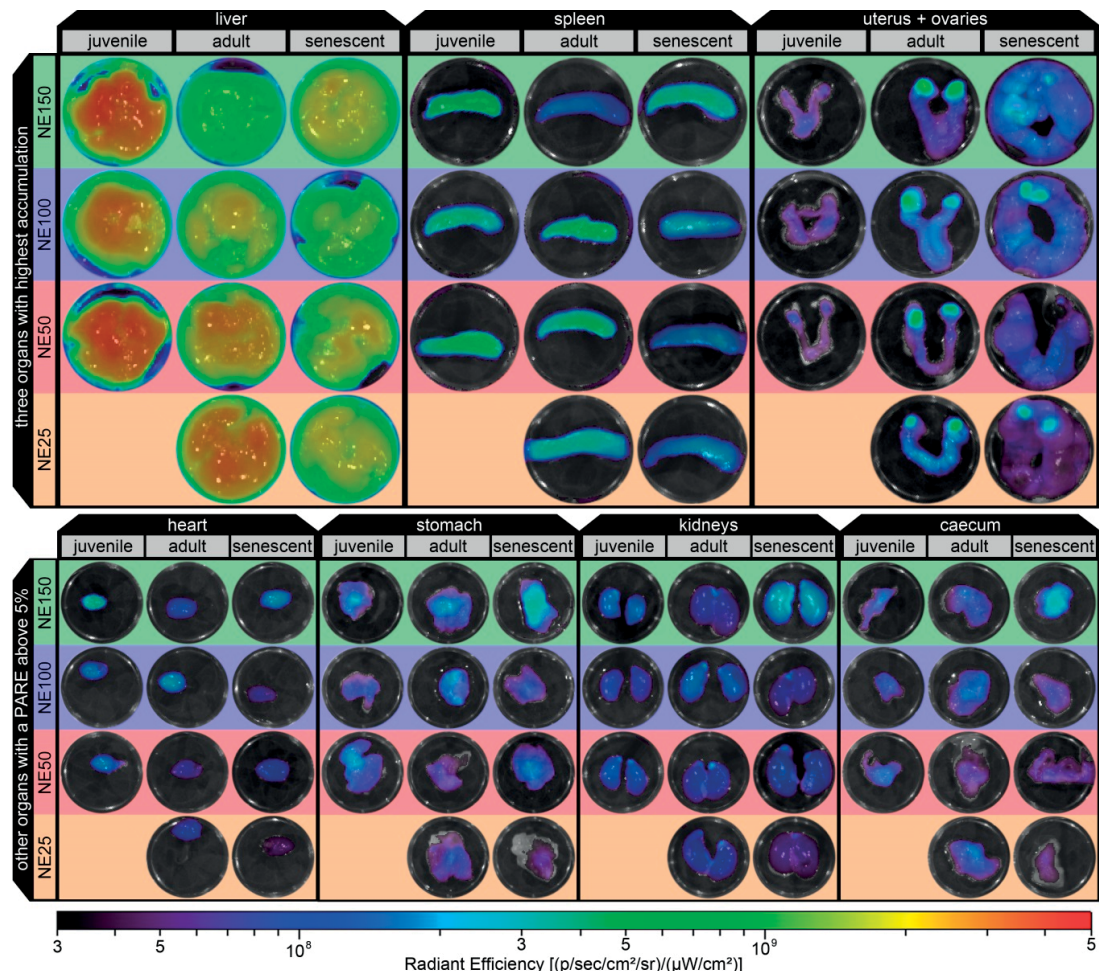


Figure 8. Ex vivo fluorescence images of the excised organs with the highest accumulation (liver, spleen, uterus + ovaries, heart, stomach, kidneys, and caecum) of the representative mice.

3. Materials and Methods

For the preparation of the nanoemulsions, PIONIER MCT (medium-chain triglyceride) and Kolliphor® HS 15 (macrogol 15 hydroxystearate) were kindly provided by Hansen & Rosenthal KG (Hamburg, Germany) or BASF SE (Ludwigshafen, Germany), respectively. Sodium Chloride was purchased from Grüssing GmbH (Filsum, Germany) and the near-infrared fluorescent dye DiR (1,1'-dioctadecyl-3,3',3'-tetramethylindotricarbocyanine iodide) was purchased from Invitrogen/Thermo Fisher Scientific Inc. (Carlsbad, CA, USA). Dulbecco's modified eagle medium–high glucose with 4500 mg/L glucose, L-glutamine, sodium bicarbonate, with and without sodium pyruvate (DMEM w/NaP or DMEM w/o NaP, respectively), fetal calf serum (FCS), penicillin-streptomycin (P/S), Triton™ X-100 and the fluorescent dye resazurin sodium salt for the cell toxicity assays, plus sodium citrate dehydrate and Dulbecco's phosphate-buffered saline 10x were purchased from

Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Germany). Double distilled and 0.2 µm sterile filtered water was used in all experiments and analytics.

3.1. Preparation of Isotonic Nanoemulsions

Isotonic nanoemulsions with four different targeted particle sizes of 25 nm (NE25), 50 nm (NE50), 100 nm (NE100), and 150 nm (NE150) in diameter were prepared by a modified phase-inversion-based process, which is described thoroughly in a previous article [34]. For the noninvasive optical in vivo imaging, the fluorescent dye DiR was used to label the nanoemulsion droplets. Therefore, the solvent ethanol was evaporated from the DiR stock solution and the remaining dye was dissolved in MCT at a concentration of 0.1 mg/g. At 50 °C molten Kolliphor® HS 15 and the loaded MCT were dispersed in aqueous NaCl solution under magnetic stirring at ~750 rpm using the compositions according to Table 1. The emulsion then was heated to 99 °C undergoing a phase inversion from an o/w to a w/o emulsion. The emulsion was cooled back into its phase inversion zone and shock diluted with the ice-cold water.

Table 1. Composition of the isotonic nanoemulsions.

compounds in wt.%	NE25	NE50	NE100	NE150
DiR loaded MCT ¹	8.0	8.0	8.0	8.0
Kolliphor® HS 15	20.0	8.8	5.3	4.0
NaCl solution	25.3 ²	23.2 ³	13.3 ⁴	8.0 ⁵
ice-cold water	46.7	60.0	73.3	80.0

¹ DiR loaded MCT at a concentration of 0.1 mg/g; NaCl solutions at salinities of ² 0.24 wt.%, ³ 2.35 wt.%, ⁴ 4.96 wt.%, and ⁵ 8.78 wt.%

For the animal trials, the educts were sterilized before the nanoemulsion preparation. Therefore, MCT was sterilized by dry heat at 180 °C for 30 min, the Kolliphor® HS 15 mixed with NaCl solution as well as the water for the shock dilution were autoclaved at 121 °C and 2 bar for 30 min including equilibration time. These nanoemulsions were then prepared as described beforehand, but aseptically in the Heraeus HERAsafe HS 12 laminar flow bench and finally sterile filtered with a 0.2 µm polyethersulfone (PES) filter into sterilized vials.

3.2. Particle Size Analysis, Zeta Potential, Osmolality, and pH Measurements

The particle diameters and zeta potentials were measured with the Malvern Instruments Zetasizer Nano ZS. For the particle diameter measurements, each individually produced batch was diluted at 1:100 in water and measured in triplicate with 15 runs each at 25 °C in backscattering mode. The zeta potential was measured in triplicate with each batch diluted at 1:10 in 0.1x PBS buffer with pH 7.4 at 25 °C with 10 to 50 runs per measurement. The osmolality of each individually produced batch was determined as well in triplicate with the KNAUER Semi-Mikro Osmometer. The pH values were determined with single-point measurements of each batch with the Knick Portamess® 913 pH meter.

3.3. Determination of the IC50 on 3T3 and NHDF Fibroblasts

Toxicity assays with 3T3 and NHDF fibroblasts were carried out in triplicate per cell line at eight replicates per run, aseptically in the Heraeus HERAsafe HS 12 laminar flow bench by seeding approximately 20,000 NHDF cells or 10,000 3T3 cells in 11 of the 12 columns of the 96-well plates. The seeded cells were then grown in the Heraeus HERAccl incubator for 24 h at 37 °C and 5% CO₂ in 100 µL DMEM w/NaP for 3T3 fibroblasts or DMEM w/o NaP for NHDF fibroblasts, both media with additionally 10 vol.% FCS and 1 vol.% P/S. Therefore, the first of the 12 columns was left without cells, hence filled solely with a cell culture medium for the determination of the blank. The cells in the second column were left untreated by adding 100 µL cell culture medium as a negative control of

viable cells and the third column was treated by adding 100 μL with 0.05 vol.% Triton™ X-100 solution (final concentration 0.025 vol.%) as positive control of fully inhibited cells. For the remaining nine columns, each nanoemulsion was sterile filtered with 0.2 μm PES filter and then diluted up to 10 times at ratios of 1:2.35 with the corresponding cell culture medium. A total of 100 μL of the different diluted nanoemulsions were added to the remaining nine columns with NHDF or 3T3 cells and the well plates were incubated for another 4 or 24 h. The cell viability was determined by a resazurin reduction assay. Therefore, 20 μL of 440 μM resazurin solution was added and mixed thoroughly with the cell culture medium by carefully withdrawing the medium back and forth into the pipette tips. The mixture was incubated for 2 h and the fluorescence intensity was determined with the BioTek® Instruments Cytation™ 5 imaging reader using the RFP 531(excitation)/593(emission) filter set. The cell viability was calculated as the percentage of the negative controls (untreated cells) after subtraction of the blank (only medium without cells). The IC50 was then calculated by linear interpolation.

3.4. Investigation of the Nanoemulsion Interaction with Blood Cells

Whole mouse blood of untreated mice was stabilized against coagulation by adding 0.109 M sodium citrate at a ratio 1:9. A total of 100 μL of the stabilized whole blood was incubated for 4 h with 50 μL of each nanoemulsion at room temperature. For the separation of the blood cell fraction from the plasma, the incubated blood was centrifuged at 3000 rpm for 15 min with the Eppendorf™ MiniSpin® Centrifuge and the plasma was pipetted off. For washing, the pellets with the blood cell fraction were repeatedly re-dispersed in 1 \times PBS and centrifuged three times in total. Both plasma and blood cell fractions, as well as untreated whole blood were then transferred into a 96-well plate and fluorescence imaging was performed of the well plates as described in Section 3.6. The PARE of both fractions was determined after the subtraction of the untreated whole blood ARE as blank, according to Equation (1) in Section 3.7.

3.5. Animal Handling

All in vivo protocols were approved by local authorities of Saxony-Anhalt, Germany, under file number 42502-2-1456 MLU and complied with the guidelines of the Federation for Laboratory Animal Science Associations (FELASA). The in vivo studies were performed in juvenile (age: 3–4 weeks), adult (age: 12–39 weeks), and senescent (age: > 48 weeks) female hairless immunocompetent SKH1-*Hr^{hr}* Elite mice (mouse model of Charles River, Sulzfeld, Germany), as illustrated in Figure 9a with changes of mouse fertility. The mice were bred by the center for basic research (ZMG) of the Martin Luther University Halle-Wittenberg. The mice were housed in windowless and fully automated air-conditioned rooms with barrier-maintained mouse colonies in closed cage systems type II long IVC with a maximum of five mice per cage according to the EG guideline 86/609/EWG and GV-SOLAS guidelines. The light and temperature regime was controlled automatically and the feeding followed the special diet for lab mice. Mice had access to water and food ad libidum.

The general experimental procedure of the animal trails is shown in Figure 9b. Five mice for each nanoemulsion formulation and age group were slowly injected i.v. with a 30 G cannula into their tail veins using a restrainer, darkened with a red foil. Thereby, 100 μL nanoemulsion was applied for the juvenile (mean bodyweight: 15.2 ± 3.4 g) and 200 μL nanoemulsion for the adult (mean bodyweight: 30.0 ± 3.8 g) and senescent mice (mean bodyweight: 37.6 ± 4.7 g), resulting in a mean dose of 6.3 ± 1.3 $\mu\text{L}/\text{g}$ bodyweight. For in vivo fluorescence imaging directly after injection (5–10 min, so that the bleeding of the injection site stopped) and after 24 h, the mice were anesthetized with the Caliper LifeSciences XGI-8 Gas Anesthesia System and MIDMARK® Matrx VIP 3000® Isoflurane Vaporizer at a 1–2% isoflurane-oxygen mixture at ~ 3.0 L/min O₂ initial flow in the induction chamber and ~ 1.5 L/min steady flow during fluorescence imaging, both flows at 21.1 °C and atmospheric pressure. During fluorescence imaging, the mice were placed on a 37 °C

temperature-controlled stage, preventing a body temperature decreasing in the mice. The mice were sacrificed by cervical dislocation 24 h after injection and for further ex vivo analysis, 17 organs and whole blood samples were withdrawn during necropsy.

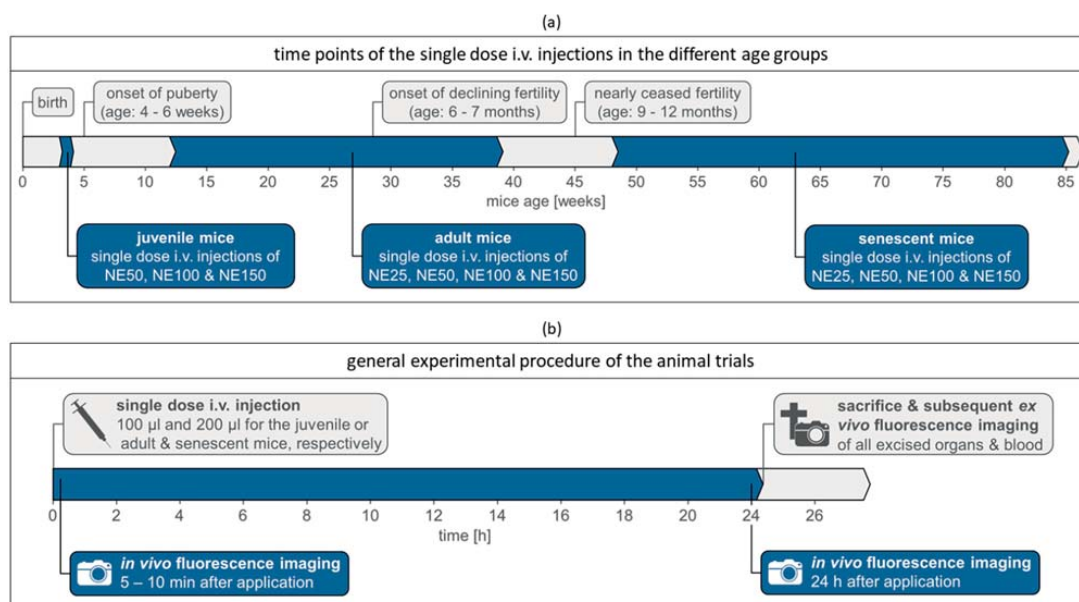


Figure 9. Experimental design of the animal trials: (a) time points of the single-dose i.v. injections with the nanoemulsions in the age groups juvenile, adult, and senescent, including the onset of puberty [24–26], the onset of declining fertility, and nearly ceased fertility of female mice [21,23,28–33]; (b) general experimental procedure of the animal trials.

3.6. Fluorescence Imaging

Both in vivo and ex vivo fluorescence imaging was performed with the PerkinElmer® IVIS® SPECTRUM fluorescence imager using the epi-illumination mode with a filter pair at auto exposure. Thereby, the excitation filter was set to 745 nm with 20 nm bandwidth and emission filter to 800 nm with 30 nm bandwidth to detect the near-infrared dye DiR. For the in vivo fluorescence imaging of every single mouse directly after injection and after 24 h, the field of view was set to D using the mouse as the set subject. The field of view was set to C using the well plate as the set subject for the ex vivo fluorescence imaging of the different excised organs displayed in a 12-well plate.

3.7. Image and Data Processing of the Fluorescence Images

For the image and data processing of the fluorescence imaging, the PerkinElmer® Living Image® 4.7.3 Software was used. For both the in vivo and ex vivo fluorescence image adjustments, the brightness was set to 100, contrast to 1.5, and opacity to 60 using the “rainbow2” color table in reverse at a logarithmic scale. The binning was set to 2 and the smoothing to “none”. For the setting of the color scale, in vivo and ex vivo fluorescence images were taken of two untreated mice. The maximal radiant efficiencies of the in vivo, as well as ex vivo fluorescence images were determined. Both values were below 3.0×10^7 (p/sec/cm²/sr)/(µW/cm²). Thus, setting the minimum of the color scale to 3.0×10^7 (p/sec/cm²/sr)/(µW/cm²) did cut off the autofluorescence of the mouse tissue in vivo as well as ex vivo. The maximum of the color scale was set just right above the maximal detected radiant efficiency of all taken fluorescence images to 3.0×10^7 or 5.0×10^9 (p/sec/cm²/sr)/(µW/cm²) for the in vivo and ex vivo fluorescence images, respectively.

For data processing of the ex vivo fluorescence images, the intensity signal of each excised organ was measured as ARE. Therefore, a ROI was drawn around each single

excised organ using the “auto 1” function, automatically drawing one ROI around the selected organ using the threshold to reach as close to the outline of the organ. In case the “auto 1” function was not applicable at organs with very low fluorescence signal, the ROI was drawn manually using the “free draw” function. The surface intensity signals of all organs then were measured as ARE, giving the sum of the fluorescence emission radiance from each pixel inside the ROI per number of pixels (photons/sec/cm²/sr) divided through the incident excitation intensity (μW/cm²). For comparison, the $PARE_{m,n}$ of each single organ n of a mouse m was expressed as a portion of the sum of all measured $ARE_{m,n}$ signals of the 17 excised organs + blood ($n = 1 \dots 18$) of that single mouse:

$$PARE_{m,n} = \frac{ARE_{m,n}}{\sum_{n=1}^{18} ARE_{m,n}} \quad (1)$$

The mean PARE was calculated for the 3D bar chart and logarithmic contour plots in Figures 6 and 7 as follows:

$$\emptyset PARE_n = \frac{\sum_{m=1}^5 PARE_{m,n}}{5} \quad (2)$$

For the depiction of the fluorescence images in Figures 5 and 8, representative mice were selected, which deviated least from the mean fluorescence signals between the five mice of each investigated group (age and nanoemulsion particle size). Therefore, the sum of the absolute values from the difference between the mean $\emptyset PARE_n$ of all five mice and the $PARE_{m,n}$ of the single mouse was calculated for each mouse in that group, giving the deviation Dev_m of each mouse to the mean of the five mice:

$$Dev_m = \sum_{n=1}^{18} |\emptyset PARE_n - PARE_{m,n}| \quad (3)$$

The mouse with the smallest Dev_m was then chosen as the representative mouse.

4. Conclusions

This in vivo study showed a significant accumulation of nanoemulsions in the ovaries of female mice, which depended on both the particle size and the age of the mice. For juvenile and immature mice younger than 4 weeks, nearly no accumulation was observed in the ovaries, mostly accumulating in the RES organs liver, and spleen. After puberty and hence in the most fertile life period, the ovarian accumulation of the nanoemulsions increased to a remarkable extent in adult mice at an age of 13–39 weeks. Therefore, particle size played a significant role in ovarian accumulation. Within the investigated size range and the chosen nanoemulsion system, the following observation was made: the bigger the nanoemulsion particle size, the higher was the accumulation in the ovaries with up to nearly 10% PARE of all excised organs. To reduce unintended accumulation and therefore possible side effects in the ovaries during the fertile lifetime period, a reduction of particle size is recommended for the chosen nanoemulsion system, since the small-sized nanoemulsions reduced the amount of ovarian accumulation to nearly half in comparison to the 150 nm-sized nanoemulsions. With increasing age and hence decreasing fertility, unintended ovarian accumulation of all different sized nanoemulsions declined to low levels with increasing senescence and therefore reduced the possibility of side effects such as nanotoxicity.

In case a drug delivery into ovarian tissue is desired, for example for ovarian cancer treatment, increasing the particle size of this nanosized DDS might increase treatment success, since the accumulation in ovarian tissue was nearly doubled by increasing the particle size of the nanoemulsions during the fertile lifetime period of the mice.

Supplementary Materials: The following are available online at www.mdpi.com/article/10.3390/ijms22158283/s1, Figure S1: Dose-response curves of the cell viability over the total mass nanoemulsion (DiR loaded MCT, Kolliphor® HS 15 + aqueous phase) per ml cell culture media on (a) 3T3 and (b) NHDF fibroblasts after 24 h of incubation, determined by three individual incubated

batches (eight replicates per run); the inlet graphs show the corresponding negative and positive controls with the untreated or Triton™ X-100 treated cells, respectively., Table S1: Mean PARE values plus standard deviation ($n = 5$) of each excised organ plus withdrawn blood of the juvenile (juv.), adult (ad.), and senescent (sen.) mice i.v. injected with NE25, NE50, NE100, or NE150 nanoemulsions.

Author Contributions: Conceptualization, E.F.B., H.L. and K.M.; methodology, E.F.B., J.K. and H.L.; validation, E.F.B., J.K. and H.L.; formal analysis, E.F.B.; investigation, E.F.B., J.K. and H.L.; resources, K.M.; data curation, E.F.B.; writing—original draft preparation, E.F.B.; writing—review and editing, H.L. and K.M.; visualization, E.F.B.; supervision, H.L. and K.M.; project administration, H.L. and K.M.; funding acquisition, K.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the German animal welfare act (TierSchG) and to the guidelines of the Declaration of Helsinki. The study was approved by the Institutional Review Board of Saxony-Anhalt, Germany (protocol code 42502-2-1456 MLU, date of approval 18 January 2018).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: We thankfully acknowledge the donation of PIONIER MCT by Hansen & Rosenthal KG and Kolliphor® HS 15 by BASF SE. Additionally; we thank Birgit Kunst and the complete animal caretaker team of the ZMG of the Martin Luther University Halle-Wittenberg for breeding the mice and animal husbandry. We acknowledge the financial support of the Open Access Publication Fund of the Martin-Luther-University Halle-Wittenberg.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Mukherjee, B.; Maji, R.; Roychowdhury, S.; Ghosh, S. Toxicological Concerns of Engineered Nanosize Drug Delivery Systems. *Am. J. Ther.* **2016**, *23*, e139–e150, doi:10.1097/01.mjt.0000433947.16654.75.
- Ema, M.; Okuda, H.; Gamo, M.; Honda, K. A Review of Reproductive and Developmental Toxicity of Silver Nanoparticles in Laboratory Animals. *Reprod. Toxicol.* **2017**, *67*, 149–164, doi:10.1016/j.reprotox.2017.01.005.
- Navya, P.N.; Daima, H.K. Rational Engineering of Physicochemical Properties of Nanomaterials for Biomedical Applications with Nanotoxicological Perspectives. *Nano Converg.* **2016**, *3*, 1–14, doi:10.1186/s40580-016-0064-z.
- Schädlich, A.; Hoffmann, S.; Mueller, T.; Caysa, H.; Rose, C.; Göpferich, A.; Li, J.; Kuntsche, J.; Mäder, K. Accumulation of Nanocarriers in the Ovary: A Neglected Toxicity Risk? *J. Control. Release* **2012**, *160*, 105–112, doi:10.1016/j.jconrel.2012.02.012.
- Yang, H.; Du, L.; Tian, X.; Fan, Z.; Sun, C.; Liu, Y.; Keelan, J.A.; Nie, G. Effects of Nanoparticle Size and Gestational Age on Maternal Biodistribution and Toxicity of Gold Nanoparticles in Pregnant Mice. *Toxicol. Lett.* **2014**, *230*, 10–18, doi:10.1016/j.toxlet.2014.07.030.
- Yih, T.C.; Wei, C. Nanomedicine in Cancer Treatment. *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.* **2005**, *1*, 191–192, doi:10.1016/j.nano.2005.04.001.
- Hirsjärvi, S.; Sancey, L.; Dufort, S.; Belloche, C.; Vanpouille-Box, C.; Garcion, E.; Coll, J.L.; Hindré, F.; Benoît, J.P. Effect of Particle Size on the Biodistribution of Lipid Nanocapsules: Comparison between Nuclear and Fluorescence Imaging and Counting. *Int. J. Pharm.* **2013**, *453*, 594–600, doi:10.1016/j.ijpharm.2013.05.057.
- El-Nouri, M.A.; Azmy, O.M.; Elshal, A.O.I.; Ragab, A.M.H.; Elsherbini, E.-S. A.-M. Study of the Effect of Silver Nanoparticles Exposure on the Ovary of Rats. *Life Sci. J.* **2013**, *10*, 1887–1894.
- Han, J.W.; Jeong, J.K.; Gurunathan, S.; Choi, Y.J.; Das, J.; Kwon, D.N.; Cho, S.G.; Park, C.; Seo, H.G.; Park, J.K.; et al. Male- and Female-Derived Somatic and Germ Cell-Specific Toxicity of Silver Nanoparticles in Mouse. *Nanotoxicology* **2016**, *10*, 361–373, doi:10.3109/17435390.2015.1073396.
- Merian, J.; Boisgard, R.; Declèves, X.; Theze, B.; Texier, I.; Tavitian, B. Synthetic Lipid Nanoparticles Targeting Steroid Organs. *J. Nuclear Med.* **2013**, *54*, 1996–2003, doi:10.2967/jnumed.113.121657.
- Lainé, A.L.; Gravier, J.; Henry, M.; Sancey, L.; Béjaud, J.; Pancani, E.; Wiber, M.; Texier, I.; Coll, J.L.; Benoît, J.P.; et al. Conventional versus Stealth Lipid Nanoparticles: Formulation and in Vivo Fate Prediction through FRET Monitoring. *J. Control. Release* **2014**, *188*, 1–8, doi:10.1016/j.jconrel.2014.05.042.
- Steuber, N.; Vo, K.; Wadhwa, R.; Birch, J.; Jacoban, P.; Chavez, P.; Elbayoumi, T.A. Tocotrienol Nanoemulsion Platform of Curcumin Elicit Elevated Apoptosis and Augmentation of Anticancer Efficacy against Breast and Ovarian Carcinomas. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, 1–17, doi:10.3390/ijms17111792.

13. Sullivan, S.D.; Sarrel, P.M.; Nelson, L.M. Hormone Replacement Therapy in Young Women with Primary Ovarian Insufficiency and Early Menopause. *Fertil. Steril.* **2016**, *106*, 1588–1599, doi:10.1016/j.fertnstert.2016.09.046.
14. Wildemeersch, D.; Janssens, D.; Weyers, S. Continuous Combined Parenteral Estrogen Substitution and Intrauterine Progestogen Delivery: The Ideal HST Combination? *Maturitas* **2005**, *51*, 207–214, doi:10.1016/j.maturitas.2004.08.008.
15. Snima, K.S.; Jayakumar, R.; Lakshmanan, V.K. In Vitro and in Vivo Biological Evaluation of O-Carboxymethyl Chitosan Encapsulated Metformin Nanoparticles for Pancreatic Cancer Therapy. *Pharm. Res.* **2014**, *31*, 3361–3370, doi:10.1007/s11095-014-1425-0.
16. Parihar, M. Role of Metformin in Management of PCOS. *JK Sci.* **2005**, *7*, 124–128.
17. Cetin, M.; Sahin, S. Microparticulate and Nanoparticulate Drug Delivery Systems for Metformin Hydrochloride. *Drug Deliv.* **2016**, *23*, 2796–2805, doi:10.3109/10717544.2015.1089957.
18. Bazile, D.V.; Ropert, C.; Huve, P.; Verrecchia, T.; Mariard, M.; Frydman, A.; Veillard, M.; Spenlehauer, G. Body Distribution of Fully Biodegradable [14C]-Poly(Lactic Acid) Nanoparticles Coated with Albumin after Parenteral Administration to Rats. *Biomaterials* **1992**, *13*, 1093–1102, doi:10.1016/0142-9612(92)90142-B.
19. Liu, T.; Choi, H.; Zhou, R.; Chen, I.W. Quantitative Evaluation of the Reticuloendothelial System Function with Dynamic MRI. *PLoS ONE* **2014**, *9*, 1–10, doi:10.1371/journal.pone.0103576.
20. Ogawara, K.; Furumoto, K.; Takakura, Y.; Hashida, M.; Higaki, K.; Kimura, T. Surface Hydrophobicity of Particles Is Not Necessarily the Most Important Determinant in Their in Vivo Disposition after Intravenous Administration in Rats. *J. Control. Release* **2001**, *77*, 191–198, doi:10.1016/S0168-3659(01)00468-0.
21. Frick, K.M. Estrogens and Age-Related Memory Decline in Rodents: What We Have Learned and Where Do We Go from Here? *Horm. Behav.* **2009**, *55*, 8–23, doi:10.1016/j.yhbeh.2008.08.015.
22. Ng, E.H.Y.; Chan, C.C.W.; Yeung, W.S.B.; Ho, P.C. Effect of Age on Ovarian Stromal Flow Measured by Three-Dimensional Ultrasound with Power Doppler in Chinese Women with Proven Fertility. *Hum. Reprod.* **2004**, *19*, 2132–2137, doi:10.1093/humrep/deh387.
23. Bernstein, L.R.; Mackenzie, A.C.L.; Kraemer, D.C.; Morley, J.E.; Farr, S.; Chaffin, C.L.; Merchenthaler, I. Shortened Estrous Cycle Length, Increased FSH Levels, FSH Variance, Oocyte Spindle Aberrations, and Early Declining Fertility in Aging Senescence-Accelerated Mouse Prone-8 (SAMP8) Mice: Concomitant Characteristics of Human Midlife Female Reproductive Agi. *Endocrinology* **2014**, *155*, 2287–2300, doi:10.1210/en.2013-2153.
24. Garris, D.R.; Williams, S.K.; West, L. Morphometric Evaluation of Diabetes-associated Ovarian Atrophy in the C57BL/KsJ Mouse: Relationship to Age and Ovarian Function. *Anat. Rec.* **1985**, *211*, 434–443, doi:10.1002/ar.1092110410.
25. Fendrick, J.L.; Raafat, A.M.; Haslam, S.Z. Mammary Gland Growth and Development from the Postnatal Period to Postmenopause: Ovarian Steroid Receptor Ontogeny and Regulation in the Mouse. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* **1998**, *3*, 7–22, doi:10.1023/A:1018766000275.
26. Ben-Or, S. Morphological and Functional Development of the Ovary of the Mouse. I. Morphology and Histochemistry of the Developing Ovary in Normal Conditions and after FSH Treatment. *J. Embryol. Exp. Morphol.* **1963**, *11*, 1–11.
27. Byers, S.L.; Wiles, M.V.; Dunn, S.L.; Taft, R.A. Mouse Estrous Cycle Identification Tool and Images. *PLoS ONE* **2012**, *7*, 1–5, doi:10.1371/journal.pone.0035538.
28. Nelson, F.; Finch, E. Differential Contributions of Ovarian and Extraovarian Factors to Age-Related Reductions in Plasma Estradiol and Progesterone during the Estrous Cycle of C57BL/6J Mice. *Endocrinology* **1992**, *130*, 806–810.
29. Kopp, C.; Ressel, V.; Wigger, E.; Tobler, I. Influence of Estrus Cycle and Ageing on Activity Patterns in Two Inbred Mouse Strains. *Behav. Brain Res.* **2006**, *167*, 165–174, doi:10.1016/j.bbr.2005.09.001.
30. Finch, C.E.; Holmes, D.J. Ovarian Aging in Developmental and Evolutionary Contexts. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2010**, *1204*, 82–94, doi:10.1111/j.1749-6632.2010.05610.x.
31. Franks, L.M.; Payne, J. The Influence of Age on Reproductive Capacity in C57BL Mice. *J. Reprod. Fertil.* **1970**, *21*, 563–565, doi:10.1530/jrf.0.0210563.
32. Suzuki, H.; Adachi, J.; Togashi, M.; Moriguchi, Y. Relationship Fertilization between Rate in IVCS Mice Decline in Fertility and In Vitro It Has Been Reported That Both the Uterus and the Oocyte Are Involved in Age-Related Decline in Fertility [1–3]. When Fertilized Ova from Young Females Are Transferred. *J. Reprod. Dev.* **1994**, *40*, 107–116.
33. Yuan, M.; Zhou, W.X.; Cheng, J.P.; Zhang, Y.X. Age-Related Changes in the Oestrous Cycle and Reproductive Hormones in Senescence-Accelerated Mouse. *Reprod. Fertil. Dev.* **2005**, *17*, 507–512, doi:10.1071/RD04099.
34. Busmann, E.F.; García Martínez, D.; Lucas, H.; Mäder, K. Phase Inversion-Based Nanoemulsions of Medium Chain Triglyceride as Potential Drug Delivery System for Parenteral Applications. *Beilstein J. Nanotechnol.* **2020**, *11*, 213–224, doi:10.3762/bjnano.11.16.
35. Leblond, F.; Davis, S.C.; Valdés, P.A.; Pogue, B.W. Pre-Clinical Whole-Body Fluorescence Imaging: Review of Instruments, Methods and Applications. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **2010**, *98*, 77–94, doi:10.1016/j.jphotobiol.2009.11.007.
36. Schaffer, B.S.; Grayson, M.H.; Wortham, J.M.; Kubicek, C.B.; McCleish, A.T.; Prajapati, S.I.; Nelon, L.D.; Brady, M.M.; Jung, I.; Hosoyama, T.; et al. Immune Competency of a Hairless Mouse Strain for Improved Preclinical Studies in Genetically Engineered Mice. *Mol. Cancer Ther.* **2010**, *9*, 2354–2364, doi:10.1158/1535-7163.MCT-10-0207.
37. Benavides, F.; Oberszyn, T.M.; VanBuskirk, A.M.; Reeve, V.E.; Kusewitt, D.F. The Hairless Mouse in Skin Research. *J. Dermatol. Sci.* **2009**, *53*, 10–18, doi:10.1016/j.jdermsci.2008.08.012.

38. Schädlich, A.; Kempe, S.; Mäder, K. Non-Invasive in Vivo Characterization of Microclimate PH inside in Situ Forming PLGA Implants Using Multispectral Fluorescence Imaging. *J. Control. Release* **2014**, *179*, 52–62, doi:10.1016/j.jconrel.2014.01.024.
39. Riehl, M.; Harms, M.; Lucas, H.; Ebensen, T.; Guzmán, C.A.; Mäder, K. Dual Dye In-Vivo Imaging of Differentially Charged PLGA Carriers Reveals Antigen-Depot Effect, Leading to Improved Immune Responses in Preclinical Models. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2018**, *117*, 88–97, doi:10.1016/j.ejps.2018.01.040.
40. Yang, N.; Ye, Z.; Li, F.; Mahato, R.I. HPMA Polymer-Based Site-Specific Delivery of Oligonucleotides to Hepatic Stellate Cells. *Bioconjug Chem.* **2009**, *19*, 389–399, doi:10.1016/j.asieco.2008.09.006.EAST.
41. Eisenblätter, M.; Ehrchen, J.; Varga, G.; Sunderkötter, C.; Heindel, W.; Roth, J.; Bremer, C.; Wall, A. In Vivo Optical Imaging of Cellular Inflammatory Response in Granuloma Formation Using Fluorescence-Labeled Macrophages. *J. Nuclear Med.* **2009**, *50*, 1676–1682, doi:10.2967/jnumed.108.060707.
42. Granot, D.; Addadi, Y.; Kalchenlo, V.; Harmelin, A.; Kunz-Schughart, L.A.; Neeman, M. In Vivo Imaging of the Systemic Recruitment of Fibroblasts to the Angiogenic Rim of Ovarian Carcinoma Tumors. *Cancer Res.* **2007**, *67*, 9180–9189, doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-0684.In.
43. Mérian, J.; Gravier, J.; Navarro, F.; Texier, I. Fluorescent Nanoprobes Dedicated to in Vivo Imaging: From Preclinical Validations to Clinical Translation. *Molecules* **2012**, *17*, 5564–5591, doi:10.3390/molecules17055564.
44. Petersen, S.; Fahr, A.; Bunjes, H. Flow Cytometry as a New Approach to Investigate Drug Transfer between Lipid Particles. *Mol. Pharm.* **2010**, *7*, 350–363, doi:10.1021/mp900130s.
45. Riehl, M.; Harms, M.; Göttel, B.; Kubas, H.; Schiroky, D.; Mäder, K. Acid-Induced Degradation of Widely Used NIR Dye DiR Causes Hypsochromic Shift in Fluorescence Properties. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2019**, *132*, 27–33, doi:10.1016/j.ejps.2019.02.031.
46. Thomas, J.C. The Determination of Log Normal Particle Size Distributions by Dynamic Light Scattering. *J. Colloid Interface Sci.* **1987**, *117*, 187–192.
47. Roethlisberger, D.; Mahler, H.C.; Altenburger, U.; Pappenberger, A. If Euhydric and Isotonic Do Not Work, What Are Acceptable PH and Osmolality for Parenteral Drug Dosage Forms? *J. Pharm. Sci.* **2016**, *106*, 446–456, doi:10.1016/j.xphs.2016.09.034.
48. Stranz, M.; Kastango, E.S. A Review of PH and Osmolarity. *Int. J. Pharm. Compd.* **2002**, *6*, 216–220.
49. Simamora, P.; Pinsuwan, S.; Alvarez, J.M.; Myrdal, P.B.; Yalkowsky, S.H. Effect of PH on Injection Phlebitis. *J. Pharm. Sci.* **1995**, *84*, 520–522, doi:10.1002/jps.2600840427.
50. Maupas, C.; Moulari, B.; Béduneau, A.; Lamprecht, A.; Pellequer, Y. Surfactant Dependent Toxicity of Lipid Nanocapsules in HaCaT Cells. *Int. J. Pharm.* **2011**, *411*, 136–141, doi:10.1016/j.ijpharm.2011.03.056.
51. Chen, Y.S.; Hung, Y.C.; Liao, I.; Huang, G.S. Assessment of the in Vivo Toxicity of Gold Nanoparticles. *Nanoscale Res. Lett.* **2009**, *4*, 858–864, doi:10.1007/s11671-009-9334-6.
52. Hamazaki, K.; Sato, S.; Yunoki, M.; Noda, T.; Moreira, L.F.; Mimura, H.; Orita, K. Kupffer Cell Function in Chronic Liver Injury and after Partial Hepatectomy. *Res. Exp. Med.* **1994**, *194*, 237–246, doi:10.1007/BF02576385.
53. Baas, J.; Senninger, N.; Elser, H. The reticuloendothelial system. An overview of function, pathology and recent methods of measurement. *Z. Gastroenterol.* **1994**, *32*, 117–123.
54. Brouwer, A.; Knook, D.L. The Reticuloendothelial System and Aging: A Review. *Mech. Ageing Dev.* **1983**, *21*, 205–228.
55. Jaroslow, B.N.; Larrick, J.W. Clearance of Foreign Red Cells from the Blood of Aging Mice. *Mech. Ageing Dev.* **1973**, *2*, 23–32.
56. Ebino, K.Y. Studies on Coprophagy in Experimental Animals. *Jikken Dobutsu.* **1993**, *42*, 1–9, doi:10.1538/expanim1978.42.1_1.

Article

Particle Engineering of Innovative Nanoemulsion Designs to Modify the Accumulation in Female Sex Organs by Particle Size and Surface Charge

Eike Folker Busmann and Henrike Lucas * 

Faculty of Natural Sciences 1—Biosciences, Department of Pharmaceutical Technology and Biopharmaceutics, Institute of Pharmacy, Martin-Luther-University Halle-Wittenberg, 06120 Halle, Germany; eike.busmann@pharmazie.uni-halle.de

* Correspondence: henrike.lucas@pharmazie.uni-halle.de; Tel.: +49-345-55-23133

Abstract: Particle engineering of nanosized drug delivery systems (DDS) can be used as a strategic tool to influence their pharmacokinetics after intravenous (i.v.) application by the targeted adaptation of their particle properties according to the needs at their site of action. This study aimed to investigate particle properties depending on patterns in the biodistribution profile to modify the accumulation in the female sex organs using tailor-made nanoemulsion designs and thereby to either increase therapeutic efficiency for ovarian dysfunctions and diseases or to decrease the side effects caused by unintended accumulation. Through the incorporation of the anionic phospholipid phosphatidylglycerol (PG) into the stabilizing macrogol 15 hydroxystearate (MHS) layer of the nanoemulsions droplets, it was possible to produce tailor-made nanoparticles with tunable particle size between 25 to 150 nm in diameter as well as tunable surface charges between -2 to nearly -30 mV zeta potential using a phase inversion-based process. Three chosen negatively surface-charged nanoemulsions of 50, 100, and 150 nm in diameter showed very low cellular toxicities on 3T3 and NHDF fibroblasts and merely interacted with the blood cells, but instead stayed inert in the plasma. In vivo and ex vivo fluorescence imaging of adult female mice i.v. injected with the negatively surface-charged nanoemulsions revealed a high accumulation depending on their particle size in the reticuloendothelial system (RES), being found in the liver and spleen with a mean portion of the average radiant efficiency (PARE) between 42–52%, or 8–10%, respectively. With increasing particle size, an accumulation in the heart was detected with a mean PARE up to 8%. These three negatively surface-charged nanoemulsions overcame the particle size-dependent accumulation in the female sex organs and accumulated equally with a small mean PARE of 5%, suitable to reduce the side effects caused by unintended accumulation while maintaining different biodistribution profiles. In contrast, previously investigated neutral surface-charged nanoemulsions accumulated with a mean PARE up to 10%, strongly dependent on their particle sizes, which is useful to improve the therapeutic efficacy for ovarian dysfunctions and diseases.

Keywords: particle engineering; anionic phospholipid; phosphatidylglycerol; ovarian accumulation; biodistribution; nanoemulsion; surface charge; optical in vivo imaging; cell toxicology



Citation: Busmann, E.F.; Lucas, H. Particle Engineering of Innovative Nanoemulsion Designs to Modify the Accumulation in Female Sex Organs by Particle Size and Surface Charge. *Pharmaceutics* **2022**, *14*, 301. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14020301>

Academic Editors: Carlotta Marianecchi, Maria Carafa and Federica Rinaldi

Received: 2 November 2021

Accepted: 24 January 2022

Published: 27 January 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Many approved and marketed drug molecules and even more of those still in development are poorly water-soluble and/or poorly permeable through the physiological barriers, which leads to a low bioavailability at their targeted site of action [1–3]. Besides pH modification and salt forms, co-solvency and surfactant solubilization, nanosizing by top-down or bottom-up processes, inclusion complexation, the ongoing development of many different nanosized DDS is a promising approach to enhance the bioavailability of i.v. applied drugs and additionally to reduce side effects [2]. Thereby, particle engineering can be used to create innovative particle designs of such nanosized DDS through the targeted

adaptation of their particle properties according to the needs for their intended site of action. In particular, adjusting the particle size, shape, surface charge, and surface flexibility of the nanosized DDS impacts the pharmacokinetics like in vivo blood circulation time, metabolic behavior, or biodistribution profile and consequently the efficiency of the active pharmaceutical ingredient at its targeted site of action [1,4,5].

Nanoparticles with different particle properties were found to accumulate in the tissues of the female reproductive organs [6–13]. On the one hand, this accumulation is desired for the treatment of ovarian dysfunctions or diseases. For ovarian carcinoma therapy, i.v. delivered nanosized DDS loaded with chemotherapeutic agents sometimes combined with contrasting or fluorescent agents are used for therapeutic, diagnostic, or even theranostic approaches [14–18], as well as for the therapy of primary ovarian insufficiency with a constant parenteral low dose hormonal infusion mimicking the daily hormonal ovarian production [19,20]. On the other hand, unintended accumulation of i.v. delivered nanoparticles in the sex organs were reported as leading to various toxicity risks like ovarian inflammation, congestion, fibrosis, extravasations of red blood cells, apoptosis in ovarian cells, or the decrease in the number of follicles [6,9,10].

By the incorporation of (highly) lipophilic active ingredients into the liquid lipid matrix, nanoemulsions are already used as nanosized DDS exhibiting numerous advantages: accepted regulatory status, since many ingredients are already used for parenteral nutrition and drug emulsions; usually low toxicity using physiological and readily biodegradable substances like triglycerides and phospholipids; easy processes obtaining very high loads of the active ingredients by pre-loading during or post-loading after manufacturing of the nanoemulsions; high protective potential against hydrolysis or oxidation of the active ingredient by its complete enclosure inside the lipid matrix showing only a very low active ingredient transfer out of its core or to the droplet surface; plus providing a water-based formulation with low viscosity suitable for parenteral i.v. applications [5,21,22].

Our previous studies revealed easy to manufacture nanoemulsions using a phase inversion-based process with tunable particle sizes within a range of 16 to 175 nm and an almost neutral surface charge [23], whose composition is illustrated in Figure 1a. In vivo studies revealed a particle size as well as age-dependent ovarian accumulation after their i.v. injection. Prepubescent juvenile mice showed nearly no ovarian accumulation. But after puberty, the ovarian accumulation increased in fertile adult mice, depending on the particle size. Thereby, increasing the nanoemulsion particle size from 25 to 150 nm in diameter doubled the measured relative fluorescence intensity in the ovaries. However the relative fluorescence intensity in the ovaries decreased again with reproductive aging and the accompanying declining fertility of senescent mice [24].

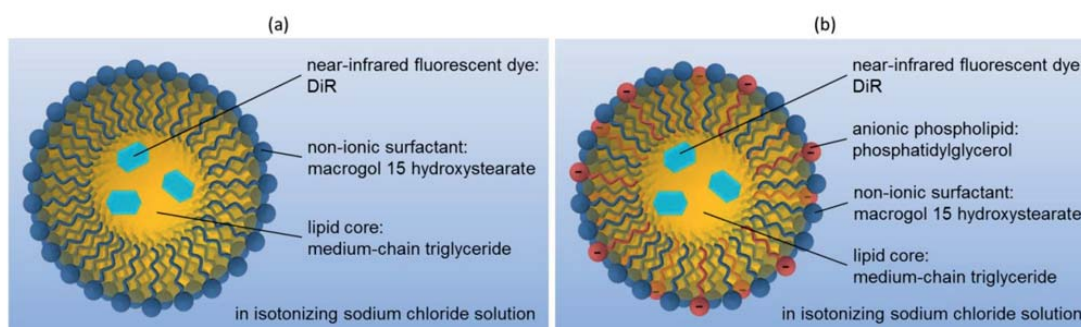


Figure 1. Composition of the nanoemulsions for the in vivo biodistribution studies: (a) previously in vivo investigated neutral surface-charged nanoemulsions [24] and (b) surface modified negatively surface-charged nanoemulsions through the integration of the anionic phospholipid PG into the stabilizing layer.

This study investigates whether the accumulation in the female reproductive organs of i.v. injected nanoemulsions can be controlled by adapting the nanoemulsion particle design. Therefore, the surface of the previously investigated neutral surface-charged nanoemulsions was modified by the incorporation of PG into the stabilizing MHS layer to create a negatively charged surface of the nanoemulsion droplets, as shown in Figure 1b. The phospholipid PG possesses an anionic charge in its hydrophilic head group, which contains a second glycerol moiety [25]. It is a natural constituent in mammals and occurs as a lung surfactant as well in the plasma [25–27]. Furthermore, PG was reported as non-toxic and non-hemolytic, plus it revealed anti-inflammatory activity in vitro [28–30] and thus seemed suitable to formulate nanoemulsions with a negative surface charge.

For the comparison of these negatively surface-charged nanoemulsions with the previously investigated neutral surface-charged nanoemulsions, the medium-chain triglyceride (MCT) core was loaded as well with the near-infrared fluorescent dye DiR (DiLC18(7)), which was already deployed for in vivo fluorescence imaging and reported as non-toxic [7,23,24,31–33]. Using such a near-infrared fluorescent dye allowed for the minimizing of the autofluorescence signal of the mice plus probing in larger tissue depths than a few hundred microns within ultraviolet and visible wavelengths because of the light absorption of the tissue cell components [34,35]. Additionally, the immunocompetent and hairless SKH1-*Hr^{hr}* mouse strain was chosen, which loses its hair within three weeks after birth and thus excludes possible interferences between fur and both excitation as well as emission light [35–37]. The dialkylcarbocyanine DiR with a reported logP of 17.4 is highly lipophilic and insoluble in water [38]. Thus the DiR stayed nearly completely inert in the MCT core of the previously investigated neutral surface-charged nanoemulsions so that depending on the particle size, only a very small amount of maximal 1.3% DiR was transferred to blood cells as an acceptor [24]. Since DiR was shown to degrade to fluorescent molecules with different properties at pH values below 4, possible changes of the fluorescence signal with DDS developing an acidic microenvironment should be considered in its data evaluation [39].

2. Materials and Methods

Kollisolv[®] MCT 70 (medium-chain triglyceride, MCT) and Kolliphor[®] HS 15 (macrogol 15 hydroxystearate, MHS) were kindly provided by BASF SE (Ludwigshafen, Germany), and LIPOID EPG (egg phosphatidylglycerol sodium salt, PG) by Lipoid GmbH (Ludwigshafen, Germany). Sodium chloride and the near-infrared fluorescent dye DiR (1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindotricarbocyanine iodide) were purchased from Grüssing GmbH (Filsim, Germany) or Invitrogen/Thermo Fisher Scientific Inc. (Carlsbad, CA, USA), respectively. Dulbecco's modified eagle medium—high glucose with 4500 mg/L glucose, L-glutamine, sodium bicarbonate, with and without sodium pyruvate (DMEM w/NaP or DMEM w/o NaP, respectively), fetal calf serum (FCS), penicillin-streptomycin (P/S), Triton[™] X-100, fluorescent dye resazurin sodium salt, sodium citrate dehydrate and Dulbecco's phosphate buffered saline 10x (PBS) were purchased from Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Germany). Double distilled and 0.2 µm sterile-filtered water was used in all experiments and analytics.

2.1. Preparation of Isotonic Nanoemulsions with Negative Surface Charge

For the preparation of isotonic nanoemulsions with a negative surface charge, a previously developed phase-inversion-based process [23] was modified by incorporating the anionic phospholipid PG into the stabilizing MHS layer. For the parameter screening, varying PG and MHS mass shares were dispersed thoroughly with 30 wt.% MCT in an aqueous NaCl solution under magnetic stirring at ~750 rpm. The emulsion was heated to 99 °C undergoing a phase inversion from an o/w to a w/o emulsion. It was cooled back into its phase inversion zone and shock diluted with ice-cold water.

A previously developed equation system for the production of isotonic nanoemulsions with a neutral surface charge [23] was modified to calculate the amounts of the respective

educts, including the incorporated PG to achieve the negative surface charge. Thereby, the mass MCT m_{MCT} is the product of the desired total mass nanoemulsion m_{tot} and the desired mass share MCT in the final product $x_{MCT,p}$ after the shock dilution, which was set to 8 wt.% MCT:

$$m_{MCT} = m_{tot} \times x_{MCT,p} \quad (1)$$

The mass of the stabilizing anionic surfactant MHS m_{MHS} is calculated by multiplying the mass MCT with the ratio of the mass shares of MHS $x_{MHS,0}$ and MCT $x_{MCT,0}$ before the shock dilution. Thereby, $x_{MHS,0}$ was varied between 10 to 40 wt.% MHS and $x_{MCT,0}$ was set to 30 wt.% MCT:

$$m_{MHS} = m_{MCT} \times \frac{x_{MHS,0}}{x_{MCT,0}} = m_{tot} \times x_{MCT,p} \times \frac{x_{MHS,0}}{x_{MCT,0}} \quad (2)$$

The mass of the incorporated anionic phospholipid PG m_{PG} is the product of the mass MCT with the ratio of the mass shares of PG $x_{PG,0}$ and MCT $x_{MCT,0}$ before the shock dilution, where $x_{PG,0}$ was varied between 0 to 6 wt.% PG:

$$m_{PG} = m_{MCT} \times \frac{x_{PG,0}}{x_{MCT,0}} = m_{tot} \times x_{MCT,p} \times \frac{x_{PG,0}}{x_{MCT,0}} \quad (3)$$

The mass of the aqueous NaCl solution $m_{NaCl-Sol}$ is similarly calculated by multiplying the mass MCT with the ratio of the mass shares of NaCl solution $x_{NaCl-Sol,0}$ and MCT $x_{MCT,0}$ before the shock dilution, where $x_{NaCl-Sol,0}$ is the difference of 1 with the mass shares of the other three components MCT, MHS, and PG:

$$m_{NaCl-Sol} = m_{MCT} \times \frac{x_{NaCl-Sol,0}}{x_{MCT,0}} = m_{tot} \times x_{MCT,p} \times \frac{1 - x_{MCT,0} - x_{MHS,0} - x_{PG,0}}{x_{MCT,0}} \quad (4)$$

The mass of ice water $m_{ice\ water}$ for the shock dilution is the difference of the total mass and all previously calculated masses of MCT, MHS, PG, and NaCl solution:

$$m_{ice\ water} = m_{tot} - m_{MCT} - m_{MHS} - m_{PG} - m_{NaCl-Sol} = m_{tot} \times \left(1 - \frac{x_{MCT,p}}{x_{MCT,0}} \right) \quad (5)$$

To achieve a similar osmolality of blood O_{blood} at 300 mosmol/kg, the calculation of the necessary salinity of the aqueous NaCl solution before shock dilution [23] was edited as follows:

$$c_{NaCl,0} = (O_{blood} - O_{MHS}(c_{MHS,p}) - O_{PG}(c_{PG,p})) \times \frac{M_{NaCl}}{\Phi_{NaCl} \times n_{NaCl}} \times \frac{m_{NaCl-Sol} + m_{ice\ water}}{m_{NaCl-Sol}} \quad (6)$$

As shown in the Supplementary Figure S1, PG did not influence the osmolality, so that the term $O_{PG}(c_{PG,p})$ was set to zero. The term $\frac{M_{NaCl}}{\Phi_{NaCl} \times n_{NaCl}}$ was previously determined as 2.922×10^{-3} kg/mmol through the reciprocal slope of the fitted linear van't Hoff law, using ideal osmolality data of aqueous NaCl solutions after Ph. Eur. 2.2.35. Experimental data revealed a well corresponding fit with the modified polynomial van't Hoff equation of 4th degree to calculate the term $O_{MHS}(c_{MHS,p})$ [23]:

$$O_{MHS}(c_{MHS,p}) = 4.6293 \frac{mmol}{kg} \times c_{MHS,p} + 0.6041 \frac{mmol}{kg} \times c_{MHS,p}^2 - 0.0235 \frac{mmol}{kg} \times c_{MHS,p}^3 + 0.0008 \frac{mmol}{kg} \times c_{MHS,p}^4 \quad (7)$$

For the animal trials, three isotonic and negatively surface-charged nanoemulsions were chosen with targeted particle sizes of 50 (negative NE50), 100 (negative NE100), and 150 nm (negative NE150), whose compositions are listed in Table 1. Their educts were sterilized before their preparation. MHS and PG mixed in aqueous NaCl solution as well as water for the shock dilution were autoclaved for 30 min at 121 °C and 2 bar. MCT was sterilized by dry heat for 30 min at 180 °C. The nanoemulsion preparations were conducted

one day before every animal experiment and under aseptic conditions in a laminar flow bench. Ethanol of the DiR stock solution was evaporated and re-dissolved in the sterilized MCT at a concentration of 0.1 mg/g for fluorescent labeling of the nanoemulsions. The further preparation of these nanoemulsions was done as described previously, but under aseptic conditions and finally sterile filtered with a 0.2 µm polyethersulfone (PES) filter into sterilized vials.

Table 1. Composition of the isotonic, negatively surface-charged nanoemulsions for the animal trials.

Compounds in wt. %	Negative NE50 ¹	Negative NE100 ¹	Negative NE150 ¹
DiR loaded MCT ²	8.00	8.00	8.00
MHS	2.67	2.67	2.67
PG	1.60	0.80	0.27
NaCl solution	14.40 ³	15.20 ⁴	15.73 ⁵
ice-cold water	73.33	73.33	73.33

¹ NE50, NE100, and NE150 refer to the nanoemulsion particle size of 50, 100, and 150 nm, respectively; ² DiR loaded MCT at a concentration of 0.1 mg/g; NaCl solutions at salinities of ³ 5.05 wt.%, ⁴ 4.83 wt.%, and ⁵ 4.69 wt.%.

2.2. Particle Size and Zeta Potential Analysis

Both particle sizes and zeta potentials were determined with the Malvern Instruments Zetasizer Nano ZS by Malvern Panalytical GmbH (Kassel, Germany). For particle size measurements, samples were diluted at 1:100 in water and measured in triplicate with 15 runs each at 25 °C in backscattering mode. The zeta potential was determined in triplicate by diluting each sample 1:10 in 0.1x PBS with pH 7.4 at 25 °C with 10 to 50 runs per measurement.

2.3. Osmolality and pH Measurements

The osmolality of each sample was determined in triplicate with the Semi-Mikro Osmometer by KNAUER Wissenschaftliche Geräte GmbH (Berlin, Germany). The pH values of each sample were determined by single-point measurements with the Portamess® 913 pH meter by Knick Elektronische Messgeräte GmbH (Berlin, Germany).

2.4. Longterm Stability

According to the ICH guidelines and Q1A recommended conditions, the samples were stored at 5 ± 3 °C, room temperature, and 40 ± 2 °C. Particle size analysis of the samples was conducted directly after production and then after two, four, eight, and 12 weeks of storage.

2.5. Cellular Toxicity

Cellular toxicity assays of the three negatively surface-charged nanoemulsions were carried out in triplicate at eight replicates per run on normal human dermal fibroblasts (NHDF) and mouse embryonic fibroblasts (3T3) obtained from Promocell (Heidelberg, Germany) or ATCC (Manassas, VA, USA), respectively. Therefore, 20,000 NHDF cells or 10,000 3T3 cells were seeded in 11 of the 12 columns of 96-well plates in 100 µL DMEM *w/o* NaP for the NHDF cells of DMEM *w/NaP* for the 3T3 cells, both media with an additional 10 vol.% FCS and 1 vol.% P/S. The cells were grown for 24 h at 37 °C and 5% CO₂. The first of the 12 columns was used for the determination of the blank filled solely with 200 µL corresponding cell culture medium without any cells, the second column with cells was left untreated by adding 100 µL cell culture medium as a negative control for viable cells and the third column was treated by adding 100 µL of 0.05 vol.% Triton™ X-100 solution (final concentration 0.025 vol.%) as a positive control of fully inhibited cells. The cells in the remaining nine columns were treated with different dilutions of the investigated nanoemulsion. Therefore, the nanoemulsion was 0.2 µm sterile filtered and diluted up to 10 times at ratios of 1:2.35, with the corresponding cell culture medium and 100 µL of the

diluted nanoemulsion added to the NHDF or 3T3 cells. The cells were then incubated for 24 h. By using a resazurin reduction assay, the cell viability was determined by adding 20 μL of 440 μM resazurin solution. The added resazurin solution was mixed thoroughly with the cell culture medium by carefully withdrawing the medium back and forth into the pipette tips and incubated for another 2 h. The fluorescence intensity was then determined with the BioTek[®] Instruments Cytation[™] 5 Cell Imaging Multi-Mode Reader by Agilent Technologies Inc. (Santa Clara, CA, USA) using the RFP 531(excitation)/593(emission) filter set. The cell viability was calculated as the percentage of the negative controls (untreated cells) after subtraction of the blank (only medium without cells). Using linear interpolation, the median inhibitory concentration IC₅₀ was determined. Additionally, to the fluorescence measurements, the morphology of the incubated 3T3 or NHDF fibroblasts was observed by phase-contrast microscopy at 20 \times magnification.

2.6. Investigation of the Interaction with Blood Cells

By adding 0.109 M sodium citrate solution at a ratio of 1:9 to the withdrawn whole blood of untreated mice, the whole blood was stabilized against coagulation. 50 μL nanoemulsion was added to 100 μL stabilized whole blood, mixed thoroughly, and incubated for 4 h at room temperature. The blood cell fraction was then separated from the plasma by centrifugation at 3000 rpm for 15 min with the MiniSpin[®] Centrifuge by Eppendorf SE (Hamburg, Germany). The plasma was pipetted off and the pellet with the blood cell fraction was washed by repeatedly redispersing in 1x PBS and centrifuging three times in total. Both plasma and blood cell fractions as well as untreated whole blood as blank were transferred into a 96-well plate. The fluorescence intensity of the samples was determined as average radiant efficiency (ARE) by fluorescence imaging as described in Section 2.8. The portion of the average radiant efficiency (PARE) of both fractions was calculated after subtraction of the untreated whole blood ARE, according to Section 2.9 and Equation (8).

2.7. Animal Handling

All in vivo protocols complied with the guidelines of the Federation for Laboratory Animal Science Associations (FELASA) and were approved under file number 42502-2-1456 MLU by the local authorities of Saxony-Anhalt, Germany. The in vivo studies were performed in adult (age: 15–30 weeks, mean body weight 29.3 ± 1.5 g) female hairless immunocompetent SKH1-*Hr^{hr}* Elite mice (mouse model of Charles River, Sulzfeld, Germany) bred by the center for basic medical research (ZMG) of the Martin Luther University, Halle-Wittenberg, Germany. The mice were housed in windowless and fully automated air-conditioned rooms with barrier-maintained mouse colonies in closed cage systems type II long with a maximum of five mice per cage according to the EG-guideline 86/609/EWG and GV-SOLAS guidelines. The light and temperature regime was controlled automatically and the feeding followed the special diet for lab mice, having access to water and food ad libitum.

The experimental procedure of the animal trials is illustrated in Figure 2. Using a 30 G cannula and a restrainer darkened with red foil, five mice for each nanoemulsion formulation were slowly i.v. injected in the tail veins with 200 μL nanoemulsion, which results in a mean dose of 6.8 ± 0.3 $\mu\text{L/g}$ body weight. For in vivo fluorescence imaging directly after the bleeding of the injection site stopped (5–10 min after application), as well as after 24 h, the mice were anesthetized with the XGI-8 Gas Anesthesia System by Caliper Life Sciences (Waltham, MA, USA) and Matrx VIP 3000[®] Isoflurane Vaporizer by Midmark Corporation (Dayton, OH, USA) at a 1–2% isoflurane-oxygen mixture at ~ 3.0 L/min O₂ initial flow in the induction chamber and ~ 1.5 L/min steady flow during fluorescence imaging, both flows at 21.1 °C and atmospheric pressure. During fluorescence imaging, the mice were placed on a 37 °C temperature-controlled stage, preventing the body temperature from decreasing. The mice were sacrificed by cervical dislocation 24 h after injection. For further ex vivo analysis, 17 organs were excised and whole blood samples were withdrawn during necropsy.

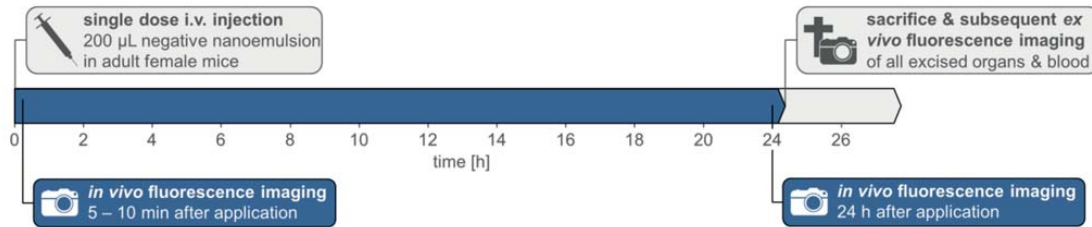


Figure 2. Experimental procedure of the animal trials.

2.8. Fluorescence Imaging

In vivo and ex vivo fluorescence imaging was performed with the IVIS[®] SPECTRUM fluorescence imager by PerkinElmer Inc. (Waltham, MA, USA) using the epi-illumination mode at auto exposure with the following filter pair: excitation at 745 nm with 20 nm bandwidth, emission at 800 nm with 30 nm bandwidth. For the in vivo fluorescence imaging of every single mouse, the field of view was set to D using the mouse as the set subject. The field of view was set to C using the well plate as the set subject for the ex vivo fluorescence imaging of the excised organs displayed in a 12-well plate.

2.9. Image and Data Processing of the Fluorescence Images

PerkinElmer[®] Living Image[®] 4.7.3 Software was used for the image and data processing as described previously [24]. For the adjustment of the fluorescence images, brightness was set to 100, the contrast to 1.5, binning to 2, opacity to 60, and the smoothing to “none”, using the “rainbow2” color table in reverse and logarithmic scale. The color scale of the radiant efficiency was set to 3.0×10^7 (p/sec/cm²/sr)/(µW/cm²) minimum to cut off the autofluorescence of mouse tissue, which was determined beforehand with untreated mice as blank. The maximum was set to 3.0×10^9 and 5.0×10^9 (p/sec/cm²/sr)/(µW/cm²) above the maximal detected radiant efficiency of all taken in vivo or ex vivo fluorescence images, respectively.

For data processing of the ex vivo fluorescence images, the fluorescence intensity of the excised organs was determined as ARE by drawing a region of interest (ROI) automatically around the outlines of each organ with the “auto1” function, and if not applicable manually, with the “free draw” function. For comparison, the PARE of each single organ n of a mouse m $PARE_{m,n}$ was expressed as the portion of the sum of all measured ARE-signals of the 17 excised organs plus the withdrawn blood ($n = 1 \dots 18$) of the mouse m $ARE_{m,n}$:

$$PARE_{m,n} = \frac{ARE_{m,n}}{\sum_{n=1}^{18} ARE_{m,n}} \tag{8}$$

The mean PARE $\varnothing PARE_n$ was calculated for the 3D bar chart and logarithmic contour plots for the discussion of the biodistribution in Section 3.7:

$$\varnothing PARE_n = \frac{\sum_{m=1}^5 PARE_{m,n}}{5} \tag{9}$$

The mouse with the smallest deviation Dev_m from the arithmetic mean of all calculated $PARE_{m,n}$ within the group of the five mice was then chosen as a representative mouse for the in vivo and ex vivo fluorescence images in the Sections 3.6 and 3.7, according to the following equation:

$$Dev_m = \sum_{n=1}^{18} |\varnothing PARE_n - PARE_{m,n}| \tag{10}$$

Using the software IBM[®] SPSS[®] Statistics Version 24, statistical analysis was performed by pairwise Mann-Whitney-U-Tests (MWU) to investigate the effect of the particle size on

the accumulation within both groups' negatively and neutral surface-charged nanoemulsions. To investigate the effect of the surface charge on the accumulation, pairwise MWUs were performed between the pairs of similar-sized nanoemulsions with a negative and neutral surface charge. MWU is a robust test for the statistical analysis of small samples and does not presuppose a normal distribution, suitable for such a small number of samples with only five mice per administered nanoemulsion formulation.

3. Results and Discussion

3.1. Screening of the Nanoemulsion Formation with Negative Surface Charge

Screening trials were conducted to achieve nanoemulsions with a negative surface charge and targeted particle sizes of 50, 100, and 150 nm in diameter, with a narrow size distribution. Furthermore, it was aimed to achieve isotonicity and thus reduce the risk of crenation or shriveling of the blood cells as well as pain at the site of application. The contour plots in Figure 3 show the resulting (a) particle sizes, (b) polydispersity index (PDI), (c) zeta potential, and (d) osmolality of the produced nanoemulsions at different MHS and PG mass shares at a constant MCT mass share of 8 wt.%. Additionally, the Supplementary Figure S2 shows the same experimental data as scatter plots against the PG:MHS ratio.

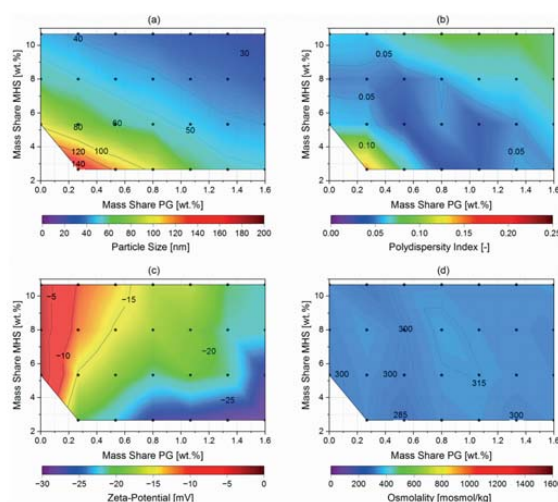


Figure 3. Contour plots showing (a) the resulting particle diameter, (b) the PDI, (c) the zeta potential in $0.1 \times$ PBS at pH 7.4, and (d) the osmolality of the screening trials depending on the MHS against the PG mass shares at a constant MCT mass share of 8 wt.%, in which each dot • represents a conducted experiment.

The hydrodynamic particle diameters were measured by dynamic light scattering and were expressed as the commonly used Z average (z_{ave}) and the width of the overall particle size distribution as the common dimensionless PDI (ISO 22412 and [40]). Depending on the mass shares of the non-ionic surfactant MHS and the anionic phospholipid PG, nanoemulsions were formed with particles of 27 to 148 nm in diameter (Figure 3a) and narrow size distributions with PDIs of 0.02 to 0.15 (Figure 3b). Thereby, the increase of both surfactant mass shares MHS and PG led to consistently decreasing particle sizes of the nanoemulsions. In the case of the PDIs, the composition passed through an optimum, where at first the PDIs decreased with increasing surfactant mass shares from 0.15 to very narrow distributions with PDIs below 0.05 accompanying the decreasing particle sizes of the nanoemulsions. Thereby, the lowest PDIs were detected for the nanoemulsions with particle sizes around 60 nm. With the further increase of both surfactant mass shares, the PDIs increased slightly up to 0.08, although with the further decreasing particle sizes of the nanoemulsions.

By electrophoretic light scattering in $0.1 \times$ PBS at physiological pH 7.4, the electrokinetic potentials at the slipping plane of the nanoemulsion droplets were determined, and these results are plotted in Figure 3c. With the increasing mass share of the anionic phospholipid, the zeta potential decreased from nearly neutral with -2 mV at 0.00 wt.% PG up to nearly -30 mV at 1.60 wt.% PG and 2.67 wt.% MHS. Thereby, the resulting zeta potential depended only on the PG:MHS ratio of the nanoemulsion composition, as shown in the Supplementary Figure S2c. Hence, increasing this ratio and therewith increasing the portion of PG on the surface of the nanoemulsion droplets decreased the zeta potential of the nanoemulsions.

Figure 3d shows the resulting osmolalities of the screened nanoemulsions, which were determined by cryoscopy. All produced nanoemulsions were nearly isotonic at osmolalities between 283 and 318 mosmol/kg.

3.2. Physicochemical Properties of the Three Chosen Negatively Surface-Charged Nanoemulsions

For further *in vitro* and *in vivo* investigation, three compositions were chosen with the targeted particle sizes of 50, 100, and 150 nm, and the most possible negative zeta potentials. Thereby, these three compositions had the lowest investigated MHS mass share of 2.67 wt.%, since this non-ionic surfactant was determined as the main potentially toxic ingredient of previously investigated isotonic and neutral surface-charged nanoemulsions [23]. Negatively surface-charged nanoemulsions of different particle sizes were reproducible and formed by only adjusting the PG mass shares to 1.60 wt.% for the negative NE50 (red bars), 0.80 wt.% PG for the negative NE100 (blue bars), and 0.27 wt.% PG for the negative NE150 (green bars), as shown with their resulting physicochemical properties in Figure 4. By adjusting only the PG mass shares to 1.60 wt.% for the negative NE50 (red bars), to 0.80 wt.% for the negative NE100 (green bars), and to 0.27 wt.% for the negative NE150 (green bars), the three targeted nanoemulsion formulations were reproducibly formed with the in Figure 4 depicted physico-chemical properties.

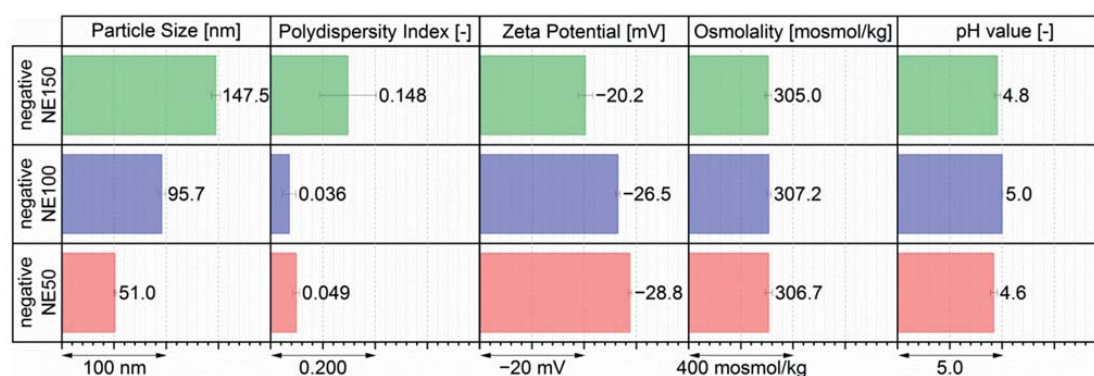


Figure 4. Physicochemical properties of the three chosen isotonic, negatively surface-charged nanoemulsions for the animal trials, determined by three individual produced batches.

The three negatively surface-charged nanoemulsions had particle sizes very close to their targeted particle sizes with the negative NE50 at 51.0 nm, the negative NE100 at 95.7 nm, and the negative NE150 at 147.5 nm in diameter. With PDIs below 0.05, both negative NE50 and negative NE100 had very narrow monomodal size distributions, as shown in the Supplementary Figure S3a. The PDI of 0.148 indicated as well a narrow monomodal size distribution for the negative NE150 (Figure S3a). The zeta potentials of these three nanoemulsions were determined at -28.8 mV for the negative NE50, -26.5 mV for the negative NE100, and -20.2 mV for the negative NE150. All three nanoemulsion compositions were isotonic with osmolalities between 305.0 to 307.2 mosmol/kg, thus

ensuring a painless i.v. application without any vascular damage [41,42]. The pH values between 4.6 and 5.0 indicated a slight acidity of the three nanoemulsions but were still within the acceptable range of pH 3–11 for small volume i.v. injections [41,43]. Within the short time between the aseptic nanoemulsion preparation one day before i.v. application until the end of the animal trials, acid-induced degradation of the incorporated fluorescent dye DiR for the in vivo fluorescence imaging was very unlikely, since DiR was described as chemically stable for pH values above 4.0 [39].

3.3. Longterm Stability

As metastable systems, nanoemulsions are prone to physical destabilization through flocculation, coalescence, Ostwald ripening, or even creaming at various timescales, which may take up to many months or years [44,45]. Therefore, the three negatively surface-charged nanoemulsions were investigated against possible physical destabilization according to the ICH guidelines of Q1A at 5 ± 3 °C, room temperature, and 40 ± 2 °C. Figure 5 shows their changes in particle size and PDI over 12 weeks at the three recommended storage conditions.

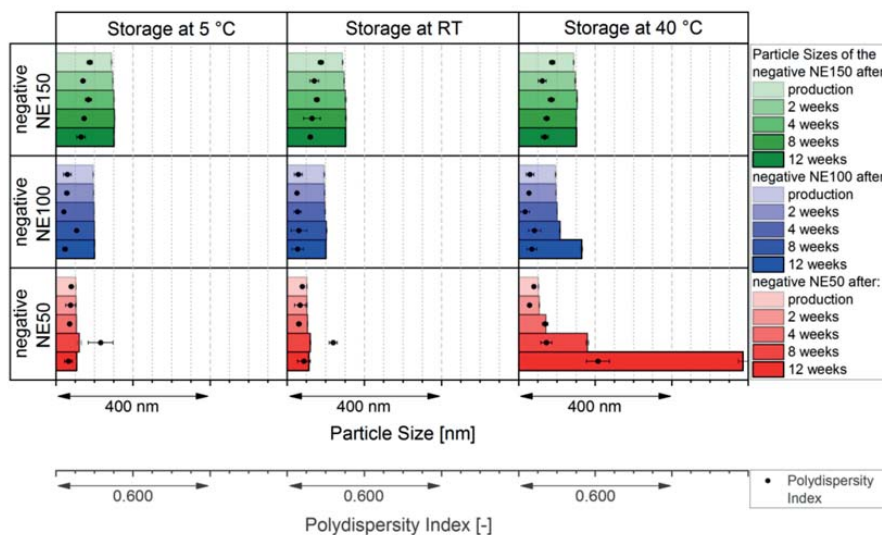


Figure 5. Long-term stability of the three negatively surface-charged nanoemulsions at the recommended storage conditions according to the ICH guidelines Q1A of 5 ± 3 °C, room temperature (RT), and 40 ± 2 °C.

At both storing conditions of 5 ± 3 °C and room temperature, all three negatively surface-charged nanoemulsions showed sufficient stability of their particle size over the complete time of 12 weeks. Their intensity weighed particle size distributions stayed monomodal and still narrowly distributed, as shown in the Supplementary Figure S3b,c. Exposing the negatively surface-charged nanoemulsions to increased thermal stress of 40 ± 2 °C, led to a small increase of the particle size of the negative NE50 after four weeks of storage, which further increased up to 587 nm after 12 weeks of storage. The intensity weighed particle size distribution became bimodal and broadly distributed, as shown in the Supplementary Figure S3d. While the particle size of the negative NE100 increased slightly after 12 weeks of storage at 40 ± 2 °C with a shift of the intensity weighed size distribution to bigger particle sizes (Figure S3d), the particle size of the negative NE150 stayed stable throughout the complete investigated time with a remaining narrow intensity weighed particle size distribution (Figure S3d).

3.4. Cellular Toxicity

The cellular toxicity of the negatively surface-charged nanoemulsion was determined by resazurin reduction assays with 3T3 as well as NHDF fibroblasts after 24 h of incubation. The resulting dose-response curves of the cell viability against the concentration of the three nanoemulsions are shown in Figure 6.

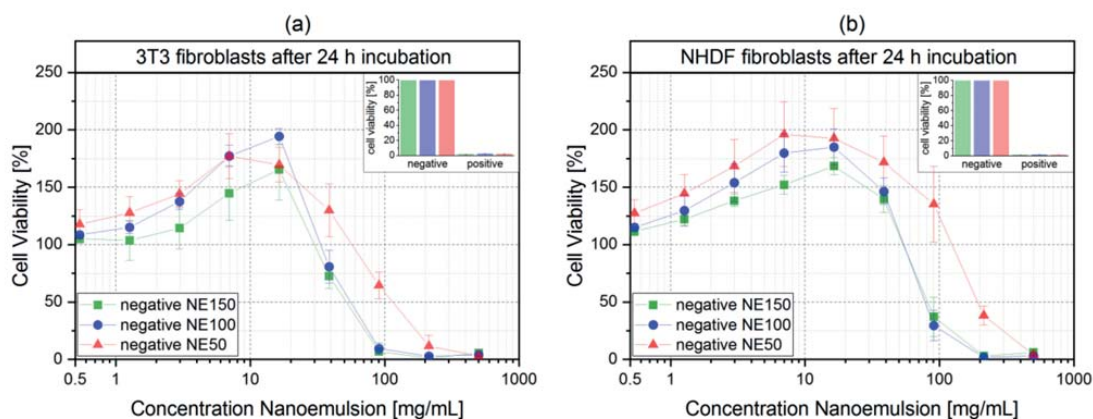


Figure 6. Dose-response curves of the cell viability over the total mass nanoemulsion (DiR loaded MCT, PG, MHS + aqueous phase) per 1mL cell culture media on (a) 3T3 and (b) NHDF fibroblasts after 24 h incubation with the three negatively surface-charged nanoemulsions, determined by three individual incubated batches (eight replicates per run); the inset graphs show the corresponding negative and positive controls with the untreated or TritonTM X-100 treated cells, respectively.

With increasing nanoemulsion concentration, all three nanoemulsions revealed growth-promoting effects. Thereby, the negative NE50 had its maximal cell viability at a nanoemulsion concentration of 7.0 mg/mL for both fibroblasts lines. The negative NE100 and negative NE150 had both their maximal cell viabilities at 16.4 mg/mL for both fibroblasts lines. With increasing concentrations beyond their maxima, cytotoxic effects became dominant, leading to a rapid decrease in cell viability for the negative NE100 and NE150 for both fibroblast lines and less rapid for the negative NE50. This less rapid decrease in cell viability for the negative NE50 might derive from a more robust surfactant layer by higher electrostatic forces through the high amount of incorporated anionic phospholipid PG in the stabilizing layer of the negative NE50 nanoemulsion droplets. The cytotoxic effects of the three negatively surface-charged nanoemulsions were likely induced by the non-ionic surfactant MHS, which was detected in previous research as the main cell viability inhibiting ingredient on various cell lines [23,46–48]. Thereby, a formation of needle-like 12 hydroxystearic acid crystals as a metabolic degradation product of MHS likely caused cell death *in vitro* [23]. A similar formation of the needle-like 12 hydroxystearic acid crystal formation was observed for the negatively surface-charged nanoemulsions, as shown in the Supplementary Figure S4.

However, such a crystal formation is unlikely to occur *in vivo* because of different transport and metabolic conditions. Instead, 12 hydroxystearic acid was found to be deposited in the body lipids, mainly in the abdominal fat, after feeding rats with a 12 hydroxystearic acid-containing diet for up to 16 weeks. Furthermore, the 12 hydroxystearic acid was degraded to its metabolites 10 hydroxypalmitic acid and 8 hydroxymyristic acid by successive losses of two carbon units at the carboxyl end of the fatty acid chain [49]. Another *in vivo* study showed a rapid breakdown of the 12 hydroxystearic acid, where only one-fifth of the radioactively labeled 12 hydroxystearic acid could be recovered 5 min after *i.v.* injection from the whole rat [50].

Since the dose-response curves of the cell viabilities did not show a sigmoidal curve, the median inhibitory concentrations IC₅₀ of the three nanoemulsions were determined by linear interpolation between the two data points above and below 50% cell viability. The calculated IC₅₀ values, at which the fibroblasts possess half the viability of untreated cells, are displayed in Figure 7 for both fibroblast lines.

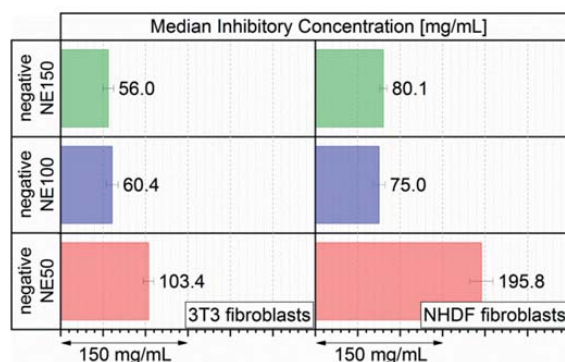


Figure 7. IC₅₀ as the total mass of the three negatively surface-charged nanoemulsions (DiR loaded MCT, PG, MHS + aqueous phase) per mL cell culture media on 3T3 and NHDF fibroblasts after 24 h incubation, determined by three individual incubated batches (eight replicates per run).

After 24 h incubation, both negative NE100 and negative NE150 had similar IC₅₀ values at concentrations of 56.0 and 60.4 mg/mL (3T3 fibroblasts) as well as 80.1 and 75.0 mg/mL (NHDF fibroblasts), respectively. The negative NE50 had substantially higher IC₅₀ values at 103.4 mg/mL (3T3 fibroblasts) and 195.8 mg/mL (NHDF fibroblasts), resulting from the previously discussed less rapid decrease of both 3T3 and NHDF dose-response curves in comparison to the 3T3 and NHDF dose-response curves with the negative NE100 and negative NE150. In comparison, these three negatively surface-charged nanoemulsions had substantially higher IC₅₀ values than previously investigated neutral surface-charged MCT nanoemulsions with equivalent particle sizes. Their IC₅₀ values after 24 h incubation were determined to be between 14.6 to 32.3 mg/mL (3T3 fibroblasts) or 23.9 to 51.5 mg/mL (NHDF fibroblasts), depending on their particle size and consequently on their MHS content [24]. The almost doubled IC₅₀ values of these three nanoemulsions were derived by reducing the potentially cytotoxic MHS concentrations from 4.0–8.8 wt.% for the neutral surface-charged nanoemulsions (depending on the targeted particle size) down to 2.67 wt.% for the negatively surface-charged nanoemulsions for all three targeted particle sizes. Hence, the incorporation of the anionic phospholipid PG into the stabilizing layer of the MCT nanoemulsion droplets decreased the cytotoxicity substantially in comparison to the neutral surface-charged MCT nanoemulsions. Therefore, the safety for a complication-free i.v. application was increased by maintaining equivalent targeted particle sizes.

3.5. Blood Cell Interaction

The interaction of blood cells with the three negatively surface-charged nanoemulsions loaded with the fluorescent dye DiR was investigated by incubating a volume of 50 µL of every nanoemulsion in 100 µL sodium citrate stabilized whole mouse blood for 4 h at room temperature. The portions of the detected fluorescent signal of both separated plasma and blood fractions were calculated as PARE and are displayed in Figure 8. The PARE of the blood cell fraction slightly increased from 0.2% to 0.9% with decreasing particle size. This derived either by a marginal cellular uptake of the smaller sized nanoemulsion droplets into the blood cells or by a very small amount of transferred DiR molecules from the lipid core of the nanoemulsion droplets through the blood cell membranes because

of a highly increased specific surface area available for such a transfer by downsizing the nanoemulsion droplets. Overall, the very low PARE of the blood cell fraction indicated that all three nanoemulsions merely interacted with the blood cells and that for the most part the highly lipophilic fluorescent dye DiR with a reported logP of 17.4 [38] stayed inert in the MCT core of the negatively surface-charged nanoemulsions, similar to previously investigated neutral surface-charged nanoemulsions of the same particle size range [24].

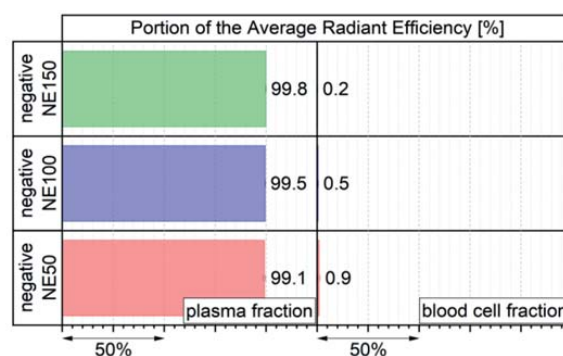


Figure 8. PARE in plasma and blood cell fractions after 4 h of incubation with the three negatively surface-charged nanoemulsions, determined by three individual incubated batches.

3.6. In Vivo Fluorescence Imaging

The incorporation of the near-infrared fluorescent dye DiR into the lipid core enabled the detection of accumulating nanoemulsions in larger tissue depths, avoiding the light adsorption of tissue cell components in ultraviolet and visible wavelengths [34]. The accumulation of the three negatively surface-charged nanoemulsions in adult mice (age: 15–30 weeks) was monitored in vivo by noninvasive fluorescence imaging directly after the i.v. application into the tail vein (5–10 min), and again 24 h thereafter. Figure 9 shows the lateral, ventral, and dorsal in vivo fluorescence images of the representative mice (one for each nanoemulsion according to Equation (10)). For better comparability of the biodistribution profiles affected by the nanoemulsion particle design, the results of the animal trials with the previously developed neutral surface-charged nanoemulsions i.v. injected in adult SKH1-*Hr^{fl}* Elite mice (age: 12–39 weeks) are included in the following figures. Their particle properties were reported with particle sizes of 25.7 nm (neutral NE25), 50.5 nm (neutral NE50), 97.7 nm (neutral NE100), and 144.9 nm (neutral NE150) at zeta potentials between -2 to -3 mV at pH 7.4 [24]. Thereby, their MCT concentration of 8.0 wt.% as well as their DiR-load of 0.1 mg/g were exactly similar to the MCT concentration and DiR load of the negatively surface-charged nanoemulsions and therefore suitable for a direct comparison by fluorescence imaging.

The previously investigated neutral surface-charged nanoemulsions were reported to accumulate in the liver quickly after their i.v. application [24], which was observed as well for all three negatively surface-charged nanoemulsions in the ventral view, as shown by the white arrows. This indicated a rapid hepatic uptake of both types of nanoemulsions into the RES, involving the Kupffer cell-mediated phagocytosis in the liver similar to a variety of other nanoparticulate formulations observed within a few minutes to 1.5 h after parenteral application [8,51–54]. The intensity of the fluorescence signal, stated as radiant efficiency, increased for the liver within 24 h after the i.v. application. Thereby, the radiant efficiency increased moderately for all three negatively surface-charged nanoemulsions, contrary to the previously investigated neutral surface-charged nanoemulsions, where the highest radiant efficiencies in the liver were detected, especially for the small-sized formulations NE25 and NE50 [24]. This indicated that the incorporation of the anionic phospholipid PG into the stabilizing layer and hence the targeted decrease of zeta potential

from nearly neutral down to at least -20.2 mV might lead to a more wide biodistribution of the negatively surface-charged nanoemulsions across other organs, which was observed as well for negatively surface-charged PG liposomes in comparison to neutral surface-charged phosphatidylserine liposomes [54]. Despite the hepatic accumulation, ovarian accumulation was detected 24 h after i.v. application of the three negatively surface-charged nanoemulsions in the adult mice. Depending on the reproductive aging of the mice, this phenomenon was as well detected in all four previously investigated neutral surface-charged nanoemulsions. Thereby, nearly no ovarian accumulation was detected before the onset of puberty, peaking at its maximum during the most fertile lifetime of adulthood, and then decreasing again with increasing senescence of the mice [24].

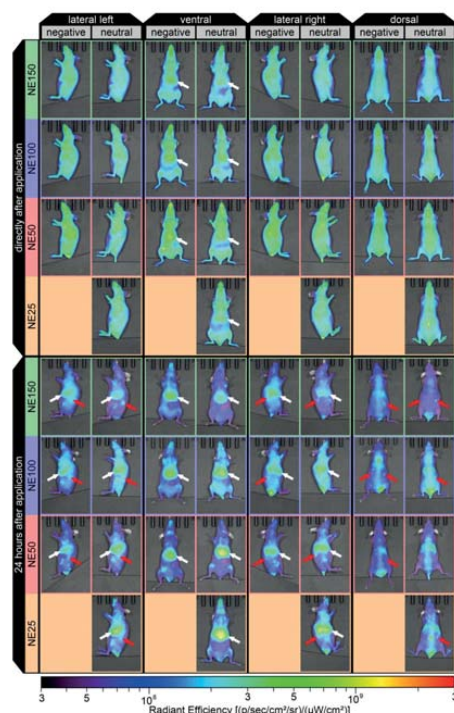


Figure 9. Noninvasive in vivo fluorescence images of the representative mice directly after (5–10 min) and 24 h after i.v. injection with the three negatively surface-charged nanoemulsions and an additional four previously investigated neutral surface-charged nanoemulsions [24].

3.7. Ex Vivo Fluorescence Imaging and Biodistribution of the Nanoemulsions

For ex vivo analysis, the mice were sacrificed 24 h after their i.v. injection. Seventeen organs were excised and whole blood was withdrawn by heart puncture during necropsy. Ex vivo fluorescence imaging was conducted of the excised organs and the withdrawn whole blood. Around the outlines of every single organ, a ROI was drawn using the PerkinElmer® Living Image® 4.7.3 Software to determine the fluorescence intensity as ARE. The PARE of every single organ was calculated for each mouse according to Equation (8), followed by the mean PAREs for the five mice per nanoemulsion formulation according to Equation (9), which are provided in the Supplementary Table S1. Because of the small number of samples of five mice per i.v. injected nanoemulsion formulation, statistical analysis was performed with MWU. The results are provided in Supplementary Tables S2–S4. Figure 10 gives an overview of all calculated mean PAREs of the three negatively surface-charged nanoemulsions and, additionally, for better comparability, the four previously

investigated neutral surface-charged nanoemulsions [24]. Thereby, the mean PARE and the individual PARE values of every single mouse are plotted as a combined 3D bar chart and 3D scatter chart, respectively. Depending on their targeted particle size, the nanoemulsion formulations NE25 (orange bars and scatter), NE50 (red), NE100 (blue), and NE150 (green) are plotted according to their negative or neutral zeta potential along the *x*-axis. The ex vivo excised organs are plotted against the *y*-axis, while the mean and individual PARE values of the mice are plotted along the *z*-axis.

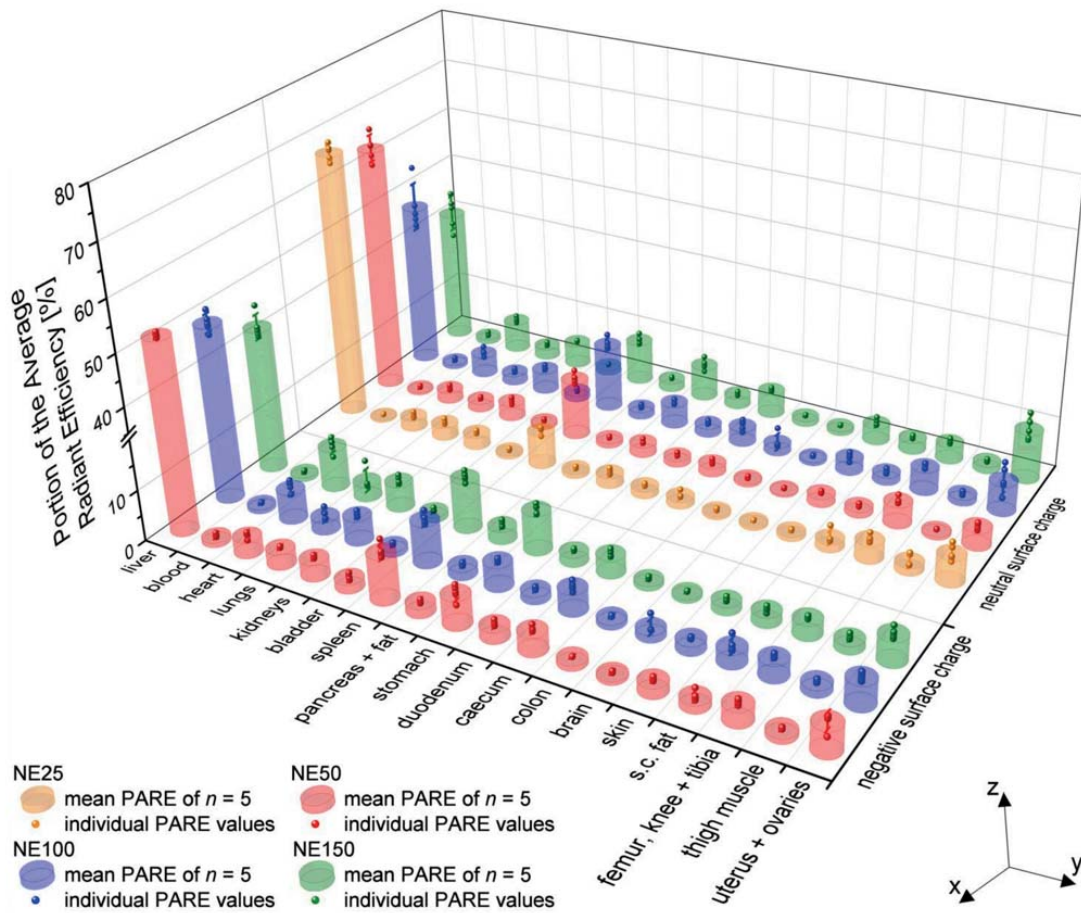


Figure 10. 3D bar and scatter chart of the PARE of the ex vivo excised organs and blood, 24 h after i.v. injection of the three negatively surface-charged nanoemulsions and additionally four previously investigated neutral surface-charged nanoemulsions [24].

Additional to the overview of all excised organs, the mean PARE of the seven organs with the highest accumulations (liver, spleen, uterus + ovaries, heart, stomach, kidneys, and caecum) are plotted as contour plots against the particle size of both negatively and neutral surface-charged nanoemulsion formulations and their corresponding zeta potential in Figure 11. Each black dot represents the exact particle size and zeta potential of the nanoemulsions.

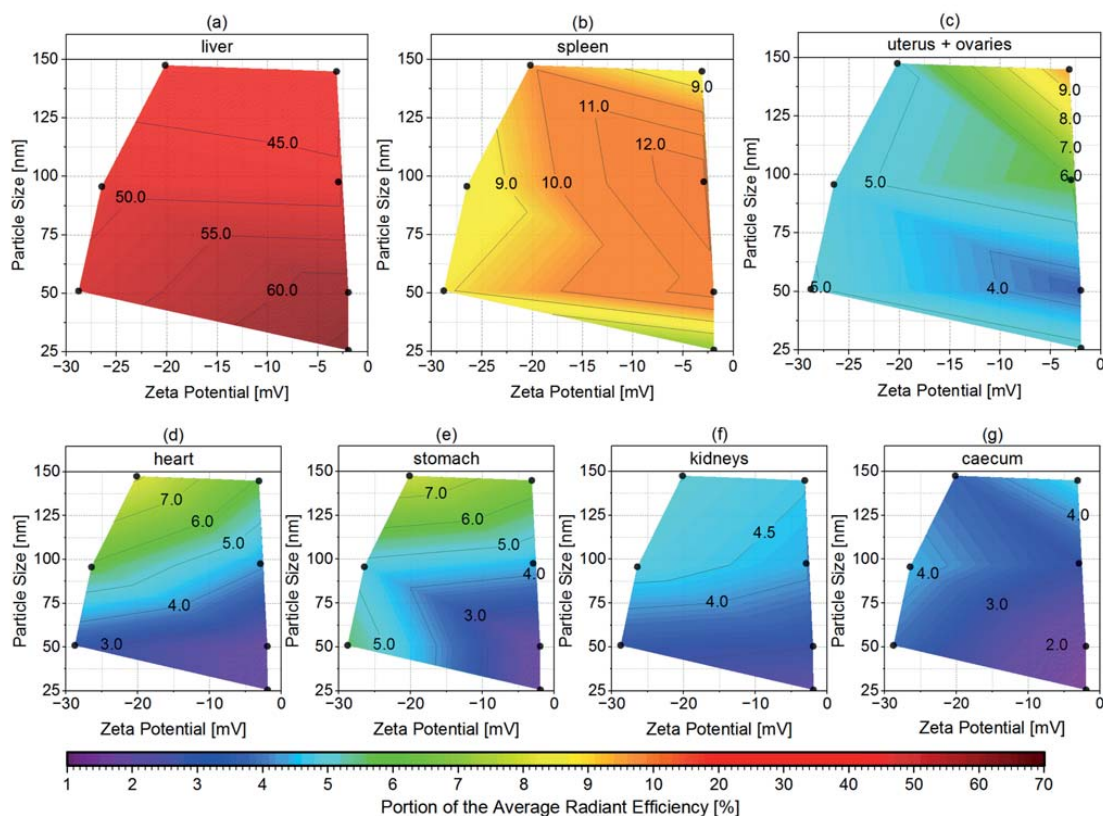


Figure 11. Logarithmic contour plots of the mean PARE for the organs with the highest accumulations ((a) liver, (b) spleen, (c) uterus + ovaries, (d) heart, (e) stomach, (f) kidneys, and (g) caecum) plotted against the particle size and the zeta potential of the three i.v. injected negatively surface-charged nanoemulsions and the additional four previously investigated neutral surface-charged nanoemulsions [24], displayed as •.

Blood was withdrawn by heart puncture after scarification to verify a complete accumulation of the i.v. injected nanoemulsions from the bloodstream into the organ tissue. With all mean PAREs of the blood below 1%, nearly no nanoemulsion droplets did circulate in the bloodstream anymore for all three negatively surface-charged nanoemulsion formulations, similar to the four previously investigated neutral surface-charged nanoemulsions [24]. The nanoemulsion formulations either accumulated in the organ tissue within 24 h after i.v. application or were already excreted hepatically.

The highest accumulation for all three negatively surface-charged nanoemulsions was detected in the liver tissue, since the liver takes up to 80–90% of the RES function [52,55,56]. The PAREs decreased significantly with increasing particle size, from 51.8% mean PARE for the negative NE50 (zeta potential of -28.8 mV) down to 42.1% mean PARE for the negative NE150 (zeta potential of -20.2 mV), as shown in Figure 11a. Thereby, the significance was prominent between all three particle sizes. In comparison with the previously investigated neutral surface-charged nanoemulsions with zeta potentials between -2.0 and -3.2 mV, the hepatic accumulation was even more dependent on the particle size, decreasing significantly from 66.2% mean PARE for the smallest nanoemulsion NE25 down to 40.3% mean PARE for the NE150 in adult mice [24]. MWU of the similar-sized nanoemulsions with neutral and negative surface charge revealed a significant reduction of the PAREs by the incorporation of the anionic PG into the stabilizing layer of the NE50. For the nanoemulsions NE100 and

NE150, the negative surface charge did not change the PAREs significantly in comparison to the neutral surface charge.

Containing reticular cells, the spleen and bone marrow are further parts of the RES as well [57]. The particle size of the negatively surface-charged nanoemulsions had no significant effect on the PARE values and thus on the accumulation in the spleen with mean PAREs between 8.2 and 9.9%, as shown in Figure 11b. In contrast, the particle size of the previously investigated neutral surface-charged nanoemulsions had significant effects on the PARE values with mean PAREs between 6.7 and 12.9%, with their maximum peak at a particle size of 100 nm [24]. Except for the pair of the neutral NE50 and NE100, the significance was prominent between all other pairs of the four different particle sizes. The surface charge of similar-sized nanoemulsions had significant effects on the PARE values. The accumulation in the excised femur, knee, and tibia showed no dependency on the particle size for the negatively surface-charged nanoemulsions with mean PAREs between 2.9 to 3.3% (not depicted as logarithmic contour plot). The previously investigated neutral surface-charged nanoemulsions had mean PAREs between 3.3 and 4.6% [24]. Statistical analysis by MWU between the pairs of similar-sized nanoemulsions with the negative and neutral surface charges revealed that the negative NE50 and negative NE100 accumulated significantly lower in the femur, knee, and tibia than their neutral counterparts. No significant effect of the surface charge was found between the accumulation of the neutral NE150 and negative NE150. Therefore, the detected accumulation in the excised femur, knee, and tibia was probably caused by the uptake of the nanoemulsions into the bone marrow as part of the RES.

The previously investigated neutral surface-charged nanoemulsions revealed a particle size dependency for the accumulation in the reproductive female sex organs uteri and ovaries, especially during their fertile lifetime period in adult mice with up to 9.8% mean PARE for the neutral NE150. The PAREs of the neutral NE150 were significantly higher than the PAREs of the smaller-sized neutral surface-charged nanoemulsions, and therefore may be suitable for the treatment of ovarian diseases or dysfunctions [24]. In contrast to that, all three negatively surface-charged nanoemulsions accumulated independently of their particle size in the female sex organs with nearly identically mean PAREs between 4.8 and 5.1%, as shown in Figure 11c. There was no significant difference in the PAREs caused by the nanoemulsion particle size. Consequently, unintended accumulation of these nanoemulsions in the female sex organs remained at low amounts through the implementation of innovative particle design by incorporation of the anionic phospholipid PG into the stabilizing MHS layer. As a result, the possibility of side effects in the ovaries can effectively be reduced while maintaining a tunable biodistribution profile by adjusting the particle size of the negatively surface-charged nanoemulsions.

Dependent on the particle size, the negatively surface-charged nanoemulsions accumulated in the heart and kidneys, as shown in Figure 11d,f. The mean PARE increased with increasing particle size of the nanoemulsions from 3.2% up to 8.1% in the heart and from 3.3% up to 5.0% in the kidneys. Pairwise statistical analysis by MWU revealed that the increase of the PAREs in the heart was significant from the negative NE50 to the negative NE100 and negative NE150. The PAREs between the negative NE100 and negative NE150 were not significant, but the ongoing increasing mean PAREs suggested that the cardiac accumulation further increased with increasing particle size. In the kidneys, the PAREs of the negative NE50 were significantly lower than the similarly high PAREs of the negative NE100 and negative NE150. This accumulation behavior was observed as well but less intensively with the previously investigated neutral surface-charged nanoemulsions: independently of aging for the accumulation in the heart and in the case of the kidney, accumulation increasing with the aging of the mice [24]. Therefore, the surface charge may influence the cardiac accumulation, since the PAREs of the negative NE100 were significantly higher than the neutral NE100. Although the PAREs of the negative NE50 and negative NE150 were not significantly higher than the PAREs of the similar-sized neutral surface-charged nanoemulsions, their higher mean PAREs suggested an increased cardiac

accumulation through the modified negative surface of the nanoemulsion droplets. For the accumulation in the kidneys, no significant effects of the surface charge were detected. The effect of particle size on the accumulation in the heart and kidneys was found as well with other i.v. injected nanoparticulate formulations: gold nanoparticles showed an increasing particle size-dependent heart accumulation in pregnant and non-pregnant mice [58], as well as lipid nanocapsules for both heart and kidney accumulation in mice aged 6–8 weeks [59].

As shown in Figure 11e,g, mean PAREs were detected with up to 7.7% in the stomach with the negative NE150 significantly higher than the smaller-sized negatively surface-charged nanoemulsions and up to 4.3% in the caecum with no significant effect of the particle size for the negatively surface-charged nanoemulsions, but significant for the neutral surface-charged nanoemulsions. This increased fluorescence signal might derive partially from coprophagy, which was found to begin in the mice age of 2.5 weeks, peak at age five to six weeks with 13 pellets per day, and decreases gradually down to 2.1 pellets daily at an age of 78 weeks [60]. Hence, the adult mice aged 15–30 weeks might reuptake the excreted fluorescent dye DiR into their gastrointestinal tract, which probably already left the body hepatically. Similar observations were made with the previously investigated neutral surface-charged nanoemulsions: a substantial fluorescence signal in the stomach and caecum were found to increase with aging in adult and senescent mice at an age <12 weeks, but not in juvenile mice at an age of three to four weeks, although coprophagy was occurring. Therefore, it was found that the increasing fluorescence signal with aging after puberty stood in contrast to the decreasing coprophagic activity [24]. Consequently, the detected fluorescence signal of the negatively surface-charged nanoemulsions in the stomach and caecum derived likely not only by coprophagy but also through aging effects after puberty, where the RES capacity was found to decline [51–53]. This might lead to the more widely distributed accumulation of the negatively surface-charged nanoemulsions in the adult mice across the described other non-RES organs including the uterus, ovaries, heart, stomach, kidneys, and caecum, similar to the previous investigated neutral surface-charged nanoemulsions [24].

All other excised organs (lungs, s.c. fat, pancreas and fat, duodenum, skin, bladder, brain, thigh muscle, and colon) had mean PAREs below 3.0% (in declining order), and thus had just a marginal accumulation of the negatively surface-charged nanoemulsions similar to the previously investigated neutral surface-charged nanoemulsions [24].

Figure 12 shows ex vivo fluorescent images of the seven excised organs with the highest negatively surface-charged nanoemulsions accumulations of the representative mice (one for each nanoemulsion according to Equation (10)). The previously discussed courses of the mean PAREs were confirmed by these ex vivo images, in which the radiant efficiency was mostly evenly distributed over the organs with no distinctive hot spots, except for the female sex organs. The hot spots with high radiant efficiency in the female sex organs were detected in the ovaries for both negatively and the previously investigated neutral surface-charged nanoemulsions [24], as well as many other different lipid or polymer nanoparticulate DDS by fluorescent and nuclear imaging [4,7,8,11–13].

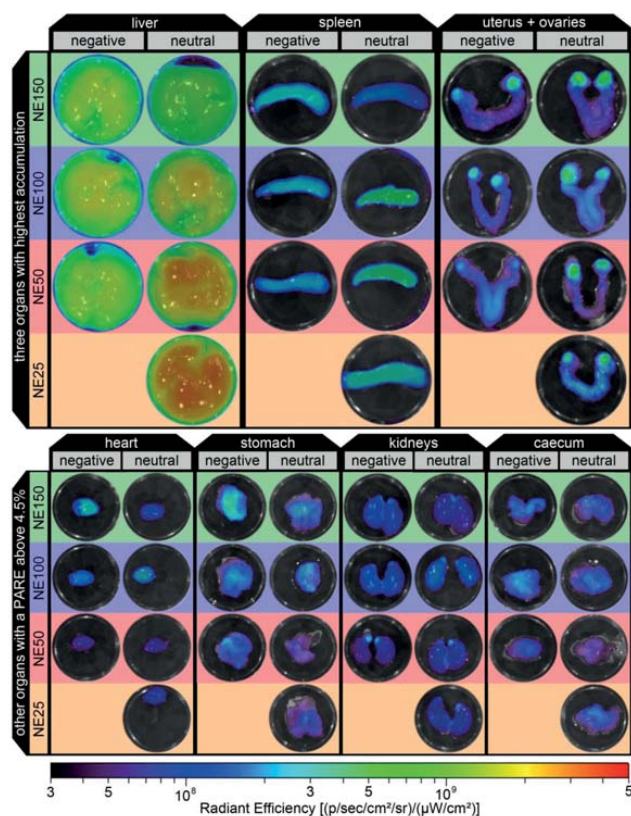


Figure 12. Ex vivo fluorescence images of the excised organs with the highest accumulation (liver, spleen, uterus + ovaries, heart, stomach, kidneys, and caecum) of the representative mice with the three i.v. injected negatively surface-charged nanoemulsions and additionally four previously investigated neutral surface-charged nanoemulsions [24].

4. Conclusions

Particle engineering of nanoemulsions was successfully applied by the incorporation of the anionic phospholipid PG into the stabilizing MHS layer of the nanoemulsion droplets. Therewith, the tunable particle properties' particle size and negative surface charge were achieved. The negatively surface-charged nanoemulsions showed a greatly reduced cellular toxicity on 3T3 and NHDF fibroblasts in comparison to previously investigated neutral surface-charged nanoemulsions of the same particle sizes without any incorporated phospholipids in their stabilizing layer.

The tailor-made nanoemulsion properties' surface charge and particle size greatly influenced the biodistribution profile in the following pattern: by far the highest accumulation was expectedly found in the liver, which significantly decreased with increasing particle size for both negatively and neutral surface-charged nanoemulsions. While no significant effect of the particle size was detected for the accumulation in the spleen with the negatively surface-charged nanoemulsions, the particle size of the neutral surface-charged nanoemulsions showed significant effects with its maximal accumulation of the neutral NE100 at 13% mean PARE. The accumulation in the heart significantly increased with the increasing of the particle size of both negatively and neutral surface-charged nanoemulsions. As a result, the negatively surface-charged nanoemulsions had higher degrees of cardiac accumulation than their similar-sized neutral surface-charged counterparts. Furthermore, the particle size significantly affected the accumulation in the stomach with

their maxima at the biggest particle size for both negatively and neutral surface-charged nanoemulsions. Interestingly, the particle size of the negatively surface-charged nanoemulsions did not affect the accumulation in the female sex organs, since all three different-sized formulations accumulated nearly identically at mean PAREs of 5%. In contrast, the neutral surface-charged nanoemulsions accumulated dependent on their particle size, where the highest accumulation of the neutral NE150 with 10% mean PARE significantly differed from the smaller-sized formulations. The mean PAREs of all other organs were below 5% for all formulations.

Consequently, innovative particle engineering of these nanoemulsions proved to be a powerful tool to alter the biodistribution profile and thereby to modify the accumulation in different organs. Of special interest was the accumulation in the female sex organs with hot spots in the ovaries: the accumulation of the nanoemulsions remained at constant low amounts through the implemented negative surface charge for all three tested particle sizes. Thus, possible side effects through unintended drug delivery or nanotoxicology of the carrier itself can effectively be reduced while maintaining a tunable biodistribution profile by adjusting the particle size of the negatively surface-charged nanoemulsions. In case a drug delivery into the ovarian tissue is desired, using the previously investigated neutral surface-charged nanoemulsions with the biggest particle size of 150 nm in diameter might increase the treatment success of ovarian dysfunctions or diseases, like primary ovarian insufficiency or ovarian cancer, since this formulation showed the highest ovarian accumulation in adult mice [24].

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/pharmaceutics14020301/s1>, Figure S1: The ideal osmolality of aqueous sodium chloride solutions after Ph.Eur. 2.2.35 and experimental (exp.) determined osmolality of aqueous dissolved MHS and PG., Figure S2: Scatter plots showing (a) the resulting particle diameter, (b) the PDI, (c) the zeta potential at pH 7.4, and (d) the osmolality of the screening trials against the PG:MHS ratio at a constant MCT mass share of 8 wt.%, Figure S3: Particle size distributions of the negatively surface-charged nanoemulsions (a) after production and after 12 weeks of storage at the recommended storage conditions according to the ICH guidelines Q1A of (b) 5 ± 3 °C, (c) room temperature (RT), and (d) 40 ± 2 °C., Figure S4: Phase contrast microscopy images at 20x magnification showing the morphology changes of the 3T3 and NHDF fibro-blasts with increasing nanoemulsion concentration including the formation of needle-like 12 hydroxystearic acid crystals after 24 h incubation with the negatively surface charged nanoemulsions NE50, NE100, NE150, and a 20 wt.% MHS aqueous (aq.) solution (*negative control, mean cell viability \pm standard deviation given as a percentage in the microscopy images)., Table S1: Mean PARE values plus standard deviation ($n = 5$) of each excised organ plus withdrawn blood of the adult mice i.v. injected with the negative NE50, NE100, or NE150 nanoemulsions and additionally previously investigated neutral NE25, NE50, NE100, or NE150 nanoemulsions., Table S2: Calculated 2-sided exact significance p and corresponding U value of the OAREs with the three negatively surface-charged nanoemulsions by MWU, showing the effects of the particle size onto the PAREs., Table S3: Calculated 2-sided exact significance p and corresponding U value of the PAREs with the four neutral surface-charged nanoemulsions by MWU, showing the effects of the particle size onto the PAREs., Table S4: Calculated 2-sided exact significance p and corresponding U value of the PAREs with similar-sized nanoemulsions with negative and neutral surface charge by MWU, showing the effects of the surface charge onto the PAREs.

Author Contributions: Conceptualization, E.F.B. and H.L.; methodology, E.F.B. and H.L.; software, E.F.B.; validation, E.F.B. and H.L.; formal analysis, E.F.B.; investigation, E.F.B. and H.L.; resources, H.L.; data curation, E.F.B.; writing—original draft preparation, E.F.B.; writing—review and editing, H.L.; visualization, E.F.B.; supervision, H.L.; project administration, H.L.; funding acquisition, H.L. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the German animal welfare act (TierSchG) and to the guidelines of the Declaration of Helsinki. The study was approved by the Institutional Review Board of Saxony Anhalt, Germany (protocol code 42502-2-1456 MLU, date of approval the 18 January 2018).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: We thankfully acknowledge the donation of Kollisolv[®] MCT 70 and Kolliphor[®] HS 15 by BASF SE, as well LIPOID EPG by Lipoid GmbH. We greatly thank Karsten Mäder for the fruitful scientific discussions, Jessica Edlich for her assistance with the statistic calculations, as well as Birgit Kunst plus the complete animal caretaker team of the ZMG of the Martin Luther University Halle-Wittenberg for breeding the mice and animal husbandry. We acknowledge the financial support of the Open Access Publication Fund of the Martin-Luther-University Halle-Wittenberg.

Conflicts of Interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

References

1. Di, J.; Gao, X.; Du, Y.; Zhang, H.; Gao, J.; Zheng, A. Size, shape, charge and “stealthy” surface: Carrier properties affect the drug circulation time in vivo. *Asian J. Pharm. Sci.* **2020**, *16*, 444–458. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Kalepu, S.; Nekkanti, V. Insoluble drug delivery strategies: Review of recent advances and business prospects. *Acta Pharm. Sin. B* **2015**, *5*, 442–453. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Loftsson, T.; Brewster, M.E. Pharmaceutical applications of cyclodextrins: Basic science and product development. *J. Pharm. Pharmacol.* **2010**, *62*, 1607–1621. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Fan, W.; Yu, Z.; Peng, H.; He, H.; Lu, Y.; Qi, J.; Dong, X.; Zhao, W.; Wu, W. Effect of particle size on the pharmacokinetics and biodistribution of parenteral nanoemulsions. *Int. J. Pharm.* **2020**, *586*, 119551. [[CrossRef](#)]
5. Hörmann, K.; Zimmer, A. Drug delivery and drug targeting with parenteral lipid nanoemulsions—A review. *J. Control. Release* **2016**, *223*, 85–98. [[CrossRef](#)]
6. Ema, M.; Okuda, H.; Gamo, M.; Honda, K. A review of reproductive and developmental toxicity of silver nanoparticles in laboratory animals. *Reprod. Toxicol.* **2017**, *67*, 149–164. [[CrossRef](#)]
7. Schädlich, A.; Hoffmann, S.; Mueller, T.; Caysa, H.; Rose, C.; Göpferich, A.; Li, J.; Kuntsche, J.; Mäder, K. Accumulation of nanocarriers in the ovary: A neglected toxicity risk? *J. Control. Release* **2012**, *160*, 105–112. [[CrossRef](#)]
8. Hirsjärvi, S.; Sancey, L.; Dufort, S.; Belloche, C.; Vanpouille-Box, C.; Garcion, E.; Coll, J.-L.; Hindré, F.; Benoît, J.-P. Effect of particle size on the biodistribution of lipid nanocapsules: Comparison between nuclear and fluorescence imaging and counting. *Int. J. Pharm.* **2013**, *453*, 594–600. [[CrossRef](#)]
9. El-Nouri, M.A.; Azmy, O.M.; Elshal, A.O.I.; Ragab, A.M.H.; Elsherbini, E.-S.A.-M. Study of the Effect of Silver Nanoparticles Exposure on the Ovary of Rats. *Life Sci. J.* **2013**, *10*, 1887–1894.
10. Han, J.W.; Jeong, J.-K.; Gurunathan, S.; Choi, Y.-J.; Das, J.; Kwon, D.-N.; Cho, S.-G.; Park, C.; Seo, H.G.; Park, J.-K.; et al. Male- and female-derived somatic and germ cell-specific toxicity of silver nanoparticles in mouse. *Nanotoxicology* **2015**, *10*, 361–373. [[CrossRef](#)]
11. Mérian, J.; Boisgard, R.; Declèves, X.; Thezé, B.; Texier, I.; Tavitian, B. Synthetic Lipid Nanoparticles Targeting Steroid Organs. *J. Nucl. Med.* **2013**, *54*, 1996–2003. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Lainé, A.-L.; Gravier, J.; Henry, M.; Sancey, L.; Béjaud, J.; Pancani, E.; Wiber, M.; Texier, I.; Coll, J.-L.; Benoit, J.-P.; et al. Conventional versus stealth lipid nanoparticles: Formulation and in vivo fate prediction through FRET monitoring. *J. Control. Release* **2014**, *188*, 1–8. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Weiss, V.M.; Lucas, H.; Mueller, T.; Chytil, P.; Etrych, T.; Naolou, T.; Kressler, J.; Mäder, K. Intended and Unintended Targeting of Polymeric Nanocarriers: The Case of Modified Poly(glycerol adipate) Nanoparticles. *Macromol. Biosci.* **2017**, *18*, 1700240. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Barani, M.; Bilal, M.; Sabir, F.; Rahdar, A.; Kyzas, G.Z. Nanotechnology in ovarian cancer: Diagnosis and treatment. *Life Sci.* **2021**, *266*, 118914. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Khalifa, A.M.; Elsheikh, M.A.; Khalifa, A.M.; Elnaggar, Y.S. Current strategies for different paclitaxel-loaded Nano-delivery Systems towards therapeutic applications for ovarian carcinoma: A review article. *J. Control. Release* **2019**, *311–312*, 125–137. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Satpathy, M.; Wang, L.; Zielinski, R.J.; Qian, W.; Wang, Y.A.; Mohs, A.; Kairdolf, B.A.; Ji, X.; Capala, J.; Lipowska, M.; et al. Targeted Drug Delivery and Image-Guided Therapy of Heterogeneous Ovarian Cancer Using HER2-Targeted Theranostic Nanoparticles. *Theranostics* **2019**, *9*, 778–795. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Mangeolle, T.; Yakavets, I.; Marchal, S.; Debayle, M.; Pons, T.; Bezdetnaya, L.; Marchal, F. Fluorescent Nanoparticles for the Guided Surgery of Ovarian Peritoneal Carcinomatosis. *Nanomaterials* **2018**, *8*, 572. [[CrossRef](#)]
18. Perche, F.; Patel, N.R.; Torchilin, V.P. Accumulation and toxicity of antibody-targeted doxorubicin-loaded PEG–PE micelles in ovarian cancer cell spheroid model. *J. Control. Release* **2012**, *164*, 95–102. [[CrossRef](#)]
19. Sullivan, S.D.; Sarrel, P.M.; Nelson, L.M. Hormone replacement therapy in young women with primary ovarian insufficiency and early menopause. *Fertil. Steril.* **2016**, *106*, 1588–1599. [[CrossRef](#)]
20. Wildemeersch, D.; Janssens, D.; Weyers, S. Continuous combined parenteral estrogen substitution and intrauterine progestogen delivery: The ideal HST combination? *Maturitas* **2005**, *51*, 207–214. [[CrossRef](#)]

21. Petersen, S.; Fahr, A.; Bunjes, H. Flow Cytometry as a New Approach To Investigate Drug Transfer between Lipid Particles. *Mol. Pharm.* **2010**, *7*, 350–363. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Finke, J.H.; Richter, C.; Gothsch, T.; Kwade, A.; Büttgenbach, S.; Müller-Goymann, C.C. Coumarin 6 as a fluorescent model drug: How to identify properties of lipid colloidal drug delivery systems via fluorescence spectroscopy? *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2014**, *116*, 1234–1246. [[CrossRef](#)]
23. Busmann, E.F.; Martínez, D.G.; Lucas, H.; Mäder, K. Phase inversion-based nanoemulsions of medium chain triglyceride as potential drug delivery system for parenteral applications. *Beilstein J. Nanotechnol.* **2020**, *11*, 213–224. [[CrossRef](#)]
24. Busmann, E.; Kollan, J.; Mäder, K.; Lucas, H. Ovarian Accumulation of Nanoemulsions: Impact of Mice Age and Particle Size. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 8283. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Furse, S. Is phosphatidylglycerol essential for terrestrial life? *J. Chem. Biol.* **2016**, *10*, 1–9. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Quehenberger, O.; Armando, A.M.; Brown, A.H.; Milne, S.B.; Myers, D.S.; Merrill, A.H.; Bandyopadhyay, S.; Jones, K.N.; Kelly, S.; Shaner, R.L.; et al. Lipidomics reveals a remarkable diversity of lipids in human plasma 1 [S]. *J. Lipid Res.* **2010**, *51*, 3299–3305. [[CrossRef](#)]
27. Veldhuizen, R.; Nag, K.; Orgeig, S.; Possmayer, F. The role of lipids in pulmonary surfactant. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* **1998**, *1408*, 90–108. [[CrossRef](#)]
28. Klein, M.E.; Rieckmann, M.; Lucas, H.; Meister, A.; Loppnow, H.; Mäder, K. Phosphatidylserine (PS) and phosphatidylglycerol (PG) enriched mixed micelles (MM): A new nano-drug delivery system with anti-inflammatory potential? *Eur. J. Pharm. Sci.* **2020**, *152*, 105451. [[CrossRef](#)]
29. Klein, M.E.; Mauch, S.; Rieckmann, M.; Martínez, D.G.; Hause, G.; Noutsias, M.; Hofmann, U.; Lucas, H.; Meister, A.; Ramos, G.; et al. Phosphatidylserine (PS) and phosphatidylglycerol (PG) nanodispersions as potential anti-inflammatory therapeutics: Comparison of in vitro activity and impact of pegylation. *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.* **2019**, *23*, 102096. [[CrossRef](#)]
30. Chen, W.-W.; Chao, Y.-J.; Chang, W.-H.; Chan, J.-F.; Hsu, Y.-H.H. Phosphatidylglycerol Incorporates into Cardiolipin to Improve Mitochondrial Activity and Inhibits Inflammation. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 4919. [[CrossRef](#)]
31. Riehl, M.; Harms, M.; Lucas, H.; Ebensen, T.; Guzmán, C.A.; Mäder, K. Dual dye in-vivo imaging of differentially charged PLGA carriers reveals antigen-depot effect, leading to improved immune responses in preclinical models. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2018**, *117*, 88–97. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Texier, I.; Goutayer, M.; Da Silva, A.; Guyon, L.; Djaker, N.; Jossierand, V.; Neumann, E.; Bibette, J.; Vinet, F. Cyanine-loaded lipid nanoparticles for improved in vivo fluorescence imaging. *J. Biomed. Opt.* **2009**, *14*, 054005. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Eisenblätter, M.; Ehrchen, J.; Varga, G.; Sunderkötter, C.; Heindel, W.; Roth, J.; Bremer, C.; Wall, A. In Vivo Optical Imaging of Cellular Inflammatory Response in Granuloma Formation Using Fluorescence-Labeled Macrophages. *J. Nucl. Med.* **2009**, *50*, 1676–1682. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Leblond, F.; Davis, S.C.; Valdés, P.A.; Pogue, B. Pre-clinical whole-body fluorescence imaging: Review of instruments, methods and applications. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **2010**, *98*, 77–94. [[CrossRef](#)]
35. Etrych, T.; Lucas, H.; Janoušková, O.; Chytil, P.; Mueller, T.; Mäder, K. Fluorescence optical imaging in anticancer drug delivery. *J. Control. Release* **2016**, *226*, 168–181. [[CrossRef](#)]
36. Schaffer, B.S.; Grayson, M.H.; Wortham, J.M.; Kubicek, C.B.; McCleish, A.T.; Prajapati, S.I.; Nelson, L.D.; Brady, M.M.; Jung, I.; Hosoyama, T.; et al. Immune Competency of a Hairless Mouse Strain for Improved Preclinical Studies in Genetically Engineered Mice. *Mol. Cancer Ther.* **2010**, *9*, 2354–2364. [[CrossRef](#)]
37. Benavides, F.; Oberyszyn, T.M.; VanBuskirk, A.M.; Reeve, V.E.; Kusewitt, D.F. The hairless mouse in skin research. *J. Dermatol. Sci.* **2009**, *53*, 10–18. [[CrossRef](#)]
38. Mérian, J.; Gravier, J.; Navarro, F.; Texier, I. Fluorescent Nanoprobes Dedicated to in Vivo Imaging: From Preclinical Validations to Clinical Translation. *Molecules* **2012**, *17*, 5564–5591. [[CrossRef](#)]
39. Riehl, M.; Harms, M.; Göttel, B.; Kubas, H.; Schiroy, D.; Mäder, K. Acid-induced degradation of widely used NIR dye DiR causes hypochromic shift in fluorescence properties. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2019**, *132*, 27–33. [[CrossRef](#)]
40. Thomas, J.C. The determination of log normal particle size distributions by dynamic light scattering. *J. Colloid Interface Sci.* **1987**, *117*, 187–192. [[CrossRef](#)]
41. Roethlisberger, D.; Mahler, H.-C.; Altenburger, U.; Pappenberger, A. If Euhydric and Isotonic Do Not Work, What Are Acceptable pH and Osmolality for Parenteral Drug Dosage Forms? *J. Pharm. Sci.* **2016**, *106*, 446–456. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Stranz, M.; Kastango, E.S. A Review of pH and Osmolarity. *Int. J. Pharm. Compd.* **2013**, *6*, 216–220.
43. Simamora, P.; Pinsuwan, S.; Alvarez, J.M.; Myrdal, P.B.; Yalkowsky, S.H. Effect of pH on Injection Phlebitis. *J. Pharm. Sci.* **1995**, *84*, 520–522. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Berton-Carabin, C.C.; Sagis, L.; Schroen, K. Formation, Structure, and Functionality of Interfacial Layers in Food Emulsions. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* **2018**, *9*, 551–587. [[CrossRef](#)]
45. Mason, T.G.; Wilking, J.N.; Meleson, K.; Chang, C.B.; Graves, S.M. Nanoemulsions: Formation, structure, and physical properties. *J. Phys. Condens. Matter* **2006**, *18*, R635–R666. [[CrossRef](#)]
46. Maupas, C.; Moulari, B.; Béduneau, A.; Lamprecht, A.; Pellequer, Y. Surfactant dependent toxicity of lipid nanocapsules in HaCaT cells. *Int. J. Pharm.* **2011**, *411*, 136–141. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Le Roux, G.; Moche, H.; Nieto, A.; Benoit, J.-P.; Nessler, F.; Lagarce, F. Cytotoxicity and genotoxicity of lipid nanocapsules. *Toxicol. Vitro.* **2017**, *41*, 189–199. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

48. Szwed, M.; Torgersen, M.L.; Kumari, R.V.; Yadava, S.K.; Pust, S.; Iversen, T.G.; Skotland, T.; Giri, J.; Sandvig, K. Biological response and cytotoxicity induced by lipid nanocapsules. *J. Nanobiotechnol.* **2020**, *18*, 1–19. [[CrossRef](#)]
49. Binder, R.G.; Booth, A.N.; Robbins, D.J.; Fuller, G. Hydroxystearic acid deposition and metabolism in rats fed hydrogenated castor oil. *Lipids* **1970**, *5*, 832–837. [[CrossRef](#)]
50. Elovson, J. Metabolism of some monohydroxystearic acids in the intact rat. *Biochim. Biophys. Acta Spec. Sect. Lipids Relat. Subj.* **1964**, *84*, 275–293. [[CrossRef](#)]
51. Bazile, D.; Ropert, C.; Huve, P.; Verrecchia, T.; Mariard, M.; Frydman, A.; Veillard, M.; Spenlehauer, G. Body distribution of fully biodegradable [¹⁴C]-poly(lactic acid) nanoparticles coated with albumin after parenteral administration to rats. *Biomaterials* **1992**, *13*, 1093–1102. [[CrossRef](#)]
52. Liu, T.; Choi, H.; Zhou, R.; Chen, I.-W. Quantitative Evaluation of the Reticuloendothelial System Function with Dynamic MRI. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e103576. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Ogawara, K.-I.; Furumoto, K.; Takakura, Y.; Hashida, M.; Higaki, K.; Kimura, T. Surface hydrophobicity of particles is not necessarily the most important determinant in their in vivo disposition after intravenous administration in rats. *J. Control. Release* **2001**, *77*, 191–198. [[CrossRef](#)]
54. Klein, M.; Rieckmann, M.; Sedding, D.; Hause, G.; Meister, A.; Mäder, K.; Lucas, H. Towards the Development of Long Circulating Phosphatidylserine (PS)- and Phosphatidylglycerol (PG)-Enriched Anti-Inflammatory Liposomes: Is PEGylation Effective? *Pharmaceutics* **2021**, *13*, 282. [[CrossRef](#)]
55. Hamazaki, K.; Sato, S.; Yunoki, M.; Noda, T.; Moreira, L.F.; Mimura, H.; Orita, K. Kupffer cell function in chronic liver injury and after partial hepatectomy. *Res. Exp. Med.* **1994**, *194*, 237–246. [[CrossRef](#)]
56. Baas, J.; Senninger, N.; Elser, H. The reticuloendothelial system. An overview of function, pathology and recent methods of measurement. *Zeitschrift für Gastroenterologie* **1994**, *32*, 117–123.
57. Brouwer, A.; Knook, D. The reticuloendothelial system and aging: A review. *Mech. Ageing Dev.* **1983**, *21*, 205–228. [[CrossRef](#)]
58. Yang, H.; Du, L.; Tian, X.; Fan, Z.; Sun, C.; Liu, Y.; Keelan, J.A.; Nie, G. Effects of nanoparticle size and gestational age on maternal biodistribution and toxicity of gold nanoparticles in pregnant mice. *Toxicol. Lett.* **2014**, *230*, 10–18. [[CrossRef](#)]
59. Hirsjärvi, S.; Dufort, S.; Gravier, J.; Texier, I.; Yan, Q.; Bibette, J.; Sancey, L.; Josserand, V.; Passirani, C.; Benoit, J.-P.; et al. Influence of size, surface coating and fine chemical composition on the in vitro reactivity and in vivo biodistribution of lipid nanocapsules versus lipid nanoemulsions in cancer models. *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.* **2013**, *9*, 375–387. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Ebino, K.Y. Studies on Coprophagy in Experimental Animals. *Exp. Anim.* **1993**, *42*, 1–9. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]