

Entwicklung und Charakterisierung neuer kolloidaler Formulierungen für Indocyaningrün als Kontrastmittel für die optische Bildgebung

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der
Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Biowissenschaften
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von
Anne-Katrin Kirchherr
geboren am 16. Juni 1980 in Berlin

Gutachter:

1. Prof. Dr. Karsten Mäder
2. Prof. Dr. Dr. Reinhard Neubert
3. Prof. Dr. Dr. Markus Antonietti

Halle (Saale), 23.02.2010

Keine noch so große Zahl von Experimenten kann beweisen, dass ich recht habe; ein einziges Experiment kann beweisen, dass ich unrecht habe.

(Albert Einstein)

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Diagnostische Bildgebung	1
1.2	Prinzip der optischen Bildgebung	1
1.3	Optische Kontrastmittel	4
1.4	Indocyaningrün (ICG)	5
1.4.1	Hintergrund und derzeitige Anwendung	5
1.4.2	Pharmakokinetik	6
1.4.3	Toxikologische Eigenschaften	6
1.4.4	Physikochemische Eigenschaften	7
1.4.5	Limitationen des klinischen Einsatzes	8
1.5	Kolloidale Trägersysteme zur parenteralen Applikation	9
1.6	Ziel der Arbeit	11
2	Evaluierung geeigneter kolloidaler Trägersysteme für ICG	13
2.1	Materialien	15
2.2	Methoden	15
2.2.1	Herstellung kolloidaler ICG Formulierungen	15
2.2.2	Photonenkorrelationspektroskopie (PCS)	16
2.2.3	Laser-Doppler-Anemometrie (LDA) und Zetapotential (ζ -Potential)	17
2.2.4	UV/VIS-Spektroskopie	18
2.2.5	Fluoreszenzspektroskopie	19
2.2.6	Sättigungskonzentration	22
2.3	Ergebnisse und Diskussion	23
2.3.1	Charakterisierung verschiedener kolloidaler ICG Formulierungen	23
2.4	Selektion des Formulierungsprinzips	31

3	Optimierung der ausgewählten ICG Formulierung	33
3.1	Materialien	35
3.2	Methoden	35
3.2.1	Herstellung	35
3.2.2	Kryotransmissionselektronenmikroskopie (Kryo-TEM)	36
3.2.3	Analytische Ultrazentrifugation (AUZ)	37
3.2.4	Hämolyse Assay	38
3.2.5	Signifikanztest	38
3.3	Ergebnisse und Diskussion	39
3.3.1	Aggregationsverhalten von ICG in wässrigen Medien	39
3.3.2	Physikochemische Charakterisierung der ICG Mizellsysteme	43
3.3.3	Einfluss der Tenside auf die optische Stabilität von ICG	54
3.3.4	Hämolytische Aktivität der verwendeten Tenside	56
3.4	Selektion des Mizellsystems	58
4	<i>In vitro</i> Charakterisierung der optimierten ICG Formulierung	59
4.1	Materialien	61
4.2	Methoden	62
4.2.1	Kritische Mizellbildungskonzentration (CMC)	62
4.2.2	Einfluss von Albumin auf die physikalische Stabilität der Mizellen	63
4.2.3	Zellkultur	64
4.2.4	Fluoreszenzmikroskopie	67
	Ergebnisse und Diskussion	68
4.2.5	Morphologie der mizellaren ICG Formulierung	68
4.2.6	Einfluss der Temperatur auf die optische Stabilität	74
4.2.7	Physikalische Stabilität der Mizellen	76
4.2.8	<i>In vitro</i> Toxizität und Phagozytose	83
4.3	Zusammenfassende Beurteilung der <i>in vitro</i> Charakterisierung	91

5	<i>In vivo</i> Verhalten der mizellaren ICG Formulierung	93
5.1	Materialien	94
5.2	Methoden	94
5.2.1	Dosierung und Herstellung der Formulierungen	94
5.2.2	Tiere und Tierhaltung	95
5.2.3	Narkose	96
5.2.4	Intravitalmikroskopie	96
5.2.5	Auswertung	97
5.3	Ergebnisse und Diskussion	98
5.3.1	Pharmakokinetik	100
5.3.2	Kontrastwert und Extravasationsverhalten	106
5.4	Zusammenfassende Bewertung der Ergebnisse	108
6	Zusammenfassung und Ausblick	109
6.1	Deutsche Version	109
6.2	Englische Version	113
	Literaturverzeichnis	117

Abkürzungsverzeichnis

AUZ	Analytische Ultrazentrifugation
CCD	<i>charge-coupled device</i>
CMC	<i>critical micelle concentration</i> (kritische Mizellbildungskonzentration)
CT	Computertomographie
DAPI	4,6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid
DIC	Differential Interferenz Kontrast
DLS	dynamische Lichtstreuung
DMSO	Dimethylsulfoxid
DOT	diffuse optische Tomographie
D-PBS	<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>
EBM	<i>endothelial cell basal medium</i>
EGM	<i>endothelial cell growth medium</i>
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
GC	Glykocholsäure
Hb	Hämoglobin
HbO ₂	Oxyhämoglobin
HLB	<i>hydrophilic lipophilic balance</i>
HUVEC	<i>human umbilical vein endothelial cells</i>
ICG	Indocyaningrün
<i>i.v.</i>	<i>intravenös</i>
KG	Körpergewicht
Kryo-TEM	Kryotransmissionselektronenmikroskopie
LD ₅₀	mittlere letale Dosis
LDA	Laser-Doppler-Anemometrie
MPS	mononukleär-phagozytäres System
MRT	Magnetresonanztomographie
MTT	3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromid

NIBS	<i>non-invasive backscattering</i> (nicht-invasive Rückstreuung)
NIR	Nahinfrarot
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PC	Phosphatidylcholin
PCS	<i>photon correlation spectroscopy</i> (Photonenkorrelationspektroskopie)
PDI	Polydispersitätsindex
PEG	Polyethylenglykol
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
<i>p.i.</i>	<i>post injectionem</i> (nach Injektion)
PLGA	<i>poly(lactid-co-glycosid)</i> (Polymilchsäure-co-glykolsäure)
RES	retikuloendotheliales System
ROI	<i>region of interest</i> (innerhalb einer definierten Region)
Solutol	Solutol [®] HS 15
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
UV/VIS	<i>ultraviolet-visible</i> (ultravioletter und sichtbarer Bereich)
VE	Verkapselungseffizienz
ZP/ ζ -Potential	Zetapotential

1 Einleitung

1.1 Diagnostische Bildgebung

Der Grundstein der diagnostischen Bildgebung wurde 1895 durch die Entdeckung der Röntgenstrahlung gelegt [1]. Mehr als ein Jahrhundert später hat sich die diagnostische Bildgebung zu einem hoch spezialisierten Gebiet der Medizin entwickelt. Neben dem klassischen Röntgenverfahren helfen den Ärzten heute unter anderem Computertomographie (CT), Magnetresonanztomographie (MRT), Ultraschalltechnik (Sonographie), optische Verfahren sowie nuklearmedizinische Methoden bei der schnellen und präzisen Diagnose [2]. Die frühe und spezifische Erkennung pathologischer Prozesse ist bei vielen Krankheiten der Schlüssel zur besseren Behandlung mit besseren Zukunftsprognosen für den Patienten. Sowohl für die gezielte Auswahl geeigneter Therapien als auch für eine individuelle Bestimmung der Wirksamkeit zielgerichteter Medikamente ist die nicht-invasive Bildgebung von entscheidender Bedeutung.

Die verschiedenen bildgebenden Verfahren weisen unterschiedliche räumliche Auflösung und Sensitivität auf und werden entsprechend der Fragestellung eingesetzt. Aufgrund einer hohen räumlichen Auflösung sind derzeit die CT und MRT die maßgeblichen Verfahren zur Darstellung von Morphologien [3]. Durch Kombination mit sensitiveren Methoden, wie zum Beispiel der Positronen-Emissions-Tomographie (PET) oder der *Single Photon Emission Computed Tomographie* (SPECT), können molekulare Vorgänge und Stoffwechselfvorgänge sichtbar gemacht werden. Zu den sensitiveren Verfahren zählt auch die optische Bildgebung, die durch Verwendung von Farbstoffen eine ähnliche Empfindlichkeit wie die nuklearmedizinischen Methoden besitzt [4].

1.2 Prinzip der optischen Bildgebung

Die Verwendung von Licht zur Differenzierung von Gewebe ist seit Jahrzehnten ein Teil klinischer Praxis und experimenteller Forschung [5-8]. Viele Bereiche aus dem elektromagnetischen Spektrum werden derzeit in der Medizin sowohl therapeutisch (Laserchirurgie, UV-Therapie, γ -Strahlung) als auch diagnostisch (CT, optische Bildgebung, MRT) genutzt (s. Abbildung 1) [9].

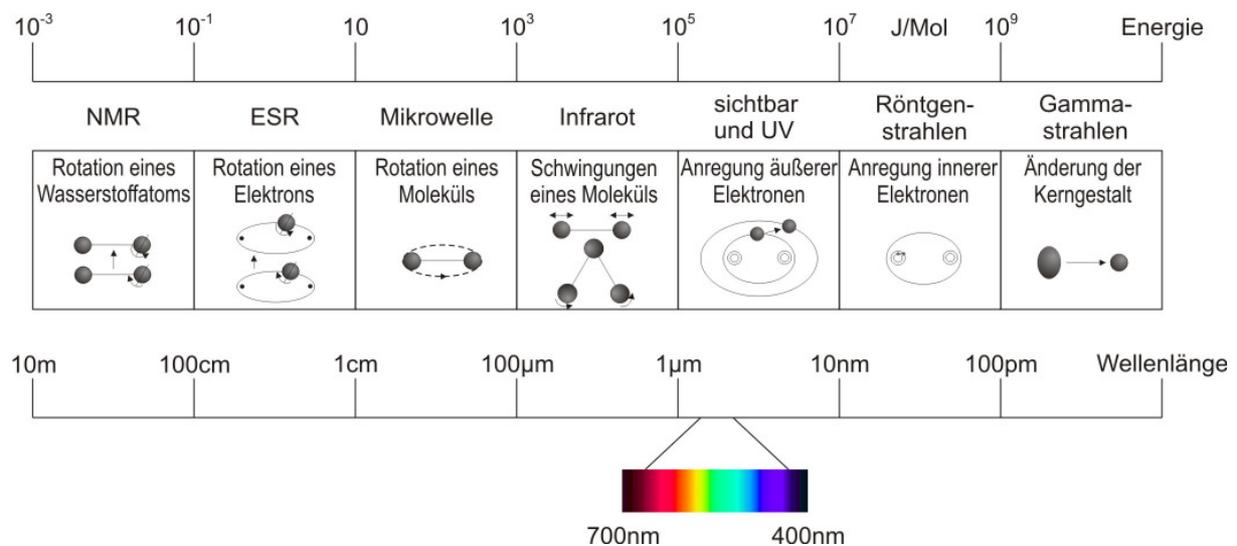


Abbildung 1: Elektromagnetisches Spektrum modifiziert nach [9].

Die optische Bildgebung arbeitet im Bereich des visuellen (VIS) bis nahinfraroten (NIR) Spektrums (400 – 1000 nm). Im Vergleich zu anderen diagnostischen Verfahren wie Computertomographie (CT) oder Magnetresonanztomographie (MRT) liegen die Vorteile der optischen Bildgebung in der Verwendung von nicht-ionisierender Strahlung, dem Verzicht auf Gewebekontakt, sowie in der besonders schnellen und kosteneffektiven Anwendung [9]. Der Aspekt der Unbedenklichkeit durch die Vermeidung von ionisierender Strahlung spielt vor allem in der Frühdiagnostik und in der Therapiekontrolle eine wichtige Rolle [10-13].

Limitiert ist dieses Verfahren durch die geringe Eindringtiefe des Lichtes in das Gewebe, verursacht durch Streuung und Absorption der Photonen. Die Eindringtiefe ist dabei stark abhängig von der verwendeten Wellenlänge [14]. Während mit kurzwelligem Strahlen (400 – 700 nm) lediglich Gewebeoberflächen untersucht werden können (z.B. in der Endoskopie), dringt NIR-Licht (700 – 1000 nm) bis zu einige Zentimeter tief in das Gewebe ein und ermöglicht so die Darstellung von größeren Volumenbereichen (z.B. bei der optischen Mammographie) [15, 16]. Dieser Bereich der größten optischen Gewebetransparenz, der auch als diagnostisches Fenster bezeichnet wird, ist gekennzeichnet durch die geringste Eigenabsorption physiologischer Gewebekomponenten wie Hämoglobin, Oxyhämoglobin und Wasser (s. Abbildung 2).

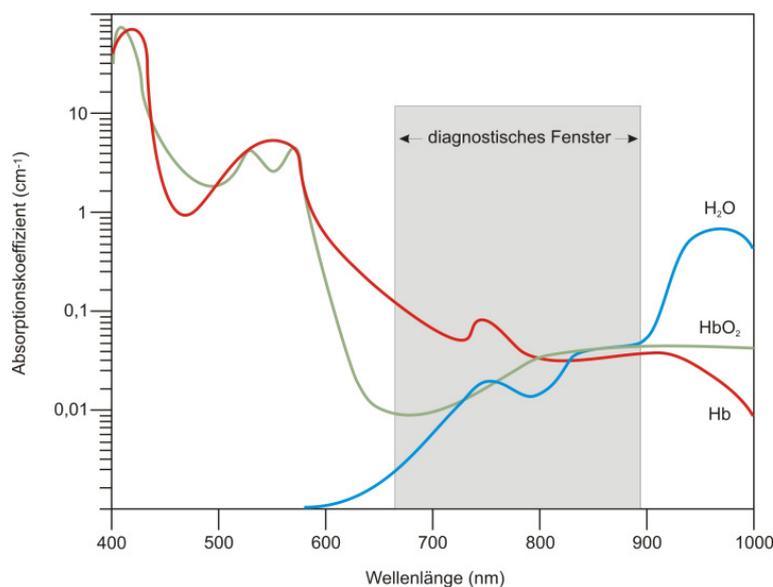


Abbildung 2: Diagnostisches Fenster der Gewebekomponenten Wasser (H_2O), Oxyhämoglobin (HbO_2) und Hämoglobin (Hb) modifiziert nach [17].

Um die diagnostische Aussagekraft optisch-bildgebender Verfahren zu erhöhen, können zusätzlich Fluoreszenzfarbstoffe angewendet werden. Bei der NIR-Fluoreszenz-Bildgebung wird durch Anregung der Farbstoffe mit Hilfe spezieller Lichtquellen und Detektion der emittierten Photonen mit digitalen CCD-Kameras („*charge-coupled device*“) sowohl die örtliche Auflösung als auch die Sensitivität der Methode stark verbessert [18]. Ein bereits klinisch eingesetztes bildgebendes Detektionssystem ist die diffuse optische Tomographie (DOT) [19]. Hierbei erfolgt die Detektion ähnlich wie bei der Computertomographie aus verschiedenen Projektionsrichtungen. Mit Hilfe von präzisen mathematischen Modellen lässt sich daraus eine dreidimensionale Rekonstruktion von Absorptions- und Streuungsverteilungen im Gewebe errechnen. Im Vergleich zur NIR-Fluoreszenz-Bildgebung liefert die DOT eine Quantifizierung von Fluorochromen mit zusätzlich höherer Ortsauflösung [7].

Zur Anwendung kommt die Fluoreszenzdiagnostik hauptsächlich bei der Untersuchung von oberflächennahen Strukturen. So konnte die Methode beispielsweise in der Urologie erfolgreich in einer klinischen Studie zum Nachweis von Harnblasenkarzinomen eingesetzt werden [20]. Auch beim Nachweis von Tumoren im Mund- und Rachenraum [21], im Magen-Darm-Trakt [22] sowie in der Lunge [23] konnte im Vergleich zu den bisherigen Diagnostikverfahren mit der Fluoreszenz-Bildgebung eine höhere Sensitivität erzielt werden. Mit Hilfe von intravasalen Fluoreszenzfarbstoffen („*blood pool contrast agents*“) können sowohl der Verlauf von Gefäßen als auch Gefäßpermeabilitäten sichtbar gemacht werden

[24]. Aus dem An- und Abfluten der Fluoreszenz können zusätzlich Flussgeschwindigkeiten und Perfusion untersucht werden [9]. Weitere Anwendungsgebiete finden sich in der Dermatologie [25], Rheumaforschung [26] und Neurochirurgie [27].

1.3 Optische Kontrastmittel

Die Fluorochrome, die den optisch aktiven Teil des Fluoreszenzfarbstoffes repräsentieren, sollten für die Anwendung *in vivo* folgende Anforderungen erfüllen [7, 28]:

- Absorption und Emission im NIR-Bereich
- hohe Fluoreszenzquantenausbeute
- Photostabilität
- gute Wasserlöslichkeit
- biologische Verträglichkeit

Insbesondere Cyaninfarbstoffe genügen vielen dieser Anforderungen und haben sich in den letzten Jahren als günstig für die Anwendung als optisches Kontrastmittel erwiesen.

Nach ihrer Funktion lassen sich optische Kontrastmittel in drei Hauptgruppen einteilen: unspezifische Kontrastmittel, zielgerichtete Kontrastmittel („*targeted probes*“) und aktivierbare Kontrastmittel („*smart sensor probes*“) [29] (s. Abbildung 3). Die meisten Fluoreszenzfarbstoffe sind unspezifisch, d.h. sie haben keine Spezifität für bestimmte molekulare Targets. Der Kontrast zwischen den verschiedenen Geweben beruht im Wesentlichen auf Permeabilitäts- oder Perfusionsunterschieden [30]. Durch Kopplung der unspezifischen Fluoreszenzfarbstoffe an spezifische Liganden wie Peptide, monoklonale Antikörper oder so genannte „*small molecules*“, erhält man zielgerichtete Kontrastmittel, die an Epitope bestimmter Zellen oder Gewebe binden. Die selektive Anreicherung ist vor allem dann von Bedeutung, wenn aufgrund ähnlicher Perfusionsverhältnisse zwischen pathologischem und gesundem Gewebe eine deutliche Kontrastverbesserung erzielt werden soll. Aktivierbare Kontrastmittel entstehen durch Aneinanderkopplung vieler Fluoreszenzfarbstoffe über eine Peptidbrücke an ein Polymerrückgrat. Durch die geringe Distanz zwischen den Farbstoffen entsteht ein Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET), wodurch das Fluoreszenzsignal stark gequench wird [12]. Enthalten die Peptidbrücken Erkennungsmotive für Proteasen, können diese gespalten werden und die Farbstoffe freigeben. Die Fluoreszenzlöschung wird aufgehoben und

es kommt zu einem starken Signalanstieg mit einem gleichzeitig geringen Hintergrundsignal [17].

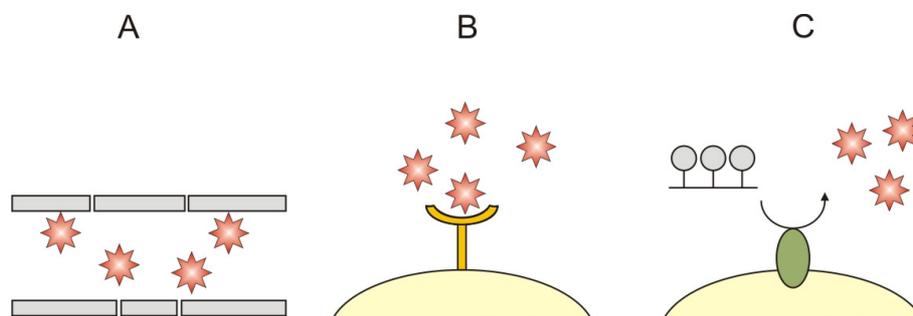


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Kontrastmittelgruppen, eingeteilt nach ihrer Funktion. Unspezifische (A), zielgerichtete (B) und aktivierbare Kontrastmittel (C) modifiziert nach [31].

1.4 Indocyaningrün (ICG)

1.4.1 Hintergrund und derzeitige Anwendung

Indocyaningrün (ICG) wurde bereits 1956 durch Brooker und Heseltine von den Kodak Research Laboratories in den USA entwickelt und patentiert [32, 33]. Dieser zu der Klasse der unspezifischen Kontrastmittel gehörende Nahinfrarot-Farbstoff wurde zunächst hauptsächlich für die Herz-, Kreislauf- und Mikrozirkulationsdiagnostik verwendet. Durch die pharmakologische Eigenschaft von ICG ausschließlich über die Leber eliminiert zu werden, konnte das Anwendungsspektrum schnell auf die Leberfunktionsdiagnostik ausgeweitet werden [34, 35]. Mittlerweile stellt die Fluoreszenzangiographie in der Ophthalmologie eine der wichtigsten Anwendungsgebiete des ICG dar [36, 37]. In der Onkologie wurde der Farbstoff bereits erfolgreich für den Nachweis von Tumoren an Tiermodellen [38], in der Veterinärmedizin [39] und in der Humanmedizin getestet [19, 27, 40]. Neuere Studien zeigten zudem, dass ICG reaktive Sauerstoffspezies generiert und somit zur photooxidativen Schädigung von Tumorzellen in der photodynamischen Therapie (PDT) anwendbar ist [41-44].

Kommerziell ist ICG in verschiedenen Formulierungen als Lyophilisat erhältlich. In einigen Präparaten (Diagnogreen[®], ICGreen[®] und ICG-Pulsion[®]) werden 5 % Natriumiodid (NaI) als Rekristallisationsagens bei der Synthese von ICG zugesetzt [45]. Ein weiterer Syn-

theseansatz, der auf die Verwendung von Natriumiodid verzichtet, ist ebenfalls verfügbar [46]. Als Lösungsmittel für die NaI-haltigen ICG Lyophilisate dient Wasser für Injektionszwecke, während das NaI-freie Lyophilisat (Infracyanine[®]) in 5 % Glukose Lösung gelöst wird.

1.4.2 Pharmakokinetik

Nach intravenöser Applikation bindet ICG sofort zu 98 % an Plasmaproteine, vorzugsweise an α_1 -Lipoproteine [47]. Durch diese sekundschnelle, vollständige Bindung verbleibt der Farbstoff vorwiegend intravasal und verteilt sich gleichmäßig im zirkulierenden Blut [48]. Die Elimination erfolgt ausschließlich über die Leber und wird nicht durch renale oder systemische Elimination beeinflusst. Ferner wird ICG im Darm nicht rückresorbiert; es liegt somit kein entero-hepatischer Kreislauf vor [49]. Während der Leberpassage bleibt ICG chemisch unverändert und findet sich mit mehr als 99 % der injizierten Menge in der Gallenflüssigkeit wieder. Die Elimination erfolgt biphasisch mit einer Initialbluthalbwertszeit von 3 - 4 min und einer zweiten dosisabhängigen Halbwertszeit von über 1 h [50, 51]. Die Gewebahalbwertszeit von ICG beträgt in unverändertem und tumorösem Gewebe weniger als 10 min [52]. Aufgrund der hohen Plasmaproteinbindung und schnellen Eliminierung von ICG aus dem Blutkreislauf sind die Möglichkeiten zum Nachweis von verändertem Gewebe stark eingeschränkt. Jedoch ist die Darstellung von oberflächennahen Tumoren oder entzündlichen Veränderungen in den ersten Minuten nach Applikation aufgrund erhöhter Perfusion des Gewebes möglich. Zusätzlich entstehen durch Neovaskularisierung in tumorösem Gewebe vermehrt neue Blutgefäße, die ebenfalls für einen besseren Kontrast sorgen.

1.4.3 Toxikologische Eigenschaften

Die akute Toxizität von ICG in Lösung ist gering. Der LD₅₀-Wert ist bei Mäusen mit 50 - 80 mg/kg Körpergewicht (KG) angegeben [53, 54]. Die tägliche Maximaldosis im Menschen soll in der Regel nicht über 5 mg/kg KG liegen. Über fetotoxische oder teratogene Wirkungen liegen derzeit noch keine ausreichenden Ergebnisse vor, es deutet jedoch alles darauf hin, dass ICG auch in höherer Dosierung nicht über teratogene Wirkungen verfügt [35]. In äußerst seltenen Fällen kommt es nach Injektion zu anaphylaktischen Reaktionen mit Symptomen wie Unruhe, Juckreiz, Urtikaria, Tachykardie, Blutdruckabfall oder Atemnot [35]. Die

Sicherheit von ICG nach intravenöser Applikation wurde mehrfach in Studien untersucht und bewiesen [48, 55, 56].

1.4.4 Physikochemische Eigenschaften

ICG ist ein amphiphiler, zwitterionischer Tricarbocyaninfarbstoff, der als Mononatriumsalz vorliegt (s. Abbildung 4). Das Molekulargewicht beträgt 775 Dalton. Aufgrund des amphiphilen Charakters ist ICG sowohl in organischen Lösungsmitteln wie Methanol und Dimethylsulfoxid (DMSO) als auch in wässrigen Lösungsmitteln wie Wasser und Phosphatpuffer löslich.

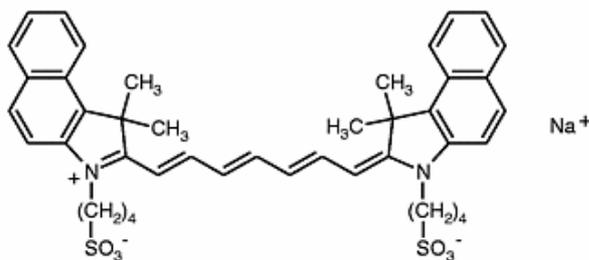


Abbildung 4: Strukturformel von Indocyaningrün, Mononatriumsalz.

Die optischen Eigenschaften von ICG hängen stark von der Farbstoffkonzentration sowie vom verwendeten Lösungsmittel ab (s. Abbildung 5). In wässriger Lösung bildet ICG Aggregate aus, die mit steigender Farbstoffkonzentration und mit der Zeit vermehrt gebildet werden. Durch den so genannten Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET), der zwischen den Aggregatmolekülen stattfindet, wird die Fluoreszenz von ICG stark gequencht. Die Fluoreszenzquantenausbeute von ICG in Wasser ist in Folge dessen sehr gering und beträgt nur 1,2 %. Im Blutplasma liegt die Quantenausbeute durch Bindung an Plasmaproteine und Verringerung der Aggregatbildung bei etwa 3 - 5 % [57, 58]. Zudem unterliegt ICG in wässriger Lösung einem starken hydrolytischen Abbau, der zu einer verringerten Absorptions- und Fluoreszenzfähigkeit führt. Extreme pH-Werte, hohe Temperaturen und Licht beschleunigen diesen Abbauprozess. Hohe Farbstoffkonzentrationen wirken durch die verstärkte Aggregatbildung stabilisierend. Die Halbwertszeit einer 1,3 μM ICG Lösung, die bei Raumtemperatur im Dunkeln gelagert wurde, beträgt $16,8 \pm 1,5$ h [59].

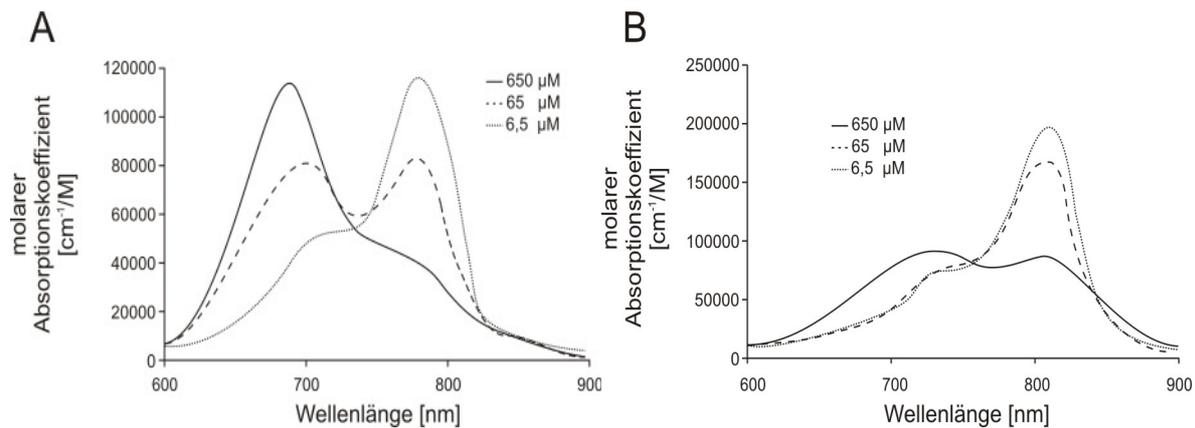


Abbildung 5: Absorptionsspektren von ICG in Wasser (A) und ICG in Plasma (B) in Abhängigkeit von der Farbstoffkonzentration modifiziert nach [60]. Mit steigender Farbstoffkonzentration nimmt der Absorptionskoeffizient des Monomerenpeaks ($\lambda_{\text{Wasser}} = 780 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{Plasma}} = 800 \text{ nm}$) ab, während der Absorptionskoeffizient der Schulter ($\lambda_{\text{Wasser}} = 700 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{Plasma}} = 720 \text{ nm}$), charakteristisch für Dimere und Polymere des Farbstoffes, zunimmt. In Plasma ist das Absorptionsspektrum von ICG im Vergleich zu dem in Wasser bathochrom verschoben und weist durch die geringere Aggregatbildung einen höheren Absorptionskoeffizienten auf.

1.4.5 Limitationen des klinischen Einsatzes

Aufgrund der geringen Toxizität, der kommerziellen Verfügbarkeit und der geringen Kosten im Vergleich zu anderen Fluoreszenzfarbstoffen stellt ICG ein optimales Agens zur optischen Bildgebung dar. Der praktische Einsatz ist jedoch aufgrund mehrerer Faktoren limitiert: Zum einen werden durch das starke Aggregationsverhalten von ICG die optischen Eigenschaften wie Absorption- und Fluoreszenzvermögen nachteilig beeinflusst. Zusätzlich besitzt ICG aufgrund der schnellen hepatischen Elimination aus dem Blutkreislauf eine sehr kurze Bluthalbwertszeit. Dadurch ist eine Detektion der Fluoreszenz nach intravenöser Gabe nur für einen sehr kurzen Zeitraum möglich. Des Weiteren weist der Farbstoff in Lösung eine sehr geringe Stabilität auf, welche stark von äußeren Bedingungen abhängt. In Lösung kommt es zum irreversiblen Verfall des Farbstoffes mit der Folge von geringerer Lichtabsorption und Emission sowie Verschiebung der Wellenlängenmaxima. Ein weiterer limitierender Faktor für den Einsatz des Fluorochroms in der optischen Bildgebung ist außerdem, dass ICG auf Grund seiner chemischen Struktur nicht spezifisch an Biomoleküle wie Peptide und Proteine gebunden werden kann. Ein aktives Targeting mit einer systemischen Darstellung von Gewebe kann dadurch nicht realisiert werden.

Verschiedenste Ansätze wurden bereits untersucht, um die Nachteile von ICG zu beseitigen. Eine chemische Veränderung der Struktur von ICG sollte das Aggregationsverhalten des Farbstoffes reduzieren, für eine erhöhte Quantenausbeute und einen besseren Kontrast in den Blutgefäßen sorgen. Durch den Einbau von hydrophilen Gruppen in das Molekül konnte der erwünschte Effekt einer erhöhten Quantenausbeute realisiert werden, der Kontrast in den Blutgefäßen wurde jedoch nicht verbessert. Der Grund dafür war eine verstärkte Extravasation des Farbstoffes aus den Blutgefäßen in das umliegende Gewebe aufgrund der stark reduzierten Plasmaproteinbindung. Nur für die Detektion von Tumorgewebe wirkte sich das Extravasationsverhalten positiv aus, da eine verstärkte Anreicherung im Gewebe dort für einen besseren Kontrast sorgte [52]. Die Stabilität der Farbstoffe in wässrigen Medien konnte durch die chemische Veränderung jedoch nicht verbessert werden.

Durch nichtkovalente Interaktionen von ICG mit Natrium Polyaspartat oder Biopolymeren wie Albumin konnte die Stabilität von ICG positiv beeinflusst werden. Die Quantenausbeute und die Halbwertszeit wurden jedoch nicht beeinflusst [61-64].

Ein weiterer Ansatz stellte die Entwicklung neuer Formulierungen auf Basis von Nanopartikeln, Kapseln und Emulsionen dar. Keine der untersuchten Formulierungen konnte jedoch alle Nachteile von ICG gleichzeitig beseitigen. Eine Verkapselung von ICG in Nanopartikel oder Kapseln führte zu einer Stabilisierung des Farbstoffes in wässrigen Medien und zu einer Verlängerung der Bluthalbwertszeit [65-68]. Im Inneren der Partikel kam es jedoch zu einer verstärkten Aggregation des Farbstoffes, wodurch die Quantenausbeute stark reduziert wurde. Die Formulierung von ICG als O/W-Emulsion konnte die Bluthalbwertszeit erhöhen, die Stabilität von ICG wurde jedoch nachteilig beeinflusst [69].

1.5 Kolloidale Trägersysteme zur parenteralen Applikation

Kolloidale Trägersysteme werden seit den letzten Jahrzehnten in der pharmazeutischen Forschung und klinischen Anwendung erfolgreich eingesetzt, um die *in vivo* Wirksamkeit von Arzneistoffen zu verbessern [70]. Diese auch als *Drug Delivery Systeme* bekannten Träger weisen eine durchschnittliche Größe von wenigen bis einigen hundert Nanometern auf und sind aufgrund der geringen Gefahr von Gefäßverschlüssen für eine parenterale Anwendung sehr gut geeignet. Es gibt eine Vielzahl von kolloidalen Trägersystemen wie zum Beispiel Liposomen, Mizellen, Dendrimere, Mikroemulsionen, Nanopartikel und Nanokapseln, deren Eigenschaften für eine Drug Delivery Anwendung derzeit untersucht werden [71-74]. Einige

von ihnen haben ihre Verträglichkeit und Funktionalität bereits durch erhaltene Marktzulassungen bewiesen. Als Beispiele hierfür können Mikroemulsionen (Sandimmun[®] Optoral, Neoral[®]), Nanoemulsionen (Diazepam Lipuro[®]), Mischmizellen (Konaktion MM[®]), Nanosuspensionen (Rapamune[®]) und Liposomen (AmBisome[®]) aufgeführt werden.

Die Verwendung von kolloidalen Trägersystemen dient vor allem einer gesteuerten Verteilung und Anreicherung des Wirkstoffes im Körper („*drug targeting*“), einer Verbesserung der Bioverfügbarkeit sowie einer kontrollierten Freisetzung des Wirkstoffes aus der Trägermatrix [75]. Zudem können mit Hilfe von Drug Delivery Systemen Unverträglichkeiten mit anderen Wirk- oder Hilfsstoffen vermieden und Stabilitätsprobleme behoben werden [76]. Nach intravenöser Applikation von kolloidalen Trägersystemen können diese das Blutgefäßsystem nur dort verlassen, wo die Endothelzellen Öffnungen aufweisen. Dies ist zum einen im retikulo-endothelialen System (RES) der Fall, zu dem Leber, Milz und Knochenmark gehören. Die Träger können in das Gewebe entweichen und werden dort von den Gewebemakrophagen eliminiert, weshalb das RES auch als mononukleär-phagozytäres System (MPS) bezeichnet wird [76]. Auch in pathologischem Gewebe ist eine Anreicherung von kolloidalen Trägersystemen über den so genannten EPR-Effekt („*enhanced permeation and retention*“) möglich [77]. Hierbei handelt es sich um einen passiven Anreicherungsmechanismus, der durch Fenestrierungen der Blutgefäße („*leaky vessels*“) in tumorösem oder entzündetem Gewebe zustande kommt [78]. Man spricht in diesem Fall von einem „*passiven Targeting*“. Werden zusätzlich gewebs- oder zellspezifische Liganden auf der Oberfläche von Trägersystemen aufgebracht, spricht man von einem „*spezifischen*“ oder „*aktiven Targeting*“.

Die Anforderungen, die vor allem an parenteral zu applizierende Trägersysteme gestellt werden, sind eine einfache und kostengünstige Herstellung, bioabbaubare Hilfsstoffe, kleine Teilchengrößen, hohe Beladungskapazitäten, lange Blutzirkulationszeiten und idealerweise die Möglichkeit eines spezifischen oder unspezifischen Targetings [75]. Zudem muss die Sterilität, Isotonie, Pyrogenfreiheit, biologische Verträglichkeit und physikalische sowie chemische Stabilität der parenteralen Formulierung über einen langen Zeitraum gewährleistet sein.

1.6 Ziel der Arbeit

Die optische Bildgebung mit Licht im NIR Bereich hat in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung gewonnen. Parallel zu technischen Fortschritten ermöglicht eine Vielzahl von fluoreszierenden Farbstoffen eine sensitive Detektion molekularer Ziele *in vivo*. Einen relativ neuen und vielversprechenden Ansatz stellen die so genannten Quantum Dots dar. Diese anorganischen, nanokristallinen Fluorophore weisen Partikelgrößen von 2-10 nm auf und besitzen aufgrund ihrer besonderen optischen Eigenschaften ein großes Anwendungspotential in der optischen Bildgebung [79]. Quantum Dots zeichnen sich durch ihre über die Partikelgröße steuerbaren engen Emissionsbanden, durch hohe Photostabilitäten und breite Anregungsbereiche aus [80]. Die am häufigsten verwendeten Quantum Dots bestehen aus einem Cadmiumselenid Kern und einer Hülle aus Zinksulfid. Die zytotoxische Wirkung von Cadmium ist weit verbreitet bekannt, weswegen eine *in vivo* Anwendung von Quantum Dots als kritisch anzusehen ist [81]. Cyaninfarbstoffe wie das ICG dagegen, weisen eine sehr geringe Toxizität auf und werden als optische Kontrastmittel schon lange *in vivo* in den unterschiedlichsten klinischen Bereichen und mittlerweile auch auf dem Gebiet der NIR-Diagnostik eingesetzt. Aufgrund der Nachteile, die ICG jedoch in der klinischen Anwendung besitzt, ist die Entwicklung einer optimierten ICG Formulierung von großer Bedeutung. Die in der Literatur beschriebenen Ansätze haben gezeigt, dass die Entwicklung neuer Formulierungen die Eigenschaften von ICG positiv beeinflussen kann. Da jedoch bisher nur einzelne Nachteile von ICG optimiert werden konnten, ist eine Formulierung, die alle Nachteile gleichzeitig behebt, erstrebenswert.

Das Ziel dieser Arbeit ist die Entwicklung einer geeigneten Formulierung für ICG, die eine erhöhte *in vitro* Stabilität, verbesserte optische Eigenschaften und eine verlängerte Bluthalbwertszeit aufweist. Kolloidale Systeme bieten sich als Träger für den Farbstoff an, da sie für eine intravenöse Applikation geeignet sind und zudem eine Anreicherung in pathogenem Gewebe über ein passives Targeting ermöglichen.

In einem Screening soll eine Auswahl von Trägersystemen untersucht werden, deren Verträglichkeit und Funktionalität bereits durch erhaltene Marktzulassung bewiesen wurde. Die Vor- und Nachteile dieser Trägersysteme und der Einfluss, den sie auf die Eigenschaften des Farbstoffes ausüben, sollen evaluiert und ein Formulierungsprinzip selektiert werden. Nach Optimierung der Formulierung soll eine *in vitro* Charakterisierung, in der vor allem die

Morphologie des Systems, die Stabilität, die optischen Eigenschaften und die Toxizität *in vitro* untersucht werden, erste Hinweise auf die Eignung der neuen Formulierung als optisches Kontrastmittel geben. Zusätzlich soll anhand einer explorativen Studie, an einer geringen Anzahl von Tieren, die Pharmakokinetik und die Verträglichkeit der Formulierung *in vivo* untersucht werden.

2 Evaluierung geeigneter kolloidaler Trägersysteme für ICG

Um ein geeignetes Trägersystem für ICG zu finden wurde zunächst im Rahmen eines Prä-screenings wässrige ICG Lösung mit verschiedenen kolloidalen Marktprodukten versetzt und charakterisiert. Aufgrund der amphiphilen Eigenschaften von ICG wurden als potentiell geeignete Trägersysteme Liposomen (Empty Liposomes, COATSOME[®] EL-11-C), Mischmizellen (Konaktion[®] MM), Fettemulsionen (Lipofundin[®] N) und Mikroemulsionen (Sandimmun[®] Optoral) ausgewählt. Untersucht wurden die Teilchengrößenverteilung und das Zetapotential der kolloidalen Träger mit ICG, die Veränderung der optischen Eigenschaften, die Sättigungskonzentration sowie die optische Stabilität von ICG in den Systemen.

Teilchengröße und Teilchengrößenverteilung wurden mit Hilfe der Photonenkorrelationspektroskopie (PCS), auch als dynamische Lichtstreuung (DLS) bezeichnet, bestimmt. Diese weit verbreitete nicht-invasive Methode bietet die Möglichkeit, Partikel direkt in ihrem Herstellungsmedium zu vermessen. Das zugrunde liegende Messprinzip und die Berechnung der Größen aus den Streudaten wird in Kapitel 2.2.2 genauer beschrieben. Neben der Größe und der Größenverteilung von kolloidalen Systemen liefert das Zetapotential (ζ -Potential) wichtige Informationen über die Stabilität der Teilchen. Hohe ζ -Potentiale sorgen für eine starke Abstoßung zwischen den Teilchen und somit für eine hohe Stabilität der Dispersionen.

Die wichtigste Anforderung, die an ein optisches Kontrastmittel gestellt wird, ist die Absorptions- und Emissionsfähigkeit im NIR-Bereich mit einer hohen Quantenausbeute. Um die Veränderungen der optischen Eigenschaften von ICG bei Zugabe zu den verschiedenen kolloidalen Trägersystemen zu überprüfen, wurden mit Hilfe der Absorptions- und Fluoreszenzspektroskopie die Absorptions- und Emissionsspektren, die Fluoreszenzintensitäten und die Quantenausbeuten der jeweiligen Formulierungen miteinander verglichen. Die Absorptions- und Emissionsmaxima sollten möglichst im langwelligen Bereich des diagnostischen Fensters (700 - 900 nm) liegen und einen hohen Absorptions- und Emissionskoeffizienten aufweisen [7, 28]. Die Berechnung der Quantenausbeuten wird im folgenden Abschnitt (Kapitel 2.2.5) näher beschrieben.

Die optische Stabilisierung von ICG in wässrigen Medien sollte, aufgrund der geringen *in vitro* Stabilität von freiem Farbstoff, als primäres Aufgabenziel betrachtet werden. Da der

Abbau von ICG aufgrund der Bildung von Leukoformen des Farbstoffes zu einer stetigen Abnahme der Absorptions- und Emissionsfähigkeit führt, konnte die optische Stabilität mit Hilfe der Absorptions- oder Fluoreszenzspektroskopie bestimmt werden [59, 82].

Das Ziel dieses Präscreenings war es, durch Beschreibung, Analyse und Bewertung der verwendeten kolloidalen Trägersysteme ein geeignetes Formulierungsprinzip für ICG zu finden, welches die physikochemischen Eigenschaften von ICG positiv beeinflusst.

2.1 Materialien

Indocyaningrün (Cardiogreen), frei von Natriumiodid, wurde von der Firma Fluka (Taufkirchen) bezogen. Sofern nicht anders angegeben, wurden alle verwendeten Laborchemikalien im analytischen Reinheitsgrad von den Firmen Merck (Darmstadt), Sigma-Aldrich (Deisenhofen), Roth (Karlsruhe) und Serva (Heidelberg) bezogen. Alle Lösungen wurden mit deionisiertem Wasser, aus einem Milli-Q[®] Gradient System (Millipore, Bedford, UK), angesetzt. Die Hersteller und wichtigsten Bestandteile der verwendeten kolloidalen Trägersysteme sind in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Übersicht über die verwendeten kolloidalen Trägersysteme.

Präparat	Arzneiform	Bestandteile	Hersteller
COATSOME [®] EL-11-C	Liposomen	Cholesterol, Stearylamin, POPC ^a	NOF Corporation (Tokyo, Japan)
Konaktion [®] MM	Mischmizellen	Phosphatidylcholin, Glykocholsäure	Roche Pharma AG (Basel, Schweiz)
Lipofundin [®] N	Fettemulsion	Eilecithin (75 % Phosphatidylcholin), Glycerol, Sojaöl	B. Braun Melsungen AG (Melsungen, Deutschland)
Sandimmun [®] Optoral	Mikroemulsion	Maiskeimöl, Propylenglykol, Ethanol, Cremophor [®] RH 40 ^b	Novartis Pharma GmbH (Basel, Schweiz)

^aPOPC – Palmitoyl-oleoyl-phosphatidylcholin. ^bCremophor[®] RH 40 – Macrogol-Glycerolhydroxystearat.

2.2 Methoden

2.2.1 Herstellung kolloidaler ICG Formulierungen

Für die Herstellung der kolloidalen ICG Formulierungen wurde eine wässrige ICG Stammlösung mit einer Konzentration von $3 \cdot 10^4$ mg/l in deionisiertem Wasser angesetzt und auf dem Magnetrührer gerührt. Nach vollständigem Lösen des Farbstoffes wurden jeweils 0,5 ml dieser Stammlösung auf 2,5 ml Trägersystem gegeben, um eine ICG Endkonzentration von $5 \cdot 10^3$ mg/l zu erhalten. Da Sandimmun[®] Optoral ein wasserfreies Präkonzentrat darstellt, wurde die Lösung vor der Verwendung 1:10 mit Wasser verdünnt, um eine Mikroemulsion zu erhalten. Die Glasgefäße mit den enthaltenen neuen ICG Formulierungen wurden mit Alumi-

niumfolie umwickelt und weitere 30 min auf dem Magnetrührer gerührt. Als Vergleichslösung zu den kolloidalen ICG Formulierungen wurde ICG in deionisiertem Wasser in einer Konzentration von $5 \cdot 10^3$ mg/l gelöst. Die optischen Eigenschaften, die Teilchengrößenverteilung und das Zetapotential der Proben wurden direkt im Anschluss an die Herstellung bestimmt. Für die Stabilitätsuntersuchungen wurden die Proben eine Woche unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur gelagert und alle 24 h photometrisch vermessen. Vor jeder Messung wurden die Proben 1:1000 mit dem jeweiligen Formulierungsmedium (deionisiertes Wasser oder kolloidales Trägersystem) verdünnt, um eine Farbstoffkonzentration von 5 mg/l zu erhalten.

2.2.2 Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS)

Zur Bestimmung des mittleren Partikeldurchmessers und der Partikelgrößenverteilung nanoskaliger Formulierungen wurde die Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS) angewendet, mit der Partikel im Bereich von ca. 5 nm bis 5 μ m detektiert werden können [83].

Bei diesem Messverfahren wird die Intensität der gestreuten Lichtstrahlen, in diesem Falle in einem Rückstreuwinkel von 173° (NIBS - „*non-invasive backscatter technology*“ von Malvern), erfasst. Die Anwendung der Rückstremethode verringert im Vergleich zur Detektion bei kleineren Winkeln die Mehrfachstreuung von Partikeln, wodurch es möglich ist, auch höher konzentrierte Proben zu vermessen [84]. Bedingt durch die *Brownsche* Molekularbewegung der dispergierten Partikel kommt es zu zeitabhängigen Schwankungen der Streulichtintensitäten, welche in Abhängigkeit zur Größe der Partikel stehen. Kleine Partikel besitzen eine hohe Diffusionsgeschwindigkeit und verursachen somit starke Streulichtfluktuationen, wohingegen große Partikel langsam diffundieren und geringe Fluktuationen erzeugen. Mit Hilfe einer Autokorrelationsfunktion kann aus den zeitlichen Intensitätsschwankungen der Diffusionskoeffizient D der dispergierten Partikel bestimmt werden, über den wiederum unter Annahme von sphärischen Partikeln der hydrodynamische Durchmesser bzw. Radius r nach *Einstein-Stokes* (s. Gleichung 1) berechnet werden kann [83]:

$$r = \frac{k \cdot T}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot D} \quad (1)$$

mit: r Radius, k Boltzmann Konstante, T absolute Temperatur, η dynamische Viskosität des Mediums, D Diffusionskoeffizient

Der Polydispersitätsindex (PDI) beschreibt die Breite der Partikelgrößenverteilung und kann Werte zwischen 0 und 1 annehmen. Für eine ideale monomodale Probe ist der $PDI = 0$. In der Praxis werden Dispersionen mit einem $PDI < 0,1$ als monodispers bezeichnet, eine enge Verteilung liegt bei Werten zwischen 0,1 und 0,2 und eine breite Verteilung bei Werten $> 0,2$ vor. Ein $PDI > 0,5$ ist praktisch nicht mehr auswertbar, da dies auf eine breite Verteilung unbestimmter Form hindeutet [83].

Für die PCS Messungen wurde ein Zetasizer Nano ZS der Firma Malvern Instruments Ltd. (Worcestershire, UK), ausgestattet mit einem 4 mW Helium-Neon Laser mit einer Wellenlänge von 633 nm und einem Streuwinkel von 173° verwendet. Alle Proben wurden in dreifacher Ausführung bei geeigneter Verdünnung und konstanter Temperatur von 25°C vermessen. Die Auswertung der Autokorrelationsfunktion erfolgte über die Dispersion Technology Software (DTS Nano Version 4.20, Malvern) mittels der Kumulanten-Analyse und dem CONTIN-Algorithmus. Bei hochkonzentrierten Lösungen wurde vor den PCS Messungen die Viskosität mit Hilfe eines Kugelfallviskosimeters (Firma Haake) bei 25°C bestimmt und in der Auswertung berücksichtigt. Die Kalibrierung des Zetasizer Nano ZS erfolgte mit Standardlatexpartikeln unterschiedlicher Größe.

2.2.3 Laser-Doppler-Anemometrie (LDA) und Zetapotential (ζ -Potential)

Bei der Laser-Doppler-Anemometrie wird die Wanderungsgeschwindigkeit von Partikeln im elektrischen Feld bestimmt, die in Abhängigkeit zur Oberflächenladung der Partikel steht. Das Zetapotential, ein Maß der Oberflächenladung, kann Informationen zur Stabilität partikulärer Systeme geben oder zur Charakterisierung elektrostatischer Veränderungen auf der Partikeloberfläche herangezogen werden.

Auf der Oberfläche von Partikeln kommt es in flüssigen Medien durch Adsorption von Ionen zur Ausbildung einer elektrischen Doppelschicht, der so genannten Sternschicht. An diese Schicht schließt sich eine bewegliche diffuse Schicht an, welche die Ladungen der Sternschicht durch entsprechende Gegenionen kompensiert und den Partikel zum Umgebungsmedium hin neutral erscheinen lässt. Durch Diffusionsbewegungen der Partikel in Lösung kommt es zur teilweisen Abstreifung der diffusen Schicht, wodurch die Partikel nach außen hin nicht mehr neutral auftreten. Diese Partikel erfahren bei Anlegung eines elektrischen Feldes eine Beschleunigung auf die entgegengesetzt geladene Elektrode und es kommt

zur Reibung und nahezu kompletten Abstreifung der diffusen Schicht. Dabei entsteht ein Potential an der Scherebene der Partikel, welches als Zetapotential (ZP) bezeichnet wird [85].

Für die Bestimmung der Wanderungsgeschwindigkeit mittels LDA wird das Phänomen der Lichtstreuung an Partikeln ausgenutzt. Aufgrund des *Doppler*-Effektes kommt es bei der Streuung von Licht zu einer Frequenzverschiebung des ursprünglichen Laserstrahls. Mit Hilfe dieser Verschiebung kann die Partikelgeschwindigkeit mittels folgender Gleichung berechnet werden:

$$f_d = \frac{2 \sin(\theta/2)}{\lambda} \cdot v \quad (2)$$

mit: f_d Dopplerfrequenz, θ Streulichtwinkel, λ Wellenlänge des Laserlichtes, v Partikelgeschwindigkeit

Die Berechnung des Zetapotentials erfolgt über die *Helmholtz-Smoluchowski* Beziehung:

$$ZP = \frac{v}{\eta \cdot \varepsilon \cdot E} \quad (3)$$

mit: ZP Zetapotential, v Partikelgeschwindigkeit, η Viskosität des Mediums, ε Dielektrizitätskonstante, E elektrische Feldstärke

Die Messungen ($n = 6$) wurden, wie auch die PCS Messungen, mit einem Zetasizer Nano ZS der Firma Malvern Instruments Ltd. (Worcestershire, UK) durchgeführt. Die Proben wurden ohne weitere Verdünnung unter konstantem pH-Wert bei 25 °C mit Hilfe der DTS Nano Software, Version 4.20 vermessen.

2.2.4 UV/VIS-Spektroskopie

Die UV/VIS-Spektroskopie wird zur Charakterisierung und Identifizierung von Substanzen mit chromophoren Systemen eingesetzt. Neben qualitativen und quantitativen Aussagen können auch Konjugationseffekte, Solvationsprozesse, Kinetiken oder Stabilitäten erfasst werden, sofern die Elektronenhülle des Moleküls beeinflusst wird oder Veränderungen im chromophoren System auftreten. Die Methode beruht auf der spezifischen Absorption elektromagnetischer Strahlung des ultravioletten und sichtbaren Bereiches durch Chromophore. Dabei wird die gesamte Energie des Photons auf das Molekül übertragen und Elektronen der äußeren Schale werden vom Grundzustand in den angeregten Zustand überführt. Die Energie eines Photons ist gegeben durch die *Einstein-Bohr* Gleichung:

$$E = h \cdot \nu = h \cdot \frac{c}{\lambda} \quad (4)$$

mit: E Energie, h Plancksches Wirkungsquantum, ν Frequenz, c Lichtgeschwindigkeit, λ Wellenlänge

Beim Durchtritt eines Lichtstrahls der Anfangsintensität I_0 durch eine absorbierende Substanz, tritt ein Lichtstrahl geringerer Intensität I aus. Nach dem *Lambert-Beer'schen* Gesetz ist diese Abschwächung durch die Schichtdicke d einer Küvette abhängig von der eingesetzten Konzentration c der Probenlösung:

$$A = \log \frac{I_0}{I} = \varepsilon \cdot c \cdot d \quad (5)$$

mit: A Absorption, I_0 Intensität des einfallenden Lichtstrahls, I Intensität des austretenden Lichtstrahls, ε molarer Absorptionskoeffizient, c Konzentration der Probe, d Schichtdicke

Das *Lambert-Beer'sche* Gesetz kann zu quantitativen Bestimmungen angewendet werden, besitzt aber nur Gültigkeit für monochromatisches Licht und verdünnte klare Lösungen.

Zur Bestimmung der optischen Eigenschaften sowie der optischen Stabilität der kolloidalen Formulierungen wurde ein Zweistrahlphotometer vom Typ Uvikon 933 der Firma Kontron Instruments verwendet. Die Proben wurden in Einweg-Acryl-Küvetten mit Schichtdicken von 1 cm und Trägersystem ohne Farbstoff als Referenz vermessen. Um die optischen Eigenschaften zu bestimmen, wurden Spektren von 500 - 900 nm aufgenommen. Zur Untersuchung der optischen Stabilität von ICG wurde die Absorption im Maximum in Abhängigkeit von der Zeit vermessen. Alle Proben wurden bei Raumtemperatur und, wenn nicht anders angegeben, in dreifacher Ausführung vermessen. Für die Stabilität wurden die Proben unter Lichtausschluss (Alufolie) bei Raumtemperatur gelagert.

2.2.5 Fluoreszenzspektroskopie

Durch die Aufnahme von Energie in Form von Strahlung werden Elektronen eines Fluorophors vom Grundzustand S_0 in höhere Energieniveaus S_1 (ν_1 , ν_2 , usw.) angehoben. Nach der Absorption der Photonen strebt das Molekül danach, wieder in den energetisch günstigen Zustand zurückzukehren. Neben der Möglichkeit zur strahlungslosen Relaxation, bei der die Energiedifferenz in Form von Schwingungsenergie (Wärme) abgegeben wird, können auch Photonen in Form von Fluoreszenz emittiert werden (s. Abbildung 6). Durch verschiedene Umwandlungsprozesse kommt es zu einem Energieverlust, der eine bathochrome Verschie-

bung der emittierten Fluoreszenzstrahlung gegenüber dem Absorptionsspektrum zur Folge hat (*Stokesverschiebung*). Das Verhältnis von der Anzahl der emittierten zu der Anzahl der absorbierten Photonen wird als Quantenausbeute Φ bezeichnet:

$$\Phi = \frac{n(\text{Em})}{n(\text{Abs})} \cdot 100 \quad (6)$$

mit: Φ Quantenausbeute, $n(\text{Em})$ Anzahl der emittierten Photonen, $n(\text{Abs})$ Anzahl der absorbierten Photonen

Die Quantenausbeute kann maximal den Wert 1 (= 100 %) erreichen, in diesem Fall wird jedes absorbierte Photon als Fluoreszenzphoton wieder emittiert. In der Realität ist dies kaum der Fall, da neben der *Stokesverschiebung* die zuvor erwähnten Energieverluste durch nicht-strahlende Prozesse auch für eine Verminderung der Quantenausbeute sorgen. Strahlungslose Deaktivierungsprozesse können in Gegenwart bestimmter Stoffe, so genannte Quencher, gefördert werden. Dabei wird die Energie vom angeregten Molekül, dem Donator, strahlungslos auf ein anderes Molekül, dem Akzeptor, übertragen.

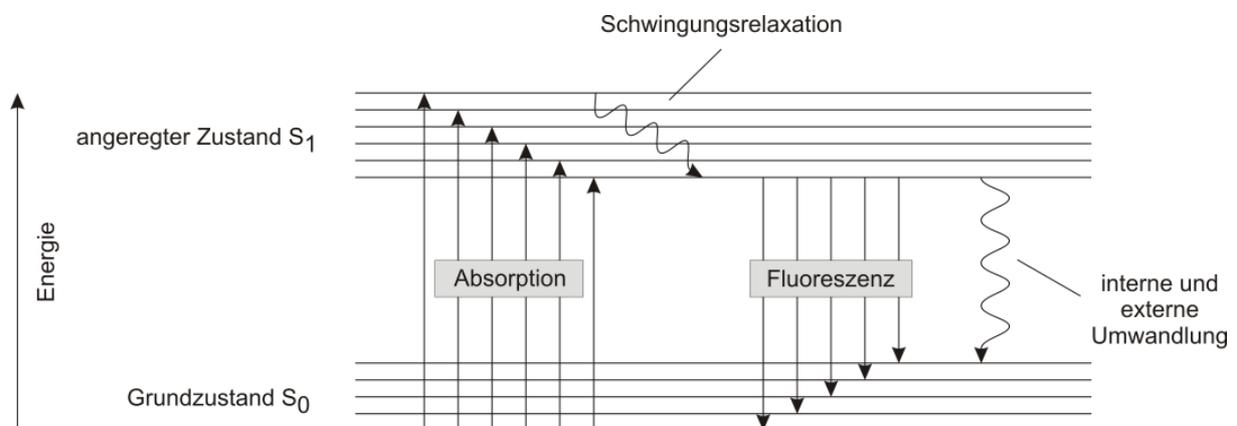


Abbildung 6: Vereinfachtes Jablonski-Termschema modifiziert nach [86].

Für die Bestimmung der Quantenausbeute wurde eine Relativmethode angewendet, bei der ICG in DMSO als Standard eingesetzt wurde [87]. Die Anzahl der emittierten Photonen wurde über die integrierte Funktionskurve des Emissionsspektrums zwischen 500 und 900 nm bestimmt [88]. Die Berechnung der Anzahl der absorbierten Photonen erfolgte über die Ab-

sorption A bei der Anregungswellenlänge λ_{Ex} mit Hilfe des *Lambert Beer'schen* Gesetzes und des Absorptionsgrades α :

$$A = -\log \frac{I}{I_0} = -\log \tau \quad (7)$$

$$\frac{I}{I_0} = \tau = 10^{-A} \quad (8)$$

$$1 = \alpha + \tau \quad \text{bzw.} \quad \tau = 1 - \alpha \quad (9)$$

$$\alpha = 1 - 10^{-A} \quad (10)$$

mit: τ Transmissionsgrad, I_0 Intensität des einfallenden Lichtstrahls, I Intensität des austretenden Lichtstrahls, A Absorption, α Absorptionsgrad

Somit ergibt sich für den Korrekturfaktor f aus ICG in DMSO ($\Phi = 13 \%$) folgende Gleichung [58, 89]:

$$f = \frac{\int f(\lambda)_{DMSO}}{(1 - 10^{-A}) \cdot \Phi_{DMSO}} \quad (11)$$

mit: f Korrekturfaktor, $f(\lambda)_{DMSO}$ Funktion der Emissionskurve von 500-900 nm, A Absorption bei der Anregungswellenlänge, Φ_{DMSO} Quantenausbeute von ICG in DMSO

Für die Berechnung wurden zunächst Absorptions- und Emissionsspektren von ICG in DMSO ($c(\text{ICG}) = 5 \text{ mg/l}$), mit reinem DMSO als Referenz, von 500-900 nm aufgenommen. Die Anregungswellenlänge des Emissionsspektrums entsprach der Wellenlänge des jeweiligen Maximums im Absorptionsspektrum ($\lambda_{\max}(\text{ICG}_{\text{DMSO}}) = 794 \text{ nm}$). Die Fläche unter der Fluoreszenzkurve wurde durch Integration der Funktion mit Hilfe der Software Origin (Version 6.0) berechnet und die Absorption bei der Anregungswellenlänge ($\lambda_{\text{ex}}(\text{ICG}_{\text{DMSO}}) = 794 \text{ nm}$) notiert. Nach Berechnung des Korrekturfaktors wurden in gleicher Weise Absorptions- und Emissionsspektren der neuen Formulierungen aufgenommen. Aufgrund von variierenden Anregungswellenlängen und folglich abweichenden Lampenintensitäten bei den verschiedenen ICG Formulierungen, wurden alle Emissionsspektren auf die Standardlampenintensität normiert. Nach Bestimmung der Flächen unter der Emissionskurve und Absorption bei der Anregungswellenlänge wurde die Quantenausbeute mit Hilfe folgender Gleichung berechnet:

$$\Phi_{\text{Probe}} = \frac{\int f(\lambda)_{\text{Probe}}}{(1 - 10^{-A}) \cdot f} \quad (12)$$

mit: Φ_{Probe} Quantenausbeute der Formulierung, $f(\lambda)_{\text{Probe}}$ Funktion der Emissionskurve, A Absorption bei der Anregungswellenlänge, f Korrekturfaktor

Die Emissionsspektren wurden an einem Spex Fluorolog-2 Spektrofluorometer der Firma Horiba Jobin Yvon (Edison, NJ), ausgestattet mit einer 450 W Xenon Lampe, einem Anregungs- und einem Emissionsmonochromator (Spex 1681) und einem Detektor (Hamamatsu R928 PMT), aufgenommen. Die Detektorempfindlichkeit wurde mit Hilfe geeichter Standardglühlampen bestimmt und alle Emissionsspektren mittels dieser Funktion korrigiert. Die Proben wurden in Einweg-Acryl-Küvetten mit 1 cm Schichtdicke und Formulierungen ohne Farbstoff als Referenz vermessen. Die Versuche erfolgten bei Raumtemperatur und wenn nicht anders angegeben in dreifacher Ausführung.

2.2.6 Sättigungskonzentration

Die Sättigungskonzentration von ICG in kolloidalen Trägersystemen wurde durch Rühren einer übersättigten Suspension mit ICG über 24 h und anschließender photometrischen Gehaltsbestimmung von ICG nach Zentrifugation im Überstand bestimmt. Dazu wurde in etwa 1 ml Trägermedium soviel ICG gegeben, bis sich ein Bodensatz bildete. Diese übersättigte Suspension wurde auf dem Thermoschüttler (Thermomixer Comfort, Fa. Eppendorf) bei 23 °C und 750 U/min geschüttelt. In bestimmten Abständen wurde das Vorhandensein des Bodensatzes überprüft und gegebenenfalls ICG ergänzt. Nach 24 h wurde die Probe zentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5417R, Fa. Eppendorf) und der Überstand durch einen 0,45 µm Spritzenfilter (Minisart[®] RC 4 mm, Fa. Sartorius) filtriert. Der Gehalt an ICG wurde nach entsprechender Verdünnung mit Hilfe einer Kalibriergerade photometrisch bestimmt. Aus drei Parallelansätzen wurde der Gehalt von jeweils drei Proben bestimmt und daraus der Mittelwert und die Standardabweichung gebildet.

2.3 Ergebnisse und Diskussion

2.3.1 Charakterisierung verschiedener kolloidaler ICG Formulierungen

Die Herstellung der verschiedenen ICG Formulierungen wurde ausführlich in Kapitel 2.2.1 beschrieben. Aufgrund der guten Wasserlöslichkeit von ICG konnte die Bildung kolloidaler Formulierungen durch Mischen einer wässrigen ICG Stammlösung mit den ausgewählten Trägersystemen erfolgen. Ob und welche Wechselwirkungen zwischen ICG und den Trägersystemen erfolgten, wurde mit Hilfe der zuvor erläuterten Methoden untersucht.

Einen ersten Eindruck lieferten die Veränderungen der Absorptions- und Emissionsspektren, die bei allen Formulierungen im Vergleich zu der rein wässrigen ICG Lösung um 17 nm (in der Mikroemulsion) bis hin zu 29 nm (in den Mischmizellen) bathochrom verschoben wurden (s. Abbildung 7).

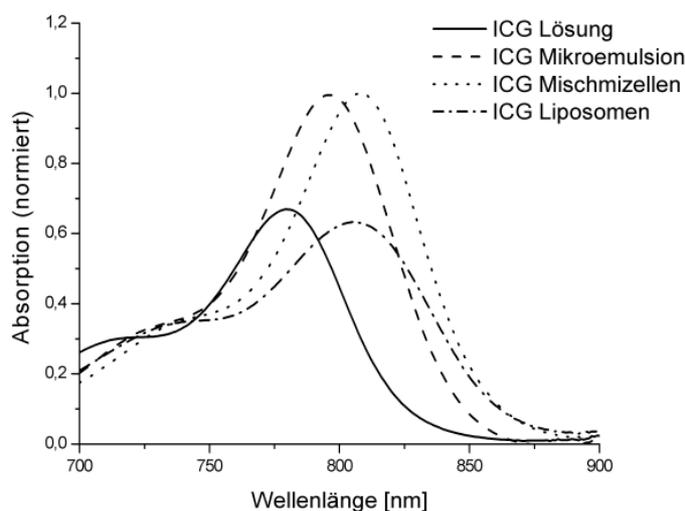


Abbildung 7: Veränderung der Absorptionsspektren von ICG in den untersuchten kolloidalen Trägersystemen im Vergleich zu reiner ICG Lösung ($c_{\text{ICG}} = 5 \text{ mg/l}$). Alle Spektren zeigen eine bathochrome Verschiebung um etwa 20 nm. In der Mikroemulsion und den Mischmizellen ist die optische Dichte im Monomerenmaximum deutlich erhöht.

Einen Spezialfall stellte dabei die Formulierung aus der Fettemulsion Lipofundin[®] N dar, bei der aufgrund der milchig-weißen Trübung starke Streuungseffekte keine optischen Untersuchungen zuließen. Erst nach starker Verdünnung der Emulsion mit Wasser (1:1000) konnten Absorptionsspektren aufgenommen werden, was zumindest eine Bestimmung der optischen Stabilität von ICG in diesem System zuließ. Aufgrund ähnlicher Streukoeffizienten von Fettemulsionen und Gewebekomponenten, wurden verdünnte Fettemulsionen (0,5 %

Intralipid[®] und 1 % Nutralipid[®]) bereits 1986 in der optischen Bildgebung *in vitro* als Gewebephantome verwendet [90-93]. Mit Hilfe dieser Modelle wurden besondere Methoden entwickelt, um Fluorophore in stark streuenden Medien detektieren zu können [91, 92]. So wurde es möglich, die optischen Eigenschaften von ICG in 0,5 % Intralipid[®] Lösung, eine Fettemulsion mit ähnlichen Bestandteilen wie Lipofundin[®] N, zu bestimmen [94, 95]. Die Absorptions- und Emissionsspektren von ICG veränderten sich in 0,5 % Intralipid Lösung analog zu den zuvor genannten Trägersystemen mit einer bathochromen Verschiebung von etwa 20 nm. Diese bei allen kolloidalen ICG Formulierungen beobachtete spektrale Verschiebung entsteht durch eine Veränderung des physikochemischen Umgebungsmilieus von ICG oder durch spezifische Interaktionen mit Grenzflächen [69]. Wie bekannt ist, besitzt ICG amphiphile Eigenschaften und bindet im Blut an Plasmaproteine [96] und Lipoproteine [47] mit der Folge einer spektralen Verschiebung um 25 nm. Im Falle der Emulsionen, Mischmizellen und Liposomen könnte sich ICG teilweise an den Grenzflächen in den hydrophoben Teil der Phospholipide bzw. Tenside einlagern, was die beobachtete Rotverschiebung erklären würde. Für diese Interaktion sind die zwei dimethylierten Benzoindotricarbocyanin-Gruppen des Farbstoffes verantwortlich, welche den lipophilen Teil des Moleküls darstellen [97].

Tabelle 2: Übersicht der optischen Eigenschaften und Stabilität von ICG in wässriger Lösung und ICG mit verschiedenen kolloidalen Trägersystemen.

ICG Trägersystem	λ_{\max} Abs [nm]	λ_{\max} Em [nm]	Int _{Em} ^a	Φ ^b [%]	optische Stabilität ^c [Tage]
ohne Trägersystem	779	805		2,54 ± 0,04	< 1
COATSOME [®] EL-11-C	805	830	↓	0,71 ± 0,03	2
Konaktion [®] MM	808	830	↑	5,32 ± 0,13	> 7
Lipofundin [®] N	799 ^d	825 ^d	↑ ^d	n.b. ^e	3
Sandimmun [®] Optoral	796	820	↑	6,14 ± 0,28	> 7

^aFluoreszenzintensität im Vergleich zu der von ICG in Wasser. ^bFluoreszenzquantenausbeute (Φ) relativ zu der von ICG in DMSO ($\Phi = 13$ %) nach [58]. ^cDie Formulierungen wurden als optisch stabil bewertet, solange die Absorptionswerte über 90 % der Ausgangsabsorption lagen. ^dLiteraturwerte aus [94]. ^en.b. - nicht bestimmt.

Zusätzlich zu der Rotverschiebung der Spektren nahm der Absorptionskoeffizient von ICG in 0,5 % Intralipid Lösung [94], in der Mikroemulsion und in den Mischmizellen zu (s. Abbildung 7). Lediglich in der liposomalen Formulierung nahm die Absorptions- und Emissionsfä-

higkeit von ICG ab. Sowohl die erhöhten Quantenausbeuten von ICG in der Mikroemulsion ($\Phi = 6,14 \pm 0,28 \%$) und in den Mischmizellen ($\Phi = 5,32 \pm 0,13 \%$), als auch die geringere Quantenausbeute von ICG in den Liposomen ($\Phi = 0,71 \pm 0,03 \%$) bestätigten diese Beobachtungen (s. Tabelle 2). Eine geringe Absorptions- und Emissionsfähigkeit von ICG in wässrigen Medien ist auf die Selbstaggregation der Farbstoffmoleküle zurückzuführen, welche mit einem starkem Quenching der Fluoreszenz durch einen Fluoreszenz-Resonanz-Transfer (FRET) Effekt (s. Kapitel 1.4.4) verbunden ist. Durch Interaktion von ICG mit den Grenzflächen in den kolloidalen Trägersystemen scheint diese Aggregatbildung verringert zu sein. Die Farbstoffmoleküle werden durch die Einlagerung in die Grenzflächen voneinander getrennt [98]. Nur in der liposomalen Formulierung zeigte ICG eine geringere Quantenausbeute im Vergleich zu rein wässriger ICG Lösung (s. Tabelle 2). Folglich scheint die Farbstoffaggregation in diesem System verstärkt zu sein. Wie bereits von Devoisselle *et al.* beobachtet, neigen die ICG Moleküle in Abhängigkeit von der Zusammensetzung der Liposomen zu einer Aggregation an der Oberfläche und nicht zu einer Auftrennung zwischen den Grenzflächen [98]. Vorversuche mit neutralen und negativ geladenen Liposomen zeigten, dass die Menge an aufgenommenem Farbstoff in Abhängigkeit zu der Ladung der Liposomen steht. Im Vergleich zu den positiv geladenen Liposomen wurden in neutralen Liposomen etwa ein fünfzigstel und in negativ geladenen Liposomen nur ein hundertstel der Menge an ICG aufgenommen. Dies lässt darauf schließen, dass die Aufnahme des Farbstoffes durch elektrostatische Wechselwirkungen bestimmt wird. Hydrophobe Wechselwirkungen tragen dagegen nur wenig zur Aufnahme bei. Die in dieser Arbeit ausführlicher beschriebenen positiven Liposomen verstärkten folglich die Aggregation des Farbstoffes durch elektrostatische Wechselwirkungen mit den negativ geladenen ICG Molekülen an der Oberfläche.

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, lässt sich die optische Stabilität von ICG über die Veränderung der Absorptions- oder Emissionseigenschaften bestimmen (s. Abbildung 8). Bei dem Abbau von ICG in wässriger Lösung kommt es zu einer Sättigung der konjugierten Doppelbindungen, was zu einer Bildung von Leukoformen mit geringeren Absorptions- und Emissionseigenschaften führt [82]. Weiterhin werden diese Leukoformen in Fragmente mit intakten aromatischen Endgruppen gespalten. Die Anwesenheit von Lösungsmittelradikalen und Ionen beschleunigt diesen Prozess. Zusätzlich bestimmen das Licht, der Sauerstoffpartialdruck, hohe Temperaturen, extreme pH-Werte und die ICG Konzentration selbst die Geschwindigkeit dieses Abbaus [59].

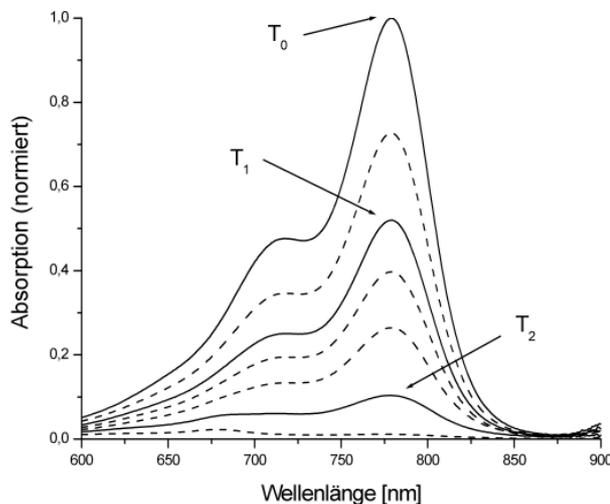


Abbildung 8: Veränderung des Absorptionsspektrums von ICG in Wasser ($c_{\text{ICG}} = 1 \text{ mg/l}$) in Abhängigkeit von der Zeit. (T_0) Direkt nach der Herstellung, (T_1) nach zwei Tagen und (T_2) nach einer Woche Lagerung bei Raumtemperatur und unter normalen Lichtbedingungen.

Um einen Eindruck von den stabilisierenden Eigenschaften der Trägersysteme zu bekommen, wurden Absorptionsspektren von ICG in Lösung und ICG in den kolloidalen Formulierungen über einen Zeitraum von einer Woche aufgenommen. Alle Proben wurden dabei bei Raumtemperatur und unter normalen Lichtbedingungen gelagert. Die Formulierungen wurden als optisch stabil bewertet, solange die Absorptionswerte bei über 90 % der Ausgangsabsorption lagen. In Tabelle 2 sind die optischen Stabilitäten von ICG in den verschiedenen Formulierungen dargestellt. Alle kolloidalen Trägersysteme erhöhten die Stabilität von ICG im Vergleich zu rein wässriger ICG Lösung. Diese zeigte schon nach einem Tag Lagerung nur noch 89 % der Ausgangsabsorption. In der Fettemulsion und in der liposomalen Formulierung blieb ICG über einen Zeitraum von etwa zwei bis drei Tagen stabil, während in den Mischmizellen und der Mikroemulsion die Absorptionswerte über eine Woche annähernd konstant blieben (s. Abbildung 9). Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die hydrolyse-empfindlichen Strukturen des Farbstoffes in den Mischmizellen und der Mikroemulsion vom Umgebungsmilieu Wasser abgeschirmt werden. Bei den Liposomen und der Fettemulsion scheint dies nicht, oder nur in geringerem Maße, der Fall zu sein. Wie bereits durch die Verringerung der Quantenausbeute von ICG in der liposomalen Formulierung vermutet, wird ICG nur an die Liposomenoberfläche gebunden und nicht in die Phospholipiddoppelschicht aufgenommen. Bei einer Aufnahme in die Doppelschicht müsste mit einer höheren Stabilität analog zu der mischmizellaren Formulierung zu rechnen sein.

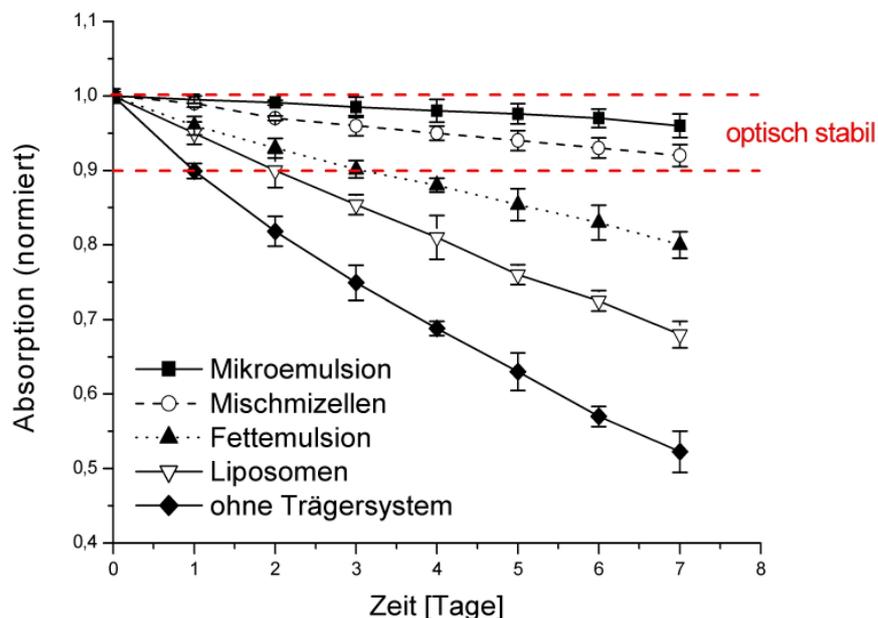


Abbildung 9: Optische Stabilität von ICG ($c_{\text{ICG}} = 5 \cdot 10^3$ mg/l) in verschiedenen kolloidalen Trägersystemen. Die Proben wurden bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss gelagert und alle 24 h photometrisch vermessen. Dazu wurden die Stammlösungen direkt vor der Messung mit dem jeweiligen Trägermedium 1:1000 verdünnt. Die Fettemulsion wurde aufgrund der starken Streueffekte der milchigen Lösung mit Wasser verdünnt. Bestimmt wurden die optischen Dichten der Proben im jeweiligen Absorptionsmaximum die dann auf den Ausgangswert normiert wurden. In der Mikroemulsion und den Mischmizellen zeigt ICG nach einer Woche Lagerung noch 90 % der Ausgangsabsorption, während die optische Dichte in Wasser auf 50 % der Ausgangsabsorption absinkt.

Der geringe Stabilisierungseffekt der Intralipid® Fettemulsion im Vergleich zur Mikroemulsion ist auf eine geringere spezifische Grenzfläche zurückzuführen. Intralipid® stellt eine O/W Emulsion dar, die 10 % lipophile Phase (Sojaöl), 0,8 % Emulgator (Eilecithin), 2,5 % Glycerol zur Isotonisierung und als äußere Phase Wasser enthält [99]. Die Lipidtröpfchen besitzen einen mittleren Teilchendurchmesser von etwa 270 ± 80 nm [100, 101]. Im Vergleich dazu weist die Mikroemulsion durch einen höheren Anteil an Tensid sehr viel kleinere Tröpfchengrößen von $27,5 \pm 0,2$ nm auf (s. Tabelle 3). Durch den zehnfach höheren Dispersionsgrad der Tröpfchen in der Mikroemulsion vergrößert sich die dem Farbstoff zur Verfügung stehende Grenzfläche [102]. Die Stabilisierung von ICG ist demnach, wie auch beobachtet, in der Mikroemulsion effektiver als in der Fettemulsion. Eine zudem stark

variierende Stabilität von ICG in Fettemulsionen wurde bereits in früheren Studien beobachtet [97, 103]. Diese veränderte sich in Abhängigkeit vom Herstellungsprozess, von der verwendeten ICG Konzentration und dem Lichteinfluss. Genauere Untersuchungen zur Langzeitstabilität von ICG in Fettemulsionen wurden jedoch nicht durchgeführt. In diversen anderen Studien konnte bereits eine verbesserte Stabilität von ICG durch Verkapselung des Farbstoffes in nanopartikuläre Trägersysteme gezeigt werden [65, 67, 90, 104]. Die Langzeitstabilität von ICG in Mikroemulsionen, Fettemulsionen, Mischmizellen und Liposomen wurde bisher noch nicht untersucht. Erst kürzlich wurde eine erste Studie von Rodriguez *et al.* über die Stabilität von ICG in einem mizellaren System veröffentlicht [105]. Die Ergebnisse dieser Studie zeigten, dass ICG verkapselt in Mizellen über einen Zeitraum von zwei Wochen, gelagert bei Raumtemperatur und unter Lichtausschluss, optisch stabil blieb. Zum Zeitpunkt der eigenen Untersuchungen lagen diese Ergebnisse jedoch noch nicht vor.

Tabelle 3: Mittlere hydrodynamische Durchmesser, Polydispersitätsindizes, Zetapotentiale und pH-Werte der ICG-haltigen kolloidalen Formulierungen ($c_{\text{ICG}} = 5 \text{ mg/l}$) und Sättigungskonzentration von ICG in den Trägersystemen.

ICG Trägersystem	d_H^a [nm]	PDI ^a	ζ -Potential ^a [mV]	pH-Wert	$c(\text{ICG})_s$ [mg/ml]
ohne Trägersystem	---	---	---	6,8	35 ± 2
COATSOME® EL-11-C	248 ± 3	$0,265 \pm 0,015$	$-7,9 \pm 0,8$	6,9	$2,2 \pm 0,3$
Konaktion® MM	$1,4 \pm 2,2$ (55%) $28,8 \pm 1,7$ (45%)	$0,338 \pm 0,021$	$-11,4 \pm 3,4$	6,7	115 ± 11
Lipofundin® N	270 ± 80^b	n.b. ^c	$-30,4 \pm 1,4^b$	6,8	62 ± 5
Sandimmun® Optoral	$27,5 \pm 0,2$	$0,037 \pm 0,008$	$-0,6 \pm 0,7$	6,9	130 ± 8

^aIntensitäts-gewichteter mittlerer hydrodynamischer Durchmesser (d_H), Polydispersitätsindex (PDI) und ζ -Potential wurden mittels dynamischer Lichtstreuung (DLS) bestimmt. ^bLiteraturwerte ohne ICG aus [101].
^cn.b. - nicht bestimmt

Die Teilchengrößenverteilungen, Polydispersitätsindizes und Zetapotentiale der untersuchten ICG-haltigen kolloidalen Trägersysteme sind in Tabelle 3 dargestellt. Bei der ICG-haltigen Fettemulsion konnten diese Parameter aufgrund der zuvor schon beschriebenen Streuungseffekte mit Hilfe der dynamischen Lichtstreuung nicht bestimmt werden. Die liposomale Formulierung wies bei einer relativ breiten Verteilung ($\text{PDI} = 0,265 \pm 0,015$) einen mittleren hydrodynamischen Durchmesser von $d_H = 248 \pm 3 \text{ nm}$ auf. Das Zetapotential wurde bei einem

pH-Wert der Lösung von 6,9 mit $\zeta = -7,9 \pm 0,8$ mV bestimmt. Die reine Liposomensuspension ohne ICG besaß bei einer ähnlich breiten Verteilung ($PDI = 0,233 \pm 0,010$) einen etwas kleineren Durchmesser ($d_H = 217 \pm 2$ nm) und ein positives Zetapotential ($\zeta = +13,7 \pm 1,2$ mV) (s. Abbildung 10). Für die positive Oberflächenladung der Liposomen ist ein geringer Anteil an positiv geladenem Stearylamin verantwortlich (s. Tabelle 1). Die Zugabe von ICG zu den Liposomen bewirkte einen Anstieg des mittleren hydrodynamischen Durchmessers sowie einen Sprung des Zetapotentials von positiven zu negativen Werten (s. Abbildung 10).

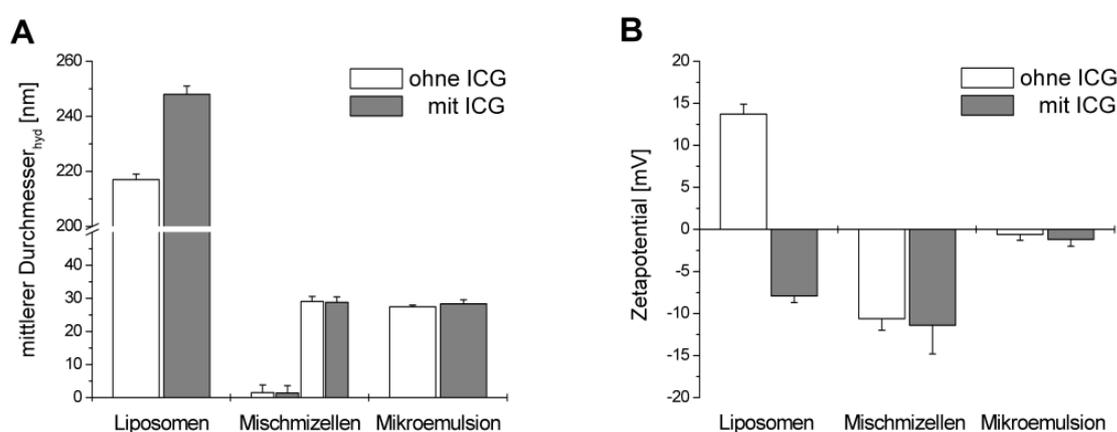


Abbildung 10: Vergleich des mittleren hydrodynamischen Durchmessers (A) und des Zetapotentials (B) der verwendeten Liposomen, Mischmizellen und Mikroemulsion vor und nach Zugabe von 5 mg/l ICG. Die Mischmizellen weisen eine bimodale Verteilung auf, weswegen die maximalen Intensitäten beider Populationen aufgeführt werden. In den Mischmizellen und der Mikroemulsion bewirkt die Zugabe von ICG keine signifikante Veränderung des Durchmessers und des Zetapotentials. Lediglich in den Liposomen erhöht sich der Durchmesser und das Zetapotential veränderte sich von positiven zu negativen Werten.

Diese Ergebnisse bestätigen die vorherige Annahme, dass ICG nicht in die Doppelschicht der Liposomen aufgenommen wird, sondern an der Liposomenoberfläche aggregiert. Im Vergleich zu den Liposomen traten bei Zugabe von ICG zu der mischmizellaren Formulierung und der Mikroemulsion keine signifikanten Veränderungen des mittleren hydrodynamischen Durchmessers und des Zetapotentials auf (s. Abbildung 10). Aus diesem Ergebnis müsste abgeleitet werden, dass der Farbstoff weder an der Oberfläche noch in der Grenzfläche, sondern im Innern der Mizellen und Mikroemulsionströpfchen eingelagert wird. Aufgrund der guten

Wasserlöslichkeit von ICG und der zuvor beschriebenen Verringerung der Aggregatbildung des Farbstoffes in diesen Systemen, ist diese Annahme jedoch unwahrscheinlich. Eine weitere Erklärung für die Konstanz des Durchmessers und Zetapotentials nach Zugabe von Farbstoff kann die Kurzlebigkeit dieser Systeme sein. Mizellen und Mikroemulsionströpfchen sind keine starren Gebilde sondern hochgradig dynamisch. Sie verändern sich infolge thermischer Fluktuationen und in Abhängigkeit von anderen thermodynamischen Zustandsvariablen [106, 107]. Aufgrund dieser ständigen Fluktuationen ist die Bestimmung der tatsächlichen Größe und Oberflächenladung der Teilchen mit Hilfe der dynamischen Lichtstreuung problematisch, so dass die Werte nur Näherungswerte darstellen können. Die Ergebnisse der dynamischen Lichtstreuung für die Konaktion[®] Mischmizellen lassen jedoch eindeutig auf eine bimodale Verteilung schließen, die sich zu etwa gleichen Teilen aus einer Fraktion kleinen und einer Fraktion größeren Teilchen zusammensetzt (s. Tabelle 3). Die Bildung von Mischmizellen wurde bereits 1968 von Small und später von Mazer *et al.* anhand von quasielastischer Lichtstreuung und Kernresonanzspektroskopie-Experimenten durch das „Primär-Sekundär-Mizellmodell“ beschrieben [108-110]. In Abhängigkeit von den eingesetzten Glykocholat-(GC) und Phosphatidylcholin- (PC) Konzentrationen, der Ionenstärke des Mediums, dem pH-Wert und der Temperatur können sich verschieden große Aggregatstrukturen in unterschiedlichen Formen ausbilden [111-113]. Bei einem geringen PC/GC Verhältnis (0 bis 0,6) koexistieren einfache Glykocholatmizellen mit kleinen sphärischen Primärmischmizellen, die hydrodynamische Durchmesser von 2,5 nm bis 7,0 nm besitzen und deren Lösungen besonders polydispers sind [114-116]. Bei einem hohen PC/GC Verhältnis (> 0,6) bilden sich große stäbchen- oder scheibenförmige Sekundärmischmizellen aus, die Durchmesser von 4 nm bis 60 nm aufweisen [111, 112, 114]. Für Konaktion[®] MM sind keine Konzentrationsangaben in der Literatur beschrieben, jedoch lassen die ermittelten Werte darauf schließen, dass neben Sekundärmischmizellen aus GC und PC ($d_H = 28,8 \pm 1,7$ nm) auch kleine Primärmischmizellen oder reine Glykocholatmizellen ($d_H = 1,4 \pm 2,2$ nm) vorliegen.

Die Sättigungskonzentrationen von ICG in den Trägersystemen zeigt, dass der Farbstoff eine starke Neigung hat, sich in Grenzflächen einzulagern (s. Tabelle 3). Mit Ausnahme der liposomalen Formulierung nahm die Sättigungskonzentration von ICG mit steigendem Tensidgehalt in den Trägersystemen zu. Diese Ergebnisse bestätigen die vorangegangenen Vermutungen, dass ICG an der Liposomenoberfläche aggregiert, während der Farbstoff in den anderen kolloidalen Trägern in die Grenzfläche eingelagert wird.

2.4 Selektion des Formulierungsprinzips

Mit Ausnahme der liposomalen ICG Formulierung zeigten alle kolloidalen ICG Formulierungen eine deutliche Verbesserung der optischen Eigenschaften und der *in vitro* Stabilität im Vergleich zu der konventionellen, kommerziell erwerblichen ICG Formulierung. Zusätzlich zu der positiven Wirkung auf die Farbstoffeigenschaften konnte die Sättigungskonzentration von ICG in kolloidalen Trägersystemen um ein Vielfaches erhöht werden. Zusammenfassend kann gefolgert werden, dass ICG aufgrund seiner Amphiphilie eine hohe Affinität zu Grenzflächen besitzt. Je höher der Anteil an Tensid und je größer die spezifische Oberfläche in der Formulierung ist, desto höher ist die Absorptions- und Emissionsfähigkeit, die Quantenausbeute und die *in vitro* Stabilität des Farbstoffes. Alle kolloidalen Formulierungen besaßen Teilchengrößen unter 300 nm und sind somit für eine parenterale Anwendung geeignet.

Die besten Ergebnisse wurden durch Formulierung als Mikroemulsion und als Mischmizellen erzielt. Beide Systeme stellen sehr ähnliche Formulierungsprinzipien dar und sind deswegen häufig schwer voneinander zu differenzieren. Sie enthalten Amphiphile, die sich ohne Energiezufuhr spontan in wässriger Lösung zu Assoziationskolloiden zusammenlagern. Betrachtet man Tensid/Wasser Gemische bei geringen Tensid Konzentrationen, so liegen mizellare Lösungen vor. Setzt man dem System kleine Mengen einer Ölkomponente zu, so werden diese in die Innenräume der Mizellen eingelagert. Unter bestimmten Konzentrationsverhältnissen der drei Komponenten Wasser/Öl/Tensid werden Mikroemulsionen gebildet. Beide Systeme sind thermodynamisch stabil und weisen vergleichbare Teilchengrößen auf. Durch diese Übereinstimmungen ist eine exakte Differenzierung zwischen den beiden Systemen oft schwierig.

Aufgrund des höheren Tensidgehaltes der Mikroemulsion muss abgewogen werden, ob die Verträglichkeit der Formulierung mit einer parenteralen Applikation zu vereinbaren ist. Ein hoher Tensidgehalt kann nach intravenöser Applikation zu starken Nebenwirkungen wie Histaminfreisetzung, anaphylaktischen Schock oder Hämolyse führen [117]. Mehrere Studien beschäftigten sich mit der Entwicklung von O/W-Mikroemulsionen für eine parenterale Anwendung [118-120]. Auch W/O-Mikroemulsionen wurden für eine retardierte Freisetzung von Peptiden nach i.m. Applikation entwickelt [121]. Einen sehr interessanten Ansatzpunkt für eine weitere Anwendung von Mikroemulsionen stellt die Solubilisierung extrem lipophiler Fluorocarbone dar, die zum Sauerstofftransport befähigt sind und somit als Blutersatzflüssig-

keiten dienen könnten [122]. Diese intensive Forschung zeigt, dass Mikroemulsionen für eine parenterale Anwendung vielversprechend sind; die Markteinführung für ein spezielles Präparat ist jedoch noch nicht in Aussicht.

Aufgrund der besseren Verträglichkeit der Mischmizellen im Vergleich zu der Mikroemulsion wurde in dieser Arbeit das mizellare System für die neue ICG Formulierung ausgewählt. Im Folgenden soll dieses Trägersystem genauer untersucht und optimiert werden.

3 Optimierung der ausgewählten ICG Formulierung

Nach der Auswahl eines geeigneten Formulierungsprinzips für ICG wurde das mizellare Trägersystem im folgenden Kapitel intensiver untersucht und optimiert. Dazu wurden neben einigen bekannten Tensiden wie Tween[®] 80, Pluronic[®] F 68, Cremophor[®] RH 40 und Solutol[®] HS 15, zwei Fettsäure-Zuckerester (Ryoto Sugar Ester[®] L-1695 und S-1170) und Mischmizellen aus Glykocholsäure und Phosphatidylcholin analog Konakion[®] MM untersucht. Bis auf die Zuckerester sind die verwendeten Tenside bereits für die parenterale Anwendung am Menschen zugelassen [117, 123]. Die beiden Fettsäure-Zuckerester werden seit vielen Jahren in der Kosmetik- und Lebensmittelindustrie verwendet und stellen aufgrund ihrer geringen Toxizität, Bioabbaubarkeit und exzellenten Emulgiereigenschaften Erfolg versprechende Hilfsstoffe dar. Zusätzlich sind sie nicht-ionisch und weisen im Vergleich zu Polyethylenglykol- (PEG) Tensiden eine geringere Temperatursensitivität auf [124]. Die Eignung dieser Tenside als pharmazeutischer Hilfsstoff für eine parenterale Anwendung sollte geprüft werden.

Das Aggregationsverhalten von ICG, welches die optischen Eigenschaften des Farbstoffes negativ beeinflusst, wurde in wässriger Lösung und in den Mizellformulierungen genauer untersucht. In Abhängigkeit von der Konzentration bildet ICG Dimere aus, die zu einer Abweichung vom Lambert-Beer'schen Gesetz führen [125]. Mit Hilfe der Absorptionsspektroskopie wurde das Dimerisierungsverhalten von ICG in wässriger Lösung mit dem in den mizellaren Formulierungen verglichen. Zusätzlich bildet ICG in Abhängigkeit von der Zeit bei hohen Konzentrationen in wässrigen Lösungen höher geordnete Aggregate, so genannte J-Aggregate aus [126-128]. Die Morphologie dieser Aggregate ist bisher unbekannt und sollte mit Hilfe der Kryotransmissionselektronenmikroskopie (Kryo-TEM) aufgeklärt werden. Dieses bildgebende Verfahren, welches in der Biologie bereits für Proteinstrukturaufklärungen als Routinemethode etabliert ist, ermöglicht eine direkte Untersuchung der Aggregate in der Umgebung des Lösungsmittels und somit eine Aufklärung der nativen Strukturen.

Neben der Charakterisierung der optischen Eigenschaften, der Stabilität, der Partikelgrößenverteilung und des Zetapotentials, wurde die Verkapselungseffizienz von ICG in ausgewählten Mizellsystemen bestimmt. Die Abtrennung des unverkapselten Farbstoffes vom verkapselten Anteil mit Hilfe von konventionellen Methoden wie Filtration oder Größen-

ausschlusschromatographie scheiterte aufgrund starker Interaktionen von ICG mit dem Säulen- und Filtermaterial. Aus diesem Grund wurde als Alternativmethode die Verkapselungseffizienz mit Hilfe der analytischen Ultrazentrifugation (AUZ) bestimmt. Durch Sedimentationsgeschwindigkeitsexperimente fraktionierte die AUZ bei 45.000 U/min den freien Farbstoff vom verkapselten Farbstoff in den Mizellen. Während der Sedimentation wurde die Messzelle von optischen Systemen durchstrahlt. Die Menge an nicht verkapseltem ICG konnte so im Überstand detektiert und die Konzentration mit Hilfe einer Kalibriergerade bestimmt werden. Eine genauere Beschreibung der Methode erfolgt in Kapitel 3.2.3.

Bei tensidhaltigen parenteral anzuwendenden Formulierungen ist die toxikologische Untersuchung der Hämolyseaktivität von besonders großer Bedeutung. Aufgrund der amphiphilen Struktur der Tenside kann es zu Wechselwirkungen und Schädigungen von Zellmembranen kommen [129]. Im Blut können Tenside an den Erythrozyten eine Hämolyse bewirken, was eine Ruptur der Zellmembran und den Austritt von Hämoglobin zur Folge hat. Durch Inkubation von humanen roten Blutkörperchen mit verschiedenen Konzentrationen der verwendeten Tenside wurde deren hämolytische Aktivität über den Anteil an freiem Hämoglobin photometrisch bestimmt.

3.1 Materialien

Lipoid[®] S 100, ein Phosphatidylcholin aus fettfreiem Sojalecithin wurde von der Firma Lipoid GmbH (Ludwigshafen, Deutschland) bezogen. Die Handelsnamen, chemische Bezeichnungen, HLB-Werte und Herstellerangaben der verwendeten Tenside sind in Tabelle 4 dargestellt. Die Herstellerangaben aller zusätzlich verwendeten Materialien werden bei der jeweiligen Methode mit aufgeführt.

Tabelle 4: Handelsnamen, chemische Bezeichnungen, HLB-Werte und Herstellerangaben der verwendeten Tenside.

Handelsname	Chemische Bezeichnung	HLB _G ^a	HLB _D ^b	Hersteller
Pluronic [®] F 68	Polyoxyethylen-Polyoxypropylen Blockcopolymer	16	29	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Tween [®] 80	Polyoxyethylen-20-Sorbitanmonooleat	15	15	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Cremophor [®] RH 40	Macrogol-Glycerolhydroxystearat	14	15	BASF (Ludwigshafen, Deutschland)
Solutol [®] HS 15	Macrogol-15-Hydroxystearat	16	15	BASF (Ludwigshafen, Deutschland)
Ryoto Sugar Ester [®] L-1695	Saccharoseester der Laurinsäure	16	15	Mitsubishi-Kagaku Foods Corp. (Tokyo, Japan)
Ryoto Sugar Ester [®] S-1170	Saccharoseester der Stearin- und Palmitinsäure	11	12	Mitsubishi-Kagaku Foods Corp. (Tokyo, Japan)
Glykocholsäure	Natriumglykocolat	-	23	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)

^aHLB-Werte nach Griffin [130]. ^bHLB-Werte nach Davies [131]. Bei der Berechnung der HLB-Werte wurden im Falle von Substanzgemischen die Hauptkomponenten betrachtet.

3.2 Methoden

3.2.1 Herstellung

Die Herstellung der Mizellen erfolgte durch Auflösen der Tenside in deionisiertem Wasser unter Rühren bei Raumtemperatur. Es wurden dabei Tensidkonzentrationen von $c = 0,05$ bis 100 mg/ml hergestellt. Die Osmolarität der Mizellformulierungen wurde mit wasserfreier

D(+)-Glukose (Merck, Darmstadt) auf 300 ± 10 mOsm/kg eingestellt und mit einem Vapor Pressure Osmometer der Firma Wescor (Vapro[®] 5520, USA) kontrolliert. Für die Mischmizellen wurden 10 ml Wasser auf 60 °C erhitzt, 540 mg Glykocholsäure und 900 mg Phosphatidylcholin oder 100 mg Ryoto Sugar Ester[®] S-1170 suspendiert und für 1,5 min mit Hilfe eines SilentCrusher[®] S (Heidolph Instruments, Deutschland) bei 75.000 U/min homogenisiert. Der pH-Wert der Suspension wurde mit 1 N NaOH auf 6,5 eingestellt, und die daraus resultierende klare Lösung wurde unter Rühren auf Raumtemperatur abgekühlt.

Die Verkapselung von ICG erfolgte durch Mischen von aliquoten Teilen einer wässrigen ICG Stammlösung ($c = 10^4$ mg/l) mit jeweils 5 ml der Mizellösungen. Die Endkonzentrationen von ICG reichten von $c = 0,1$ bis 15 mg/l. Die Formulierungen wurden weitere 30 min bei Raumtemperatur gerührt und dann ohne weitere Waschschrte verwendet.

3.2.2 Kryotransmissionselektronenmikroskopie (Kryo-TEM)

Die Aggregatbildung von ICG Molekülen in wässrigen Medien wurde mit Hilfe der Kryotransmissionselektronenmikroskopie (Kryo-TEM) untersucht. Die Kombination von ultraschneller Kryofixierung (Vitrifizierung durch schnelles Abkühlen) und TEM Abbildung ermöglicht eine direkte *in situ* Visualisierung der in Lösung vorliegenden Strukturen (eingefrorener Lösungszustand). Das TEM Bild entsteht durch Streuung und Absorption der Elektronen im Objekt mit einem Auflösungsvermögen von etwa 0,2 nm. Der Kontrast des Bildes entsteht durch unterschiedlich starke Streuung der Objektbereiche und ist eine Funktion der Massendickendifferenzen.

Die Probenpräparation erfolgte bei Raumtemperatur, indem jeweils 10 µl der Probe auf spezielle mit Kohlenstoff beschichtete und perforierte Kupfergitter aufgetragen wurden. Überschüssige Flüssigkeit wurde mit einem Filterpapier abgetragen, so dass sich die Probe in einem dünnen Film (ca. 100 nm) über die im Durchmesser etwa 2 µm großen Löcher spannte. Anschließend wurde der erzeugte Probenfilm in flüssigem Ethan bei -183 °C mit einer Abkühlrate von $> 10^4$ Ks⁻¹ schockgefroren [132]. Die vitrifizierten Filme wurden unter flüssigem Stickstoff bei -175 °C gelagert und im gefrorenen Zustand ins Transmissionselektronenmikroskop überführt, um die Ausbildung von Eiskristallen auf der Filmoberfläche zu vermeiden. Die Aufnahmen wurden mit einer Beschleunigungsspannung von 160 kV an einem Philips CM 12 Transmissionselektronenmikroskop mit 62.000- und 100.000-facher Vergrößerung bei -175 °C aufgenommen.

3.2.3 Analytische Ultrazentrifugation (AUZ)

Die analytische Ultrazentrifugation ist eine Methode, mit der unter anderem Molmassen, Molmassenverteilungen, Teilchengrößenverteilungen und Teilchendichteverteilungen bestimmt werden können. Unter dem Einfluss starker Zentrifugalkräfte kann die Bewegung oder Konzentrationsverteilung von gelösten Makromolekülen untersucht werden. Die Zentrifuge ist dafür mit einem optischen System ausgestattet, welches während der Zentrifugation die Messung der Absorption und des Brechungsindex in der Probe ermöglicht. Man erhält sowohl ein orts aufgelöstes Konzentrationsprofil über den radialen Verlauf der Messzelle, als auch zeitaufgelöste Informationen durch mehrfache Wiederholung der Messung während des Experimentes.

Zur Bestimmung der Verkapselungseffizienz von ICG in Mizellen wurden Sedimentationsgeschwindigkeitsexperimente mit 10 mg/l Farbstoff in 10 mg/ml Tensidlösung bei 25 °C durchgeführt. Mit der dafür verwendeten analytischen Ultrazentrifuge des Typs Optima XL-A der Firma Beckman, ausgestattet mit einer Absorptionsoptik und einer Rayleigh-Interferenzoptik, konnte der Farbstoff gleichzeitig neben den Mizellen untersucht werden. Das ICG wurde dabei mit Hilfe der Absorptionsoptik bei 720 nm und die Tensidmizellen mit der Interferenzoptik durch Vergleich der Brechungsindizes von Probe und Referenz bei 675 nm detektiert. Bei einer Drehzahl von 45.000 U/min, was etwa dem 150.000-fachen der Erdbeschleunigung entspricht, wurden die Proben in Doppelsektor-Zellen mit Saphir-Fenstern und einer Schichtdicke von 20 mm gegen deionisiertes Wasser als Referenz vermessen. Die Experimente zeigten, dass die Farbstoffmoleküle nur bei Verkapselung zusammen mit den Mizellen sedimentierten. Freies ICG verblieb auch bei längerem Zentrifugieren im Überstand. Nach vollständiger Sedimentation der Mizellen wurde der Restanteil an nicht verkapselten Farbstoff nach 131 Messungen (27 h) quantifiziert, wofür die Mittelwerte der Restabsorptionen zwischen 6,3 und 6,9 cm Zellradius berechnet und die Restkonzentrationen mit Hilfe einer Kalibriergeraden bestimmt wurden. Die Verkapselungseffizienz errechnete sich nach dem Verhältnis verkapselte ICG Konzentration zu eingesetzter ICG Konzentration.

3.2.4 Hämolyse Assay

Um die Verträglichkeit der ICG Formulierungen, insbesondere das Irritationspotential der verwendeten Tenside zu bestimmen, wurde die Freisetzung von Hämoglobin aus humanen Erythrozyten untersucht.

Zunächst wurden die Plasmabestandteile des humanen heparinisierten Vollblutes (50 ml) durch Zentrifugation (15 min, 4 °C, 1500 g) und dreimaliges Waschen mit PBS-Puffer (Gibco D-PBS 1x, Invitrogen) entfernt. Nach Verdünnung der aufkonzentrierten Erythrozyten mit PBS-Puffer zu einer 2 %igen (v/v) Suspension, erfolgte die Inkubation mit den Proben für 1 h bei 37 °C. Jeweils 100 µl Erythrozytensuspension wurden in 96 DeepWell Platten (Nunc, Thermo Fisher Scientific) mit 100 µl Probe versetzt, 5 s geschüttelt und dann im Brutschrank aufbewahrt. In jedem Versuch wurden zusätzlich Erythrozyten zur Negativkontrolle mit PBS-Puffer und zur Positivkontrolle mit 2 %iger Triton X-100 Lösung inkubiert. Nach 1 h wurden die intakten Erythrozyten abzentrifugiert (15 min, 4 °C, 1500 g) und 100 µl des Überstandes in 96 MicroWell Platten (Nunc, Thermo Fisher Scientific) mit transparentem Boden überführt. Die Menge an freiem Hämoglobin wurde mit Hilfe eines Plattenreaders (Fluostar Optima, BMG Labtech, Offenbach, Deutschland) über die Absorption der einzelnen Proben und Kontrollen bei 540 nm bestimmt. Die hämolytische Aktivität in % berechnete sich nach folgender Gleichung:

$$\text{Hämolyse}[\%] = \frac{A_{\text{Probe}} - A_{\text{negativ}}}{A_{\text{positiv}} - A_{\text{negativ}}} \cdot 100 \quad (13)$$

mit: A_{Probe} Absorption der Probe, A_{negativ} Absorption der Negativkontrolle (PBS-Puffer), A_{positiv} Absorption der Positivkontrolle (2 % Triton Lösung)

Der Assay wurde in Dreifachbestimmung durchgeführt. Die Ergebnisse präsentieren den Mittelwert \pm Standardabweichung.

3.2.5 Signifikanztest

Zur Abschätzung von signifikanten Unterschieden von Messwerten wurde der Student's t-Test für ungepaarte Stichproben angewendet [133]. Bei einer statistischen Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ wurde der Unterschied zweier Mittelwerte als signifikant bewertet.

3.3 Ergebnisse und Diskussion

3.3.1 Aggregationsverhalten von ICG in wässrigen Medien

Aggregatbildung in wässriger Lösung ist ein wohlbekanntes Phänomen vieler Cyaninfarbstoffe [134, 135]. Durch den amphiphilen Charakter von ICG neigt der Farbstoff zur Selbstorganisation in hochgeordnete Strukturen. Diese Selbstaggregation, überwiegend verursacht durch van der Waals Kräfte und hydrophobe Interaktionen, wirkt sich nachteilig auf die optischen Eigenschaften von ICG aus [96, 128]. Dass ICG neben Dimeren und Oligomeren auch stabile J-Aggregate ausbildet, ist bekannt [126, 127]. Die Morphologie dieser Aggregate sollte mit Hilfe der Kryo-TEM aufgeklärt werden.

Die Bildung von J-Aggregaten wurde an einer konzentrierten wässrigen ICG Lösung ($c_{\text{ICG}} = 10^3 \text{ mg/l}$) untersucht, die bei Raumtemperatur und unter Lichtausschluss gelagert wurde. Nach zwei Wochen wurde die J-Aggregatbildung im Absorptionsspektrum durch die Entstehung einer neuer Bande bei $\lambda = 900 \text{ nm}$ sichtbar (s. Abbildung 11).

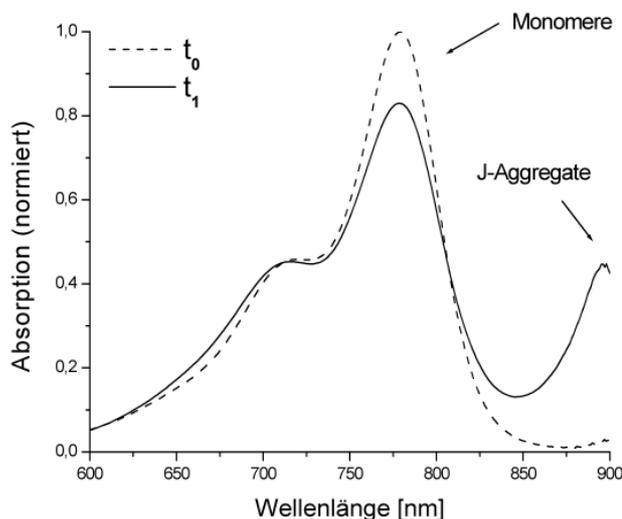


Abbildung 11: Absorptionsspektren einer ICG Lösung ($c_{\text{ICG}} = 10^3 \text{ mg/l}$) direkt nach der Herstellung (t_0) und nach zwei Wochen (t_1) Lagerung bei Raumtemperatur und unter Lichtausschluss. Die konzentrierte Probe wurde direkt vor der photometrischen Messung 1:1000 mit deionisiertem Wasser verdünnt. Nach zwei Wochen bildet sich bei $\lambda = 900 \text{ nm}$ ein neues Absorptionsmaximum aus, welches die Bildung von J-Aggregaten anzeigt.

Um das Absorptionsspektrum aufnehmen zu können, wurde die stark konzentrierte Lösung direkt vor der Vermessung 1:1000 mit deionisiertem Wasser verdünnt. Kryo-TEM Aufnahmen der konzentrierten Probe nach zwei Wochen zeigten bei 100.000-facher Vergrößerung sphärische Aggregate mit einem Durchmesser von annähernd 5 nm (s. Abbildung 12A). Innerhalb von weiteren zwei Wochen wandelten sich die sphärischen Aggregate in große planare Schichtaggregate um, die eine Schichtdicke von etwa 3,6 nm aufwiesen (s. Abbildung 12B).

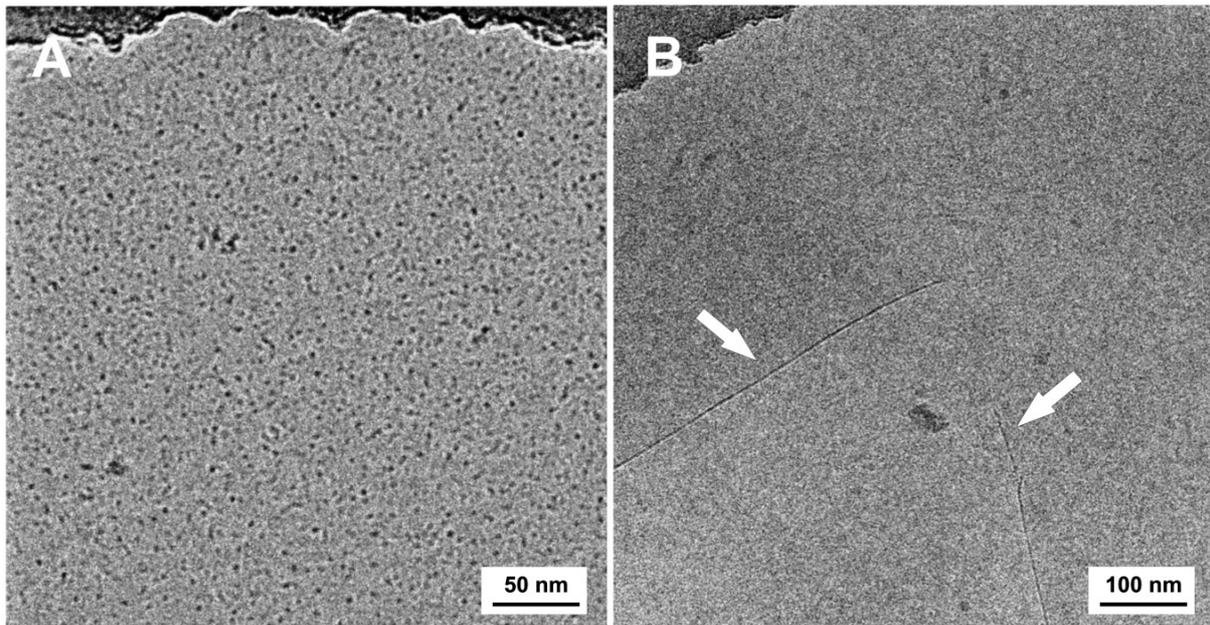


Abbildung 12: Kryo-TEM Aufnahmen einer zwei Wochen alten ICG Lösung ($c_{\text{ICG}} = 10^3$ mg/l) (A) und nach vier Wochen Lagerung (B) bei Raumtemperatur und unter Lichtausschluss. Die Proben wurden unter 100.000-facher (A) und 62.000-facher (B) Vergrößerung aufgenommen. Nach zwei Wochen bilden sich zunächst sphärische J-Aggregate aus, die sich nach vier Wochen in planare Schichtaggregate umwandeln. Die weißen Pfeile markieren die Kanten der planaren J-Aggregat Schichten.

Da die Schichtaggregate bei einer geringeren Vergrößerung (62.000-fach) aufgenommen wurden kann nicht ausgeschlossen werden, dass auch in dieser Probe neben den großen Schichtaggregaten noch kleine sphärische Aggregate existieren. Die sphärischen Aggregate lagern sich vermutlich, wie in der schematischen Darstellung in Abbildung 13A skizziert, mizellartig zusammen. Die Schichtaggregate dagegen bilden vermutlich eine Bilayerstruktur aus (s. Abbildung 13B), da die Schichtdicke von 3,6 nm etwa der Breite eines typischen biologi-

schen Lipidbilayers (3,6 – 4,3 nm) entspricht [136-138]. In der Literatur wurde für die J-Aggregate von ICG eine fadenartige Struktur vermutet [127, 139]. Möglich ist, dass diese Struktur sich als eine weitere Stufe nach den sphärischen und planaren Aggregaten ausbildet. Solche fadenartigen J-Aggregate entstehen aus planaren Bilayerstrukturen durch Windung um die eigene Längsachse [135]. Kirstein *et al.* beschrieben die Beziehungen zwischen den optischen Eigenschaften und der Aggregatstruktur von verschiedenen Cyaninfarbstoffen [135]. Dabei stand die Ausbildung einer Bilayerstruktur im engen Zusammenhang mit einer schmalen zum Monomerenmaximum bathochrom verschobenen Absorptionsbande [135, 140, 141].

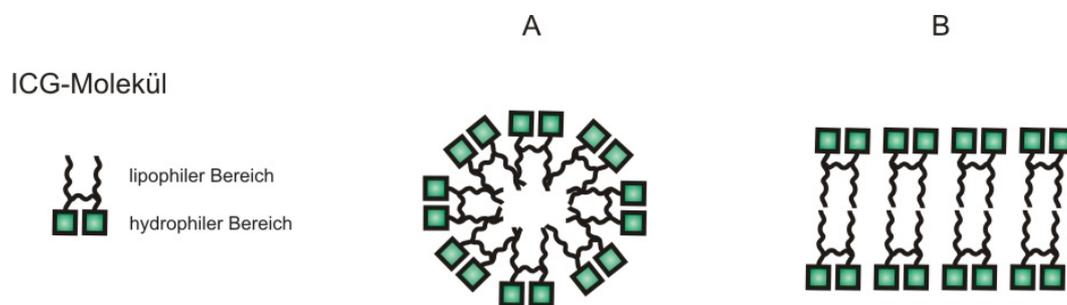


Abbildung 13: Schematische Darstellung der ICG J-Aggregate. Sphärische Aggregate nach zwei Wochen Lagerung (A) und planare Bilayer-Schichtaggregate nach vier Wochen Lagerung (B).

Um den Einfluss der mizellaren Formulierungen auf das Aggregationsverhalten von ICG zu untersuchen, wurde die konzentrationsabhängige Dimerisierung von ICG bestimmt. Dazu wurde die optische Dichte in der Monomerenbande der jeweiligen Proben bei verschiedenen Konzentrationen bestimmt. Die Absorptionswerte wurden gegen die Konzentration aufgetragen und die Linearität der Kurven betrachtet. Bei allen ICG Formulierungen konnte man erkennen, dass bei geringen Farbstoffkonzentrationen ein linearer Zusammenhang in Übereinstimmung mit dem Lambert-Beer'schen Gesetz vorlag (s. Abbildung 14A). Bei höheren Farbstoffkonzentrationen kam es zu mehr oder wenigen starken Abweichungen vom Lambert-Beer'schen Gesetz, was auf eine Dimerisierung der ICG Moleküle hindeutete. In wässriger Lösung lagern sich ICG Moleküle schon ab einer Konzentration von etwa 3,9 mg/l zu Dimeren zusammen [125, 142]. Mit steigender Farbstoffkonzentration sinkt die optische Dichte der Monomerenbande ($\lambda = 780 \text{ nm}$), während die Schulter bei $\lambda = 700 \text{ nm}$ immer ausgeprägter

wird (s. Abbildung 5A) [60]. Dies führt zu einer Abweichung vom Lambert-Beer'schen Gesetz.

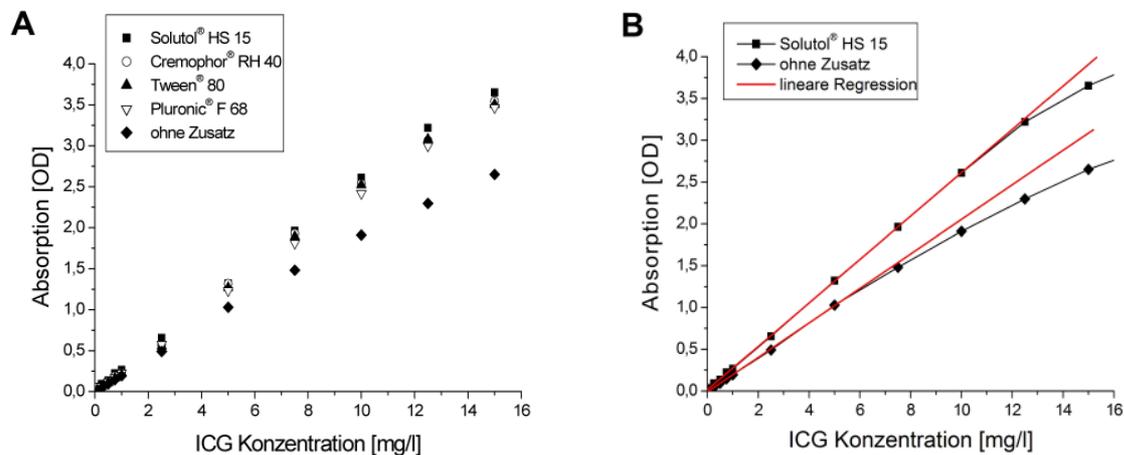


Abbildung 14: Absorption von ICG in verschiedenen nicht-ionischen Tensid Formulierungen ($c = 50 \text{ mg/ml}$) in Abhängigkeit von der Farbstoffkonzentration (A). Lineare Regression von freiem ICG und ICG in Solutol® HS 15 Mizellen (B). Die optische Dichte wurde im jeweiligen Monomerenmaximum der Probe bestimmt. ICG in Tensidmizellen zeigen Linearität über einen breiteren Konzentrationsbereich als freies ICG, was auf ein geringeres Aggregationsverhalten hindeutet. Die Werte repräsentieren den Mittelwert \pm Standardabweichung (als Balken dargestellt) von jeweils 6 Bestimmungen. Wenn kein Balken sichtbar ist, ist die Standardabweichung kleiner als das Symbol.

ICG verkapselt in Tensidmizellen zeigte Linearität über einen breiteren Konzentrationsbereich im Vergleich zu freier ICG Lösung (s. Abbildung 14B). Die Interaktion des amphiphilen ICG mit mizellaren Strukturen kann folglich die Bildung von Aggregaten reduzieren. Der Farbstoff lagert sich in der Grenzfläche der Tensidmizellen so ein, dass es zu einer Trennung der einzelnen ICG Moleküle kommt [98]. Die Aggregatbildung wird verringert, wodurch die optischen Eigenschaften des Farbstoffes positiv beeinflusst werden. Das Ergebnis sind höhere Fluoreszenzintensitäten, Wellenlängenverschiebungen und höhere Quantenausbeuten. Aus Abbildung 14 kann gefolgert werden, dass ICG verkapselt in Mizellen eine geringere Aggregationstendenz besitzt als freies ICG, vor allem bei höheren Konzentrationen.

3.3.2 Physikochemische Charakterisierung der ICG Mizellsysteme

Optische Eigenschaften

Die Ergebnisse der Absorptionsmaxima-, Emissionsmaxima- und Quantenausbeutenbestimmung von ICG in den verschiedenen mizellaren Systemen sind in Tabelle 5 dargestellt. Verglichen mit reiner ICG Lösung zeigten alle Absorptions- und Emissionsspektren eine bathochrome Verschiebung um etwa 20 bis 30 nm. Auffallend dabei war die geringere Verschiebung des Spektrums von ICG in Pluronic® F 68 Mizellen. Das Emissionsspektrum war nur 5 nm und das Absorptionsspektrum 9 nm zu dem von reinem ICG verschoben. Die Fluoreszenzquantenausbeuten von ICG zeigten in allen mizellaren Formulierungen signifikant höhere Werte ($p < 0,05$) im Vergleich zu der freien ICG Lösung ($\Phi = 2,58 \pm 0,04 \%$). Die effektivste Steigerung wurde in Solutol® HS 15 Mizellen beobachtet ($\Phi = 8,33 \pm 0,18 \%$), die geringste in Pluronic® F 68 Mizellen ($\Phi = 3,16 \pm 0,15 \%$).

Tabelle 5: Absorptionsmaximum, Emissionsmaximum, Quantenausbeute von ICG (5 mg/l) in verschiedenen mizellaren Formulierungen (50 mg/ml) und HLB-Werte der eingesetzten Tenside.

ICG Formulierung	λ_{\max} Absorption [nm]	λ_{\max} Emission [nm]	Φ^a [%]	HLB _D ^b
ohne Zusatz	779	805	$2,58 \pm 0,04$	--
Pluronic® F 68	788	810	$3,16 \pm 0,15$	29
Glykocholsäure (GC)	804	835	$4,00 \pm 0,11$	23
GC / Ryoto Sugar Ester® S-1170	810	832	$4,70 \pm 0,13$	23 / 11
GC / Lipoid® S 100	808	835	$5,30 \pm 0,16$	23 / --
Tween® 80	798	825	$6,77 \pm 0,15$	15
Cremophor® RH 40	798	822	$7,22 \pm 0,08$	15
Ryoto Sugar Ester® L-1695	802	830	$7,95 \pm 0,12$	15
Solutol® HS 15	798	825	$8,33 \pm 0,18$	15

^aDie Fluoreszenzquantenausbeuten (Φ) wurden relativ zu der von ICG in DMSO ($\Phi = 13 \%$) bestimmt und sind aufgeführt als Mittelwert \pm Standardabweichung von 6 Experimenten. ^bHLB-Werte der eingesetzten Tenside berechnet nach Davies.

In nicht-ionischen Tensidmizellen, mit Ausnahme von Pluronic[®] F 68, zeigte ICG einen dreifachen Anstieg der Quantenausbeute im Vergleich zu freiem Farbstoff. ICG in Pluronic[®] F 68 Mizellen dagegen erlangte nur eine geringfügige Verbesserung. Der Einschluss von ICG in ionische Tensidmizellen oder in Mischmizellen ergab einen annähernd zweifachen Anstieg der Quantenausbeute im Vergleich zu freiem ICG (s. Tabelle 5).

Eine bathochrome Verschiebung des Spektrums sowie eine erhöhte Quantenausbeute wurden für alle mizellaren ICG Formulierungen gefunden. Dieses Ergebnis beweist zunächst, dass das Aggregationsverhalten von ICG in den Mizellen reduziert ist und dadurch die optischen Eigenschaften des Farbstoffes positiv beeinflusst werden. Die unterschiedlich starken Einflüsse der Tenside auf ICG lassen sich über die verschiedenen Strukturen und HLB-Werte der Tenside erklären. Der HLB-Wert („*hydrophilic lipophilic balance*“) ist ein Maß für die Hydrophilie bzw. Lipophilie von Tensiden und kann sowohl experimentell als auch mit Hilfe von Formeln bestimmt werden. Einheitlich für alle Methoden gilt, dass mit steigendem Zahlenwert die hydrophilen Anteile im Tensidmolekül zunehmen. Aufgrund der unterschiedlichen Bestimmungsmethoden und der Komplexität der Tenside sind die in der Literatur veröffentlichten HLB-Werte jedoch häufig nicht einheitlich. In Tabelle 4 sind die HLB-Werte der in dieser Arbeit verwendeten Tenside, berechnet nach den zwei bekanntesten Bestimmungsmethoden, aufgeführt. Die Berechnung nach Griffin erfolgte nach folgender Gleichung [130, 143]:

$$\text{HLB} = 20 \cdot \frac{M_h}{M} \quad (14)$$

mit: *HLB* hydrophilic lipophilic balance, M_h molare Masse der hydrophilen Menge und M molare Masse des gesamten Moleküls.

Im Gegensatz zu Griffin werden die HLB-Werte nach Davies aus Zahlenwerten der einzelnen hydrophilen und lipophilen Gruppen im Molekül berechnet. Der Vorteil dieser Methode ist die höhere Gewichtung stark wechselwirkender Gruppen gegenüber weniger wechselwirkenden. Zusätzlich wird mit dieser Methode die Bestimmung von HLB-Werten ionischer Tenside möglich. Die Berechnung nach Davies erfolgte nach folgender Gleichung [131]:

$$\text{HLB} = \sum (Z_h) - n \cdot Z_l + 7 \quad (15)$$

mit: *HLB* hydrophilic lipophilic balance, Z_h Zahlenwerte der hydrophilen Gruppen, n Anzahl der lipophilen Gruppen im Molekül und Z_l Zahlenwert der lipophilen Gruppe.

Die von Davies festgelegten Zahlenwerte der einzelnen Gruppen wurden für die Berechnung aus der Literatur entnommen [131]. Ein Vergleich der nach Griffin und Davies bestimmten HLB-Werte zeigt, dass die Werte bei fast allen nicht-ionischen Tensiden miteinander vergleichbar sind. Nur bei Pluronic F[®] 68 weichen die Werte der beiden Bestimmungsmethoden stark voneinander ab. Nach der Formel von Griffin berechnet, erhält man für Pluronic[®] F 68 einen HLB-Wert von 16, der vergleichbar zu den anderen nicht-ionischen Tensiden ist (s. Tabelle 4). Nach Davies berechnet besitzt Pluronic[®] F 68 einen HLB-Wert von 29, was für ein deutlich hydrophileres Molekül spricht [144, 145]. Die unterschiedliche Hydrophilie der verwendeten Tenside könnte eine Erklärung für die unterschiedlich starken Einflüsse der Tenside auf die optischen Eigenschaften von ICG sein. In Tabelle 5 sind die Quantenausbeuten von ICG in den Tensidmizellen und die HLB-Werte der jeweiligen Tenside gegenübergestellt. Da in dieser Arbeit auch ionische Tenside eingesetzt wurden, mussten der Vergleichbarkeit wegen die HLB-Werte nach Davies verwendet werden. Die Gegenüberstellung zeigt deutlich, dass mit zunehmender Hydrophilie der Tenside die Quantenausbeute von ICG geringer ist. Daraus kann abgeleitet werden, dass die Affinität von ICG zu den nicht-ionischen Tensiden mit einem HLB-Wert um 15 höher ist, als zu den ionischen und nicht-ionischen Tensiden mit HLB-Werten > 20. Durch die geringere Affinität wird weniger Farbstoff in die Mizellen eingelagert, was wiederum zu einer erhöhten Aggregation des Farbstoffes im Umgebungsmilieu Wasser und zu einer geringeren Quantenausbeute führt.

Dessen ungeachtet ist nicht eindeutig zu klären, welche der beiden Bestimmungsmethoden die richtigen HLB-Werte liefert [146]. Für ionische Tenside kann nur die Berechnung nach Davies erfolgen, für nicht-ionische Tenside wird die Berechnung nach Griffin empfohlen [146]. Zusätzlich darf nicht vernachlässigt werden, dass die meisten hier verwendeten Tenside Substanzgemische darstellen und bei der Berechnung meist nur die Hauptkomponenten des Gemisches betrachtet werden. Zusammenfassend sollte der HLB-Wert nur als ein Näherungswert betrachtet werden, um orientierend die Hydrophilie von Tensiden abschätzen zu können.

Eine weitere Erklärung für die unterschiedlich starken Einflüsse der Tenside könnten strukturelle Unterschiede zwischen den Tensiden sein. Die verwendeten Tenside lassen sich nach ihrer Struktur in drei Klassen unterteilen, die in Abbildung 15 schematisch dargestellt sind. Die Einordnung der Tenside in diese Klassen zeigt, dass strukturell ähnliche Tenside auch einen ähnlich starken Einfluss auf die optischen Eigenschaften von ICG besitzen. Pluronic[®] F 68 und Glykocholsäure unterscheiden sich strukturell von den anderen Tensiden und haben einen deutlich geringeren positiven Einfluss auf die optischen Eigenschaften von ICG. Auch bei dieser Theorie muss wiederum bedacht werden, dass die Tenside Substanzgemische darstellen und nicht auf einer einzigen Struktur beruhen.

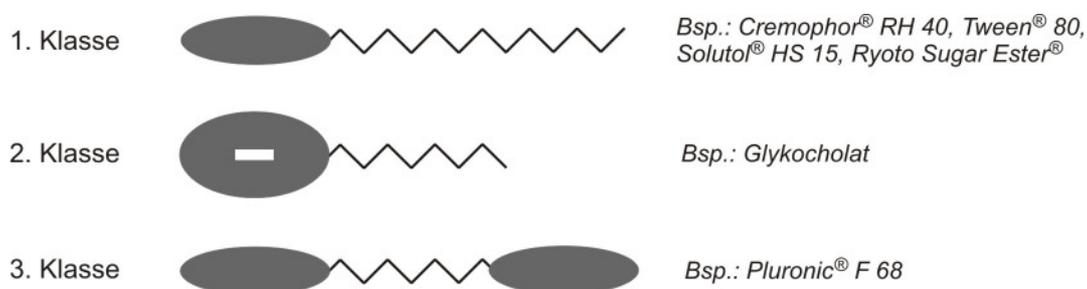


Abbildung 15: Schematische Darstellung des strukturellen Aufbaus der verwendeten Tenside.

Die Veränderung der optischen Eigenschaften von ICG variierte in Abhängigkeit von den eingesetzten Tensiden. Die nicht-ionischen Tenside der 1. Klasse mit einem HLB-Wert um 15 verringerten die Aggregation der Farbstoff Moleküle stärker als die Tenside der 2. und 3. Klasse mit HLB-Werten > 20 und sorgten somit für eine höhere Quantenausbeute von ICG in diesen Systemen.

Partikelgrößenverteilung und Zetapotential

Partikelgrößenverteilung, Polydispersitätsindizes und Zetapotential der reinen mizellaren Systeme ohne ICG sind in Tabelle 6 dargestellt.

Tabelle 6: Hydrodynamischer Durchmesser (d_H), Polydispersitätsindex (PDI), Zetapotential und pH-Wert verschiedener mizellarer Systeme (100 mg/ml).

Tensid System	$d_H^{a, b}$ [nm]	PDI ^{a, b}	ζ -Potential ^b [mV]	pH-Wert
Solutol [®] HS 15	11,8 ± 0,1	0,046 ± 0,005	-2,1 ± 1,7	6,6
Cremophor [®] RH 40	13,7 ± 0,1	0,110 ± 0,007	-1,6 ± 0,4	6,8
Tween [®] 80	8,3 ± 0,1	0,148 ± 0,007	-3,8 ± 1,0	6,7
GC / Ryoto Sugar Ester [®] S-1170	87,6 ± 0,1	0,204 ± 0,003	-24,7 ± 5,0	7,0
Ryoto Sugar Ester [®] L-1695	7,0 ± 0,2	0,246 ± 0,003	-7,5 ± 1,6	6,8
Pluronic [®] F 68	90,2 ± 82,0	0,323 ± 0,142	-3,3 ± 0,4	6,8
GC / Lipoid [®] S 100	1,4 ± 0,04 (60%) 36,3 ± 4,0 (40%)	0,352 ± 0,022	-24,8 ± 8,1	6,7
Glykocholsäure (GC)	1,1 ± 0,01 (10%) ^e 125,0 ± 10,3 (90%) ^e	0,558 ± 0,091 ^e	-37,3 ± 8,0	7,0

^aIntensitäts-gewichteter mittlerer hydrodynamischer Durchmesser (d_H) und Polydispersitätsindex (PDI) wurden mittels dynamischer Lichtstreuung (DLS) bestimmt. ^bDie Werte repräsentieren den Mittelwert ± Standardabweichung von drei unabhängigen Chargen. ^cDie Ergebnisse der Größenbestimmung sind praktisch nicht auswertbar, da der hohe PDI auf eine sehr breite Verteilung unbestimmter Form hindeutet.

Tween[®] 80 und Cremophor[®] RH 40 Mizellen zeigten bei einer engen Partikelgrößenverteilung (PDI = 0,148 ± 0,007 und PDI = 0,110 ± 0,007) kleine mittlere hydrodynamische Durchmesser (d_H = 8,3 ± 0,1 nm und d_H = 13,7 ± 0,1 nm). Solutol[®] HS 15 Mizellen waren monodispers verteilt (PDI = 0,046 ± 0,005) mit einem mittleren hydrodynamischen Durchmesser von d_H = 11,8 ± 0,1 nm. Dieser Wert stimmt mit Literaturangaben überein [147]. Alle anderen farbstofffreien Mizellen besaßen breite oder bimodale Verteilungen, was bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden muss. Die Zetapotentiale der nicht-ionischen Tensidmizellen lagen um Null. Glykocholsäure (GC) wies ein Zetapotential von ζ = - 37,3 ± 8,0 mV auf, während die Mischmizellen aus GC und Lipoid[®] S 100 oder Ryoto Sugar Ester[®] S-1170 Werte von ζ = - 24,8 ± 8,1 mV und ζ = - 24,7 ± 5,0 mV zeigten. Die Polydispersität der Mizellformulierungen variierte von monodispers bis zu sehr breiten

Verteilungen. Die genaue Bestimmung der hydrodynamischen Durchmesser der Glykocholat, Pluronic® F 68 und GC / Lipoid® S 100 Mizellen mittels dynamischer Lichtstreuung war aufgrund der sehr hohen Polydispersität ($PDI > 0,3$) nicht möglich. Diese Schwierigkeiten bestätigten bereits frühere Studien mit dynamischer Lichtstreuung [110, 115, 148]. Bei den bimodalen Verteilungen mit zwei Größenpopulationen (GC und GC / Lipoid® S 100) stellen die kleinen Teilchen vermutlich Monomere des Glykocholat und die größeren Teilchen die Mizellaggregate dar.

Die Zugabe von 10 mg/l ICG zu ausgewählten Mizellsystemen hatte keinen signifikanten Einfluss auf den Durchmesser, die Teilchengrößenverteilung und auf das Zetapotential (s. Tabelle 7). Ähnliche Beobachtungen wurden bereits in Kapitel 2.3.1 nach Zugabe von ICG zu Mischmizellen und Mikroemulsionen gemacht und sind auf die starken Fluktuationen der Mizellen und die dadurch entstehende Problematik bei der Bestimmung der Größe mit Hilfe der dynamischen Lichtstreuung zurückzuführen. Eine weitere Erklärung könnte sein, dass die Tensidmonomere in den Mizellen so locker gepackt sind, dass sich ICG zwischen die Monomere als Cotensid einlagern kann und Mischmizellen mit vergleichbarem Durchmesser bildet [147, 148]. Dies würde jedoch nicht das gleichbleibende Zetapotential erklären.

Tabelle 7: Hydrodynamischer Durchmesser (d_H), Polydispersitätsindex (PDI), Zetapotential und pH-Wert ausgewählter Tensidsysteme (100 mg/ml) versetzt mit ICG (10 mg/l).

Tensid System + 10 mg/l ICG	$d_H^{a,b}$ [nm]	PDI ^{a,b}	ζ -Potential ^b [mV]	pH-Wert
Solutol® HS 15	11,9 ± 0,1	0,049 ± 0,008	-0,7 ± 1,0	6,6
Cremophor® RH 40	13,6 ± 0,2	0,102 ± 0,007	-2,2 ± 0,8	6,8
Tween® 80	8,4 ± 0,04	0,138 ± 0,004	-2,6 ± 0,8	6,7
Ryoto Sugar Ester® L-1695	7,0 ± 0,05	0,245 ± 0,006	-7,6 ± 1,7	6,8

^aIntensitäts-gewichteter mittlerer hydrodynamischer Durchmesser (d_H) und Polydispersitätsindex (PDI) wurden mittels dynamischer Lichtstreuung (DLS) bestimmt. ^bDie Werte repräsentieren den Mittelwert ± Standardabweichung von drei unabhängigen Chargen.

Alle hergestellten Mizellformulierungen wiesen Teilchengrößen von unter 200 nm auf (s. Tabelle 6). Während der Zirkulation von Teilchen im Blutkreislauf kommt es zur Adsorption verschiedener Plasmaproteine an der Oberfläche. Diese auch als Opsonine bezeichneten Proteine besitzen eine Signalfunktion für Makrophagen, derartige körperfremde Teilchen zu

phagozytieren und damit aus dem Blutkreislauf zu eliminieren. Der Abbau erfolgt anschließend durch Organe des mononukleär-phagozytären Systems (MPS), zu dem Leber, Milz, Lunge und Knochenmark zählen (s. Kapitel 1.5). Teilchen mit Durchmessern über 300 nm werden extrem schnell durch das MPS eliminiert, während die Elimination von Teilchen kleiner als 200 nm deutlich verringert ist [149-152]. Eine langsame Eliminierung durch das MPS ist Voraussetzung für eine ausreichend lange Blutzirkulation.

Bestimmung der Verkapselungseffizienz mit Hilfe der AUZ

In Abbildung 16 sind typische Diagramme von Sedimentationsgeschwindigkeitsexperimenten am Beispiel ICG in Solutol[®] HS 15 Mizellen dargestellt. Während der Sedimentation wird die Messzelle parallel zur Rotationsachse von zwei optischen Systemen (Rayleigh-Interferenzoptik und Absorptionsoptik) durchstrahlt. Mit deren Hilfe wurden orts aufgelöste Konzentrationsprofile innerhalb der Messzelle aufgenommen. Vom Meniskus her verarmt die Lösung an Teilchen, die sich am Zellboden anreichern. An der so genannten Sedimentationsfront steigt die Konzentration an Teilchen stark an. Im zeitlichen Verlauf der Sedimentation wandert die Sedimentationsfront immer weiter zum Zellboden. Bei Anwesenheit mehrerer monodisperser Teilchenarten werden ebenso viele Sedimentationsfronten beobachtet. Außer der Sedimentation sind die Teilchen auch der Diffusion ausgesetzt. Mit der Anreicherung des Materials am Zellboden wird diese Rückdiffusion stärker, so dass sich am Ende des Experimentes ein Gleichgewicht zwischen Sedimentation und Diffusion ausbildet. Aus dem Verlauf des Sedimentationsprozesses kann bestimmt werden, ob der Farbstoff gleichzeitig mit den Mizellen sedimentiert oder ob er unverkapselt im Überstand verbleibt. Mit dieser Methode wurde zum Beispiel bewiesen, dass Polymermizellen Modellsubstanzen einschließen und auch transportieren können [153, 154]. Da die nicht-ionischen Tensidmizellen aufgrund der vorherigen Ergebnisse am besten geeignet erschienen, wurden diese für die Bestimmung der Verkapselungseffizienz von ICG ausgewählt.

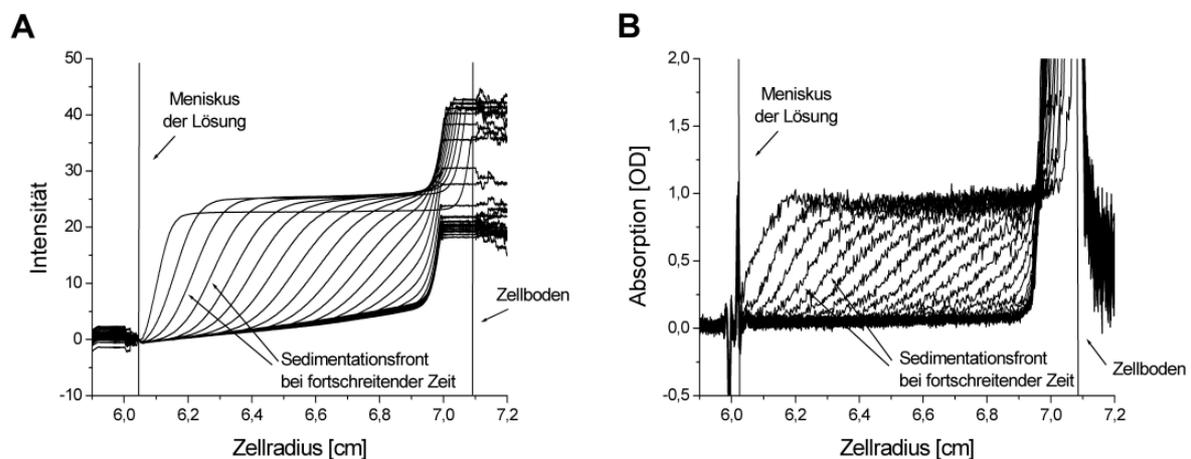


Abbildung 16: Ortsaufgelöste Konzentrationsprofile innerhalb der Messzelle von Solutol[®] HS 15 detektiert mit der Interferenzoptik bei 675 nm (A) und ICG verkapselt in Solutol[®] HS 15 detektiert mit der Absorptionsoptik bei 720 nm (B). Im zeitlichen Verlauf der Sedimentation verarmt die Lösung vom Meniskus her an Teilchen, die sich am Zellboden anreichern. Die Sedimentationsfront wandert immer weiter zum Zellboden.

Absorptionsdiagramme der Sedimentationsgeschwindigkeitsexperimente zeigten, dass ICG Moleküle nur sedimentierten wenn sie in Mizellen eingeschlossen waren (s. Abbildung 17A). Das Molekulargewicht von freien Farbstoffmolekülen ($M_r = 775$) war zu gering, um eine Sedimentation zu ermöglichen. Die Mizellen hingegen, die mit Hilfe der Rayleigh-Interferenzoptik detektiert wurden, sedimentierten innerhalb von 131 Messungen (nach etwa 27 h) vollständig zum Zellboden (s. Abbildung 16B). Die Interferenztechnik beruht auf dem Phänomen, dass die Lichtgeschwindigkeit bei Durchtritt durch ein Medium mit höherem Brechungsindex, verringert wird. Die Vorteile dieser Methode liegen in der Anwendbarkeit für nicht absorbierende Substanzen und in der geringen Beeinträchtigung der Bestimmung durch geringe Konzentrationen an stark absorbierenden Komponenten in der Lösung [155]. Der Vergleich von Absorptions- und Interferenzdiagrammen von ICG verkapselt in Mizellen zeigt, dass gleiche Konzentrationsprofile und annähernd identische Sedimentationskoeffizientenverteilungen vorlagen (s. Abbildung 16). Demzufolge sedimentierten der Farbstoff und die Mizellen gleichzeitig, was einen Einschluss des Farbstoffes in die Mizellen demonstrierte.

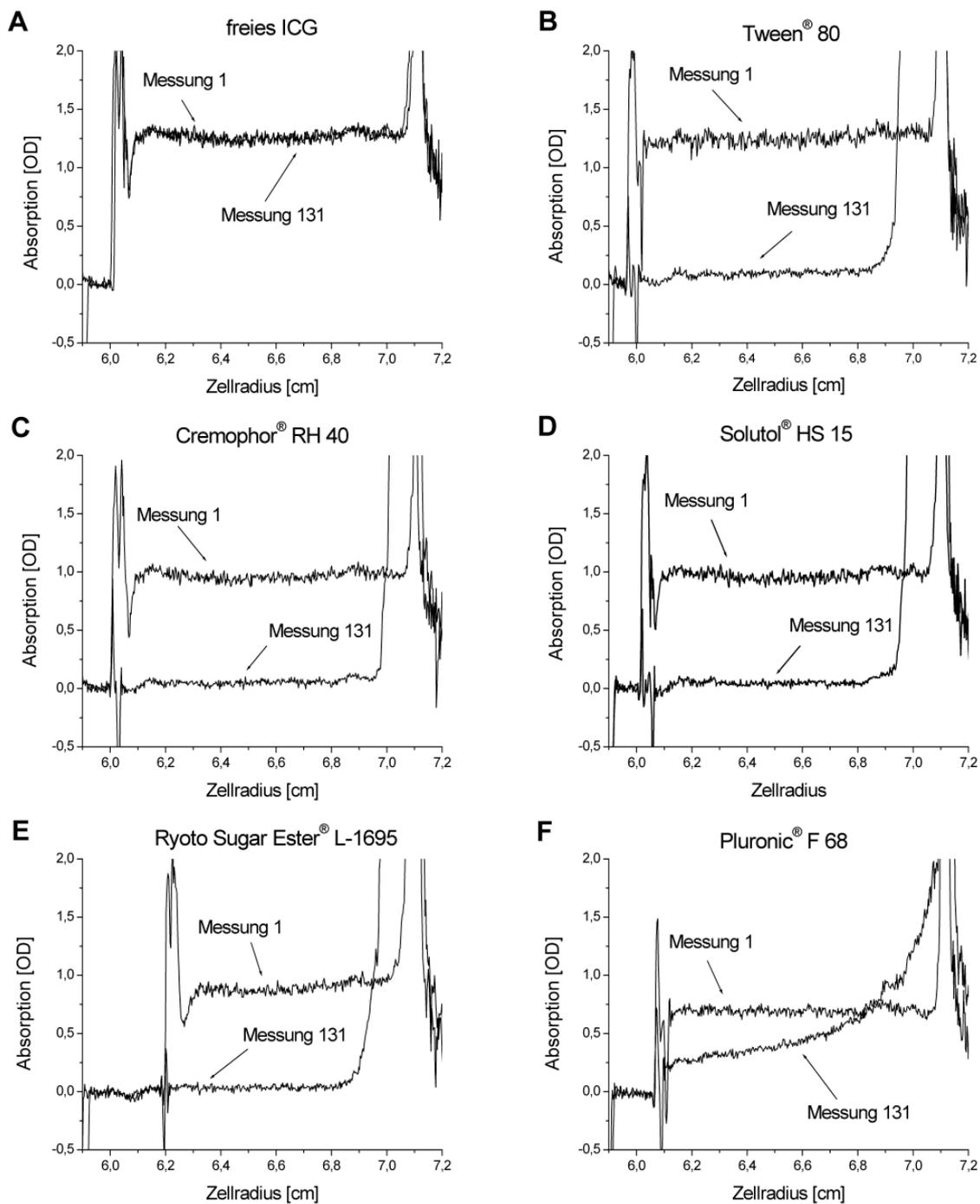


Abbildung 17: Sedimentationsexperimente von freiem ICG (A) und ICG verkapselt in Tween® 80 (B), Cremophor® RH 40 (C), Solutol® HS 15 (D) Ryoto Sugar Ester® L-1695 (E) und Pluronic® F 68 (F). Die optische Dichte des Farbstoffes wurde vor (Messung 1) und nach (Messung 131) erfolgter Sedimentation der Mizellen mit Hilfe der Absorptionsoptik bei 720 nm bestimmt. Die Absorptionsprofile deuteten an, dass ICG annähernd vollständig in Tween® 80, Cremophor® RH 40, Solutol® HS 15 und Ryoto Sugar Ester® L-1695 Mizellen verkapselt ist. In Pluronic® F 68 Mizellen zeigt ICG nach erfolgter Sedimentation der Mizellen eine deutlich höhere Restabsorption im Überstand. Freies ICG in Lösung sedimentiert nicht.

Die Absorptionsprofile vor und nach Sedimentation der Mizellen (Messung 1 und Messung 131) deuteten an, dass ICG annähernd vollständig in Tween[®] 80, Cremophor[®] RH 40, Solutol[®] HS 15 und Ryoto Sugar Ester[®] L-1695 Mizellen verkapselt wurde (s. Abbildung 17B-E). In Pluronic[®] F 68 Mizellen zeigte ICG nach erfolgter Sedimentation der Mizellen eine deutlich höhere Restabsorption im Überstand (s. Abbildung 17F).

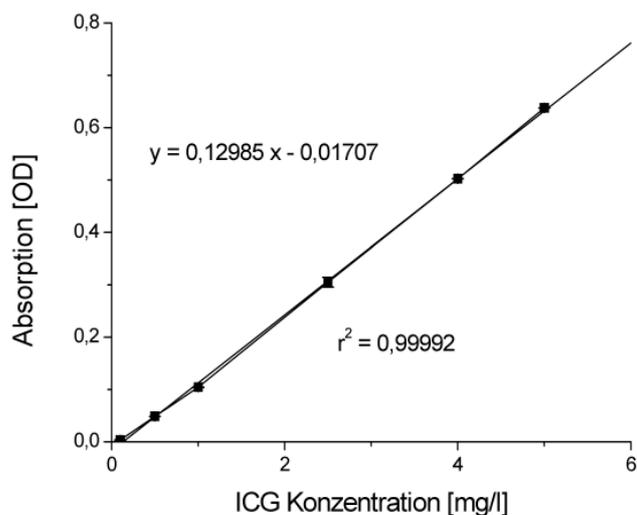


Abbildung 18: Kalibriergerade von ICG in deionisiertem Wasser. Die optische Dichte der Verdünnungsreihe wurde analog der AUZ Methode bei 720 nm bestimmt.

Nach erfolgter Mizellsedimentation (Messung 131) wurde der Mittelwert der Absorption im Überstand zwischen 6,3 und 6,9 cm Zellradius bestimmt und die Farbstoffkonzentration mit Hilfe einer zuvor erstellten Kalibriergerade ermittelt (s. Abbildung 18). Die Verkapselungseffizienz wurde dann über das Verhältnis verkapseltes ICG zu eingesetzter ICG Konzentration ($c = 10 \text{ mg/l}$) berechnet. Die ermittelten Werte sind in Tabelle 8 zusammengefasst. ICG war zu 90 bis 95 % in Tween[®] 80, Cremophor[®] RH 40, Ryoto Sugar Ester[®] L-1695 und Solutol[®] HS 15 Mizellen verkapselt. In Pluronic[®] F 68 Mizellen wurde eine geringere Verkapselungseffizienz von 61 % bestimmt (s. Tabelle 8). Dieser signifikante Unterschied könnte, wie schon bei den optischen Eigenschaften beobachtet, durch den deutlich höheren HLB-Wert von Pluronic[®] F 68 zustande kommen. Das in dieser Arbeit verwendete ICG Mononatrium Salz besitzt eine hohe Wasserlöslichkeit ($c_s = 35 \pm 2 \text{ mg/ml}$) (s. Tabelle 3). Damit ICG in die Tensidmizellen verkapselt wird, müssen hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den lipophilen Bereichen des Farbstoffes und denen der Mizellen zustande kommen. Die Tenside müssen also eine ausreichend hohe Lipophilie aufweisen, damit diese Wechselwirkungen

stärker sind als die Affinität von ICG zum Wasser. Rodriguez *et al.* versuchten das Problem der guten Wasserlöslichkeit von ICG zu umgehen, indem sie das lipophilere ICG Tetrabutylammoniumiodid Salz verwendeten. Sie erzielten dadurch eine Verkapselungseffizienz von ICG in Polystyren-alt-Maleinsäureanhydrid Block-Polystyren Mizellen mit 87 % [105]. Im Vergleich dazu wurden in dieser Studie Verkapselungseffizienzen bis zu 95 % erzielt. Die Ergebnisse zeigen, dass nicht-ionische Tenside mit einem HLB-Wert von etwa 15 sehr gut geeignet sind, um das gut wasserlösliche ICG Mononatrium Salz zu verkapseln.

Tabelle 8: Restabsorption, Restkonzentration und Verkapselungseffizienz (VE) von ICG in nicht-ionischen mizellaren Systemen.

ICG Formulierung	Restabsorption ^a [OD]	Restkonz. ICG ^b [mg/l]	VE ^c [%]
Solutol [®] HS 15	0,051	0,524	95
Cremophor [®] RH 40	0,056	0,563	94
Tween [®] 80	0,108	0,963	90
Pluronic [®] F 68	0,485	3,867	61
Ryoto Sugar Ester [®] L-1695	0,044	0,470	95

^aDie Restabsorption des freien Farbstoffes im Überstand wurde nach 131 Messungen zwischen 6,3 und 6,9 cm des Zellradius gemessen. ^bDie Restkonzentration an ICG wurde mit Hilfe einer Kalibrierungskurve bestimmt. ^cDie Verkapselungseffizienz (VE) wurde nach dem Verhältnis verkapselte ICG Konzentration zu eingesetzter ICG Konzentration (10 mg/l) errechnet.

3.3.3 Einfluss der Tenside auf die optische Stabilität von ICG

Die optische Stabilität von 5 mg/l ICG verkapselt in nicht-ionischen Tensidmizellen wurde über einen Zeitraum von vier Wochen untersucht. Dafür wurden die Proben bei Raumtemperatur und unter Lichtausschluss gelagert. Die optische Dichte der Proben wurde im jeweiligen Absorptionsmaximum bestimmt und auf die Ausgangsabsorption normiert.

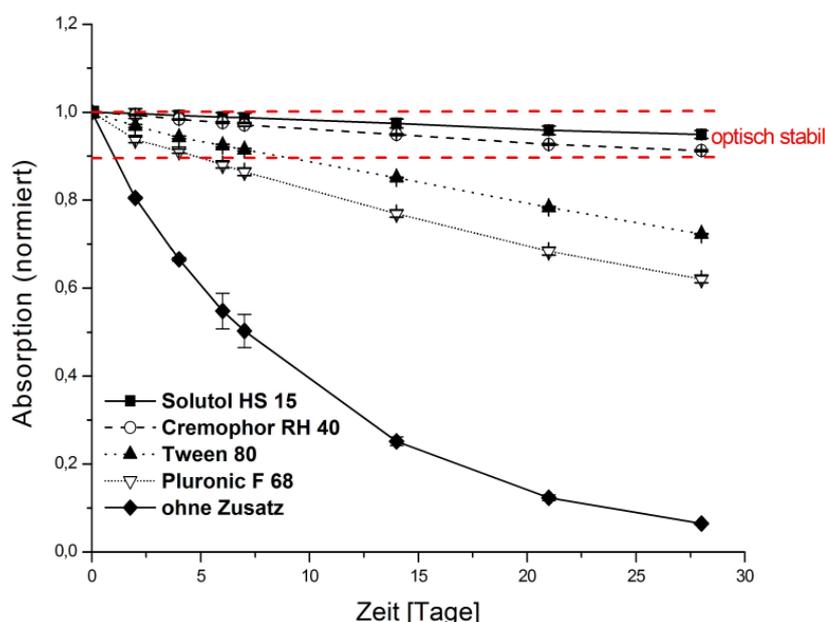


Abbildung 19: Optische Stabilität von ICG (5 mg/l) in verschiedenen nicht-ionischen Tensid Mizellen (50 mg/ml). Die Formulierungen wurden bei Raumtemperatur und unter Lichtausschluss gelagert. Die optische Dichte der Proben wurde im jeweiligen Absorptionsmaximum bestimmt und auf die Ausgangsabsorption normiert. Alle mizellaren Formulierungen weisen eine höhere Stabilität auf als freies ICG. Vor allem in Solutol[®] HS 15 und Cremophor[®] RH 40 Mizellen bleibt die Ausgangsabsorption über einen Zeitraum von vier Wochen nahezu konstant. Die Werte repräsentieren den Mittelwert \pm Standardabweichung (als Balken dargestellt) aus jeweils sechs Ansätzen. Wenn kein Balken sichtbar ist, ist die Standardabweichung kleiner als das Symbol.

Wie in Abbildung 19 zu erkennen, zeigten die verschiedenen Tensidsysteme unterschiedlich starke Stabilisierungsfähigkeiten. Die optische Dichte von ICG in Solutol[®] HS 15 und Cremophor[®] RH 40 Mizellen blieb über den gesamten Zeitraum von vier Wochen im geforderten Bereich zwischen 90 und 100 % der Ausgangsabsorption (95 % in Solutol[®] HS 15 und 91 % in Cremophor[®] RH 40). In Tween[®] 80 und Pluronic[®] F 68 Mizellen wies der Farbstoff

eine geringere Stabilität auf. Freies ICG ohne Tensidzusatz zeigte einen sehr schnellen Abbau gemäß den Angaben in der Literatur [59].

Im Vergleich zu anderen Stabilitätsstudien, in denen ICG durch nanoskalige Träger oder Polymere wie Polyaspartat stabilisiert wurde, ist eine deutlich bessere Stabilisierung mit Hilfe der Tensidmizellen erzielt worden [61, 62, 65, 67, 68, 104, 105]. Saxena *et al.* konnten beispielsweise die Halbwertszeit von ICG in Wasser durch Verkapselung in PLGA Partikel um ein vierfaches steigern (von $t_{1/2} = 16,8 \pm 1,5$ h auf $t_{1/2} = 72,2 \pm 6,1$ h) [65]. Ein direkter Vergleich der Halbwertszeiten von den Tensidmizellen mit den Literaturdaten konnte nicht durchgeführt werden, da nach Ende der Studie weniger als 60 % des Farbstoffes zerfallen waren und die Ausgangsbedingungen nicht vergleichbar waren. Saxena *et al.* verwendeten eine 1 mg/l ICG Lösung während in diesem Versuch 5 mg/l ICG eingesetzt wurde. Da die Farbstoffkonzentration einen bedeutenden Einfluss auf die Stabilität besitzt, konnten die Ergebnisse nicht direkt miteinander verglichen werden [96]. Jedoch kann angegeben werden, dass die Stabilität von ICG durch den Einschluss in einigen Tensidmizellen deutlich mehr als um ein vierfaches gesteigert werden konnte. Die Halbwertszeit von freiem ICG wurde mit etwa 168 h bestimmt. Bei einer Verbesserung der Stabilität um ein vierfaches müsste die Halbwertszeit von ICG in Tensidmizellen etwa 672 h betragen. In Solutol[®] HS 15 und Cremophor[®] RH 40 Mizellen lagen nach vier Wochen jedoch noch mehr als 90 % des Farbstoffes intakt in Lösung vor. Ein weiteres Beispiel ist die Stabilisierung von ICG durch den Einschluss in Polystyren-alt-Maleinsäureanhydrid Block-Polystyren Mizellen ($c_{\text{ICG}} = 7,75$ mg/l). Lagerung bei Raumtemperatur zeigte keine signifikante Verringerung der Fluoreszenzintensität über einen Zeitraum von zwei Wochen [105]. Im Vergleich dazu zeigen die Ergebnisse in dieser Studie eine überlegene Stabilität ohne signifikante Verringerung der Absorption von ICG in Solutol[®] HS 15 und Cremophor[®] RH 40 Mizellen über vier Wochen bei Raumtemperatur (s. Abbildung 19).

Ungeachtet dessen lässt sich eine bessere Einschätzung der Halbwertszeit von ICG in Tensidmizellen erst nach längerer Lagerzeit machen. Diese Stabilitätsstudien und eine mögliche positive Beeinflussung der Thermostabilität durch Tensidmizellen, sollten im folgenden Kapitel untersucht werden. Die Ergebnisse lassen jedoch eindeutig darauf schließen, dass die Tensidmizellen den hydrolyse-empfindlichen Farbstoff ICG vor der Zersetzung in wässrigen Medien bewahren. Die Abbau-anfälligen Strukturen werden durch den Einbau in die Mizellen vom wässrigen Umgebungsmilieu isoliert und somit geschützt.

3.3.4 Hämolytische Aktivität der verwendeten Tenside

Die hämolytische Aktivität der Tenside wurde an humanen Erythrozyten durch Inkubation bei 37 °C für 1 h mit den Tensiden ohne ICG bestimmt. Dabei wurden Konzentrationen von 0,05 mg/ml bis 50 mg/ml untersucht. Nach Inkubation und Zentrifugation der Erythrozytensuspension wurde der Anteil an freiem Hämoglobin photometrisch bei 540 nm quantifiziert. Als Negativkontrolle wurde PBS-Puffer und als Positivkontrolle 2 %ige Triton Lösung eingesetzt. Bei geringen Tensid Konzentrationen ($c = 0,05$ mg/ml) bewirkten alle Tenside wenig Hämolyse an den Erythrozyten (unter 20 %). Mit steigenden Konzentrationen von Ryoto Sugar Ester[®] L-1695, Glykocholsäure und Mischmizellen mit Ryoto Sugar Ester[®] S-1170 stieg deren hämolytische Aktivität dramatisch auf 80 bis 100 % Zelltod an (s. Abbildung 20). Im Gegensatz zu den eben genannten Tensiden blieb die hämolytische Aktivität in Solutol[®] HS 15, Cremophor[®] RH 40 und Mischmizellen mit Lipoid[®] S 100 auch bei steigenden Konzentrationen gering (unter 10 % Hämolyse).

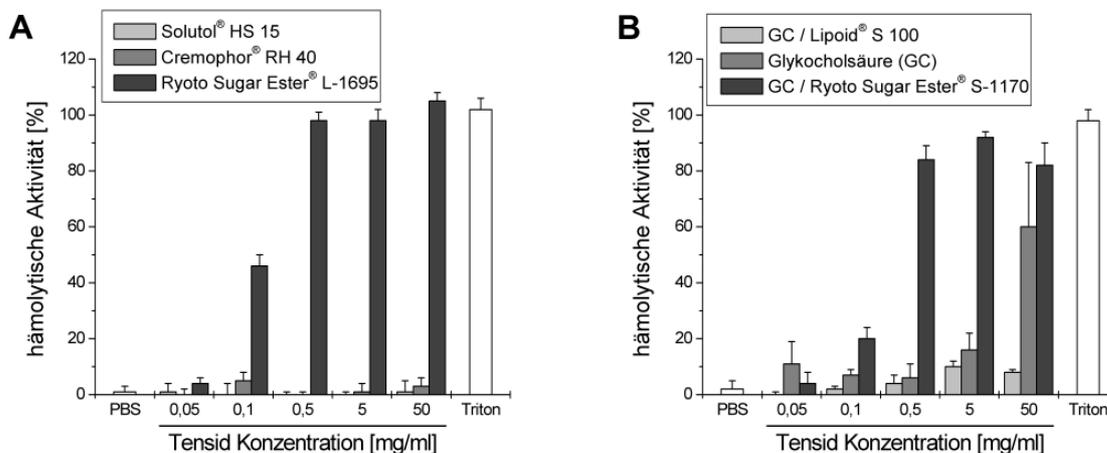


Abbildung 20: Hämolytische Aktivität der verwendeten Tenside in Abhängigkeit von der Konzentration. Humane Erythrozyten wurden bei 37 °C für 1 h mit den Tensiden verschiedener Konzentration inkubiert. Nach Zentrifugation wurden der Anteil Hämoglobin photometrisch bei 540 nm quantifiziert. Als Negativkontrolle wurde PBS-Puffer und als Positivkontrolle 2 %ige Triton Lösung eingesetzt. Lediglich Solutol[®] HS 15 und Cremophor[®] RH 40 weisen eine geringe hämolytische Aktivität über den gesamten Konzentrationsbereich auf.

Tenside, die als Hilfsstoffe in parenteralen Arzneiformulierungen eingesetzt werden, können an Erythrozyten im Blut Hämolyse induzieren. Die Ruptur der roten Blutzellen geht einher mit der Freisetzung von Hämoglobin. Der Grund für die Hämolyse sind osmotische Effekte, die durch eine erhöhte Membranpermeabilität oder Solubilisierung von Membranlipiden und Proteinen verursacht durch die verwendeten Tenside zustande kommen [129]. Inkubation von Erythrozyten mit den Tensiden kann einen Eindruck auf die Toxizität der Mizellformulierungen *in vivo* geben.

Im Allgemeinen zeigen nicht-ionische Tenside weniger negative Nebeneffekte als ionische [156]. Frühere Studien mit Zuckerester Tensiden demonstrierten hohe hämolytische Aktivität verglichen mit häufig verwendeten Tensiden wie Solutol[®] HS 15, Brij[®] und Triton[®] X-100 [157, 158]. Diese Resultate bestätigen die Ergebnisse in dieser Studie. Beide untersuchten Zuckerester Formulierungen wiesen die stärkste hämolytische Aktivität auf, gefolgt von der ionischen Glykocholsäure (s. Abbildung 20). Durch Bildung von Mischmizellen aus GC und Lipoid[®] S 100 konnte die Toxizität minimiert werden. Die protektive Natur von Phosphatidylcholin wurde bereits in mehreren Publikationen beschrieben und kann mit einer geringeren Solubilisierungskapazität der Mischmizellen für Membrankomponente erklärt werden [159, 160]. Verglichen dazu zeigten Solutol[®] HS 15 und Cremophor[®] RH 40 Mizellen keine signifikante hämolytische Aktivität.

3.4 Selektion des Mizellsystems

Durch Variation der Mizellkomponenten konnte die kolloidale ICG Formulierung weiter optimiert werden. Neben anionischen Mizellen und Mischmizellen, wurden nicht-ionische Tenside mit verschiedenen HLB-Werten untersucht. Zusätzlich wurden Fettsäure-Zuckerester auf ihre Tauglichkeit als parenteralen Hilfsstoff getestet.

Sowohl die ionischen Mizellen als auch die Pluronic[®] F 68 Mizellen zeigten nur geringe Verbesserungen der optischen Eigenschaften und der *in vitro* Stabilität von ICG. Die nicht-ionischen Tenside mit einem durchschnittlichen HLB-Wert um 15 zeigten eine dreifache Erhöhung der Quantenausbeute und eine Stabilisierung des Farbstoffes in wässriger Lösung mit einer Halbwertszeit von über vier Wochen. Die Verkapselungseffizienz zeigte deutlich, dass die Affinität von ICG zu den Mizellen in Abhängigkeit zur Hydrophilie der Tenside steht. Der Mizellbildner Pluronic[®] F 68 mit einem HLB-Wert von 29 verkapselte ICG zu 61 %, während die Tenside mit einem HLB-Wert um 15 den Farbstoff zu mindestens 90 % verkapselten.

Zusammenfassend wurden die besten Ergebnisse in Solutol[®] HS 15, Cremophor[®] RH 40 und Ryoto Sugar Ester[®] L-1695 Mizellen erzielt. Der abschließende Hämolyse Assay zeigte jedoch eine sehr starke hämolytische Aktivität der Ryoto Sugar Ester[®] bei den erforderlichen Konzentrationen im Vergleich zu den anderen untersuchten Tensiden. Aus diesem Grund wurden diese Hilfsstoffe als nicht geeignet für eine mizellare, parenteral zu applizierende Formulierung eingestuft. Cremophor[®] RH 40 kann nach parenteraler Applikation zu Nebenwirkungen wie anaphylaktischem Schock oder Histaminfreisetzung führen [161, 162]. Studien an Solutol[®] HS 15 haben gezeigt, dass es im direkten Vergleich zu Cremophor[®] RH 40 besser vertragen wird [117].

Aus diesem Grund wurde Solutol[®] HS 15 als Mizellbildner für die kolloidale ICG Formulierung ausgewählt. In den folgenden Kapiteln soll diese Formulierung genauer in *in vitro* und *in vivo* Experimenten untersucht werden.

4 *In vitro* Charakterisierung der optimierten ICG Formulierung

Im folgenden Kapitel sollte die ausgewählte kolloidale ICG Formulierung mit Solutol® HS 15 (Solutol) als Mizellbildner auf ihre Eignung für eine *in vivo* Anwendung untersucht werden. Dazu wurden *in vitro* Stabilitätsprüfungen auf die Thermostabilität, die physikalische Stabilität der Mizellen in wässrigen Medien und Zellkulturversuche bezüglich der Zytotoxizität und des Aufnahmeverhaltens durch Phagozyten durchgeführt. Zusätzlich wurde die Morphologie der Mizellen mit Hilfe der Kryo-TEM untersucht.

Die Thermostabilität wurde, wie schon zuvor beschrieben, über die Veränderung des Absorptionsspektrums detektiert. Verglichen wurde die Stabilität der mizellaren Formulierung mit der einer reinen ICG Lösung nach Lagerung bei 4 °C, 25 °C und 37 °C. Die physikalische Stabilität der Mizellen in wässrigen Medien wurde durch die Bestimmung der kritischen Mizellbildungskonzentration (CMC) untersucht. Dies wurde tensiometrisch über die Veränderung der Oberflächenspannung durchgeführt. Da diese Methode für die farbstoffhaltigen Mizellen keine Ergebnisse lieferte, musste zusätzlich auf eine fluorimetrische Bestimmung über die Veränderung der Fluoreszenzeigenschaften zurückgegriffen werden. Um einen Hinweis auf die Stabilität der Mizellen *in vivo* zu bekommen, wurde der Einfluss von Albumin auf die physikalische Stabilität der Mizellen *in vitro* untersucht. Mit Hilfe der dynamischen Lichtstreuung konnte das Vorhandensein von intakten Mizellen vor und nach Zugabe von physiologisch relevanten Albumin Konzentrationen geprüft werden. Über die Veränderungen der Emissionsspektren wurde zudem die Extraktion des Farbstoffes aus intakten Mizellen durch Bindung an Albumin untersucht.

Zellkulturversuche sollten erste Hinweise über das toxische Verhalten der mizellaren Formulierung *in vivo* geben. Dazu wurde ein ausführlicheres Hämolyse Assay im direkten Vergleich der mizellaren Formulierung mit dem freien Farbstoff durchgeführt. Zusätzlich wurde an einer Zelllinie von humanen Endothelzellen aus Nabelschnurvenen („*human umbilical vein endothelial cells*“ - HUVEC) eine Zellviabilitätsstudie durchgeführt. Ausgesucht wurde diese Zelllinie aufgrund der Ähnlichkeit zum menschlichen Endothelgewebe. Die HUVEC Zellen wurden für 30 und 60 min mit verschiedenen Konzentrationen der Formulierungen bei 37 °C inkubiert und anschließend die Zellviabilität mit Hilfe des MTT Assays bestimmt. Abschließend wurde die Zellaufnahme der mizellaren Formulierung durch

Phagozyten untersucht und mit der der freien Farbstofflösung verglichen. P388 Makrophagen wurden dazu auf speziellen Objektträgern kultiviert und für 1 h mit verschiedenen Konzentrationen der Formulierungen bei 37 °C inkubiert. Nach mehreren Waschschrinen wurde der Zellkern der Makrophagen mit DAPI angefärbt und die Objektträger mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie visuell ausgewertet. Neben Aufnahmen mit dem Differential Interferenz Kontrast (DIC) konnte die DAPI und ICG Fluoreszenz mit Hilfe von speziellen Filtersets detektiert werden.

4.1 Materialien

Die Zusammensetzung, Menge und Hersteller der Bestandteile der verwendeten Kultur- und Auflösungsmedien sind in Tabelle 9 bis Tabelle 11 dargestellt. Alle weiteren Materialien sind im jeweiligen Methodenteil aufgeführt.

Tabelle 9: Zusammensetzung, Menge und Hersteller der Bestandteile des Wachstumsmediums EGM („*endothelial cell growth medium*“) für die Kultivierung der HUVEC Zelllinie.

Zusammensetzung	Menge	Hersteller
EBM (<i>endothelial cell basal medium</i>)	500 ml	Lonza (Walkersville, USA)
BBE (<i>bovine brain extract</i>)	2,0 ml	Lonza (Walkersville, USA)
FBS (<i>fetal bovine serum</i>)	10 ml	Lonza (Walkersville, USA)
rhEGF (<i>human recombinant epidermal growth factor</i>)	0,5 ml	Lonza (Walkersville, USA)
GA-1000 (Gentamycin / Amphotericin B)	0,5 ml	Lonza (Walkersville, USA)
Hydrocortison	0,5 ml	Lonza (Walkersville, USA)

Tabelle 10: Zusammensetzung, Menge und Hersteller der Bestandteile des Wachstumsmediums RPMI 1640 für die Kultivierung der P388 Makrophagen Zelllinie.

Zusammensetzung	Menge	Hersteller
RPMI 1640	500 ml	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
FBS (<i>fetal bovine serum</i>)	50 ml	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
Penicillin / Streptomycin (10.000 U/ml / 10.000 µg/ml)	5 ml	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
Natriumpyruvat	1 mM	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
HEPES	10 mM	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)

Tabelle 11: Zusammensetzung, Menge und Hersteller der Bestandteile des Lysepuffers für den MTT Assay.

Zusammensetzung	Menge	Hersteller
30 % m/V SDS (Natriumdodecylsulfat)	10 ml	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
Dimethylformamid	5 ml	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Eisessig	0,3 ml	Merck (Darmstadt, Deutschland)

4.2 Methoden

4.2.1 Kritische Mizellbildungskonzentration (CMC)

Ein wichtiger Parameter für die Charakterisierung von Tensiden ist die kritische Mizellbildungskonzentration (CMC - *critical micelle concentration*). Wird ein Tensid in Wasser gelöst, so lagert es sich zunächst an der Grenzfläche an. Erst wenn an dieser Grenzfläche kein Raum für weitere Tensidmoleküle vorhanden ist, beginnen die Moleküle im Inneren der Lösung Agglomerate, so genannte Mizellen, zu bilden. Die Tensidkonzentration, bei der diese Mizellbildung einsetzt, wird als kritische Mizellbildungskonzentration bezeichnet. Wird die Tensidkonzentration über die CMC hinaus erhöht, bleibt die Konzentration der mit den Mizellen im Gleichgewicht stehenden Monomeren konstant. Das Phänomen der Mizellbildung kann durch Veränderung verschiedener physikalischer Eigenschaften der Lösung in Abhängigkeit von der Tensidkonzentration beobachtet werden.

Tensiometrische Bestimmung

Die Bestimmung der CMC über die Veränderung der Oberflächenspannung erfolgte bei Raumtemperatur nach der Wilhelmy-Plattenmethode an einem Tensiometer K100 der Firma Krüss (Hamburg, Deutschland). Die Oberflächenspannung wurde mit Hilfe einer an einer Präzisionswaage hängenden optimal benetzbaren Platte ermittelt. Durch einen höhenregelbaren Probenträger wurden die Stammlösungen mit der Platte in Kontakt gebracht. Verwendet wurden eine Solutol Stammlösung ($c = 10^4$ mg/l) und die Solutol Stammlösung mit Farbstoff ($c = 10^3$ mg/l). Durch die auf die Waage wirkende Kraft und die bekannte Plattenlänge konnte die Spannung der Oberfläche berechnet werden. Mittels einer automatischen Dosiereinheit wurde im logarithmischen Zugabemodus die Tensidstammlösung mit deionisiertem Wasser bis zu einer Konzentration von $c = 0,001$ mg/l verdünnt. Die angegebenen Oberflächenspannungen stellen Mittelwerte aus jeweils 6 Messwerten bei einer Dreifachbestimmung dar.

Fluorimetrische Bestimmung

Die fluorimetrische Bestimmung der CMC von Solutol mit verschiedenen Konzentrationen ICG erfolgte spektroskopisch durch Messen der Fluoreszenzintensitäten und Emissionsmaxima mit einem Spex Fluorolog-2 Spektrofluorometer (s. Kapitel 2.2.4). Dazu wurden die Proben bei einer Wellenlänge von $\lambda_{\text{EX}} = 730$ nm angeregt und Emissionsspektren von 750 bis 900 nm aufgenommen. Solutol wurde in verschiedenen Konzentrationen (von $c = 0,1$ bis 10^5 mg/ml Solutol) mit deionisiertem Wasser hergestellt und zu jeder Verdünnung eine bestimmte Menge ICG dazu gegeben. Um den Einfluss des Farbstoffes auf die CMC zu untersuchen wurden die gleichen Solutol Verdünnungsreihen mit fünf verschiedenen ICG Konzentrationen ($c_1 = 0,5$ mg/l, $c_2 = 1,0$ mg/l, $c_3 = 5,0$ mg/l, $c_4 = 10,0$ mg/l und $c_5 = 20,0$ mg/ml ICG) durchgeführt. Analog zu einer Veränderung der Fluoreszenzintensität wurde eine Verschiebung der Emissionsspektren beobachtet. Die Emissionsspektren wurden durch eine Gauss-Funktion angepasst und die Intensität und die Wellenlänge im Maximum der Kurve bestimmt. Die Werte wurden in Abhängigkeit von den Solutol Konzentrationen dargestellt und graphisch ausgewertet.

4.2.2 Einfluss von Albumin auf die physikalische Stabilität der Mizellen

Um den Einfluss von Plasmaproteinen auf die physikalische Stabilität der Mizellen zu untersuchen, wurden zum einen Emissionsspektren von freiem ICG und mizellarem ICG in An- und Abwesenheit von verschiedenen BSA-Konzentrationen („*bovine serum albumin*“, Sigma, Taufkirchen, Deutschland) miteinander verglichen. Durch die Veränderung der Spektren in Anwesenheit von BSA konnten Aussagen über eine Bindung von ICG an BSA gemacht werden. Zusätzlich wurde der mittlere hydrodynamische Durchmesser der Mizellen vor und nach Zugabe von BSA mit Hilfe der dynamischen Lichtstreuung untersucht, um das Vorhandensein von intakten Mizellen zu überprüfen.

Freier Farbstoff (50 mg/l ICG) und in Mizellen verkapselter Farbstoff (50 mg/l ICG in 100 mg/ml Solutol) wurden mit gleichen Volumina PBS-Puffer (0,01 M), der verschiedene BSA-Konzentrationen (50 g/l, 25 g/l und 10 g/l) enthielt, versetzt und bei 37 °C inkubiert. Über 5 h wurden zu verschiedenen Zeitpunkten Emissionsspektren von 700 - 900 nm bei einer Anregungswellenlänge von $\lambda_{\text{EX}} = 730$ nm aufgenommen und die Wellenlängen und Fluoreszenzintensitäten im Maximum miteinander verglichen ($n = 3$). Zeitgleich zu der Aufnahme

der Emissionsspektren wurde der mittlere hydrodynamische Durchmesser der Mizellen vor und nach Zugabe von BSA mittels DLS bestimmt (s. Kapitel 2.2.2).

4.2.3 Zellkultur

Alle Zellkulturarbeiten wurden in einem Labor der Sicherheitsstufe S1 unter sterilen Bedingungen an einer Reinraumwerkbank mit autoklavierten oder heißluftsterilisierten Materialien bzw. Geräten durchgeführt. Die Zellen wurden in einem CO₂-Begasungsbrutschrank im offenen System bei 37 °C unter einer 5 %igen CO₂-Atmosphäre und einer relativen Luftfeuchte von 95 % kultiviert. Zellkulturmedien und Proben zur Inkubation wurden vor Verwendung auf 37 °C erwärmt. Alle mit Zellmaterial in Kontakt getretenen Materialien oder Geräte wurden anschließend mit 5 % Gevisol[®] (Schülke & Mayr, Norderstedt) desinfiziert oder durch Autoklavieren sterilisiert. Die regelmäßigen phasenkontrastmikroskopischen Untersuchungen der Zellkulturen erfolgten an einem Axiovert 10 Inversmikroskop der Firma Carl Zeiss (Göttingen, Deutschland) bei 10-, 20- und 32-facher Vergrößerung.

Kultivierung der HUVEC Endothel Zelllinie

Adhärente Endothelzellen aus humanen Nabelschnurvenen (HUVEC - „*human umbilical vein endothelial cells*“) wurden von der Firma Lonza (Walkersville, USA) bezogen. Nach dem Auftauen der Endothelzellen erfolgte die Kultivierung in 75 cm² Kulturflaschen mit EGM Kulturmedium (s. Tabelle 9) im Brutschrank. Die Zellaussaat erfolgte mit einer Dichte von 2500 - 5000 Zellen pro cm². Das Kulturmedium wurde dreimal in der Woche erneuert und die Zellen nach Erreichen eines Monolayers von etwa 80 % Konfluenz (alle fünf bis neun Tage) abgelöst und subkultiviert. Dazu wurden nach Absaugen des Mediums und zweimaligem Waschen mit D-PBS (-CaCl₂, -MgCl₂) die Endothelzellen mit 2 ml Trypsin/EDTA Lösung (0,05 % Trypsin und 0,02 % EDTA in PBS) versetzt und 5 min bei 37 °C inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden in 50 ml Falcon-Zentrifugationsröhrchen überführt und zentrifugiert (5 min, 4 °C, 1000 rpm). Nach Abnahme des Überstandes wurden die Zellen im Kulturmedium resuspendiert, 10 µl der Zellsuspension in einem Eppendorfcup mit 90 µl Trypanblau versetzt und die Anzahl der nicht angefärbten Zellen lichtmikroskopisch in der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Endothelzellen wurden nach Erreichen von etwa 80 % Konfluenz

für die Durchführung des MTT Assays mit einer Konzentration von $2,5 \cdot 10^5$ Zellen pro ml eingesetzt.

Kultivierung der P388 Makrophagen Zelllinie

Adhärente murine makrophagenähnliche Monozyten der Zelllinie P388D1 (IL-1) (Cat. No. TIB 63) wurden von ATCC[®] (*American Type Culture Collection*, Wesel, Deutschland) bezogen. Die Zellen wurden in RPMI 1640 Medium (Zusammensetzung s. Tabelle 10) in 75 cm² Kulturflaschen kultiviert. Die Zelldichte betrug 3 bis $9 \cdot 10^5$ Zellen pro ml und der Mediumwechsel erfolgte dreimal wöchentlich. Alle sieben Tage, nach Erreichen eines Monolayers von etwa 80 % Konfluenz, wurden die Zellen analog der HUVEC Zelllinie subkultiviert. Zur Durchführung des Phagozytose Assays wurden subkonfluente Zellen in einer Konzentration von $3 \cdot 10^5$ Zellen pro ml verwendet.

MTT Assay

Um die zytotoxischen Eigenschaften der mizellaren Formulierung zu bestimmen, wurde die Zellviabilität von Endothelzellen (HUVEC) untersucht.

Verwendet wurde dafür der kolorimetrische MTT Assay, dessen Grundlage die Reduktion des gelben Tetrazoliumsalzes MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromid) durch die mitochondriale Dehydrogenase intakter Zellen ist. Diese Umwandlung verläuft unter Bildung eines blauen, wasserunlöslichen Formazanfarbstoffes, der photometrisch bei 580 nm quantifiziert werden kann. Die Absorption korreliert somit direkt mit der Anzahl metabolisch aktiver Zellen.

In 96 MicroWell Platten (TPP, St. Louis, USA) wurden $2,5 \cdot 10^6$ Endothelzellen ausgesät und für 24 h im Brutschrank kultiviert. Die Inkubation mit jeweils 100 µl Testsubstanz pro Well erfolgte für 30 min und für 1 h bei 37 °C unter einer 5 %igen CO₂-Atmosphäre. Als Negativkontrolle fungierte 2 %ige Triton X-100 Lösung, als Positivkontrolle PBS-Puffer. Nach der Inkubationsphase und dreimaligem Waschen mit PBS-Puffer wurden die Endothelzellen mit Kulturmedium versetzt und bis zur Durchführung des Assays für 24 h im Brutschrank verwahrt. 2 h vor Bestimmung der Zellviabilität erfolgte die Zugabe von 20 µl MTT Reagenz (5 mg/ml MTT in PBS-Puffer) und eine sofortige Absorptionsmessung im Plattenreader (Fluostar Optima, BMG Labtech, Offenburg, Deutschland) zur Bestimmung der Eigenabsorp-

tion der Proben. Nach 2 h wurde die Lösung verworfen, die Zellen mit jeweils 100 μ l Lysepuffer (s. Tabelle 11) versetzt und die optische Dichte im Plattenreader bei 580 nm bestimmt. Die Eigenabsorption wurde vom Messwert abgezogen und die Zellviabilität nach folgender Gleichung bestimmt:

$$\text{Zellviabilität [\%]} = \frac{A_{\text{Probe}} - A_{\text{negativ}}}{A_{\text{positiv}} - A_{\text{negativ}}} \cdot 100 \quad (16)$$

mit: A_{Probe} Absorption der Probe, A_{negativ} Absorption der Negativkontrolle (2 % Triton Lösung), A_{positiv} Absorption der Positivkontrolle (PBS-Puffer)

Der Assay wurde in Dreifachbestimmung mit jeweils sechs Messwerten pro Experiment durchgeführt. Die Ergebnisse präsentieren den Mittelwert \pm Standardabweichung. Zur Abschätzung von signifikanten Unterschieden der Mittelwerte wurde der Student's t-Test für ungepaarte Stichproben angewendet [133]. Bei einer statistischen Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ wurde der Unterschied zweier Mittelwerte als signifikant bewertet.

Phagozytose Assay

Um die Aufnahme der kolloidalen Formulierungen durch makrophagenähnliche Zellen zu untersuchen, wurde die P388D1 Zelllinie nach Inkubation mit den fluoreszierenden Testsubstanzen mikroskopisch betrachtet.

Dazu wurden sie auf Objektträgern mit aufgesetzten Kammern, die bei Bedarf entfernt werden können (Lab-Tek II Chamber Slide System, Nunc), mit $6 \cdot 10^5$ Zellen pro Well ausgesät. Nach Kultivierung für 24 h bei 37 °C in 5 %iger CO₂-Atmosphäre wurde das Medium verworfen und die Zellen für 30 min bei 37 °C mit den Testsubstanzen inkubiert. Als Negativkontrolle wurden zum einen Zellen mit PBS-Puffer bei 37 °C inkubiert, zum anderen wurden Kontrollzellen 1 h vor Inkubation auf Eis gelegt und dann mit den Testsubstanzen bei 4 °C inkubiert. Nach der Inkubationsphase wurden die Zellen zweimal vorsichtig mit kaltem PBS-Puffer gewaschen und mit jeweils 1 ml Paraformaldehyd (4 % w/v) für 10 min bei Raumtemperatur fixiert. Die Zellkernanfärbung erfolgte nach einem weiteren Waschschrift mit 1 ml DAPI (4,6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid) in PBS-Puffer für 5 min im Dunkeln bei Raumtemperatur. Durch Anlagerung des Fluoreszenzfarbstoffs DAPI (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) an die DNA im Zellkern wurde dieser angefärbt und konnte bei 461 nm im Fluoreszenzmikroskop detektiert werden. Zum Mikroskopieren wurden

die Zellen zweimal gewaschen, der PBS-Puffer verworfen und die Mediumkammer vorsichtig vom Objektträger abgetrennt. Mit Hilfe von zwei Tropfen FluorSave Reagenz (Calbiochem[®], Darmstadt, Deutschland) wurden die Deckgläschen luftblasenfrei aufgelegt und die Proben an einem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

4.2.4 Fluoreszenzmikroskopie

Die Objektträger des Phagozytose Assays wurden mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops (AxioImager Z1, Carl Zeiss, Jena, Deutschland), ausgestattet mit einer 100 W Halogenlampe (HAL 100, Carl Zeiss), einer 100 W Quecksilberdampf-Kurzbogenlampe (HBO 100, Carl Zeiss) und einem 20x Plan-Apochromat Objektiv (Carl Zeiss), ausgewertet. Für den Nachweis der Fluoreszenzfarbstoffe DAPI und ICG wurden spezielle optische Filter und dichroitische Strahlenteiler verwendet (s. Tabelle 12). Zusätzlich wurden Aufnahmen im Durchlicht mit dem Differential Interferenz Kontrast (DIC) durchgeführt. Die Bildaufnahmen wurden alle bei einer Belichtungszeit von 500 ms über eine digitale CCD-Kamera (AxioCam MRm, Carl Zeiss) mit Hilfe der AxioVision Software (Version 4.5) aufgenommen und gespeichert. Für die Darstellung der Ergebnisse wurden die Bilder der drei Kanäle übereinander gelagert.

Tabelle 12: Kanaleinstellungen am AxioVision Z1 für die Auswertung des Phagozytose Assays.

Kanal	Anregungswellenlänge [nm]	Strahlenteiler [nm]	Emissionsfilter [nm]
1 (weiß) DIC ^a	-	-	-
2 (blau) DAPI ^b	365	395	BP 445 – 450
3 (rot) ICG	BP 670 – 750 ^c	LP 750 ^d	BP 780 – 850

^aDIC - Differential Interferenz Kontrast. ^bDAPI - 4,6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid. ^cBP - Bandpassfilter. ^dLP - Langpassfilter.

Ergebnisse und Diskussion

4.2.5 Morphologie der mizellaren ICG Formulierung

Die Mizellstruktur wurde mit Hilfe der Kryo-TEM und der dynamischen Lichtstreuung (DLS) untersucht. Sphärische Mizellen aus konventionellen ionischen Detergentien wurden erstmals 1988 durch die Kryo-TEM direkt sichtbar gemacht [163]. Durch die Kombination von ultraschneller Kryofixierung (Vitrifizierung durch schnelles Abkühlen) und TEM-Abbildung wird eine direkte *in situ* Visualisierung der in Lösung vorliegenden Strukturen (eingefrorener Lösungszustand) ermöglicht [132]. Die Abkühlung bei der Präparation erfolgt so schnell ($> 10^4 \text{ Ks}^{-1}$), dass die Kristallisation des Wassers unterbunden wird und die Artefaktbildung reduziert wird [164-166].

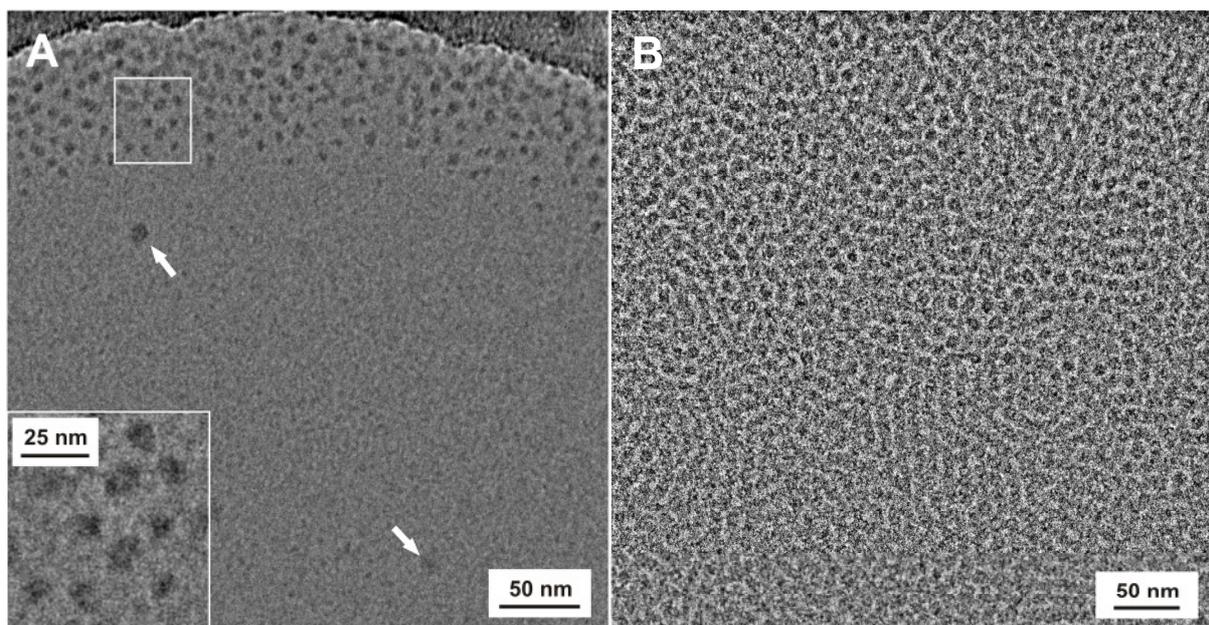


Abbildung 21: Kryo-TEM Aufnahmen von reinen Solutol Mizellen unterschiedlicher Konzentration. 1 mg/ml Solutol Lösung (A) und 100 mg/ml Solutol Lösung (B). Solutol bildet sphärische Mizellen, die sich in Abhängigkeit von ihrer Konzentration unterschiedlich auf dem perforierten Gitter anordnen. Die etwas größeren, mit weißen Pfeilen markierten Partikel stellen Artefakte aus hexagonalen Eiskristallen dar.

Reine Solutol Mizellen in deionisiertem Wasser wurden bei zwei verschiedenen Konzentrationen ($c_1 = 1 \text{ mg/ml}$, $c_2 = 100 \text{ mg/ml}$) untersucht. Die gewählten Konzentrationen lagen min-

destens um das Fünffache über den Angaben des Herstellers für die kritische Mizellbildungskonzentration ($CMC = 0,05 - 0,2 \text{ mg/ml}$) [167]. Abbildung 21 zeigt die Kryo-TEM Aufnahmen bei einer 100.000-fachen Vergrößerung. Solutol bildete sphärische Aggregate aus, die sich in Abhängigkeit von ihrer Konzentration unterschiedlich anordneten. Bei geringen Solutol Konzentrationen lagerten sich die sphärischen Mizellen mit einem gewissen Abstand zueinander am Rand der Löcher des perforierten Gitters an. Die Ursache für diese Anreicherung sind Kapillarkräfte, die während der Probenpräparation auf die Mizellaggregate wirken. Nach dem Auftragen der Lösung auf das perforierte Kupfergitter wird die überschüssige Lösung mit Hilfe eines Filterpapiers abgetragen. Dadurch spannt sich ein bikonkaver Film über das Loch, der im Zentrum etwa 10 - 20 nm und am Rand etwa 200 - 300 nm dick ist [168]. Durch diesen Gradienten wird die Mizelllösung aus dem Zentrum der Löcher zum Rand hin gepresst [169-171].

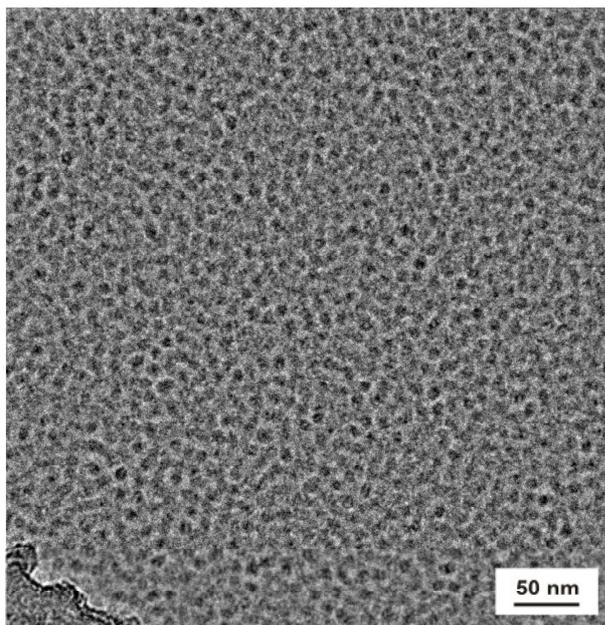


Abbildung 22: Kryo-TEM Aufnahme von ICG verkapselt in Solutol Mizellen ($c_{ICG} = 1 \text{ mg/ml}$, $c_{Solutol} = 100 \text{ mg/ml}$). Im Vergleich zu Abbildung 20B erscheint der Kontrast in einigen Mizellen verstärkt zu sein. Dies kann zum einen durch Überlagerungseffekte oder zum anderen durch den Einschluss von ICG in die Mizellen erklärt werden.

Die etwas größeren dunklen, durch weiße Pfeile markierten Flecken in der Abbildung 21A stellen Artefakte dar, die vermutlich von hexagonalen Eiskristallen stammen. Diese können sich während der Präparation oder während des Probentransfers gebildet haben [169]. Die höher konzentrierte Solutol Probe (s. Abbildung 21B) zeigte eine sehr homogene dicht gepackte Struktur von sphärischen Mizellen. In bestimmten Bereichen ließen sich hexagonale Domänen erkennen. Die Zugabe von 1 mg/ml ICG zu der konzentrierten Solutol Probe verän-

derte die dicht gepackte Struktur der sphärischen Mizellen nicht (s. Abbildung 22). Es lassen sich lediglich weniger geregelte hexagonale Domänen erkennen. In Abbildung 23 sind die Anordnungen der sphärischen Mizellen bei verschiedenen Konzentrationen mit und ohne Farbstoff schematisch dargestellt.

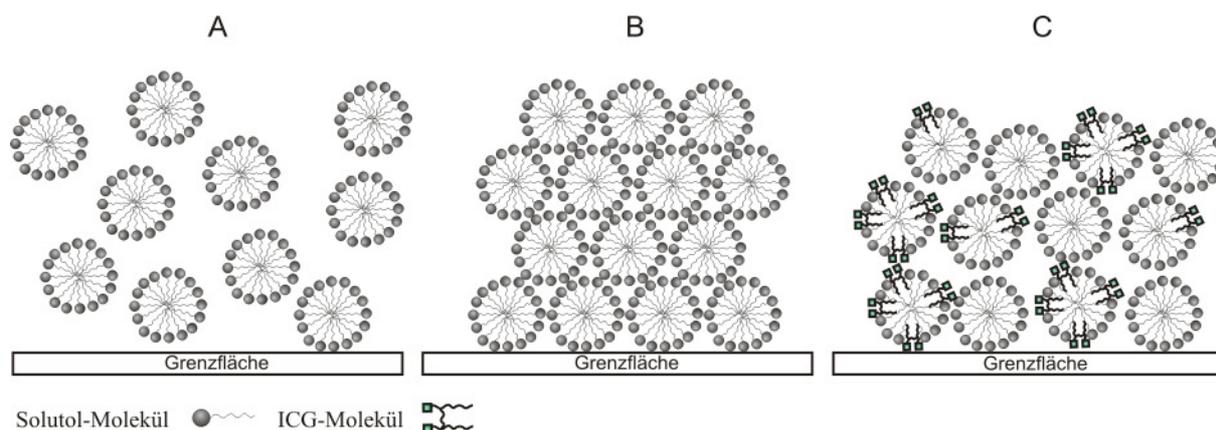


Abbildung 23: Schematische Darstellung der Anordnung von Solutol Mizellen bei geringer Solutol Konzentration (1 mg/ml) (A), bei hoher Solutol Konzentration (100 mg/ml) (B) und die Anordnung von ICG/Solutol Mizellen bei hoher Solutol Konzentration (100 mg/ml) (C). Bei geringen Solutol Konzentrationen lagern sich die sphärischen Mizellen mit einem gewissen Abstand zueinander an. Bei höheren Solutol Konzentrationen entsteht eine sehr homogene dicht gepackte Struktur von Mizellen in hexagonaler Anordnung. Durch Zugabe von ICG werden diese hexagonalen Strukturen teilweise gestört.

Ein direkter Vergleich der Kryo-TEM Aufnahmen von reinen Solutol Mizellen und ICG/Solutol Mizellen bei hohen Konzentrationen zeigt, dass der Kontrast in ICG/Solutol Mizellen leicht verstärkt erscheint (vgl. Abbildung 21B und 22). Dies kann zum einen durch Überlagerungseffekte aufgrund der hohen Tensidkonzentrationen zustande kommen. Da die Solutol Konzentrationen bei beiden Aufnahmen äquivalent sind und der Kontrast nur in den ICG/Solutol Mizellen verstärkt erscheint, kann dieser Effekt jedoch vernachlässigt werden. Eine weitere Erklärung für den verstärkten Kontrast in ICG/Solutol Mizellen könnte der Einschluss des Farbstoffes in die Mizellen sein. Das ICG sorgt in den Mizellen für eine höhere Elektronendichte, wodurch diese Bereiche im TEM dunkler erscheinen. Da nicht alle Mizellen dunkler erscheinen, kann vermutet werden, dass nicht jede Mizelle die gleiche Menge an Farbstoff aufnimmt, was auch die weniger geregelte Struktur im Vergleich zur reinen Solutol

Lösung erklären würde (s. Abbildung 23B und C). Der Einschluss des Farbstoffes in Solutol Mizellen ist in Abbildung 24 schematisch dargestellt.

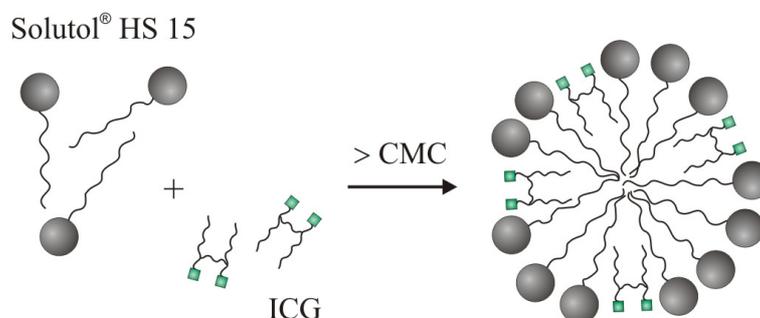


Abbildung 24: Schematische Darstellung der Bildung von ICG/Solutol Mizellen.

Die Bestimmung des mittleren Durchmessers über die Kryo-TEM Aufnahmen erfolgte durch Auswahl repräsentativer Bildausschnitte und Ermittlung der Größenverteilung mit Hilfe der Software JMicroVision (Version 1.2.7). Dabei wurde der horizontale Durchmesser an 100 Mizellen bestimmt und der Mittelwert \pm Standardabweichung gebildet (s. Abbildung 25A).

Die dynamischen Lichtstreudaten ergaben für die 1 mg/ml Solutol Lösung bei einer sehr engen Teilchengrößenverteilung ($PDI = 0,050 \pm 0,005$) einen mittleren hydrodynamischen Durchmesser von $12,1 \pm 0,1$ nm (s. Tabelle 13). Sowohl die enge Verteilung als auch der Durchmesser der Mizellen veränderten sich auch bei hoher Solutol Konzentration nicht. Erst die Zugabe von 1 mg/ml ICG erhöhte den mittleren hydrodynamischen Durchmesser leicht und bewirkte einen deutlichen Anstieg der Polydispersität. Bei gleicher Viskosität der Lösungen kann zum einen der Einschluss von ICG in die Mizellen durch eine Vergrößerung der Hydrathülle für einen Anstieg des Durchmessers sorgen. Zum anderen könnten Ladungseffekte für eine Abstoßung zwischen den Mizellen sorgen, wodurch die Fluktuationen der Mizellen reduziert und der Durchmesser erhöht werden. Zusätzlich muss beachtet werden, dass die Polydispersität der ICG/Solutol Mizellen so hoch ist, dass der angegebene Wert für den hydrodynamischen Durchmesser nur einen Näherungswert darstellt. Die Auswertung der TEM Aufnahmen zeigte, dass in allen drei Proben der mittlere Durchmesser identisch war. Somit

ist anzunehmen, dass der mit der DLS bestimmte etwas höhere mittlere Durchmesser in der farbstoffhaltigen Probe durch die erhöhte Polydispersität zustande kommt.

Tabelle 13: Vergleich der DLS und Kryo-TEM Werte für den mittleren Durchmesser der Mizellen in verschiedenen Formulierungen.

Formulierung	d_{hyd} (DLS) [nm]	PDI	d_{Kern} (TEM) [nm]	$d_{\text{Kern/Hülle}}$ (TEM) [nm]
Solutol (1 mg/ml)	$12,1 \pm 0,1$	$0,050 \pm 0,005$	$8,4 \pm 1,8$	-
Solutol (100 mg/ml)	$12,2 \pm 0,3$	$0,060 \pm 0,015$	$8,9 \pm 1,4$	$12,2 \pm 1,3$
Solutol (100 mg/ml) + ICG (1 mg/ml)	$20,8 \pm 0,3$	$0,318 \pm 0,026$	$8,3 \pm 1,2$	$12,3 \pm 1,1$

Ein Vergleich der DLS Werte (d_{hyd}) mit den durch Kryo-TEM bestimmten Werten (d_{Kern}) zeigt, dass die mikroskopisch ermittelten Teilchengrößen kleiner sind als die aus den Lichtstreuendaten ermittelten. Dies liegt daran, dass die sichtbaren Strukturen in den TEM Aufnahmen lediglich den Kern der Mizellen darstellen. Bei Block Copolymer Mizellen wurde beobachtet, dass die hydrophoben Kerne der Mizellen einen stärkeren Kontrast geben als die hydrophilen Hüllen [168, 170, 172]. In den Solutol Mizellen bilden die Ester der 12-Hydroxystearinsäure den lipophilen Kern der Mizellen und Polyethylenglykol (PEG) die hydrophile Hülle [167]. Es ist bekannt, dass PEG in der Elektronenmikroskopie aufgrund des geringen Elektronendichteunterschiedes zwischen dem PEG und der vitrifizierten Wassermatrix praktisch unsichtbar ist [173, 174]. Demnach ist anzunehmen, dass die Kryo-TEM Aufnahmen lediglich den Kern der Mizellen mit einem Durchmesser von $8,4 \pm 1,8$ nm zeigen [175]. Durch Ausmessen des Abstandes zwischen den Mizellmittelpunkten zweier aneinander liegender Mizellen bei hoher Solutol Konzentration wurde dies bestätigt (s. Abbildung 25B). Wie in Abbildung 23B schematisch dargestellt, liegen bei dieser Konzentration die Mizellen dicht beieinander. Der so ermittelte Durchmesser der Mizellen betrug $d_{\text{Kern/Hülle}} = 12,2 \pm 1,3$ nm (Solutol) bzw. $d_{\text{Kern/Hülle}} = 12,3 \pm 1,1$ nm (Solutol/ICG) und bestätigt so den mit Hilfe der DLS bestimmten hydrodynamischen Durchmesser ($d_{\text{hyd}} = 12,2 \pm 0,3$ nm) der Mizellen (s. Tabelle 13).

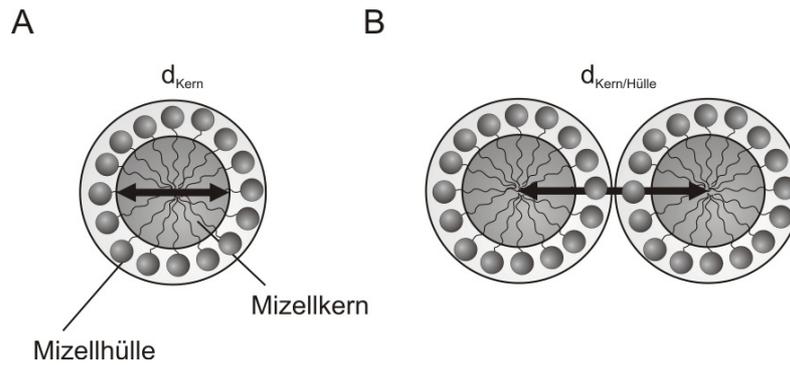


Abbildung 25: Schematische Darstellung der Bestimmung des Mizelldurchmessers d_{Kern} (A) und $d_{\text{Kern/Hülle}}$ (B) aus den Kryo-TEM Aufnahmen mit Hilfe der Bildbearbeitungssoftware JMicroVision. Der horizontale Durchmesser wurde an 100 Mizellen bestimmt und der Mittelwert \pm Standardabweichung gebildet. Da die PEG Hülle der Solutol Mizellen im Elektronenmikroskop praktisch nicht sichtbar ist, wird durch das Ausmessen des Durchmessers nach Methode A nur der Kern der Mizellen erfasst. Durch Ausmessen des Abstandes zwischen den Mizellmittelpunkten zweier aneinander liegender Mizellen (Methode B) kann der Durchmesser der Mizellen mit PEG Hülle bestimmt werden.

4.2.6 Einfluss der Temperatur auf die optische Stabilität

Um eine gleich bleibende Effektivität der ICG Formulierung bei jeder Anwendung garantieren zu können, müssen die Faktoren, die die optische Stabilität negativ beeinflussen, kontrollierbar sein. Zu diesen Faktoren zählen Lichteinfluss, Temperatur, extreme pH-Werte und die ICG Konzentration selber [65, 176]. Da bei der Herstellung der Formulierung auf die Einstellung des pH-Wertes, die ICG Konzentration und auch auf den Ausschluss von Licht durch Verwendung geeigneter gefärbter Glasgefäße Rücksicht genommen werden kann, muss als nicht steuerbarer Faktor der Temperatureinfluss betrachtet werden.

Dafür wurden freie ICG Lösung in deionisiertem Wasser ($c_{ICG} = 5 \text{ mg/l}$) und mizellare ICG Lösung in Solutol ($c_{ICG} = 5 \text{ mg/l}$ und $c_{Solutol} = 50 \text{ mg/ml}$) bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$, $25 \text{ }^\circ\text{C}$ und $37 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert und in definierten Abständen die Absorption der Proben bestimmt. Alle Formulierungen wurden unter Lichtausschluss gelagert und vor der photometrischen Bestimmung für 30 min auf Raumtemperatur gebracht.

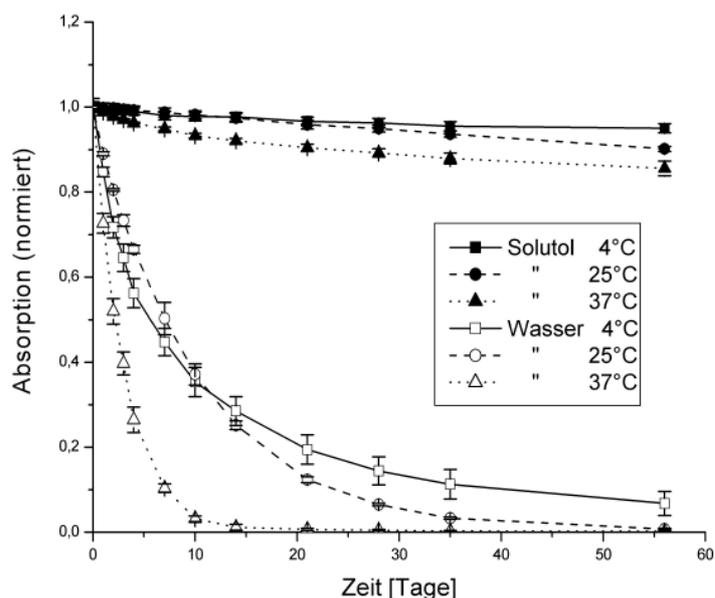


Abbildung 26: Vergleich der optischen Stabilität von freiem ICG und ICG verkapselt in Solutol Mizellen in Abhängigkeit von der Temperatur. Die Proben wurden alle unter Lichtausschluss bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$, $25 \text{ }^\circ\text{C}$ oder $37 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert. Die Werte repräsentieren den Mittelwert \pm Standardabweichung (als Balken dargestellt) aus jeweils 6 Ansätzen.

Freies ICG unterlag wie in der Literatur beschrieben einem schnellen hydrolytischen Abbau, der durch erhöhte Temperatur deutlich verstärkt wurde [65]. ICG verkapselt in Solutol Mizellen blieb über einen Zeitraum von acht Wochen optisch stabil. Auch bei höheren Temperaturen ($37 \text{ }^\circ\text{C}$) kam es lediglich zu einer geringen Abnahme der Absorption (86 % der Ausgangsabsorption).

Da auch nach acht Wochen Lagerzeit noch immer mehr als 80 % der Ausgangsabsorption erhalten sind, kann die Stabilität mit anderen Studien nur über den t_{90} -Wert verglichen werden. Der t_{90} -Wert gibt die Zeit an, bei der die Absorption um 10 % abgenommen hat und noch 90 % der Ausgangsabsorption erhalten sind. Freies ICG zeigte bei Raumtemperatur einen t_{90} -Wert von 21 h (s. Tabelle 14). Verkapselt in Solutol Mizellen konnte der Wert um ein vielfaches auf 1329 h erhöht werden. Bei erhöhten Lagertemperaturen (37 °C) lag der t_{90} -Wert von freiem ICG bei 11 h und von den ICG/Solutol Mizellen bei 491 h. Im Vergleich dazu zeigte bei vergleichbaren t_{90} -Werten von freiem ICG die bislang stabilste ICG Formulierung (ICG in Polystyren-alt-Maleinsäureanhydrid Block-Polystyren Mizellen) bei Raumtemperatur einen t_{90} -Wert von etwa 500 h und bei 37 °C einen t_{90} -Wert von etwa 100 h (s. Tabelle 14) [105]. Demzufolge zeigte ICG verkapselt in Solutol Mizellen im Vergleich zu dieser und anderen, zuvor diskutierten Stabilitätsstudien (s. Kapitel 3.3.3) sowohl eine deutlich überlegene Stabilität in Wasser als auch eine überlegene Thermostabilität [65, 105]. Die empfindlichen ICG Strukturen werden durch den Einschluss in Mizellen auch bei erhöhten Temperaturen geschützt.

Tabelle 14: t_{90} -Werte der Ausgangsabsorption nach Lagerung bei 25 °C und 37 °C von freiem ICG und ICG/Solutol Mizellen im Vergleich zu den t_{90} -Werten von ICG/Polystyren Mizellen [105].

ICG Formulierung	t_{90} -Werte bei 25 °C	t_{90} -Werte bei 37 °C
	[h]	[h]
freies ICG	21	11
ICG/Solutol Mizellen	1329	491
ICG/Polystyren Mizellen ^a	~ 500 ^b	~ 100 ^b

^aPolystyren-alt-Maleinsäureanhydrid Block-Polystyren Mizellen. ^bDie Werte wurden graphisch aus der Publikation von Rodriguez *et al.* ermittelt [105].

4.2.7 Physikalische Stabilität der Mizellen

Bestimmung der CMC und Einfluss der ICG Konzentration auf die CMC

Es ist offensichtlich, dass die ICG-haltigen Mizellen physikalisch stabil genug sein müssen, um eine ausreichend lange Zeit im Blutkreislauf zirkulieren zu können. Die *in vitro* und *in vivo* Stabilität der Mizellen hängt dabei vor allem von der kritischen Mizellbildungskonzentration (CMC) ab [177]. Dennoch ist es wichtig, zwischen thermodynamischer und kinetischer Stabilität zu unterscheiden. Von thermodynamisch stabilen Mizellen spricht man, wenn die Tensidkonzentration oberhalb der CMC liegt. Durch Selbstaggregation der amphiphilen Tensidmoleküle zu Mizellen wird die freie Enthalpie (ΔG) des Systems auf ein Minimum reduziert [178, 179]. Da mizellare Lösungen nach intravenöser Injektion im Blutkreislauf verdünnt werden, ist die Kenntnis der CMC wichtig, um ausreichend hohe Dosen verabreichen zu können [180, 181]. Die kinetische Stabilität von Mizellsystemen liefert Informationen über die Dissoziationszeit von Mizellaggregaten zu Monomeren bei Verdünnung. Kinetisch stabile Mizellen können somit auch unterhalb der CMC für einen gewissen Zeitraum als Mizellaggregate vorliegen [178-180, 182].

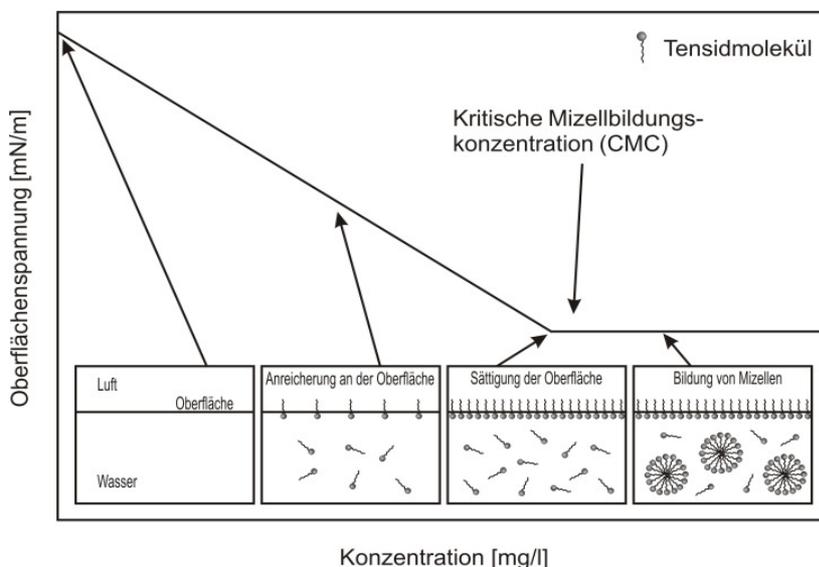


Abbildung 27: Schematische Darstellung der Mizellbildung in Abhängigkeit von der Tensidkonzentration und Bestimmung der CMC über die Veränderung der Oberflächenspannung, modifiziert nach [183].

Die CMC wurde in dieser Arbeit durch die Veränderung der Oberflächenspannung nach der Wilhelmy-Plattenmethode bestimmt. Diese statische Methode liefert sehr genaue und reproduzierbare Ergebnisse und kann ohne Kenntnis der Dichte von Lösungen durchgeführt wer-

den. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte graphisch durch Auftragung der Oberflächenspannung gegen die logarithmierte Solutol Konzentration. In Abbildung 27 ist die Veränderung der Oberflächenspannung in Abhängigkeit von der Tensidkonzentration schematisch dargestellt. Unterhalb der CMC, wo sich die Tensidmoleküle an der Grenzfläche anlagern, kommt es mit steigenden Tensidkonzentrationen zu einem linearen Abfall der Oberflächenspannung. Ist die Grenzfläche gesättigt und die Mizellbildung setzt ein, erreicht die Oberflächenspannung ein Plateau (s. Abbildung 27). Die Bestimmung der CMC erfolgt durch die Bildung zweier Ausgleichsgeraden im abfallenden Ast und im Plateau mit anschließender Berechnung derer Schnittpunkte.

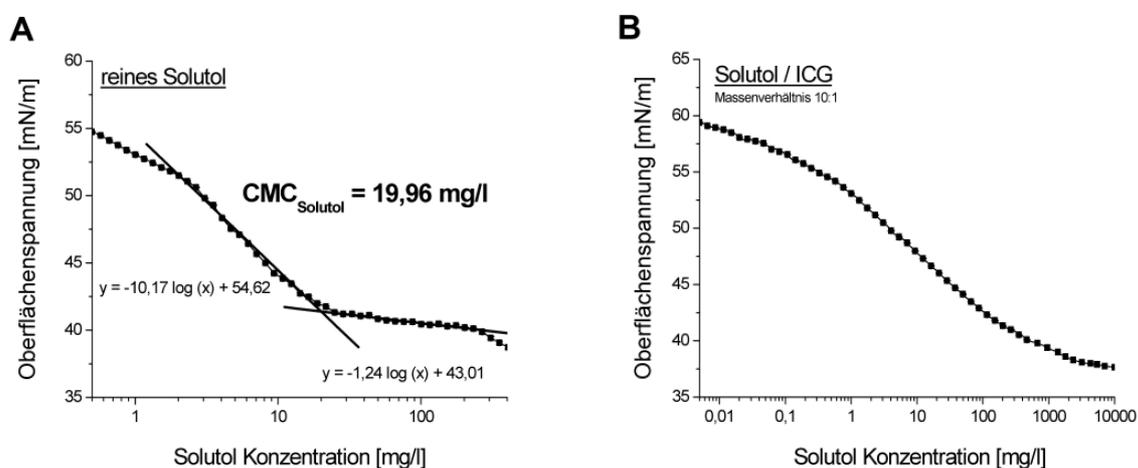


Abbildung 28: Tensiometrische Bestimmung der CMC von reiner Solutol Lösung (A) und von ICG/Solutol Mizellen (B). Da über einen breiten Konzentrationsbereich bei den ICG/Solutol Mizellen kein signifikantes Plateau in der Oberflächenspannung zu erkennen ist, muss eine sensitivere Methode für die CMC Bestimmung der Farbstoff Mizellen entwickelt werden.

In Abbildung 28 sind Diagramme der Oberflächenspannung in Abhängigkeit von der Solutol Konzentration von reiner Tensidlösung (A) und farbstoffhaltiger Tensidlösung (B) dargestellt. Bei reinen Solutol Lösungen wurden der Abfall der Oberflächenspannung sowie die Plateaubildung deutlich detektiert. Der zunächst nur langsame Abfall der Oberflächenspannung bei geringen Tensidkonzentrationen kann mit präferenzialer Adsorption der Tensidmonomere an der Gefäßwand erklärt werden. Der Schnittpunkt aus dem deutlich stärker abfallenden Ast und dem Plateau lieferte als Mittelwert von drei Bestimmungen eine CMC von $22,26 \pm 4,98 \text{ mg/l}$. Im Gegensatz zu der reinen Solutol Lösung zeigt die farbstoffhaltige Tensidlösung zwar einen

kontinuierlichen Abfall der Oberflächenspannung aber keine Plateaubildung über einen breiten Konzentrationsbereich. Die Vermutung liegt nahe, dass das ebenfalls grenzflächenaktive ICG einen starken Einfluss auf die CMC von Solutol hat [98]. Möglich ist zum einen, dass die CMC durch den Farbstoff stark ansteigt und außerhalb des hier gemessenen Bereiches von $c_{\text{Solutol}} = 10.000 \text{ mg/l}$ liegt. Ein weiteres Problem könnte die Automatisierung der Methode sein. Durch den standardisierten Einsatz einer automatischen Bürette konnte keine Verdünnungsreihe mit immer der gleichen Farbstoffkonzentration vermessen werden. Somit wurde nicht nur Solutol, sondern auch ICG verdünnt. Um den Einfluss des Farbstoffes auf die CMC von Solutol zu bestimmen, müsste die Oberflächenspannung bei konstanten ICG Konzentrationen untersucht werden. Da dies aufgrund der Automatisierung nicht mit der Tensiometrie zu realisieren war, wurde die CMC von farbstoffhaltigen Solutol Lösungen mit Hilfe der Fluorimetrie untersucht.

Wie schon in Kapitel 3.3.2 beschrieben, verändert ICG durch den Einschluss in Mizellen seine optischen Eigenschaften. Frei in Lösung vorliegend besitzt der Farbstoff eine sehr geringe Fluoreszenzintensität bei einem Emissionsmaximum von etwa 805 nm. Befindet sich ICG jedoch in einer lipophilen Umgebung, eingelagert in die lipophilen Molekülteile der Tensidmizellen, kann ein Fluoreszenzanstieg und eine Verschiebung des Emissionsmaximums nach 825 nm beobachtet werden. In Abbildung 29 sind die Fluoreszenzintensitäten und Wellenlängenmaxima in Abhängigkeit von der Solutol Konzentration bei fünf verschiedenen ICG Konzentrationen dargestellt. Ein Vergleich der Fluoreszenzintensitäten bei verschiedenen ICG Konzentrationen macht deutlich, dass die Intensität bis zu einer Solutol Konzentration von etwa 10 mg/l annähernd konstant bleibt, kurz unterhalb der CMC abfällt und oberhalb der CMC sprunghaft ansteigt. Die tensiometrisch bestimmte CMC von Solutol liegt bei $22,26 \pm 4,98 \text{ mg/l}$. Im Bereich dieser Solutol Konzentration kommt es in Anwesenheit von ICG Molekülen jedoch nicht zu einem sprunghaften Anstieg der Fluoreszenzintensität durch die einsetzende Mizellbildung, sondern zu einer Fluoreszenzabnahme. Dieses Fluoreszenzquenching kann damit erklärt werden, dass die Lösung bei vorliegender Solutol Konzentration an Solutol und Farbstoff Molekülen gesättigt ist. ICG verhindert die Mizellbildung, indem es mit anderen Farbstoff und Tensid Molekülen Aggregate ausbildet, die zu einem Fluoreszenzquenching führen. Erst wenn bei höheren Solutol Konzentrationen die Mizellbildung einsetzt, kommt es zu einer Auftrennung der Farbstoffmoleküle in den Mizellaggregaten und zu einem Anstieg der Fluoreszenz.

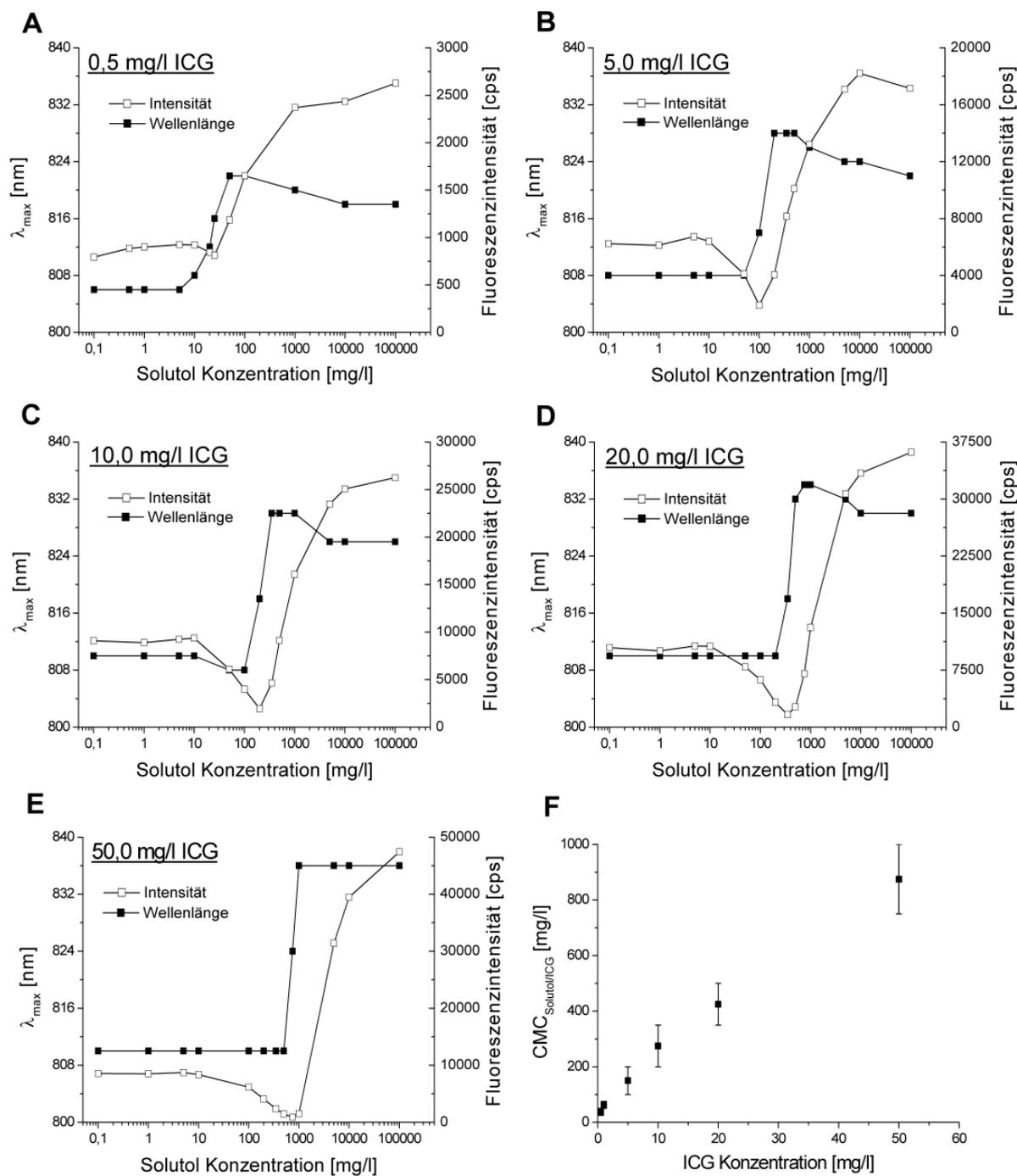


Abbildung 29: Bestimmung der CMC von ICG/Solutol Mizellen über die Veränderung der Fluoreszenzeigenschaften. Wellenlängenverschiebung (■) und Fluoreszenzintensität (□) gegen Solutol Konzentration bei verschiedenen ICG Konzentrationen (A-E). Abhängigkeit der $CMC_{Solutol/ICG}$ von der ICG Konzentration (F). Kurz oberhalb der CMC steigt die Fluoreszenzintensität sprunghaft an und das Emissionsmaximum verschiebt sich zu größeren Wellenlängen. Mit steigender ICG Konzentration nimmt die CMC der ICG/Solutol Mizellen zu.

Die bathochrome Verschiebung des Emissionsmaximums setzt im Vergleich zum Fluoreszenzanstieg bei geringeren Solutol Konzentrationen ein und erfolgt sprunghaft. Mit steigender ICG Konzentration verlagert sich dieser Anstieg zu höheren Tensidkonzentrationen (s. Abbildung 29A-E). Ein ähnliches Verhalten wurde durch den Einschluss von ICG und anderen Xanthenfarbstoffen in Natriumdodecylsulfat (SDS) und Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB) Mizellen beobachtet [98, 184].

Die CMC wurde bei der Konzentration festgelegt, bei der die Fluoreszenzintensität sprunghaft ansteigt und die maximale Verschiebung des Emissionsmaximums erreicht ist. Für Solutol versetzt mit 0,5 mg/l ICG ergab sich ein Wert von $37,5 \pm 12,5$ mg/l (s. Abbildung 29A). Mit steigender ICG Konzentration stieg die CMC an. Bei einem Farbstoffzusatz von 50 mg/l ICG betrug die CMC = 875 ± 125 mg/l (s. Abbildung 29E). Eine Erhöhung der CMC durch den Einschluss von Farbstoffen, wurde bereits in SDS und CTAB Mizellen beobachtet [98]. Durch Auftragung der CMC in Abhängigkeit von der ICG Konzentration, konnte der theoretische Wert der CMC von Solutol ohne Farbstoff durch den Schnittpunkt mit der y-Achse bestimmt werden (s. Abbildung 29F). Es wurde ein Wert von $CMC_{Fluo} = 31,0 \pm 5,6$ mg/l ermittelt, der in guter Übereinstimmung mit dem zuvor mit Hilfe der Tensiometrie bestimmten Wert von $CMC_{Tensio} = 22,26 \pm 4,98$ mg/l steht.

Die CMC Angaben für Solutol aus der Literatur sind oft nicht einheitlich. Von BASF wurde ein Bereich von 0,05 bis 0,2 mg/ml angegeben [167]. Anderen Literaturstellen entnimmt man Werte von 0,21 mg/ml und 0,014 mg/ml Solutol [185-187]. Die großen Unterschiede in den Angaben liegen zum einen an den unterschiedlichen Bestimmungsmethoden und Versuchsbedingungen (Temperatur, Elektrolyte). Zum anderen ist die heterogene Zusammensetzung der meisten Tenside problematisch. Solutol ist ein Stoffgemisch aus Polyethylenglykol und Polyglykol Mono- und Diestern der 12-Hydroxystearinsäure, dessen Zusammensetzung von Charge zu Charge variieren kann. Aufgrund dieser nicht einheitlichen Mischung aus mehreren grenzflächenaktiven Substanzen lassen sich die unterschiedlichen CMC Werte erklären. Die in dieser Arbeit bestimmten CMC Werte für Solutol ($CMC_{Tensio} = 22,26 \pm 4,98$ mg/l und $CMC_{Fluo} = 31,0 \pm 5,6$ mg/l) liegen im Bereich der in der Literatur angegebenen Werte.

Es sollte beachtet werden, dass die CMC in wässriger Lösung ohne beeinflussende Faktoren, wie beispielsweise Plasmaproteine, bestimmt wurde. Durch Protein-Farbstoff oder Protein-Tensid Interaktionen könnte das thermodynamische Gleichgewicht zwischen Monomeren

und Mizellen zugunsten der Monomeren verschoben werden [181]. Neben einer Destabilisation der Mizellen könnte es zusätzlich zu einer Extraktion des verkapselten Farbstoffes aus intakten Mizellen kommen [188-191].

Einfluss von Albumin auf die physikalische Stabilität der Mizellen

Um den *in vivo* Zustand der Mizellen *in vitro* zu simulieren, wurden ICG/Solutol Mizellen in An- und Abwesenheit von physiologisch relevanten BSA-Konzentrationen („*bovine serum albumin*“) untersucht. Abbildung 30A zeigt die aufgenommenen Emissionsspektren direkt nach der Verdünnung von freiem ICG und ICG/Solutol Mizellen mit gleichen Volumina PBS-Puffer, versetzt mit verschiedenen BSA-Konzentrationen. Obwohl alle Lösungen die gleiche Menge an Farbstoff enthielten, zeigte sich in Abhängigkeit von der BSA-Konzentration eine unterschiedlich hohe Fluoreszenzintensität und eine Verschiebung der Spektren. Freies ICG verdünnt mit reinem PBS-Puffer zeigte eine geringe Fluoreszenzintensität mit einem Emissionsmaximum bei 808 nm. Durch Zugabe von 5 % BSA-Lösung stieg die Fluoreszenz-

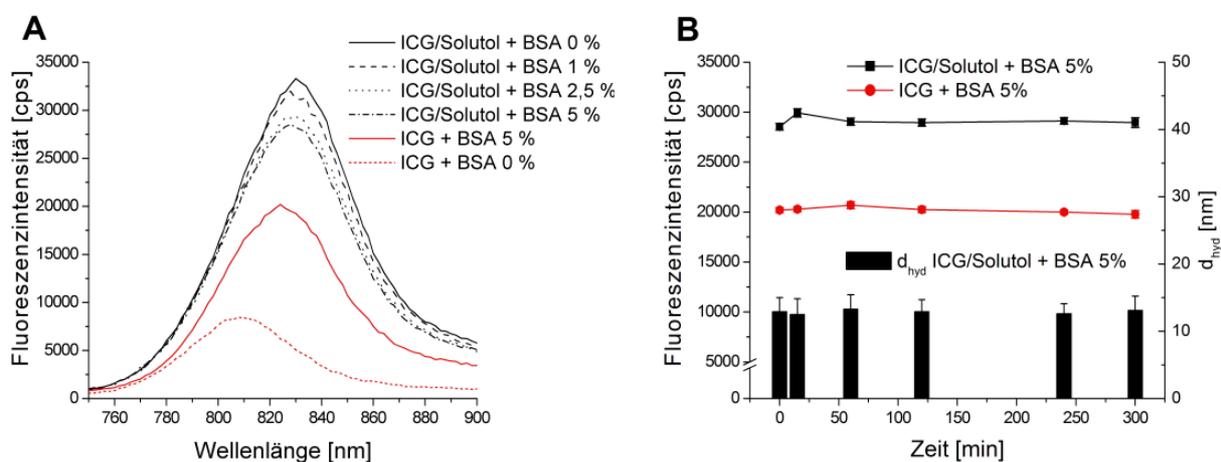


Abbildung 30: Emissionsspektren von freiem ICG und ICG/Solutol Mizellen in Abhängigkeit von der BSA-Konzentration bei gleicher Farbstoffkonzentration (A). Fluoreszenzintensitäten bestimmt im Maximum der Emissionskurven der Formulierungen in 5 % BSA-Lösung und hydrodynamischer Durchmesser der ICG/Solutol Mizellen in 5 % BSA-Lösung bei Lagerung unter 37 °C in Abhängigkeit von der Zeit (B). Auch bei physiologisch relevanten BSA-Konzentrationen (5 % BSA) liegen noch intakte ICG/Solutol Mizellen vor. Nach Inkubation bei 37 °C bleiben die Mizellen in 5 % BSA-Lösung über einen Zeitraum von 300 min stabil und geben keinen zusätzlichen Farbstoff mehr an Albumin ab.

intensität an, und das Spektrum verschob sich bathochrom ($\lambda_{\text{max}} = 824 \text{ nm}$). Dieser Effekt wurde bereits mehrfach erläutert (s. Kapitel 1.4.4) und ist auf eine Bindung von ICG an Albumin zurückzuführen [57]. ICG/Solutol Mizellen verdünnt mit reinem PBS-Puffer zeigen im Gegensatz zu freiem ICG eine deutlich höhere Fluoreszenzintensität mit einem Emissionsmaximum bei 830 nm (s. Kapitel 3.3.2). Die Zugabe von BSA bewirkte eine hypsochrome Verschiebung der Spektren und eine Abnahme der Fluoreszenzintensität, wobei mit steigender BSA-Konzentration die Fluoreszenzabnahme und die hypsochrome Verschiebung verstärkt wurden. Dies deutet darauf hin, dass durch Albumin der Farbstoff aus den Mizellen extrahiert und an Albumin gebunden wird. Mit zunehmender BSA-Konzentration erhöht sich die Menge an extrahiertem Farbstoff und die Spektren nähern sich dem Spektrum von freiem ICG in BSA-Lösung an. Es ist jedoch anzunehmen, dass bei physiologisch relevanten BSA-Konzentrationen (5 %) neben ICG/Albumin-Komplexen auch intakte ICG/Solutol Mizellen vorliegen. Ansonsten wäre das Emissionsspektrum der Mizellen in 5 % BSA-Lösung identisch mit dem der freien ICG-Lösung in BSA.

Die Proben wurden bei 37 °C über einen Zeitraum von 300 min inkubiert und weitere Spektren aufgenommen, um eine zeitabhängige Extraktion des Farbstoffes aus den Mizellen zu untersuchen. Zeitgleich wurde der mittlere hydrodynamische Durchmesser der Mizellen mit und ohne Zusatz von 5 % BSA ermittelt. Abbildung 30B zeigt die Veränderungen der Fluoreszenzintensitäten, die im Maximum der Emissionskurven von freiem ICG und ICG/Solutol Mizellen in 5 % BSA-Lösung bestimmt wurden und den mittleren hydrodynamischen Durchmesser der Mizellen in Abhängigkeit von der Zeit. Die Mizellen blieben über den gesamten Messzeitraum stabil und gaben keinen zusätzlichen Farbstoff an Albumin ab.

Die hohe Plasmaproteinbindung von ICG hat einen starken Einfluss auf das *in vivo* Verhalten des Farbstoffes (s. Kapitel 1.4.5). Durch nahezu vollständige Bindung an Proteine (98 %) verbleibt der Farbstoff intravasal und wird sehr schnell über die Leber mit einer Blut-halbwertszeit von 3 - 4 min eliminiert [48, 51]. Der Einfluss der BSA-Konzentration auf die physikalische Stabilität der Mizellen *in vitro* wurde untersucht, um einen Hinweis auf die Stabilität der Mizellen *in vivo* zu bekommen. Die Mizellen blieben über einen Zeitraum von 300 min nach Verdünnung mit 5 % BSA-Lösung stabil und nur ein geringer Anteil an ICG wurde aus den Mizellen extrahiert. Es ist anzunehmen, dass die Mizellen eine gewisse Zeit *in vivo* stabil bleiben und erst nach längerer Zirkulation im Blutkreislauf destabilisiert werden und den Farbstoff vollständig abgeben.

4.2.8 In vitro Toxizität und Phagozytose

Hämolytische Aktivität

Um die hämolytische Aktivität der mizellaren ICG Formulierung mit der derzeit auf dem Markt befindlichen ICG Formulierung (ICG-Pulsion®) zu vergleichen, wurde der Hämolyse Assay aus Kapitel 3.2.4 angewendet. Dazu wurde neben *in vivo* relevanten Konzentrationen der mizellaren Formulierung, ICG in Wasser für Injektionszwecke (analog ICG-Pulsion®) und in isotoner Glukose Lösung für 1 h mit Erythrozyten inkubiert.

ICG in Wasser gelöst verursachte Hämolyse bei allen untersuchten Konzentrationen im gleichen Ausmaß wie Wasser selber. Die starke hämolytische Aktivität von reinem Wasser demonstriert die hohe Sensitivität des verwendeten Assays. Die Verwendung von isotoner Glukose Lösung als Medium reduzierte die hämolytische Aktivität signifikant ($p < 0,05$) (s. Abbildung 31A).

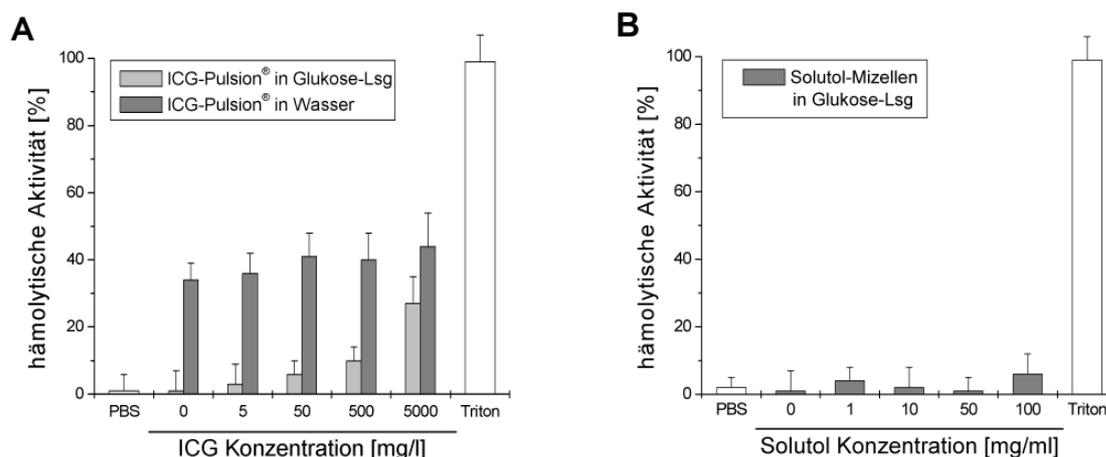


Abbildung 31: Hämolytische Aktivität von ICG-Pulsion® gelöst in mitgeliefertem Lösungsmittel (Wasser für Injektionszwecke) und in isotoner Glukose Lösung (A). Hämolytische Aktivität von Solutol Mizellen, die mit Glukose isotonisiert wurden (B). Die starke hämolytische Aktivität der wässrigen ICG Lösung resultiert aus der geringen Osmolarität der Lösung und wird durch Isotonisierung mit Glukose reduziert. Die hämolytische Aktivität von Solutol ist bei den untersuchten Konzentrationen gering.

Die Erklärung hierfür liegt in der geringen Osmolarität der glukosefreien Farbstofflösung ($5 \cdot 10^3$ mg/l ICG in Wasser für Injektionszwecke = 20 mOsm/kg). Mehrere Studien beschrie-

ben bereits die toxischen Effekte von ICG aufgrund der geringen Osmolarität [192-194]. Untersuchungen an ARPE-19 Zellen *in vitro* zeigten, dass eine Inkubation für 5 min mit leicht hypo-osmolaren ICG Lösungen (282 mOsm/kg) die Zellviabilität reduzierten. Dieser Effekt wurde der Osmolarität und nicht der Farbstoffkonzentration zugeschrieben [194]. Stalmans *et al.* bestätigten diese Vermutung, indem sie ICG-Pulsion[®] (Lösungsmittel: Wasser) mit Infracyanine[®] (Lösungsmittel: 5 % Glukose) verglichen [192]. Für den Anstieg der hämolytischen Aktivität mit steigender ICG Konzentration in Glukose Lösung kann der amphiphile Charakter von ICG verantwortlich sein (s. Abbildung 31A). *In vivo* wird die Toxizität von ICG höchstwahrscheinlich durch die Bindung an Plasmaproteine reduziert.

Die hämolytische Aktivität von reinen Solutol Mizellen wurde bereits als sehr gering eingestuft und wird hier der Vollständigkeit halber noch einmal aufgeführt (s. Kapitel 3.3.4). Im Vergleich zu den reinen Mizellen wurde die hämolytische Aktivität farbstoffhaltiger Solutol Mizellen untersucht (s. Abbildung 32A). Zugabe von 50 mg/l und 500 mg/l ICG zu verschiedenen Solutol Konzentrationen zeigten keine signifikante Veränderung des Hämolyseverhaltens der Mizellen. Im Vergleich zu der reinen ICG-Pulsion[®] Lösung wurde eine geringere hämolytische Aktivität für die mizellare Formulierung gefunden, zu freiem ICG in Glukose Lösung wurde kein signifikanter Unterschied detektiert (s. Abbildung 32B).

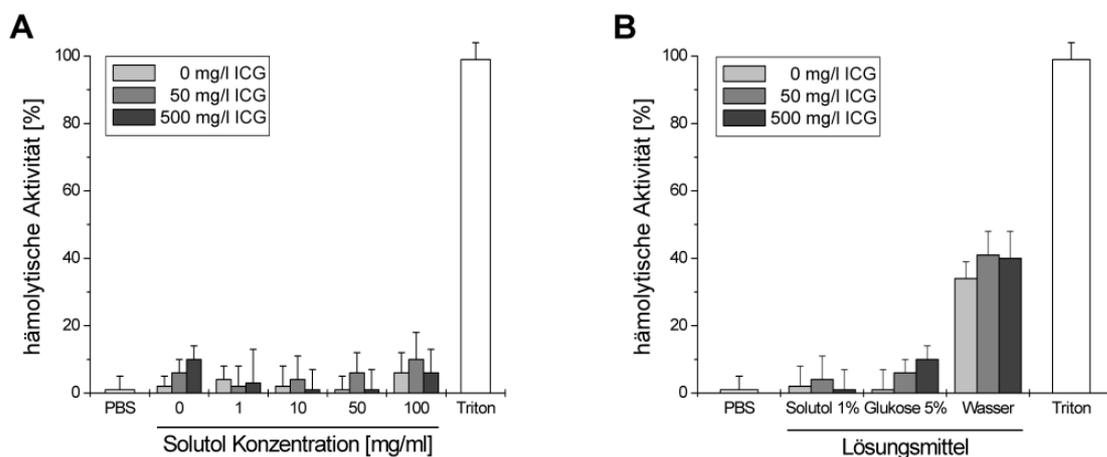


Abbildung 32: Vergleich der hämolytischen Aktivität von ICG/Solutol Mizellen bei verschiedenen Solutol und ICG Konzentrationen (A). Einfluss des Lösungsmittels auf die hämolytische Aktivität von verschiedenen ICG Formulierungen (B). Die Zugabe verschiedener ICG Konzentrationen zu den Solutol Mizellen zeigt keine signifikante Erhöhung der hämolytischen Aktivität.

Zytotoxizität

Die *in vitro* Zytotoxizität der mizellaren ICG Formulierung wurde an HUVEC Zellen durch Bestimmung der Zellviabilität mit Hilfe des MTT Assays untersucht. Die Zellen wurden 30 und 60 min mit *in vivo* relevanten Farbstoff und Tensidkonzentrationen analog dem Hämolyse Assay bei 37 °C inkubiert. Die Osmolarität der Proben wurde mit wasserfreier Glukose (Merck, Darmstadt, Deutschland) auf 300 ± 10 mOsm/kg eingestellt. Zur Bestimmung der Zellviabilität wurden die Zellen für 2 h mit dem MTT Reagenz inkubiert, welches nur in Anwesenheit von metabolisch aktiven Zellen in einen blauen quantifizierbaren Formazanfarbstoff umgewandelt wird.

In Abbildung 33 ist die Zellviabilität von HUVEC Zellen nach Inkubation für 30 und 60 min mit reiner Farbstofflösung und reinen Solutol Mizellen dargestellt. Die Inkubation für 30 min mit reiner Farbstofflösung zeigte mit steigender ICG Konzentration einen leichten Abfall der Zellviabilität (auf 80 % Viabilität). Bei einer 60-minütigen Inkubationszeit sank die Zellviabilität mit steigender Farbstoffkonzentration drastisch auf 20 % ab (s. Abbildung 33A).

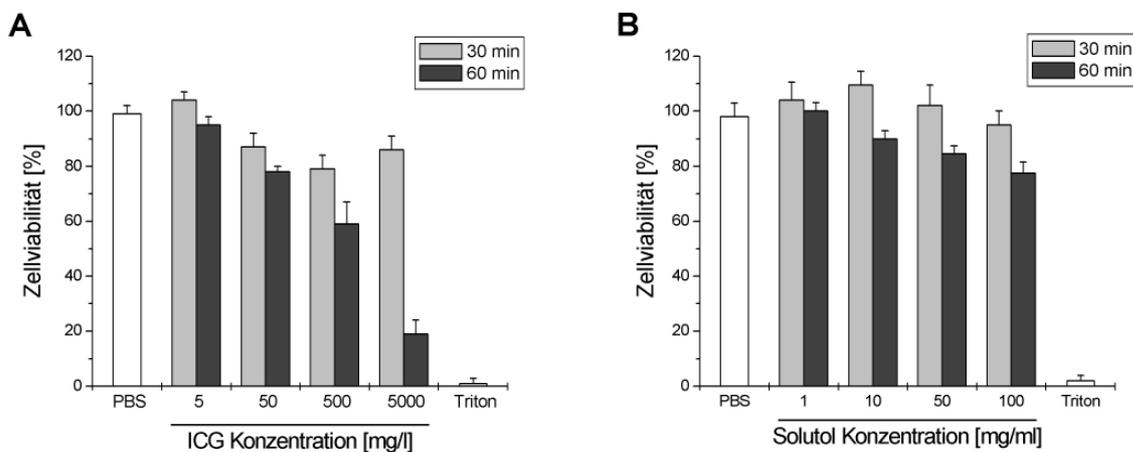


Abbildung 33: Vergleich der Viabilität von HUVEC Zellen nach Inkubation für 30 und 60 min mit isotonischer ICG Lösungen (A) und Solutol Lösungen (B) verschiedener Konzentrationen. Inkubation für 30 min mit ICG bewirkt eine geringe Abnahme der Zellviabilität. Nach 60-minütiger Einwirkzeit sinkt die Zellviabilität bei hohen ICG Konzentrationen auf 20 % ab. Solutol wirkt bei physiologisch relevanten Konzentrationen auch nach Inkubation für 60 min nur gering zytotoxisch.

Reine Solutol Mizellen verursachten weder bei einer 30- noch bei einer 60-minütigen Einwirkzeit eine extreme Abnahme der Zellviabilität. Lediglich bei 50 und 100 mg/ml Solutol wurde nach 60 min Inkubationszeit die Zellviabilität auf 80 % reduziert (s. Abbildung 33B). Im Vergleich zu der ICG Lösung wies die Solutol Lösung in den *in vivo* relevanten Konzentrationen geringere zytotoxische Effekte auf. Da in diesem Versuch die Osmolarität der Lösungen (alle 300 ± 10 mOsm/kg) keinen Einfluss hatte, muss der amphiphile Charakter der beiden Substanzen für die zytotoxischen Effekte verantwortlich sein. Es sollte allerdings beachtet werden, dass nach intravenöser Applikation die Formulierungen sofort durch den Blutfluss verdünnt werden, wodurch die zytotoxischen Effekte reduziert werden. Ein direkter Kontakt zu Endothelzellen wird in den hier untersuchten Konzentrationen und Inkubationszeiten nach i.v. Applikation *in vivo* nicht auftreten. Der Zellviabilitätsassay soll lediglich einen direkten Vergleich der Zytotoxizität von freiem ICG zu mizellarem ICG liefern.

Die Zugabe von ICG zu verschiedenen Solutol Konzentrationen reduzierte im Allgemeinen die Zellviabilität von HUVEC Zellen im Vergleich zu reinen Solutol Mizellen, wobei keine signifikanten Unterschiede zwischen 50 mg/l und 500 mg/l ICG auftraten (s. Abbildung 34). Besonders auffällig war die Verringerung der Zellviabilität auf etwa 50 % nach Inkubation für 60 min bei 0 mg/ml und 1 mg/ml Solutol. Hier erkennt man deutlich, dass ICG stärker zytotoxisch wirkt, wenn es frei in Lösung vorliegt, als verkapselt in Solutol Mizellen. Die Mizellen weisen somit einen protektiven Effekt auf, der die Zytotoxizität von ICG senkt.

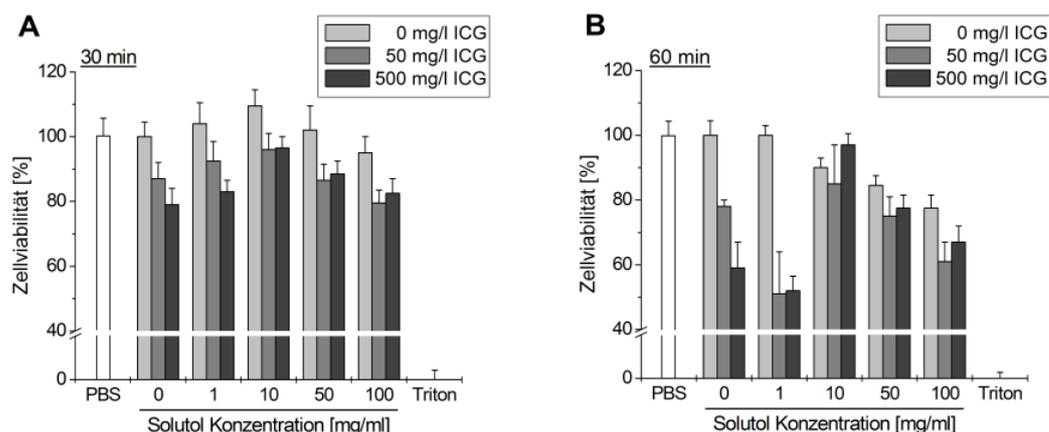


Abbildung 34: Zellviabilität von HUVEC Zellen nach Inkubation für 30 min (A) und 60 min (B) mit ICG/Solutol Mizellen. Inkubation der Zellen für 60 min mit ICG/Solutol Mizellen zeigt deutlich, dass Solutol bei ausreichend hoher Konzentration die Zytotoxizität von ICG senkt.

Eine relativ neue Anwendung von ICG im „*off-label use*“ ist die Anfärbung der inneren Grenzmembran der Netzhaut (ILM - „*internal limiting membrane*“) im Rahmen chirurgischer Eingriffe an der Makula [195]. Dabei wird der Farbstoff zur besseren Visualisierung der ILM direkt in den Glaskörper injiziert. Durch die Anfärbung der Netzhautoberfläche wird die Präparation vor allem für weniger erfahrene Chirurgen erheblich erleichtert und kontrollierbarer [195]. Neueste Studien jedoch ergaben, dass ICG noch mehrere Monate nach der Makulaoperation im Bereich der Netzhaut anzufinden ist und morphologische Veränderungen des retinalen Pigmentepithels und Reduktion der Zellvitalität und Zelldichte auftreten [196-198]. Aufgrund dieser direkten zytotoxischen Wirkung raten Experten von der Anwendung von ICG für diesen Eingriff ab [199]. Die intravenöse Anwendung von ICG kann am Menschen jedoch als vollkommen unbedenklich angesehen werden [195].

Die Ergebnisse des Hämolyse Assays lassen auf eine geringe Toxizität nach intravenöser Applikation von ICG-haltigen Solutol Mizellen schließen, bedenkt man, dass die Zytotoxizität durch die Mizellen gesenkt wird und dass freies ICG sogar als hypo-osmolare Lösung (ICG-Pulsion®) mit einer stärkeren hämolytischen Aktivität als die mizellare Formulierung für den Markt zugelassen ist.

Untersuchungen zur Zellaufnahme der Formulierungen durch P388 Makrophagen

Stark limitierend auf die Bluthalbwertszeit kolloidaler Systeme wirkt sich die Tatsache aus, dass Mizellen nach ihrer Applikation schnell von Zellen des mononukleär-phagozytären Systems (MPS) als körperfremd erkannt und eliminiert werden könnten. Eine ausreichend lange Zirkulationszeit setzt also ein geringes Zellaufnahmeverhalten durch Phagozyten voraus.

Die phagozytotische Aufnahme von freiem und mizellarem ICG durch P388 Makrophagen wurde fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Dazu wurden die P388 Makrophagen auf geeigneten Objektträgern kultiviert und nach Inkubation geeigneter Farbstoff und Tensid Konzentrationen unter dem Mikroskop ausgewertet. In Vorversuchen wurde die Fluoreszenzstärke von verschiedenen ICG Konzentrationen nach Inkubation mit P388 Makrophagen bestimmt und 10 mg/l ICG als optimale Farbstoffkonzentration festgelegt. Solutol wurde dann analog den vorherigen *in vitro* Untersuchungen in denselben ICG/Solutol Mengenverhältnissen (maximal 1:2000) zugegeben. Die Zellkerne der Makrophagen wurden zur besseren Fokussierbarkeit am Mikroskop mit DAPI angefärbt.

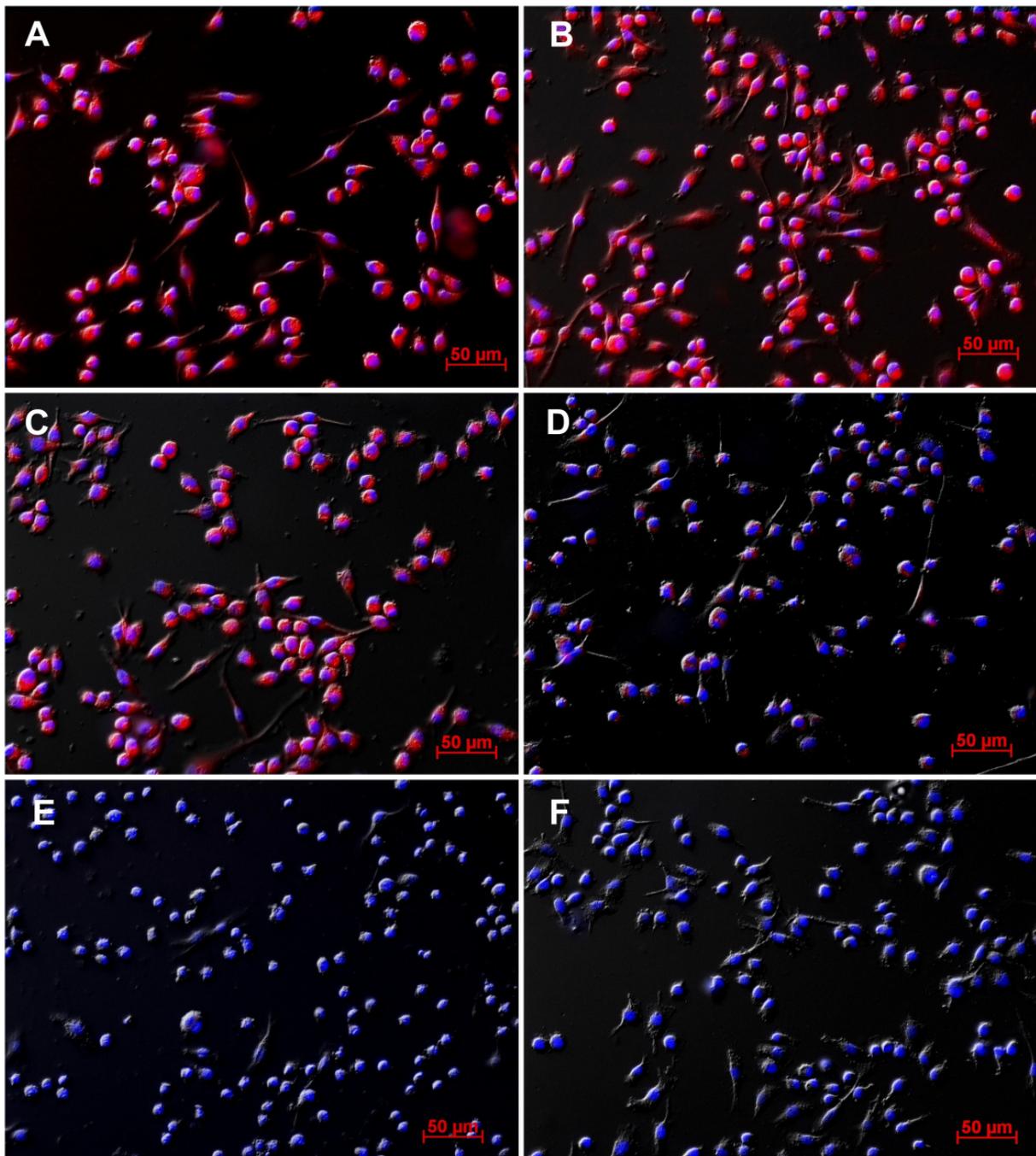


Abbildung 35: Phagozytoseaktivität von P388 Zellen nach Inkubation mit ICG und ICG/Solutol Mizellen in Abhängigkeit von der Solutol Konzentration ($c_{\text{ICG}} = 10 \text{ mg/l}$). (A) 0 mg/ml Solutol, (B) 0,1 mg/ml Solutol, (C) 1 mg/ml Solutol, (D) 2 mg/ml Solutol, (E) 20 mg/ml Solutol. (F) PBS-Puffer (Kontrolle). Es ist deutlich zu erkennen, dass mit zunehmender Solutol Konzentration die Aufnahme von ICG in die Phagozyten abnimmt. Die rote Fluoreszenz markiert ICG, die blaue Fluoreszenz den Zellkern durch die DAPI Färbung.

In Abbildung 35 sind die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der P388 Makrophagen nach Inkubation mit ICG und ICG/Solutol Mizellen dargestellt. Die blaue Fluoreszenz stellt die Zellkernfärbung mit DAPI dar, während die Rotfärbung die ICG Fluoreszenz widerspiegelt. Als Negativkontrolle wurden die Makrophagen unter denselben Versuchsbedingungen mit PBS-Puffer inkubiert (s. Abbildung 35F). Freies ICG zeigte eine sehr hohe Affinität zu der Zelloberfläche der P388 Makrophagen (s. Abbildung 35A). Die Zellmembran der Makrophagen besteht aus einer Phospholipiddoppelschicht, die von verschiedenen Membranproteinen und Kohlenhydratverbindungen durchzogen wird. Eine starke Affinität von ICG zu Membranen wurde bereits in Kapitel 2.4 demonstriert. Ein Vergleich der Abbildungen A bis E macht deutlich, dass mit steigender Solutol Konzentration die Aufnahme von ICG durch die Makrophagen reduziert wird (s. Abbildung 35A-E). Bei hoher Solutol Konzentration (20 mg/ml Solutol) kommt es zu einer Veränderung der Zellmorphologie. Die typischen länglichen Strukturen der P388 Makrophagen waren bei diesen Zellen abgerundet. Eine veränderte Morphologie ist ein Zeichen dafür, dass die normalen Zellprozesse gestört worden sind, wahrscheinlich durch die hohe Tensidkonzentration. Es ist abermals anzumerken, dass eine direkte Inkubation mit Makrophagen in den hier gewählten Konzentrationen und Inkubationszeiten *in vivo* nicht auftreten wird.

Um zu zeigen, ob es sich um eine aktive Aufnahme des Farbstoffes in die Zellen handelt, wurden in einem weiteren Versuch Makrophagen 1 h vor Inkubation auf Eis gelegt und mit reiner ICG Lösung bei 4 °C inkubiert. Der Vorgang der Phagozytose ist temperatur- bzw. energieabhängig. Durch Abkühlung der Makrophagen auf etwa 4 °C wird der Stoffwechsel der Zellen herabgesetzt und so die Phagozytoseaktivität gestoppt [200]. Abbildung 36 zeigt deutlich, dass freie ICG Lösung auch nach Inkubation bei 4 °C von den Makrophagen im gleichen Ausmaß wie nach Inkubation bei 37 °C aufgenommen wird. Daraus kann man schließen, dass der Aufnahmemechanismus von ICG nicht aktiv, sondern passiv verlaufen muss. Die Aufnahme von freiem ICG wurde bereits in mehreren Studien untersucht, der Aufnahmemechanismus wurde jedoch nicht vollständig geklärt. Saxena *et al.* beschrieben beispielsweise eine konzentrations- und zeitabhängige Aufnahme von freiem ICG in B16F10 und C33A Zellen mit anschließender Verteilung im Zytoplasma und Akkumulation durch Bindung an zelluläre Proteine und Strukturen [66, 201].

Die Ergebnisse des Phagozytose Assays zeigen deutlich, dass die Aufnahme von ICG in Makrophagen durch den Einschluss in Solutol Mizellen reduziert wird. Aufgrund der hydro-

philen Oberfläche und der kleinen Teilchengröße der Mizellen kann sowohl eine passive als auch aktive Aufnahme in Makrophagen reduziert werden [202]. Dies zeigte Zhao *et al.* durch Formulierung einer Mikroemulsion mit Solutol für den Wirkstoff Ibuprofen. Nach parenteraler Applikation wies diese Formulierung im Vergleich zu reiner Ibuprofen Lösung eine signifikant verlängerte Bluthalbwertszeit auf [203]. Durch den Zusatz von Solutol wurden die Mikroemulsionströpfchen vor der Erkennung und Aufnahme des MPS geschützt, was sich in einer verlängerten Bluthalbwertszeit widerspiegelte [203].

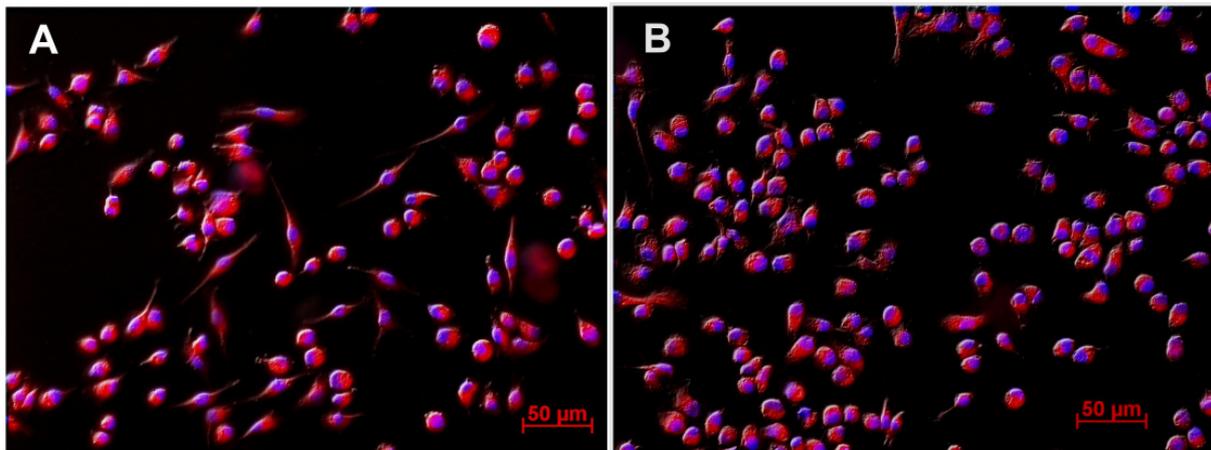


Abbildung 36: Vergleich der Phagozytoseaktivität von P388 Zellen nach Inkubation mit reiner ICG Lösung ($c_{\text{ICG}} = 10 \text{ mg/l}$) bei 37 °C (A) und bei 4 °C (B). Da die P388 Makrophagen bei 4 °C inaktiv sind aber trotzdem die gleiche Menge ICG wie bei 37 °C aufnehmen, kann von einer passiven Aufnahme ausgegangen werden.

4.3 Zusammenfassende Beurteilung der *in vitro* Charakterisierung

Die *in vitro* Charakterisierung der ICG/Solutol Formulierung hat gezeigt, dass die Verkapselung von ICG in Solutol Mizellen die optischen Eigenschaften und die *in vitro* Stabilität des Farbstoffes verbessert. Weiterhin wird die Zytotoxizität gesenkt und die Aufnahme von ICG in Makrophagen reduziert. Es ist anzunehmen, dass die mizellare Formulierung, parenteral appliziert, gut verträglich ist und der Farbstoff im Blutkreislauf länger zirkulieren wird als das freie ICG.

Die morphologische Charakterisierung der Solutol Mizellen ergab sphärisch geformte Mizellen mit einem mittleren Durchmesser von etwa 12 nm. Kryo-TEM Aufnahmen haben gezeigt, dass der Kern der Mizellen etwa 8 nm groß ist, und dass sich bei hohen Solutol Konzentrationen wohlgeordnete hexagonale Domänen ausbilden. Die Zugabe von ICG zu den Solutol Mizellen bewirkte keine Veränderung der Morphologie der Mizellen, lediglich die Anzahl der hexagonalen Domänen bei hohen Tensid Konzentrationen wurde reduziert.

Über einen Zeitraum von acht Wochen war die Formulierung in Lösung stabil und zeigte auch bei erhöhten Temperaturen keine signifikante Abnahme der Absorptionsfähigkeit. Die physikalische Stabilität der Mizellen in Lösung wurde stark von der eingesetzten Farbstoffkonzentration beeinflusst. Mit steigender ICG Konzentration stieg die CMC von Solutol an, was zu einer geringeren Stabilität der Mizellen bei Verdünnung der Lösung führt. Um den *in vivo* Zustand der Mizellen zu simulieren, wurden den Proben physiologisch relevante Albumin Konzentrationen zugesetzt. Geringe Mengen an Farbstoff wurden aus den Mizellen extrahiert und an Albumin gebunden. Inkubation der Lösung bei 37 °C über einen Zeitraum von 300 min bewirkte keine weitere Extraktion und keine Degeneration der Mizellen. Es ist demnach denkbar, dass die Mizellen *in vivo* für eine gewisse Zeit stabil bleiben und nur geringe Mengen von ICG sofort an Plasmaproteine binden. Erst nach längerer Zirkulation im Blutkreislauf werden die Mizellen destabilisiert und geben den restlichen Farbstoff frei.

Die hämolytische Aktivität von Solutol wurde im vorherigen Kapitel diskutiert und kann als gering angesehen werden. Die handelsübliche ICG Formulierung (ICG-Pulsion) zeigte im Gegensatz zur mizellaren ICG Formulierung eine starke hämolytische Aktivität, welche auf die geringe Osmolarität der Lösung zurückzuführen ist. Die Zytotoxizität von ICG, bestimmt in iso-osmolaren Lösungen, konnte durch den Einschluss in Solutol Mizellen signifikant gesenkt werden ($p < 0,05$). Durch die Verringerung der phagozytotischen Aufnahme von ICG

nach Verkapselung in Solutol Mizellen im Vergleich zu freiem Farbstoff, kann eine längere Zirkulation im Blutkreislauf gewährleistet werden.

5 *In vivo* Verhalten der mizellaren ICG Formulierung

In den folgenden *in vivo* Versuchen soll an gesunden Versuchstieren die Verträglichkeit und das pharmakokinetische Verhalten der neuen kolloidalen ICG Formulierung untersucht werden. In Form einer explorativen Studie sollen die Experimente, an einer kleinen Anzahl von Tieren ($n = 4$), erste Hinweise auf die Kontrastintensität in den Blutgefäßen, die Bluthalbwertszeit und das Extravasationsverhalten der mizellaren ICG Formulierung geben. Aufgrund der geringen Tieranzahl kann die Interpretation der Ergebnisse nur explorativ erfolgen, was bedeutet, dass nur hypothesengenerierende Aussagen getroffen werden können. Eine statistische Auswertung ist nur eingeschränkt möglich, weswegen die Ergebnisse jedes einzelnen Tieres aufgeführt und separat ausgewertet werden müssen.

Die Versuche wurden an gesunden Nacktmäusen mit Hilfe der Intravitalmikroskopie durchgeführt. Diese Methode ermöglicht die fluoreszenzmikroskopische Darstellung der Blutgefäße am lebenden Tier mit einer sehr hohen räumlichen ($< 10 \mu\text{m}$) und zeitlichen Auflösung (bis zu 15 Bildern pro Sekunde). Aus den Bildsequenzen können nach Versuche wichtige Parameter wie die Bluthalbwertszeit, das An- und Abflutverhalten, der Kontrastwert oder das Extravasationsverhalten des Kontrastmittels ermittelt werden. Ein für die Durchlichtmikroskopie sehr gut geeignetes Gewebe stellen die Ohren der Mäuse dar. Das Gewebe ist gut durchblutet, besitzt geringe Schichtdicken und das fehlende Fell reduziert die Lichtreflexe.

Die *in vivo* Versuche sollen die Vermutung bestätigen, dass die mizellare ICG Formulierung gut verträglich ist und dass die Zirkulationszeit im Blut im Vergleich zur handelsüblichen ICG Formulierung verlängert ist.

5.1 Materialien

Als Versuchstiere dienten Nacktmäuse der Züchtungslinie NMRI nu/nu. Die Tiere wurden von der Firma Taconic (Germantown, USA) bezogen. 2 % Xylazinhydrochlorid Lösung (Rompun[®]) und 5 % Ketaminhydrochlorid Lösung (Ketavet[®]) wurden von der Bayer AG (Leverkusen, Deutschland) verwendet. Rompun[®] wurde mit Ketavet[®] in einem Verhältnis von 1:2 gemischt und mit 0,9 %iger NaCl Lösung (Berlin-Chemie AG, Berlin, Deutschland) 1:10 verdünnt.

5.2 Methoden

5.2.1 Dosierung und Herstellung der Formulierungen

Die erforderlichen Dosen von ICG und Solutol wurden über das Blutvolumen der Tiere und die CMC von Solutol errechnet. Das durchschnittliche Blutvolumen einer Maus beträgt 74 ml/kg Körpergewicht (KG), was etwa 6,6 % des Gesamtkörpergewichtes entspricht [204]. Bei einem durchschnittlichen Körpergewicht der Mäuse von etwa 25 g sollte das Applikationsvolumen wegen der Dosiergenauigkeit etwa 8 ml/kg KG betragen. Um ein ausreichend hohes Fluoreszenzsignal im Blutkreislauf zu erhalten, wurde eine ICG Dosis von 0,4 mg/kg KG verwendet. Die Farbstoffkonzentration der Formulierung betrug folglich 50 mg/l ICG.

Um thermodynamisch stabile Mizellen im Blutkreislauf zu erhalten, sollte die Solutol Konzentration nach Verdünnung im Blutkreislauf noch oberhalb der kritischen Mizellbildungskonzentration (CMC) liegen. Bei einer Farbstoffkonzentration von 50 mg/l ICG wurde die CMC mit 875 ± 125 mg/l Solutol bestimmt (s. Kapitel 4.2.7). Die Solutol Dosis sollte folglich mindestens 74 mg/kg KG betragen, was einer Tensidkonzentration in der Formulierung von 10 mg/ml Solutol entspricht. *In vivo* Toxizitätsstudien in nicht-menschlichen Säugertierspezies zeigten, dass 200 – 750 mg Solutol/kg KG intravenös über acht Wochen wiederholt appliziert werden konnten, ohne Krankheitseffekte zu verursachen [205]. Die mittlere letale Dosis (LD₅₀) in Beagles wurde mit 3,1 g Solutol/kg KG bestimmt [205]. Am Menschen ist Solutol als Hilfsstoff in Präparaten wie Panitol[®] (Firma Cryopharma, Mexiko) oder Vitamin K₁ (Firma Sabex, Kanada) in einer Konzentration von 50 bzw. 7 % (w/v) Solutol zugelassen [123]. Auf Grundlage dieser Daten und der Kenntnis der minimal erforderlichen Solutol Konzentration

on von 74 mg/kg KG wurde die Tensid Dosis für die Tierversuche mit 800 mg/kg KG festgelegt. Die Solutol Konzentration der Formulierung betrug demzufolge 100 mg/ml.

Die Herstellung der Formulierungen erfolgte aseptisch unter Laminar Airflow Bedingungen wie in Kapitel 3.2.1 beschrieben. Für die herkömmliche ICG Formulierung wurden 50 mg/l Farbstoff (Fluka, Taufkirchen, Deutschland) in 55 mg/ml Glukose Lösung (Merck, Darmstadt, Deutschland) gelöst. Die mizellare ICG Formulierung enthielt neben 50 mg/l Farbstoff 100 mg/ml Solutol (BASF, Ludwigshafen, Deutschland) und 40 mg/ml Glukose. Die Osmolarität, der pH-Wert und die Farbstoffkonzentration wurden vor Verwendung für die Tierversuche kontrolliert.

5.2.2 Tiere und Tierhaltung

Die Versuche wurden an gesunden Nacktmäusen der Züchtungslinie NMRI nu/nu durchgeführt. Es wurden weibliche Tiere (n = 4 pro Gruppe) mit einem Körpergewicht zwischen 20 und 30 g verwendet, die während der einwöchigen Versuchsphase in einem artgerechten Käfig für immundefiziente Mäuse gehalten wurden (Eurostandard Typ III, 425 x 266 x 155 mm - Nutzfläche 820 cm², Tecniplast, Italien). Der Käfig war mit einer Filterhaube (Tecniplast, Italien) und einem Filtervlies aus 100 % Polyester ausgestattet, der eine 92 %ige Rückhalterate von 8 bis 10 µm kleinen Partikeln aus der Atmosphäre garantierte. Zusätzlich war der Käfig mit einem roten Häuschen aus Polycarbonat (Maushaus, 117 x 117 x 64 mm, Tecniplast, Italien) und mit Einstreu (Lignocel, Rettenmaier & Söhne GmbH und Co. KG, Deutschland) ausgestattet. Frisches Wasser und Futter stand den Tieren *ad libitum* zur Verfügung. Der Käfig wurde in einem speziellen Schrank mit durchsichtigen Türen (Scantainer, Klasse EU10, Scanbur BK A/S, Dänemark) untergebracht, der eine kontinuierliche Luftwechselrate garantierte und mit Zu- und Abluftfiltern ausgestattet war. Alle zwei Tage wurden die Mäuse in einen neuen Käfig mit frischem Einstreu, Futter und Wasser umgesetzt. Nach Versuche wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet.

Die Tierhaltung und die Versuchsdurchführungen entsprachen dem deutschen Tierschutzgesetz. Die Tierversuchsvorhaben wurden als genehmigungspflichtiger Tierversuch beim Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin unter dem Aktenzeichen G0105/04 registriert und genehmigt.

5.2.3 Narkose

Die Tiere wurden gewogen und die Narkosemenge entsprechend dem Gewicht berechnet. Durch intraperitoneale Injektion von 6 ml/kg KG des Rompun[®]/Ketavet[®] Gemisches (s. Kapitel 5.1) wurde die Narkose eingeleitet. Über die laterale Schwanzvene wurde ein intravenöser Zugang gelegt der mit Histoacryl fixiert wurde. Um die Initialnarkose über einen längeren Zeitraum aufrechterhalten zu können, wurden den Tieren im Anschluss 10 ml/kg KG Rompun[®]/Ketavet[®] über den intravenösen Zugang appliziert. Bei Bedarf wurde die Narkose während des Experimentes durch subkutane Nachinjektionen im Bereich des Oberschenkels aufrechterhalten.

5.2.4 Intravitalmikroskopie

Nach Erreichen einer ausreichenden Narkosetiefe wurde das Versuchstier für die intravitalmikroskopischen Aufnahmen in seitlicher Lage auf den Deckel einer Mikrotiterplatte gelegt und das Ohr mit dünnem Klebeband auf einem Kunststoffzylinder (Höhe 1,5 cm, Durchmesser 2,5 cm) fixiert. Die Mikrotiterplatte sowie der Kunststoffzylinder waren mit schwarzem Neopren beklebt, um die Entstehung von Lichtreflexen zu vermeiden. Das fixierte Versuchstier wurde auf den Objektisch eines AxioImager Z1 Fluoreszenzmikroskops der Firma Carl Zeiss (Jena, Deutschland), ausgestattet mit einer 100 W Halogenlampe (HAL 100, Carl Zeiss) und einem 2,5x EC-Plan-Neofluar Objektiv (Carl Zeiss), positioniert. Für die Fluoreszenzaufnahmen wurde ein NIR-Filterset (s. Tabelle 12, Kanal 3) verwendet. Die Bildaufnahmen erfolgten über eine digitale CCD-Kamera (AxioCam MRm, Carl Zeiss) mit Hilfe der Software AxioVision (Version 4.5).

Nach Einstellung sämtlicher Parameter der Apparatur und korrekter Positionierung des narkotisierten Tieres im Bildausschnitt der Kamera wurden zunächst eine Durchlicht- und Fluoreszenzaufnahme des Ohres vor ICG Applikation gemacht. Danach erfolgte die gewichtsadaptierte Kontrastmittelapplikation von 8 ml/kg KG als Bolusgabe über den intravenösen Zugang (s. Kapitel 5.2.1). Direkt im Anschluss wurde mit 200 µl isotoner Kochsalzlösung nachgespült. Gleichzeitig mit der Kontrastmittelapplikation wurde die Videoaufnahme mit einer Geschwindigkeit von 30 Bildern pro Minute für die ersten 5 min gestartet. Nach Ablauf dieser Zeit wurde für weitere 80 min jeweils ein Bild pro Minute aufgenommen. Die Belichtungszeit pro Bild betrug bei allen Experimenten 500 ms und die Kamera befand sich im „2x2 Binning Modus“.

Durch das „*Binning*“ wurde die Information in benachbarten Bildpunkten in horizontaler und vertikaler Nachbarschaft auf dem Sensor der Kamera in einem Bildpunkt zusammengefasst. Dadurch konnte die Anzahl der übertragenden Daten reduziert und eine Bildrate von 30 Bildern pro Minute realisiert werden. Nach Abschluss der Aufzeichnungen wurde das narkotisierte Tier zum Aufwachen in einem separaten Käfig in einen Wärmeschrank gestellt.

5.2.5 Auswertung

Die aufgenommenen Fluoreszenzbildsequenzen ermöglichten die Darstellung von Arterien, Venen und umliegendem Gewebe. Um die Fluoreszenzintensitäten bestimmen zu können wurden in die Bildsequenzen repräsentative Arterien-, Venen- und Geweberegionen mit Hilfe der Software Simple PCI 6.0 (Compix Inc. Imaging Systems, Fa. Hamamatsu, Japan) manuell markiert und abgespeichert. Die Fluoreszenzintensitäten der Regionen wurden über ein spezielles, von der Abteilung Contrast Media Research der Bayer Schering Pharma AG eigens geschriebenes, Computerprogramm NIR-XP quantifiziert. Die erhaltenen Werte stellen das 90. Perzentil der Signalintensität in der definierten Region dar. Um die Halbwertszeit der Kontrastmittel im Blutkreislauf zu bestimmen, wurden die Signalintensitäten innerhalb der Regionen über die Zeit aufgetragen und durch Anpassen einer bi-exponentiellen Funktion ausgewertet. Konnte aufgrund eines komplexeren Signalverlaufes keine bi-exponentielle Funktion angepasst werden, so wurde die Halbwertszeit graphisch ermittelt. Die Berechnung des Kontrastwertes (Blutgefäß zu Gewebe) erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{Kontrastwert} = \frac{I_{\text{Fluo}} (\text{Blutgefäß})}{I_{\text{Fluo}} (\text{Gewebe})} - 1 \quad (17)$$

mit: $I_{\text{Fluo}} (\text{Blutgefäß})$ 90. Perzentil der Fluoreszenzintensität in der Blutgefäßregion, $I_{\text{Fluo}} (\text{Gewebe})$ 90. Perzentil der Fluoreszenzintensität in der Geweberegion.

Die Bildauswertung erfolgte für alle acht Tiere unabhängig voneinander in gleicher Weise. Die Bestimmung der Bluthalbwertszeit erfolgte für jedes Tier einzeln. Der Kontrastwert wurde für jedes Tier in Abhängigkeit von der Zeit nach Gleichung 17 bestimmt und die Mittelwerte der Gruppen zum Vergleich dargestellt. Zur Abschätzung von signifikanten Unterschieden der Mittelwerte wurde der Student's t-Test für ungepaarte Stichproben angewendet. Bei einer statistischen Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ wurde der Unterschied der Mittelwerte als signifikant bewertet.

5.3 Ergebnisse und Diskussion

Den Tieren wurde über einen intravenösen Zugang in die Schwanzvene eine gewichtsadaptierte Dosis von 0,4 mg/kg KG ICG und 200 mg/kg KG Solutol appliziert. Die Osmolarität der Formulierungen wurde mit wasserfreier Glukose auf 300 ± 10 mOsm/kg eingestellt und der pH-Wert der Lösungen betrug $6,8 \pm 0,1$. Die Behandlung wurde von allen Mäusen gut vertragen und die Tiere zeigten über den gesamten Versuchszeitraum keine Verhaltensauffälligkeiten.

Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Tier 2 aus der ICG Gruppe und Tier 6 aus der ICG/Solutol Gruppe vor Applikation (nativ) und 30 s, 2, 3 und 5 min nach intravenöser Applikation sind in Abbildung 37 dargestellt. Vor der Injektion der Formulierungen waren die Blutgefäße im Ohr der Nacktmäuse unter dem Fluoreszenzmikroskop nicht sichtbar. 30 s nach Applikation waren bei allen Tieren die Gefäße durch die Farbstofffluoreszenz (nachträglich digital rot eingefärbt) deutlich zu erkennen.

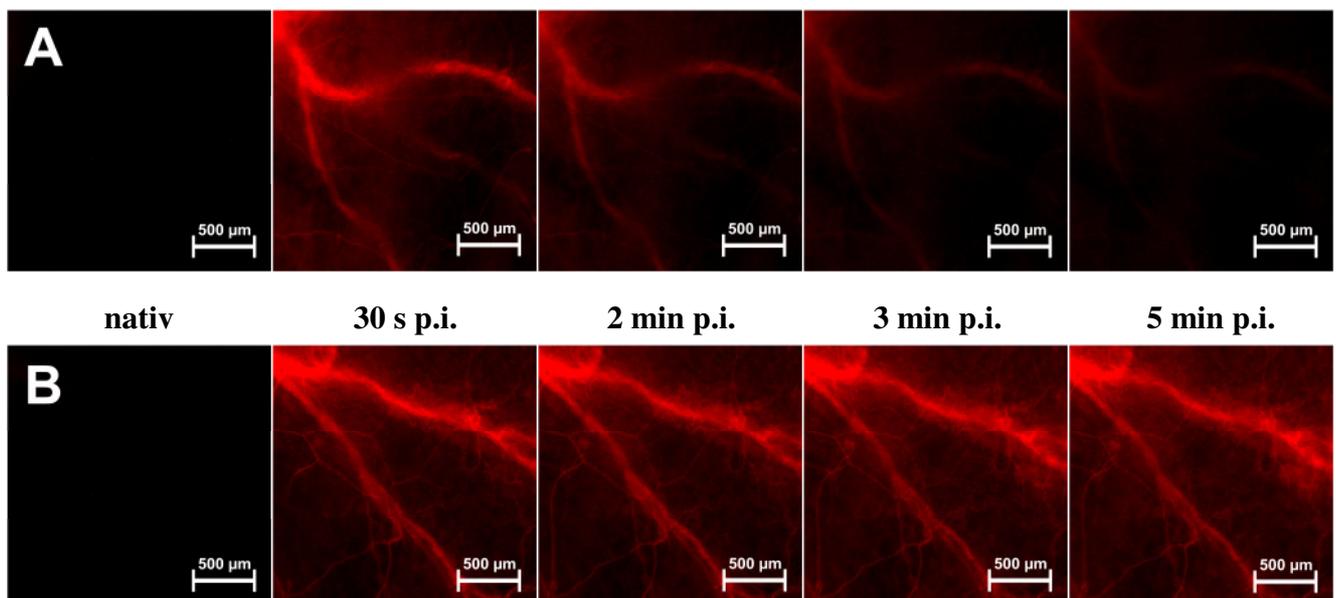


Abbildung 37: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen des Gefäßbettes im Ohr von Nacktmäusen vor und nach intravenöser Injektion von freiem ICG am Beispiel von Maus 2 (A) und der mizellaren ICG/Solutol Formulierung am Beispiel von Maus 6 (B). Nach 30 s sind bei beiden Tieren die Gefäße durch die Farbstofffluoreszenz (rot) klar zu erkennen. Nach Applikation von freiem ICG lässt die Signalintensität nach 2 min deutlich nach, während die Intensität nach Applikation der mizellaren ICG/Solutol Formulierung noch nach 5 min gleich bleibend hoch ist. Die Fluoreszenz wurde nachträglich zu besseren Visualisierung digital rot eingefärbt.

In der ICG Gruppe nahm die Signalintensität in den Gefäßen innerhalb der ersten 5 min sehr schnell ab (s. Abbildung 37A), während das Signal nach Applikation der ICG/Solutol Mizellen innerhalb der 5 min konstant blieb (s. Abbildung 37B). Für die Auswertung der Bilder wurden in die Sequenzen mit Hilfe der Software Simple PCI repräsentative Regionen in Arterien, Venen und in das umliegende Gewebe gelegt. Die Differenzierung zwischen Arterien und Venen erfolgte durch das zeitlich versetzte Anflutverhalten des Farbstoffes in den Gefäßen. Zuerst flutete der Farbstoff in den Arterien an, erst danach in den Venen. Abbildung 38 zeigt am Beispiel von Maus 6 das Anflutverhalten von ICG nach intravenöser Applikation von ICG/Solutol Mizellen und die Festlegung der Regionen in Venen, Arterien und Gewebe. Die Signalintensitäten wurden über das Computerprogramm NIR-XP (Bayer Schering Pharma AG, Berlin) quantifiziert und stellen das 90. Perzentil der Intensität in der definierten Region dar.

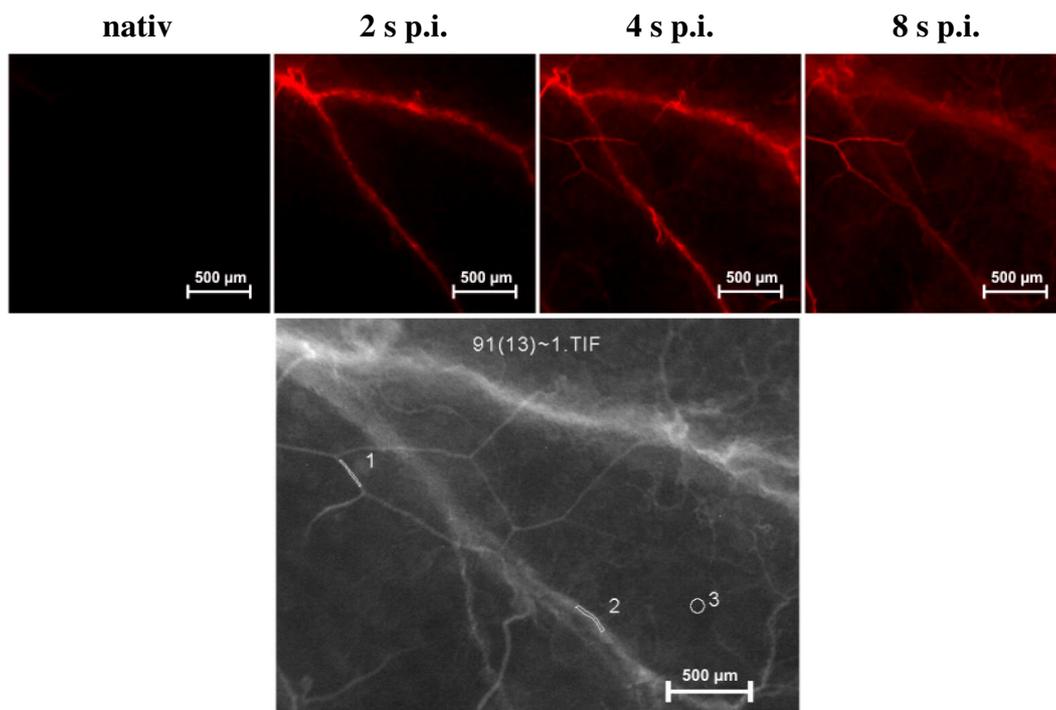


Abbildung 38: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen des Anflutverhaltens von ICG im Ohr am Beispiel von Maus 6 nach intravenöser Applikation von ICG/Solutol Mizellen (**obere Reihe**) und die Festlegung der Regionen in Venen (1), Arterien (2) und Gewebe (3) (**untere Abbildung**). Die Fluoreszenz der oberen Reihe wurde nachträglich digital rot eingefärbt. Das untere Bild zeigt die Originaldarstellung der Fluoreszenz. Die Differenzierung zwischen Arterien und Venen erfolgt durch das zeitlich versetzte Anflutverhalten des Farbstoffes in den Gefäßen. Zuerst flutet der Farbstoff in den Arterien an, erst danach in den Venen.

5.3.1 Pharmakokinetik

In Abbildung 39 sind die Signalintensitäten in Arterien, Venen und Gewebe in den ersten 30 min in Abhängigkeit von der Zeit für alle Tiere dargestellt. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden in dieser Abbildung nur die ersten 30 min dargestellt, da nach Ablauf dieser Zeit die Fluoreszenz nach Applikation von freiem ICG fast vollständig nachgelassen hatte. Besonders auffällig ist zunächst der einheitliche Signalintensitätsverlauf der einzelnen Tiere innerhalb der Gruppen. Durch diese Homogenität ist es möglich, auch bei der kleinen Anzahl von Tieren Aussagen über das *in vivo* Verhalten der Formulierungen zu treffen. Ein Vergleich der Gruppen macht deutlich, dass sich dieses Verhalten von ICG durch den Einschluss in Solutol Mizellen signifikant verändert. Die Fluoreszenzintensität nach Applikation von ICG/Solutol Mizellen ist sowohl in den Arterien und Venen als auch im umliegenden Gewebe im Vergleich zur ICG Gruppe erhöht. Zusätzlich bleibt in Solutol Mizellen verkapseltes ICG über einen längeren Zeitraum in den Blutgefäßen. Die Bluthalbwertszeit ($t_{1/2}$) beschreibt die Zeitspanne, in der die Maximalkonzentration an Farbstoff im Blut auf die Hälfte des Wertes abgesunken ist. Für die Pharmakokinetik von freiem ICG wird weit verbreitet ein Zwei-Kompartiment-Modell angenommen [50, 60, 206]. Das so genannte „*backflux*“-Modell beschreibt die Verteilung von ICG im Blut und in der Leber mit der These, dass der Farbstoff nicht nur aus der Leber in die Galle eliminiert wird, sondern zudem aus der Leber in das Blut zurück transportiert werden kann [206].

Die Bestimmung der Bluthalbwertszeit für freies ICG erfolgte durch Anpassen der Signalintensitätskurve mit einer bi-exponentiellen Funktion und Berechnung von $t_{1/2}$ über die Geschwindigkeitskonstante. Abbildung 40 zeigt am Beispiel von Maus 2 die Kurvenanpassung an die Signalintensität in Abhängigkeit von der Zeit und eine Übersicht über die ermittelten Bluthalbwertszeiten für alle vier Tiere. In guter Übereinstimmung mit den Literaturdaten, die eine Halbwertszeit von 3 - 4 min benennen, zeigte freies ICG im Mittel eine Initialbluthalbwertszeit von $4,19 \pm 0,62$ min [50, 51, 60, 206, 207].

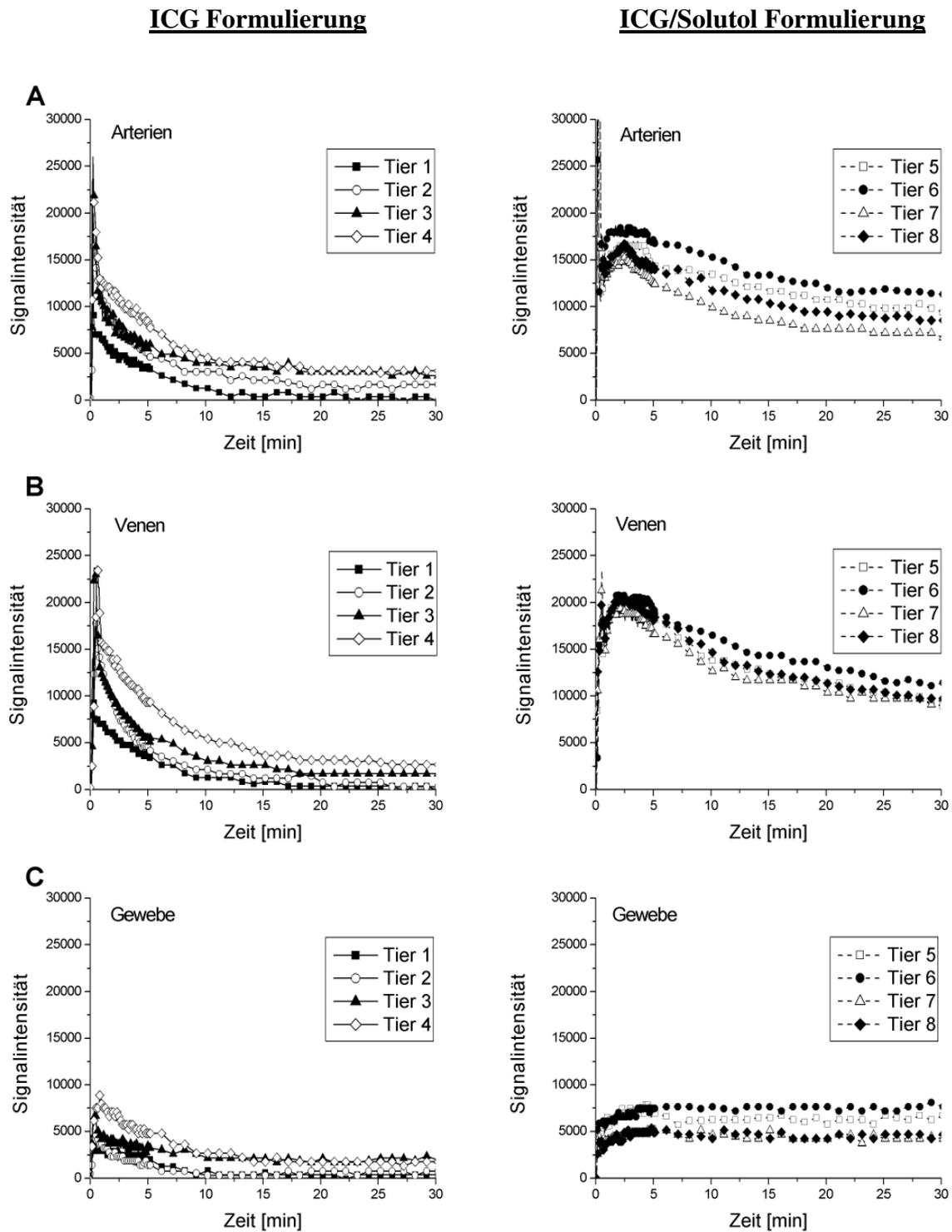


Abbildung 39: Signalintensitäten gemessen in Ohren gesunder Nacktmäuse in Abhängigkeit von der Zeit nach intravenöser Applikation der handelsüblichen ICG Formulierung (**linke Spalte**) und der mizellaren ICG/Solutol Formulierung (**rechte Spalte**). Bei jeweils vier Tieren pro Gruppe wurde das Fluoreszenzsignal in den ersten 30 min nach i.v. Gabe in Arterien (**A**), Venen (**B**) und im umliegenden Gewebe (**C**) ausgewertet.

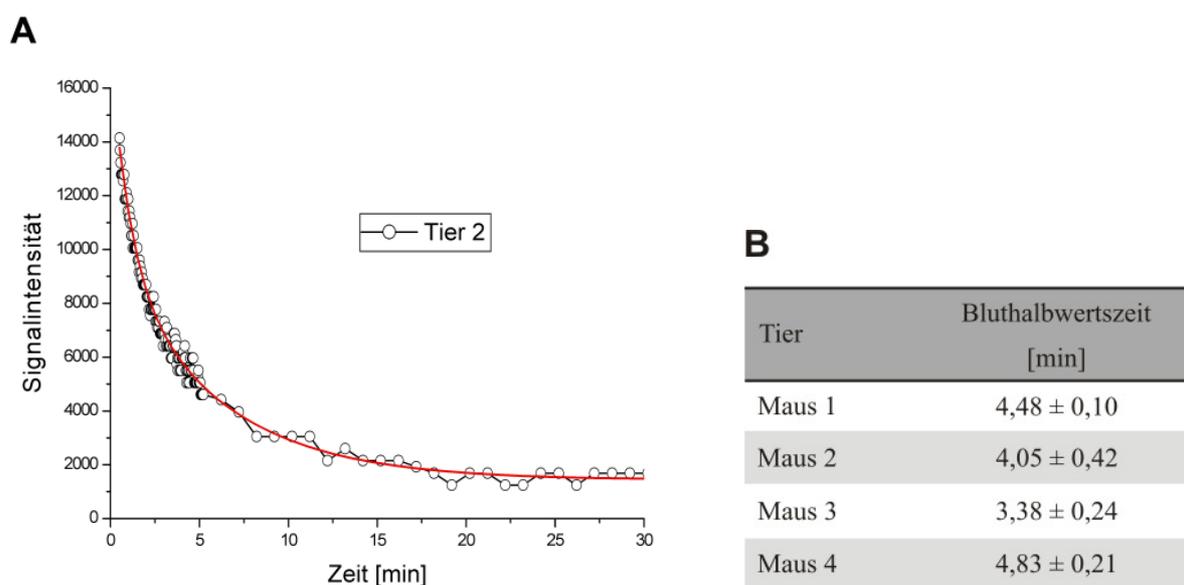


Abbildung 40: Bestimmung der Bluthalbwertszeiten von freiem ICG nach intravenöser Applikation in Nacktmäuse und Detektion der Signalintensitäten im Gefäßbett der Ohren mittels Intravitalmikroskopie. Signalintensitätsverlauf am Beispiel von Maus 2 und Anpassung der Werte an eine bi-exponentielle Funktion (A). Übersicht über die ermittelten Initialbluthalbwertszeiten von freiem ICG nach i.v. Applikation in allen vier Tieren (B). Im Mittel zeigt freies ICG eine Initialbluthalbwertszeit von $4,19 \pm 0,62$ min, was mit den Angaben in der Literatur gut übereinstimmt.

Die Pharmakokinetik von ICG/Solutol Mizellen stellt sich im Vergleich zu freiem ICG sehr viel komplexer dar. Während nach Applikation von freiem ICG das Signal nach dem Anfluten exponentiell abnahm, kam es nach Applikation von ICG/Solutol nach dem ersten Anfluten zu einer kurzen Abnahme und anschließend zu einem langsamen Anstieg des Signals. Erst nach etwa 5 min fiel das Signal wieder ab. Abbildung 41 zeigt deutlich die Unterschiede im Signalintensitätsverlauf in den ersten 5 min zwischen Applikation von freiem ICG und ICG/Solutol Mizellen. Das langsame Anfluten der Fluoreszenzintensität nach Applikation von ICG/Solutol Mizellen lässt zunächst auf einen Quenching-Effekt, aufgrund hoher Farbstoffkonzentrationen in den ersten Minuten, schließen. Eigene Vorversuche und Literaturangaben zeigen jedoch, dass der Quenching-Effekt in Blutplasma erst ab einer ICG Konzentration von etwa 0,08 mg/ml Farbstoff einsetzt [60, 208]. Die in diesen Versuchen applizierte Farbstoffmenge pro Tier beträgt etwa 0,01 mg ICG. Die Verteilung des Farbstoffes im Blutgefäßsystem erfolgt sofort in den ersten Sekunden nach der Injektion, wonach die ICG Konzentration etwa 0,005 mg/ml beträgt. Ein Quenching-Effekt kann demzufolge ausgeschlossen werden.

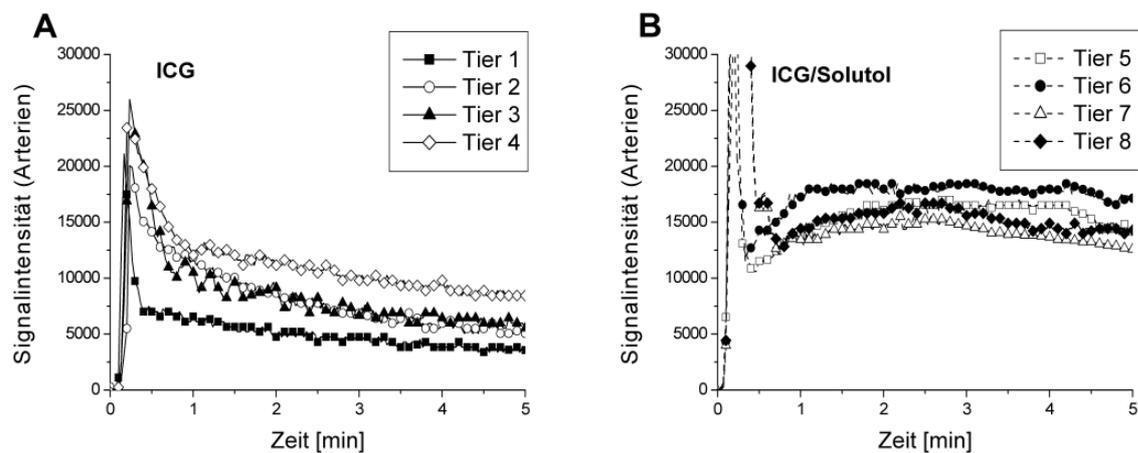


Abbildung 41: Signalintensitäten gemessen in Ohren gesunder Nacktmäuse in den ersten 5 min nach intravenöser Applikation der handelsüblichen ICG Formulierung (A) und der mizellaren ICG/Solutol Formulierung (B). Während nach Applikation von freiem ICG das Signal nach dem Anfluten exponentiell abnimmt, kommt es nach Applikation von ICG/Solutol nach dem ersten Anfluten und der Verteilungsphase zunächst zu einem langsamen Anstieg des Signals.

Die Verkapselung von ICG in Solutol Mizellen bewirkt folglich eine signifikante Veränderung der Pharmakokinetik des Farbstoffes. Eine mögliche Erklärung für die längere Zirkulationszeit des Farbstoffes im Blut ist, dass die Mizellen eine Bindung von ICG an Plasmaproteine verhindern. Dies kann jedoch nicht den Anstieg des Signals direkt nach der Verteilung des Farbstoffes im Blut erklären. Es ist folglich anzunehmen, dass Solutol nicht nur die Bindung an Plasmaproteine sondern auch die Elimination von ICG beeinflusst. Der Transport von ICG aus dem Blut über die Leber in die Galle ist derzeit nicht vollständig aufgeklärt, beinhaltet aber wenigstens drei Schritte: die Aufnahme von ICG über die basolaterale (sinusoidale) Membran in den Hepatozyt, den Transport durch die Zelle und die Exkretion über die apikale (kanalikuläre) Membran in die Gallenkanälchen [206]. Es ist anzunehmen, dass mehrere sinusoidale Transportproteine wie zum Beispiel Kandidaten aus der OATP-Familie („*organic anion transport proteins*“) für die Na^+ -unabhängige Aufnahme von ICG in den Hepatozyt verantwortlich sind. Der transzelluläre Transport erfolgt voraussichtlich durch Mikrofilamente oder Vesikel, die Ausschüttung von ICG in die Gallenkanälchen wird durch Membranproteine der ABC-Transporter („*ATP-binding-cassette*“) oder durch Exozytose vermittelt [206, 209]. Genauere Untersuchungen haben gezeigt, dass speziell das MDR2-assoziierte („*multidrug resistance gene*“) P-Glykoprotein für den Efflux von ICG aus den Hepatozyten in die Gallenkanälchen verantwortlich ist [210].

Coon *et al.* zeigten an den MDR-Zelllinien KB 8-5, KB 8-5-11 und KB 3-1, dass Solutol effektiv den Efflux von MDR-Substraten inhibiert und somit die Wirkung des Transportproteins umkehrt [205]. Als zugrunde liegender Mechanismus ist eine kompetitive Verdrängung durch Solutol aus der Substratbindungsstelle anzunehmen [205]. Weitere Untersuchungen zu Wechselwirkungen von Tensiden mit dem P-Glykoprotein zeigten, dass Solutol in der Lage ist, die Aktivität des Transportproteins so zu beeinflussen, dass das Substrat nicht mehr im normalen Ausmaß aus der Zelle transportiert werden kann [211]. Eine Anreicherung des Substrates im Intrazellularraum der Hepatozyten ist die Folge. Zusätzlich bewirkte Solutol an einem weiteren ABC-Transporter, dem MRP2 („*multidrug resistance related protein*“), eine vollständige Inhibierung des Substratflusses [211]. Es ist somit anzunehmen, dass Solutol eine Anreicherung von ICG in Hepatozyten bewirkt. Dem „*backflux*“-Modell zufolge, kommt es in den ersten Minuten nach intravenöser Applikation von ICG/Solutol Mizellen zu einem verstärkten Rückstrom von ICG aus den Hepatozyten in den Blutkreislauf.

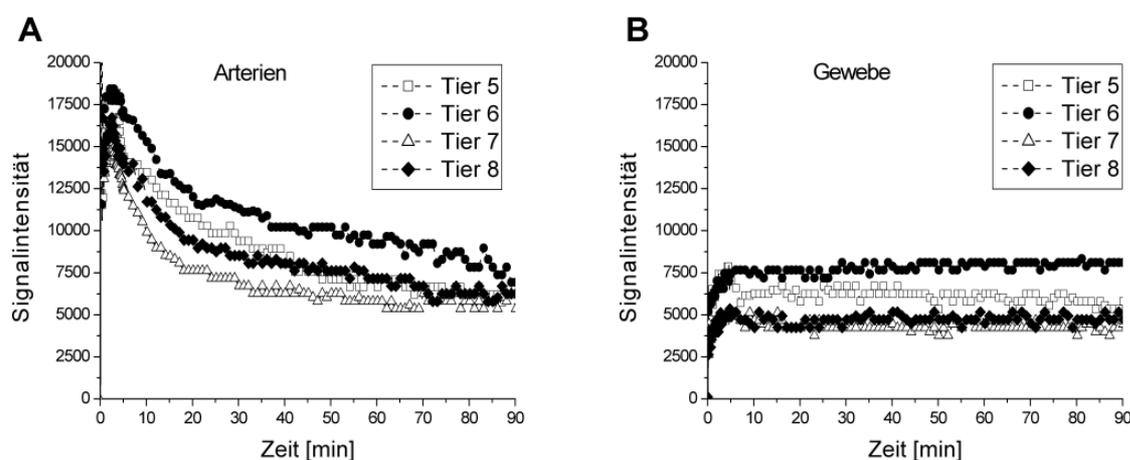


Abbildung 42: Signalintensitäten gemessen in Ohren gesunder Nacktmäuse in Abhängigkeit von der Zeit nach intravenöser Applikation der mizellaren ICG/Solutol Formulierung. Bei jeweils vier Tieren pro Gruppe wurde das Fluoreszenzsignal über den gesamten Messzeitraum von 90 min nach i.v. Gabe in Arterien (A) und im umliegenden Gewebe (B) dargestellt.

Erst nach Verdrängung von Solutol aus der Substratbindungsstelle der Transporterproteine kann der normale Eliminationsprozess von ICG erfolgen. Abbildung 42 zeigt die Signalintensitäten in Abhängigkeit von der Zeit in Arterien und im umliegenden Gewebe nach intravenöser Applikation der ICG/Solutol Formulierung für den gesamten Messzeitraum von 90 min. Erst nach

5 min ist ein Abfall der Signalintensität in den Arterien zu beobachten. Im Gewebe kommt es in den ersten 5 min zu einem Anstieg des Signals, welches dann über den gesamten Messzeitraum konstant bleibt. Nach Ablauf der Messzeit von 90 min ist das Signal in den Arterien immer noch erhöht, zeigt aber zum umliegenden Gewebe keinen Kontrast mehr.

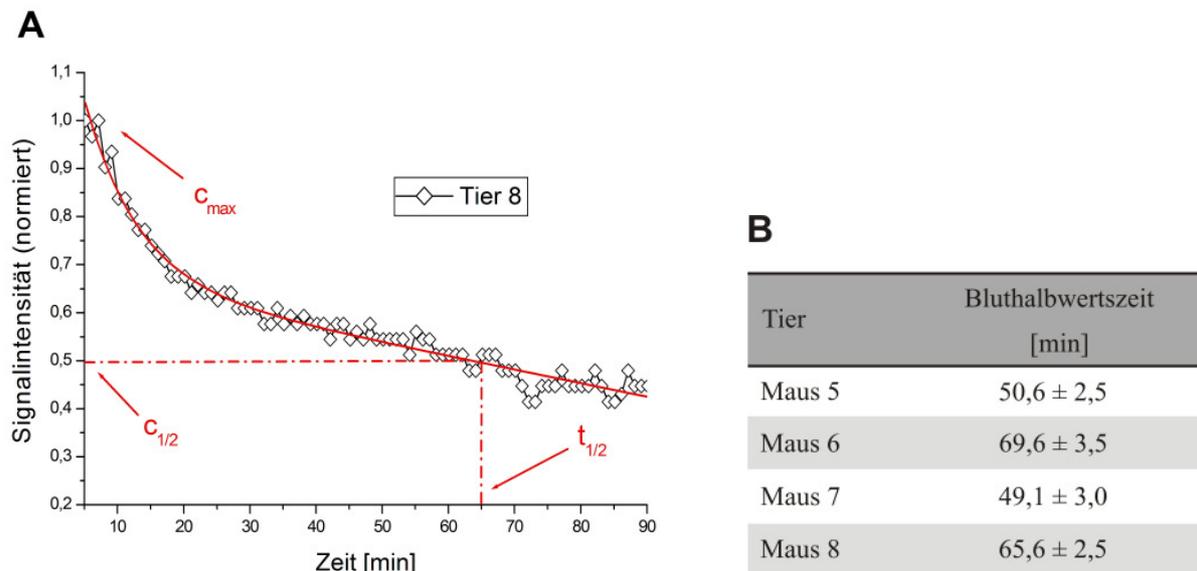


Abbildung 43: Bestimmung der Bluthalbwertszeiten von ICG/Solutol Mizellen nach intravenöser Applikation in Nacktmäuse und Detektion der Signalintensitäten im Gefäßbett der Ohren mittels Intravitalmikroskopie. Signalintensitätsverlauf am Beispiel von Maus 8 und graphische Bestimmung der Halbwertszeit ($t_{1/2}$). Die Signalintensität wurde auf den Maximalwert normiert und die Halbwertszeit ($t_{1/2}$), nach Reduktion dieses Wertes auf die Hälfte, abgelesen. (A). Übersicht über die ermittelten Bluthalbwertszeiten von ICG/Solutol Mizellen nach i.v. Applikation in allen vier Tieren (B). Im Mittel zeigen ICG/Solutol Mizellen eine Bluthalbwertszeit von $58,7 \pm 10,4$ min.

Die Bestimmung der Bluthalbwertszeit von ICG/Solutol Mizellen erfolgte aufgrund des komplexen pharmakokinetischen Verhaltens graphisch für den Bereich des abfallenden Signals (5 - 90 min). Die Signalintensität wurde auf den Maximalwert normiert und die Halbwertszeit ($t_{1/2}$), nach Reduktion dieses Wertes auf die Hälfte, abgelesen. Abbildung 43 zeigt am Beispiel von Maus 8 die graphische Bestimmung der Halbwertszeit und eine Übersicht über die ermittelten Bluthalbwertszeiten für alle vier Tiere. Im Mittel zeigten ICG/Solutol Mizellen eine Bluthalbwertszeit von $58,7 \pm 10,4$ min, was einer Verlängerung der Bluthalbwertszeit von ICG um das Vierzehnfache entspricht. Solutol beeinflusst die Pharmakokinetik von ICG durch Modifikation der Elimination und Reduktion der Plasmaproteinbindung von ICG.

5.3.2 Kontrastwert und Extravasationsverhalten

Der Kontrastwert bezieht sich auf das Signalintensitätsverhältnis von Gefäßen zum umliegenden Gewebe. Je größer die Differenz dieser Signale, desto stärker ist der resultierende Kontrast. Ein ausreichend hoher Kontrast ist somit erforderlich, um das Gefäßbett vom umliegenden Gewebe differenzieren zu können. Der Kontrastwert kann Werte ≥ 0 annehmen, wobei der Wert 0 keinen Kontrast zum umliegenden Gewebe darstellt. Der Kontrastwert wurde für jedes Tier einzeln in Abhängigkeit von der Zeit nach Gleichung 17 (s. Kapitel 5.2.5) bestimmt und der Mittelwert von den jeweils vier Tieren der ICG und der ICG/Solutol Gruppe zum Vergleich graphisch dargestellt. Abbildung 44 zeigt, dass der Kontrast in den Gefäßen nach Applikation von freiem ICG und ICG/Solutol Mizellen gleichermaßen nach etwa 30 s ein Maximum erreicht und dann in Abhängigkeit von der Zeit abnimmt.

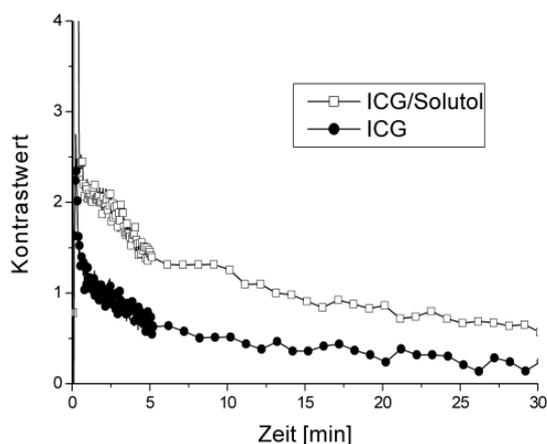


Abbildung 44: Kontrast der Gefäße zum umliegenden Gewebe in Abhängigkeit von der Zeit für die ersten 30 min nach intravenöser Applikation von freiem ICG und ICG/Solutol Mizellen. Die ICG/Solutol Formulierung zeigt im Vergleich zu freiem ICG einen signifikant höheren Kontrast in den Gefäßen ($p < 0,05$) über den gesamten Messzeitraum.

Im Gegensatz zum Signalintensitätsverlauf in den Arterien und Venen nach Applikation von ICG/Solutol Mizellen zeigt der Kontrastverlauf in den ersten 5 min keinen Anstieg. Der Grund dafür ist eine verstärkte Extravasation von ICG in das umliegende Gewebe in diesem Zeitfenster. Dies bestätigt die Vermutung, dass Solutol die Plasmaproteinbindung von ICG reduziert. Da ICG aufgrund der hohen Plasmaproteinbindung intravasal bleibt, ist eine verstärkte Extravasation ein Indiz für eine geringere Plasmaproteinbindung [212, 213]. Zusätzlich ist die Farbstoffkonzentration im Gefäßsystem nach ICG/Solutol Applikation aufgrund der reduzierten Elimination deutlich höher als nach der ICG Gabe, wodurch zudem mehr Farbstoff in das Ge-

webe diffundieren kann. Der Effekt lässt nach etwa 3 min nach und es stellt sich ein Gleichgewicht zwischen Gefäßraum und dem umliegenden Gewebe ein. Auch nach 90 min bleibt die Signalintensität im Gewebe konstant (s. Abbildung 39). Ein Vergleich der Kontrastwerte zwischen den beiden Gruppen zeigt deutlich, dass der Kontrast nach Applikation der ICG/Solutol Formulierung in den ersten 30 min signifikant höher ist als in der ICG Gruppe ($p < 0,05$). Direkt nach Applikation und Verteilung im Blut zeigte freies ICG einen Maximalkontrastwert von 1,5 und ICG/Solutol Mizellen einen Wert von 2,5. In den ersten 5 min nahmen die Werte auf 0,6 und 1,5 ab. Im Durchschnitt war der Kontrast in den Gefäßen nach Applikation von ICG/Solutol Mizellen in den ersten 30 min doppelt so hoch wie nach ICG Applikation. Aufgrund der Beeinflussung der Elimination von ICG durch Solutol ist die Farbstoffkonzentration in den Blutgefäßen im Vergleich zur Applikation von freiem ICG deutlich höher, womit der stärkere Kontrast von den Blutgefäßen zum umliegenden Gewebe erklärt werden kann.

5.4 Zusammenfassende Bewertung der Ergebnisse

Die *in vivo* Versuche bestätigen, dass Solutol einen Einfluss auf die Pharmakokinetik von ICG hat. Die Bluthalbwertszeit von ICG konnte um ein Vielfaches erhöht und der Kontrastwert verdoppelt werden.

Aufgrund der sehr einheitlichen Signalintensitätsverläufe der einzelnen Tiere innerhalb der Gruppen und der damit verbundenen geringen interindividuellen Streuung, konnten auch bei der kleinen Anzahl der Tiere Aussagen über das *in vivo* Verhalten der Formulierungen getroffen werden. Weitere *in vivo* Versuche sind jedoch notwendig, um diese Aussagen zu bestätigen und um nähere Informationen über den Mechanismus der Eliminationsbeeinflussung von ICG durch Solutol zu bekommen. Zusätzlich könnte untersucht werden, ob die mizellare ICG Formulierung für ein passives Targeting geeignet ist. Tierversuche dieser Art waren jedoch nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

Durch die vorliegenden Versuche kann abgeleitet werden, dass Solutol sowohl die Plasmaproteinbindung von ICG, als auch die Elimination von ICG in den ersten Minuten nach intravenöser Applikation beeinflusst. Eine verstärkte Extravasation des Farbstoffes und ein erneuter Anstieg der Fluoreszenzintensität nach Verteilung des Farbstoffes im Blut geben den Grund zu dieser Annahme. Dass Solutol den Efflux von MDR-Substraten aus den Hepatozyten inhibieren und somit die Transporterwirkung umkehren kann, bekräftigt diese Vermutung.

6 Zusammenfassung und Ausblick

6.1 Deutsche Version

Indocyaningrün (ICG) ist ein optisches Kontrastmittel, welches weit verbreitet in der Nahinfrarot-Diagnostik eingesetzt wird. Die praktische Anwendung des Farbstoffes wird limitiert durch seine zahlreichen nachteiligen Eigenschaften in wässriger Lösung. Durch seinen amphiphilen Charakter neigen die ICG Moleküle zu konzentrations- und zeitabhängiger Aggregation, was zu einer Beeinträchtigung der optischen Eigenschaften durch Selbstquenching und Verschiebung der Absorptions- und Emissionsspektren führt. Zusätzlich wird die *in vitro* Stabilität von ICG in wässriger Lösung bedeutend durch einen hydrolytischen Abbau beeinträchtigt, was eine Verringerung der Absorptions- und Emissionseigenschaften zur Folge hat. In Plasma bindet ICG fast vollständig (98 %) an nicht-spezifische Plasmaproteine und wird über die Leber sehr schnell, mit einer Bluthalbwertszeit von 3 - 4 min, eliminiert.

Das Ziel dieser Arbeit war die Beseitigung dieser Nachteile durch Entwicklung neuer Formulierungen für ICG auf Basis kolloidaler Trägersysteme. Diese für eine parenterale Anwendung sehr gut geeigneten Träger können sowohl die physikochemischen Eigenschaften als auch die Pharmakokinetik von Wirkstoffen oder Kontrastmitteln beeinflussen und für eine Verbesserung der *in vitro* Stabilität sorgen. Durch die geringe Größe der kolloidalen Träger kann eine Elimination aus dem Blutkreislauf durch das mononukleär-phagozytäre System (MPS) deutlich verringert und die Zirkulationszeit des Kontrastmittels verlängert werden. Zusätzlich kann durch den sogenannten EPR-Effekt eine passive Anreicherung des Kontrastmittels in pathologisch verändertem Gewebe erfolgen. Mit Hilfe dieser kolloidalen Trägersysteme sollte die neue ICG Formulierung im Vergleich zu der kommerziell erwerblichen Formulierung eine erhöhte *in vitro* Stabilität, verbesserte optische Eigenschaften und eine verlängerte Bluthalbwertszeit aufweisen.

Die Auswahl eines geeigneten Formulierungsprinzips für ICG erfolgte durch Mischen einer ICG Stammlösung mit bereits zugelassenen kolloidalen Formulierungen. Folgende Trägersysteme wurden in diesem Screening untersucht: Liposomen (COATSOME[®] EL-11-C), Mischmizellen (Konakion[®] MM), eine Fettemulsion (Lipofundin[®] N) und eine Mikroemulsion (Sandimmun[®] Optoral). Es konnte gezeigt werden, dass der Farbstoff eine hohe

Affinität zu Grenzflächen besitzt und dass die Quantenausbeute und die *in vitro* Stabilität von ICG mit steigender Tensidkonzentration und steigender spezifischer Oberfläche in der Formulierung zunimmt. Die mittleren hydrodynamischen Durchmesser der Systeme lagen unter 300 nm und waren somit für eine parenterale Anwendung geeignet. Da die Verbesserung der ICG Eigenschaften mit einer steigenden Tensidmenge korreliert, wurde das Formulierungsprinzip selektiert, welches die höchstmögliche, für eine parenterale Applikation noch tolerierbare Tensidkonzentration aufweist. Ausgewählt wurden die Mischmizellen, mit denen es gelang, ICG über eine Woche stabil in Lösung zu halten und die Quantenausbeute um das Zweifache zu erhöhen.

Durch Variation der Mizellkomponenten konnte die mizellare ICG Formulierung weiter optimiert werden. Neben Tensiden die für eine parenterale Anwendung am Menschen bereits zugelassen sind, wurden Fettsäure-Zuckerester auf ihre Eignung als parenteralen Hilfsstoff untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Quantenausbeute und die *in vitro* Stabilität von ICG in Abhängigkeit zum HLB-Wert der Tenside stehen. Durch Verwendung von Tensiden mit HLB-Werten um 15 gelang es, die Quantenausbeute und die Stabilität von ICG weiter zu erhöhen. Da das Aggregationsverhalten von ICG Molekülen für die geringe Quantenausbeute des Farbstoffes in wässrigen Medien verantwortlich ist, wurde das Dimerisierungsverhalten von ICG in An- und Abwesenheit von Tensidmizellen untersucht. Zusätzlich wurden die nativen Strukturen der in Lösung vorliegenden ICG Aggregate aufgeklärt. Diese konnten zum ersten Mal mit Hilfe der Kryotransmissionselektronenmikroskopie (Kryo-TEM) sichtbar gemacht werden. In Abhängigkeit von der Zeit bildet ICG zunächst sphärische Aggregate mit einem durchschnittlichen Durchmesser von 5 nm aus, die sich dann in große planare Schichtaggregate umwandeln. Vermutet wird eine Bilayerstruktur, die eine Schichtdicke von etwa 3,6 nm aufweist. Mit Hilfe der Tensidmizellen konnte das Aggregationsverhalten von ICG signifikant reduziert werden, womit die Erhöhung der Quantenausbeute erklärt werden kann.

Die Bestimmung der Verkapselungseffizienz von ICG in den Mizellen erwies sich mit Hilfe der konventionellen Methoden als schwierig, da der amphiphile Charakter von ICG für starke Interaktionen des Farbstoffes mit dem Säulen- oder Filtermaterial sorgte. Aus diesem Grund wurde erstmalig die analytische Ultrazentrifugation (AUZ) als Bestimmungsmethode für die Verkapselungseffizienz eingesetzt. Mit Hilfe der AUZ werden in der Regel Molmassen, Molmassenverteilungen, Teilchengrößen oder Teilchendichteverteilungen von Makromo-

lekülen untersucht. Da diese Methode in Sedimentationsgeschwindigkeitsexperimenten den freien Farbstoff vom verkapselten Anteil separiert und gleichzeitig orts aufgelöst die optische Dichte detektiert, kann die Konzentration an freiem Farbstoff im Überstand mit Hilfe einer Kalibriergeraden quantifiziert werden. Die Sedimentation der Mizellen kann parallel mit Hilfe der Rayleigh-Interferenzoptik detektiert werden. Die Methode erwies sich als sehr gut geeignet und es konnte gezeigt werden, dass die Verkapselungseffizienz von ICG ebenfalls in Abhängigkeit zum HLB-Wert der Tenside steht. In Solutol[®] HS 15 Mizellen konnte ICG zu 95 % verkapselt werden.

Die Auswahl der Tenside ist, vor allem bei parenteral anzuwendenden Formulierungen, von besonders großer Bedeutung. Durch die amphiphilen Eigenschaften der Tenside kann es im Blut zu einer Hämolyse der roten Blutkörperchen kommen. Eine geringe hämolytische Aktivität der verwendeten Tenside ist demnach Voraussetzung für eine gute Verträglichkeit. Der Hämolyse Assay, durchgeführt an isolierten humanen Erythrozyten, konnte zeigen, dass die Fettsäure-Zuckerester eine starke hämolytische Aktivität aufweisen und demnach für eine parenterale Anwendung nicht geeignet sind. Im Gegensatz dazu bewirkte Solutol[®] HS 15 in den untersuchten Konzentrationen keine signifikante Hämolyse der roten Blutkörperchen.

Zusammenfassend wurden die besten Ergebnisse in Solutol[®] HS 15 Mizellen erzielt. Diese Formulierung wurde selektiert und *in vitro* sowohl physikochemisch als auch toxikologisch in Zellkulturversuchen charakterisiert und *in vivo* anhand einer explorativen Tierstudie auf die Pharmakokinetik und Verträglichkeit hin untersucht.

Die *in vitro* Charakterisierung der mizellaren ICG Formulierung konnte zeigen, dass die Verkapselung von ICG in Solutol[®] HS 15 Mizellen zusätzlich zu einer Verbesserung der optischen Eigenschaften und der *in vitro* Stabilität, die Zytotoxizität von ICG signifikant senkt und die Aufnahme des Farbstoffes durch Makrophagen reduziert. Die morphologische Charakterisierung der Mizellen mit Hilfe der dynamischen Lichtstreuung und der Kryo-TEM ergab sphärisch geformte Aggregate mit einem mittleren Durchmesser von etwa 12 nm. Die physikalische Stabilität der Mizellen bei Verdünnung wurde tensiometrisch über die Bestimmung der CMC ermittelt, während der Einfluss der Farbstoffkonzentration auf die Stabilität der Mizellen fluorimetrisch bestimmt wurde. Da der Farbstoff in An- und Abwesenheit von Mizellen seine Fluoreszenzeigenschaften wie Emissionsmaximum und Fluoreszenzintensität ändert, konnte diese Methode erfolgreich für die Bestimmung der CMC in Abhängigkeit von der Farbstoffkonzentration eingesetzt werden. Dadurch konnte gezeigt werden, dass der Farb-

stoff einen starken Einfluss auf die physikalische Stabilität der Mizellen hat. Mit steigender ICG Konzentration steigt die CMC, was zu einer geringeren thermodynamischen Stabilität der Mizellen führt. Zusätzlich gelang es mit Hilfe dieser Methode den Einfluss von Albumin auf die Stabilität der Mizellen zu bestimmen. Aus den Ergebnissen wurde abgeleitet, dass die Mizellen eine gewisse Zeit *in vivo* stabil bleiben und erst nach längerer Zirkulation im Blutkreislauf destabilisiert werden und den Farbstoff freigegeben.

Diese Vermutung konnte durch den *in vivo* Versuch bestätigt werden: Die Bluthalbwertszeit von ICG konnte von $4,19 \pm 0,62$ min auf $58,7 \pm 10,4$ min erhöht werden. In den ersten Minuten nach Applikation zeigte ein verstärktes Extravasationsverhalten von ICG eine reduzierte Bindung an Plasmaproteinbindung an. Dies deutet auf ein Vorhandensein von intakten Mizellen in den ersten Minuten hin. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass Solutol[®] HS 15 einen Einfluss auf die Elimination von ICG hat. Durch Inhibierung von Transporterproteinen an der kanalikulären Membran der Hepatozyten akkumulierte ICG in den Hepatozyten und wurde teilweise wieder zurück in das Blut transportiert. Dadurch konnte neben einer Verlängerung der Zirkulationszeit im Blut, die Konzentration an Farbstoff im Gefäßsystem deutlich erhöht werden, was zu einer Verdopplung des Kontrastes in den ersten 30 min nach Injektion führte.

Kolloidale Tensidmizellen sind effektive Trägersysteme für ICG, mit denen die nachteiligen Eigenschaften des Farbstoffes optimiert werden können. Durch die Anwendung von Solutol[®] HS 15, einem gut verträglichen und für die parenterale Anwendung zugelassenen Tensid, konnte die *in vitro* Stabilität des Farbstoffes von wenigen Tagen auf mehrere Monate erhöht werden. Die Quantenausbeute wurde um ein Dreifaches und die Bluthalbwertszeit um ein Vielfaches erhöht. Zusätzlich zeigte die mizellare Formulierung eine geringere Zytotoxizität als der freie Farbstoff. Als Konsequenz für die praktische Anwendung bedeutet dies, dass die Formulierung durch die erhöhte Stabilität länger verwendet werden kann und zusätzlich nicht im Kühlschrank gelagert werden muss. Der erhöhte Kontrast in den Blutgefäßen sorgt für eine bessere und sicherere Diagnose und durch die Verlängerung der Bluthalbwertszeit steht für die Untersuchung ein größeres Zeitfenster zur Verfügung.

In Zukunft könnten weitere *in vivo* Versuche zusätzliche Informationen über den genauen Mechanismus der Elimination von ICG/Solutol[®] HS 15 Mizellen liefern. Zusätzlich könnte mit Hilfe geeigneter Tiermodelle untersucht werden, ob die mizellare ICG Formulierung für ein passives oder aktives Targeting geeignet ist.

6.2 Englische Version

Indocyanine green (ICG) is a fluorescence contrast agent that is widely used for near-infrared imaging. Application of this dye is limited due to its numerous disadvantageous properties in aqueous solution, including its concentration-dependent aggregation, poor aqueous stability (8 h) and low quantum yield (1.2 %). In plasma, ICG binds almost completely (98 %) to non-specific plasma proteins, leading to rapid elimination from the body with a blood half-life of 3 - 4 min.

The aim of this study was to develop a new formulation of ICG based on colloidal carriers in order to overcome these limitations. Colloidal carriers are promising systems for they can positively influence the physicochemical properties as well as the pharmacokinetics of drug substances or contrast agents. Furthermore, through selection of FDA („*Food and Drug Administration*“)-approved colloidal carriers, these systems are suitable for parenteral application.

Due to the small size of colloidal carriers, an increased elimination rate of the agents via the mononuclear phagocytic system (MPS) is not affected. Indeed, colloidal carriers can often prolong the circulation time of agents within the bloodstream. Additionally, an accumulation of the agent at pathologically modified tissues through passive targeting via the known enhanced permeation and retention effect (EPR-effect) can occur. With the aid of these carriers, the novel ICG formulation is expected to exhibit an improved *in vitro* stability, improved optical properties and a prolonged blood half-life compared to the commercially available ICG formulation.

In this work, the first task involved selection of an appropriate formulation of ICG via screening of FDA-approved colloidal formulations. The screened marketed carrier systems included liposomes (COATSOME[®] EL-11-C), mixed micelles (Konakion[®] MM), a lipid emulsion (Lipofundin[®] N) and a micro emulsion (Sandimmun[®] Optoral). ICG was found to have a high affinity for interfaces and the quantum yield and *in vitro* stability of ICG were found to increase with increasing surfactant concentration and increasing specific surface of the formulation.

The mean hydrodynamic diameter of all carriers was found to be less than 300 nm and, hence, suitable for parenteral administration. Since an improvement of the optical properties and stability of ICG correlates with an increasing surfactant concentration, micellar systems

were selected as the basis of the formulation. Such systems allow a high surfactant concentration to be reached and yet are biocompatible and, thus, suitable for parenteral application. The mixed micelles selected were those with which the ICG was stable for at least one week in solution and the quantum yield was improved at least twofold.

By variation of the micellar components, further improvement of the properties of ICG was achieved. In addition to several well-known surfactants that are already approved for parenteral application in humans, two sugar-based surfactants were investigated for their suitability as parenteral excipients. These investigations demonstrated that the quantum yield and *in vitro* stability of ICG depend on the chemical structure and HLB-value of the surfactants. Through use of surfactants with an HLB-value of approximately 15, the quantum yield and *in vitro* stability were further enhanced.

Since the aggregation of ICG in aqueous solution is responsible for the low quantum yield, the concentration-dependent dimerization of ICG, both in aqueous solution and within the micellar formulations, was investigated. Furthermore the native structures of ICG J-aggregates in aqueous solution were investigated. For the first time, this work shows use of cryogenic transmission electron microscopy (cryo-TEM) to gain information on the J-aggregate structure. In dependence of time, ICG forms spherical aggregates with an approximate diameter of 5 nm which transform into large planar sheets after 4 weeks. The sheet thickness of approximately 3.6 nm corresponds to the width of a bilayer formation of ICG molecules. With the aid of surfactant micelles, the aggregation behavior of ICG could be significantly reduced, enabling the observed increase in quantum yield.

For the first time, this work involved determination of the encapsulation efficiency of ICG into selected micelles using the analytical ultracentrifugation (AUC) technique. Application of this method was based on the fact that ICG is a zwitterionic amphiphilic molecule, which strongly adsorbs to both hydrophilic and lipophilic surfaces. Thus, conventional separation methods such as filtration or size exclusion chromatography cannot be applied due to the strong interactions of ICG with the column or filter material. The AUC method is commonly used to determine molar masses, molar mass distributions, particle sizes or particle density distributions of macromolecules. Since this method allows separation of the free dye from the encapsulated dye via sedimentation velocity experiments and simultaneous detection of space-resolved optical densities, the concentration of free dye in the supernatant can be quantified by means of a calibration curve. The sedimentation of the micelles can be detected in

parallel with the aid of the Rayleigh-interference optics. This method was found to be highly suitable and it was shown that the encapsulation efficiency of ICG is dependent on the structure and HLB-value of the surfactants. Using Solutol[®] HS 15 micelles, ICG was found to show a significantly high encapsulation efficiency of 95 %.

The selection of the right surfactants, especially for parenteral formulations, is of great importance. Due to their amphiphilic properties, surfactants may induce hemolysis, a rupture of red blood cells which accompanies the release of hemoglobin. A low hemolytic activity is therefore a requirement for sufficient compatibility. A hemolytic assay carried out on isolated human red blood cells demonstrated that the sugar-based surfactants exhibited an exceptionally high hemolysis. These findings imply that these sugar-based surfactants are not suitable for parenteral administration, even though they result in improved ICG properties. In contrast, Solutol[®] HS 15 hardly showed any hemolysis of red blood cells. Thus, the Solutol[®] HS 15 micelle formulation was selected and characterized physicochemically and toxicologically so as to gain information on the morphology and physical stability of the micelles as well as the formulation's cytotoxicity and phagocytotic behavior. Finally the *in vivo* behavior of this formulation was investigated within an explorative study for pharmacokinetics and compatibility.

The *in vitro* characterization of the micellar ICG formulation showed that encapsulation of ICG within Solutol[®] HS 15 micelles could, in addition to the improved optical properties and *in vitro* stability, reduce cytotoxicity and uptake by macrophages significantly. The morphological characterization of the micelles by means of dynamic light scattering (DLS) and cryo-TEM exhibited spherical aggregates with an approximate diameter of 12 nm. The physical stability of micelles during dilution was examined using tensiometry via determination of the CMC. The influence of the dye on the CMC of the micelles was determined by fluorimetry. Since the dye changes its optical properties such as emission maximum and fluorescence intensity in the presence and absence of surfactant micelles, this method could be used to determine the CMC in dependence of the dye concentration. Thereby, it could be shown that the dye has a strong influence on the physical stability of the micelles. With increasing ICG concentration, the CMC of the micelles increased, resulting in a lower micellar thermodynamic stability. Furthermore, using this method, it was possible to investigate the influence of albumin on the micellar stability. Results showed that the micelles could possibly remain stable for an extended period within the bloodstream and would be destroyed, thereby freeing the

dye, only after a relatively long circulation time. This assumption could be proved by *in vivo* investigations.

The blood half-life of ICG could be increased on encapsulation from 4.19 ± 0.62 min to 58.7 ± 10.4 min. Due to the lower plasma protein binding, the extravasation behavior of encapsulated ICG was increased compared to the free dye. This indicates the existence of intact micelles within the first few minutes post injection. Additionally, it was shown that Solutol[®] HS 15 has an influence on the elimination of ICG. Due to the inhibition of transporter carriers of the hepatocyte canalicular membrane by Solutol[®] HS 15, the dye accumulates within the hepatocytes and is, thus, able to reenter the bloodstream. As a result of the higher dye concentration within the vascular system, the contrast could be increased two-fold within the first 30 min post injection.

Colloidal surfactant micelles are effective carrier systems for ICG, improving the negative properties of the dye. Using Solutol[®] HS 15, a well tolerable surfactant approved for parenteral administration, the *in vitro* stability of the dye could be increased from a few days to several months. Both the quantum yield and the plasma half-life could be increased manifold. Additionally, the formulation exhibited a lower cytotoxicity than the free dye. These effects of the formulation provide added advantages in the practice, compared with the free dye: the formulation's higher stability allows for prolonged storage; its higher quantum yield results in a higher vascular contrast which, in turn, provides for a better and safer diagnosis; and its prolonged circulation in the bloodstream allows an increase in the examination time window.

In the future, additional *in vivo* experiments could provide further information regarding the actual elimination mechanism of the ICG/Solutol[®] HS 15 micelles. Additionally, using suitable animal models, investigations of the targeting method (active versus passive) of the micellar ICG formulation could be performed.

Literaturverzeichnis

1. K.-P. Grigat. Geschichte der Bildgebung in der Medizin - von Morphologie und Funktion. Vortrag in der Ressource zu Detmold, Lemgo, Deutschland (2002).
2. X. Xu. Development and Applications of Optical Imaging Techniques in Cancer Diagnosis: Diffuse Optical Tomography and Microendoscopy. *Curr. Med. Imag. Rev.* **4**: 125-133 (2008).
3. H. Herzog. In vivo functional imaging with SPECT and PET. *Radiochim. Acta.* **89**: 203 (2001).
4. B. Ebert and K. Licha. Fluoreszenzgestützte molekulare Bildgebung in vivo. *PTB-Mitteilungen.* **118**: 265-270 (2008).
5. M. Cutler. Transillumination of the Breast. *Ann. Surg.* **93**: 223-234 (1931).
6. D. J. Watmough. A light torch for the transillumination of female breast tissues. *Br. J. Radiol.* **55**: 142-146 (1982).
7. C. Bremer, V. Ntziachristos, U. Mahmood, C. H. Tung and R. Weissleder. Progress in optical imaging. *Radiologe.* **41**: 131-137 (2001).
8. B. Monsees, J. M. Destouet and W. G. Totty. Light scanning versus mammography in breast cancer detection. *Radiology.* **163**: 463-465 (1987).
9. G. Hüttmann and M. Löning. Physikalische Grundlagen optischer Technologien. *Gynäkologe.* **40**: 332-337 (2007).
10. Q. Zhu, S. Tannenbaum and S. H. Kurtzman. Optical tomography with ultrasound localization for breast cancer diagnosis and treatment monitoring. *Surg. Oncol. Clin. N. Am.* **16**: 307-321 (2007).
11. T. Yuasa, S. Tanosaki, Y. Sasaki, H. Taniguchi, B. Devaraj and T. Akatsuka. Transillumination Optical Sensing for Biomedicine and Diagnostics: Feasibility of Early Diagnosis for Rheumatoid Arthritis. *Anal. Sci.* **17**: (2001).
12. E. Schellenberger. Applications of optical imaging. *Z. Med. Phys.* **15**: 187-191 (2005).
13. V. Ntziachristos and B. Chance. Probing physiology and molecular function using optical imaging: applications to breast cancer. *Breast Cancer Res.* **3**: 41-46 (2001).

14. S. Wan, J. A. Parrish, R. R. Anderson and M. Madden. Transmittance of nonionizing radiation in human tissues. *Photochem. Photobiol.* **34**: 679-681 (1981).
15. K. Licha. Contrast Agents for Optical Imaging. Springer, Berlin / Heidelberg (2002).
16. J. M. Maarek, L. Marcu, M. C. Fishbein and W. S. Grundfest. Time-resolved fluorescence of human aortic wall: use for improved identification of atherosclerotic lesions. *Lasers Surg. Med.* **27**: 241-254 (2000).
17. U. Mahmood and R. Weissleder. Near-infrared optical imaging of proteases in cancer. *Mol. Cancer Ther.* **2**: 489-496 (2003).
18. U. Mahmood, C. H. Tung, A. Bogdanov, Jr. and R. Weissleder. Near-infrared optical imaging of protease activity for tumor detection. *Radiology.* **213**: 866-870 (1999).
19. V. Ntziachristos, A. G. Yodh, M. Schnall and B. Chance. Concurrent MRI and diffuse optical tomography of breast after indocyanine green enhancement. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **97**: 2767-2772 (2000).
20. M. Kriegmair, R. Baumgartner, R. Knuechel, P. Steinbach, A. Ehsan, W. Lumper, F. Hofstadter and A. Hofstetter. Fluorescence photodetection of neoplastic urothelial lesions following intravesical instillation of 5-aminolevulinic acid. *Urology.* **44**: 836-841 (1994).
21. A. Leunig, K. Rick, H. Stepp, R. Gutmann, G. Alwin, R. Baumgartner and J. Feyh. Fluorescence imaging and spectroscopy of 5-aminolevulinic acid induced protoporphyrin IX for the detection of neoplastic lesions in the oral cavity. *Am. J. Surg.* **172**: 674-677 (1996).
22. R. M. Cothren, M. V. Sivak, Jr., J. Van Dam, R. E. Petras, M. Fitzmaurice, J. M. Crawford, J. Wu, J. F. Brennan, R. P. Rava, R. Manoharan and M. S. Feld. Detection of dysplasia at colonoscopy using laser-induced fluorescence: a blinded study. *Gastrointest. Endosc.* **44**: 168-176 (1996).
23. S. Lam, C. MacAulay, J. Hung, J. LeRiche, A. E. Profio and B. Palcic. Detection of dysplasia and carcinoma in situ with a lung imaging fluorescence endoscope device. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **105**: 1035-1040 (1993).
24. G. Richards, G. Soubrane and L. A. Yannuzzi. Fluorescein and ICG angiography. Thieme Medical Publishers, Germany (1998).

25. C. Fritsch, P. M. Becker-Wegerich, H. Menke, T. Ruzicka, G. Goerz and R. R. Olbrisch. Successful surgery of multiple recurrent basal cell carcinomas guided by photodynamic diagnosis. *Aesthetic. Plast. Surg.* **21**: 437-439 (1997).
26. T. Fischer, I. Gemeinhardt, S. Wagner, D. V. Stieglitz, J. Schnorr, K. G. Hermann, B. Ebert, D. Petzelt, R. Macdonald, K. Licha, M. Schirner, V. Krenn, T. Kamradt and M. Taupitz. Assessment of unspecific near-infrared dyes in laser-induced fluorescence imaging of experimental arthritis. *Acad. Radiol.* **13**: 4-13 (2006).
27. M. M. Haglund, M. S. Berger and D. W. Hochman. Enhanced optical imaging of human gliomas and tumor margins. *Neurosurgery.* **38**: 308-317 (1996).
28. M. Funovics. [Optical imaging of fluorescence in the near infrared. From passive to enzymatically activated contrast medium]. *Radiologe.* **47**: 53-61 (2007).
29. J. Rao, A. Dragulescu-Andrasi and H. Yao. Fluorescence imaging in vivo: recent advances. *Curr. Opin. Biotechnol.* **18**: 17-25 (2007).
30. J. Grimm and A. Wunder. Current state of molecular imaging research. *Rofo.* **177**: 326-337 (2005).
31. R. Weissleder. Scaling down imaging: molecular mapping of cancer in mice. *Nat. Rev. Cancer.* **2**: 11-18 (2002).
32. I. J. Fox, L. G. Brooker, D. W. Heseltine, H. E. Essex and E. H. Wood. A tricarbo-cyanine dye for continuous recording of dilution curves in whole blood independent of variations in blood oxygen saturation. *Proc. Staff Meet. Mayo Clin.* **32**: 478-484 (1957).
33. L. G. Brooker. Some recent developments in the chemistry of photographic sensitizing dyes. *Experientia suppl.* **2**: 229-257 (1955).
34. H. O. Wheeler, W. I. Cranston and J. I. Meltzer. Hepatic uptake and biliary excretion of indocyanine green in the dog. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **99**: 11-14 (1958).
35. Medical Systems Pulsion. Fachinformation: ICG-Pulsion, Deutschland (1996).
36. J. S. Slakter, L. A. Yannuzzi, D. R. Guyer, J. A. Sorenson and D. A. Orlock. Indocyanine-green angiography. *Curr. Opin. Ophthalmol.* **6**: 25-32 (1995).
37. R. Brancato and G. Trabucchi. Fluorescein and indocyanine green angiography in vascular chorioretinal diseases. *Semin. Ophthalmol.* **13**: 189-198 (1998).

38. X. Li, B. Beauvoit, R. White, S. Nioka, B. Chance and A. G. Yodh. Tumor localization using fluorescence of indocyanine green (ICG) in rat models. *Proc. SPIE.* **2389**: 789-797 (1995).
39. J. S. Reynolds, T. L. Troy, R. H. Mayer, A. B. Thompson, D. J. Waters, K. K. Cornell, P. W. Snyder and E. M. Sevick-Muraca. Imaging of spontaneous canine mammary tumors using fluorescent contrast agents. *Photochem. Photobiol.* **70**: 87-94 (1999).
40. S. Zhao, M. A. O`Leary, S. Nioka and B. Chance. Breast tumor detection using continuous wave light source. *Proc. SPIE.* **2389**: 789-798 (1995).
41. E. Crescenzi, L. Varriale, M. Iovino, A. Chiaviello, B. M. Veneziani and G. Palumbo. Photodynamic therapy with indocyanine green complements and enhances low-dose cisplatin cytotoxicity in MCF-7 breast cancer cells. *Mol. Cancer. Ther.* **3**: 537-544 (2004).
42. C. Abels, S. Fickweiler, P. Weiderer, W. Baumler, F. Hofstadter, M. Landthaler and R. M. Szeimies. Indocyanine green (ICG) and laser irradiation induce photooxidation. *Arch. Dermatol. Res.* **292**: 404-411 (2000).
43. S. Fickweiler, R. M. Szeimies, W. Baumler, P. Steinbach, S. Karrer, A. E. Goetz, C. Abels, F. Hofstadter and M. Landthaler. Indocyanine green: intracellular uptake and phototherapeutic effects in vitro. *J. Photochem. Photobiol. B.* **38**: 178-183 (1997).
44. W. Baumler, C. Abels, S. Karrer, T. Weiss, H. Messmann, M. Landthaler and R. M. Szeimies. Photo-oxidative killing of human colonic cancer cells using indocyanine green and infrared light. *Br. J. Cancer.* **80**: 360-363 (1999).
45. R. C. Benson and H. A. Kues. Fluorescence properties of indocyanine green as related to angiography. *Phys. Med. Biol.* **23**: 159-163 (1978).
46. S. Y. Cohen, G. Quentel and G. Coscas. Safety of a dye without iodine for indocyanine green angiographie (abstract). *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **36**: 248 (1995).
47. K. J. Baker. Binding of sulfobromophthalein (BSP) sodium and indocyanine green (ICG) by plasma alpha-1 lipoproteins. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **122**: 957-963 (1966).
48. I. J. Fox and E. H. Wood. Indocyanine green: physical and physiologic properties. *Proc. Staff Meet. Mayo Clin.* **35**: 732-744 (1960).

49. J. Caesar, S. Shaldon, L. Chiandussi, L. Guevara and S. Sherlock. The use of indocyanine green in the measurement of hepatic blood flow and as a test of hepatic function. *Clin. Sci.* **21**: 43-57 (1961).
50. D. K. Meijer, B. Weert and G. A. Vermeer. Pharmacokinetics of biliary excretion in man. VI. Indocyanine green. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **35**: 295-303 (1988).
51. P. Ott, S. Keiding, A. H. Johnsen and L. Bass. Hepatic removal of two fractions of indocyanine green after bolus injection in anesthetized pigs. *Am. J. Physiol.* **266**: G1108-1122 (1994).
52. K. Licha, B. Riefke, V. Ntziachristos, A. Becker, B. Chance and W. Semmler. Hydrophilic cyanine dyes as contrast agents for near-infrared tumor imaging: synthesis, photophysical properties and spectroscopic in vivo characterization. *Photochem. Photobiol.* **72**: 392-398 (2000).
53. G. A. Luty. The acute intravenous toxicity of biological stains, dyes, and other fluorescent substances. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **44**: 225-249 (1978).
54. G. S. Warner. Laboratory animal toxicity studies on cardiogreen. *Documentation of Hynson, Westcott & Dunning*, Baltimore (1971).
55. M. Hope-Ross, L. A. Yannuzzi, E. S. Gragoudas, D. R. Guyer, J. S. Slakter, J. A. Sorenson, S. Krupsky, D. A. Orlock and C. A. Puliafito. Adverse reactions due to indocyanine green. *Ophthalmology.* **101**: 529-533 (1994).
56. G. R. Cherrick, S. W. Stein, C. M. Leevy and C. S. Davidson. Indocyanine green: observations on its physical properties, plasma decay, and hepatic extraction. *J. Clin. Invest.* **39**: 592-600 (1960).
57. W. F. Sutterer, S. E. Hardin, R. W. Benson, L. J. Krovetz and G. L. Schiebler. Optical behavior of indocyanine green dye in blood and in aqueous solution. *Am. Heart J.* **72**: 345-350 (1966).
58. K. Licha, B. Riefke and W. Semmler. Synthesis and characterization of cyanine dyes as contrast agents for near-infrared imaging. *Proc. SPIE.* **2927**: 192-198 (1996).
59. V. Saxena, M. Sadoqi and J. Shao. Degradation kinetics of indocyanine green in aqueous solution. *J. Pharm. Sci.* **92**: 2090-2097 (2003).

60. T. Desmettre, J. M. Devoisselle and S. Mordon. Fluorescence properties and metabolic features of indocyanine green (ICG) as related to angiography. *Surv. Ophthalmol.* **45**: 15-27 (2000).
61. R. Rajagopalan, P. Uetrecht, J. E. Bugaj, S. A. Achilefu and R. B. Dorshow. Stabilization of the optical tracer agent indocyanine green using noncovalent interactions. *Photochem. Photobiol.* **71**: 347-350 (2000).
62. J. M. Maarek, D. P. Holschneider and J. Harimoto. Fluorescence of indocyanine green in blood: intensity dependence on concentration and stabilization with sodium polyaspartate. *J. Photochem. Photobiol. B.* **65**: 157-164 (2001).
63. V. M. Jones Owen. Estimation of Indocyanine Green Concentrations. *Clin. Biochem.* **6**: 132-135 (1973).
64. J. Gathje, R. R. Steuer and K. R. K. Nicholes. Stability Studies on Indocyanine Green Dye. *J. Appl. Physiol.* **29**: 181-185 (1970).
65. V. Saxena, M. Sadoqi and J. Shao. Enhanced photo-stability, thermal-stability and aqueous-stability of indocyanine green in polymeric nanoparticulate systems. *J. Photochem. Photobiol. B* **74**: 29-38 (2004).
66. V. Saxena, M. Sadoqi, S. Kumar and J. Shao. Long Circulating Near Infrared Fluorescent Nanoparticles for Diagnosis and Photodynamic Therapy of Cutaneous Cancers. *Proc. SPIE.* **5312**: 41-46 (2004).
67. M. A. Yaseen, J. Yu, M. S. Wong and B. Anvari. Stability assessment of indocyanine green within dextran-coated mesocapsules by absorbance spectroscopy. *J. Biomed. Opt.* **12**: 064031 (2007).
68. J. Yu, M. A. Yaseen, B. Anvari and M. S. Wong. Synthesis of Near-Infrared-Absorbing Nanoparticle-Assembled Capsules. *Chem. Mater.* **19**: 1277-1284 (2007).
69. J. M. Devoisselle, S. Soulie-Begu, S. Mordon, T. Desmettre and H. Maillols. A Preliminary Study of the In Vivo Behaviour of an Emulsion Formulation of Indocyanine Green. *Lasers Med. Sci.* **13**: 279-282 (1998).
70. V. P. Torchilin. Multifunctional nanocarriers. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **58**: 1532-1555 (2006).
71. A. Rolland. Pharmaceutical Particulate Carriers. Marcel Dekker, New York (1993).

72. R. H. Müller. Colloidal Carriers for Controlled Drug Delivery and Targeting: Modification, Characterization and In Vivo Distribution. CRC Press, Boca Raton (1991).
73. M. J. Alonso. Nanomedicines for overcoming biological barriers. *Biomed. Pharmacother.* **58**: 168-172 (2004).
74. S. K. Sahoo and V. Labhasetwar. Nanotech approaches to drug delivery and imaging. *Drug Discovery Today.* **8**: 1112-1120 (2003).
75. V. P. Torchilin. Nanoparticulates as Drug Carriers. Imperial College Press, (2006).
76. K. H. Bauer, K.-H. Frömmling and C. Führer. Lehrbuch der Pharmazeutischen Technologie. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, (2002).
77. H. Maeda. The Enhanced Permeability and Retention (EPR) Effect in Tumor Vasculature: The Key Role of Tumor-Selective Macromolecular Drug Targeting. *Adv. Enzyme Regul.* **41**: 189-207 (2001).
78. D. F. Baban and L. W. Seymour. Control of tumor vascular permeability. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **34**: 109-119 (1998).
79. Y. Xing and J. Rao. Quantum dot bioconjugates for in vitro diagnostics & in vivo imaging. *Cancer Biomarkers.* **4**: 307-319 (2008).
80. H. M. E. Azzazy, M. M. H. Mansour and S. C. Kazmierczak. From diagnostics to therapy: Prospects of quantum dots. *Clin. Biochem.* **40**: 917-927 (2007).
81. U. Resch-Genger, M. Grabolle, S. Cavaliere-Jaricot, R. Nitschke and T. Nann. Quantum dots versus organic dyes as fluorescent labels. *Nature Meth.* **5**: 763-775 (2008).
82. W. Holzer, M. Mauerer, A. Penzkofer, R. M. Szeimies, C. Abels, M. Landthaler and W. Baumler. Photostability and thermal stability of indocyanine green. *J. Photochem. Photobiol. B.* **47**: 155-164 (1998).
83. R. H. Müller and R. Schuhmann. Teilchengrößenmessung in der Laborpraxis. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, (1996).
84. Malvern Instruments. Zetasizer Nano Series User Manual, MAN0317 (2.2), United Kingdom (2005).
85. R. H. Müller. Zetapotential und Partikelladung in der Laborpraxis. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, (1996).

86. K. Cammann. Instrumentelle Analytische Chemie. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg (2001).
87. J. N. Demas and G. A. Crosby. The Measurement of Photoluminescence Quantum Yields. A Review. *J. Phys. Chem.* **75**: 991-1024 (1971).
88. D. F. Eaton. International Union of Pure and Applied Chemistry Organic Chemistry Division Commission on Photochemistry. Reference materials for fluorescence measurement. *J. Photochem. Photobiol. B.* **2**: 523-531 (1988).
89. R. C. Benson and H. A. Kues. Absorption and Fluorescence properties of cyanine dyes. *J. Chem. Eng. Data.* **22**: 379-383 (1977).
90. M. A. Yaseen, J. Yu, M. S. Wong and B. Anvari. Laser-induced heating of dextran-coated mesocapsules containing indocyanine green. *Biotechnol. Prog.* **23**: 1431-1440 (2007).
91. B. C. Wilson, M. S. Patterson and D. M. Burns. Effect of Photosensitizer Concentration in Tissue on the Penetration Depth of Photoactivating Light. *Lasers Med. Sci.* **1**: 235-244 (1986).
92. A. B. Milstein, S. Oh, K. J. Webb, C. A. Bouman, Q. Zhang, D. A. Boas and R. P. Millane. Fluorescence optical diffusion tomography. *Appl. Opt.* **42**: 3081-3094 (2003).
93. A. M. De Grand, S. J. Lomnes, D. S. Lee, M. Pietrzykowski, S. Ohnishi, T. G. Morgan, A. Gogbashian, R. G. Laurence and J. V. Frangioni. Tissue-Like Phantoms for Near-Infrared Fluorescence Imaging System Assessment and the Training of Surgeons. *J. Biomed. Opt.* **11**: 014007 (2006).
94. O. O. Abugo, Z. Gryczynski and J. R. Lakowicz. Modulation Sensing of Fluorophores in Tissue: A New approach to Drug Compliance Monitoring. *J. Biomed. Opt.* **4**: 429-442 (1999).
95. B. Yuan, N. Chen and Q. Zhu. Emission and absorption properties of indocyanine green in Intralipid solution. *J. Biomed. Opt.* **9**: 497-503 (2004).
96. M. L. Landsman, G. Kwant, G. A. Mook and W. G. Zijlstra. Light-absorbing properties, stability, and spectral stabilization of indocyanine green. *J. Appl. Physiol.* **40**: 575-583 (1976).

97. J. M. Devoisselle, S. Soulie, S. Mordon, G. Mestres, T. Desmettre and H. Maillols. Effect of indocyanine green formulation on blood clearance and in vivo fluorescence decay profile of skin. *Optical Biopsies, SPIE Press.* **2627**: 100-108 (1995).
98. J. M. Devoisselle, S. Soulie, S. Mordon, T. Desmettre and H. Maillols. Fluorescence properties of indocyanine green: I. In-vitro study with micelles and liposomes. *SPIE Advances in Fluorescence Sensing Technology III.* **2980**: 530-537 (1997).
99. B. Braun Melsungen AG. Fachinformation: Lipofundin 10 % N, Deutschland (2007).
100. I. Buttle. O/W-Emulsionen für die intravenöse Applikation von Arzneistoffen. Fachbereich Biologie, Chemie und Pharmazie, Freie Universität Berlin, Berlin (2005).
101. M. L. Carasso, W. N. Rowlands and R. A. Kennedy. Electroacoustic Determination of Droplet Size and Zeta Potential in Concentrated Intravenous Fat Emulsions. *J. Colloid Interface Sci.* **174**: 405-413 (1995).
102. S. A. Krause. Entwicklung und Charakterisierung von Mikroemulsionen zur dermalen Applikation von Arzneistoffen. Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technische Fakultät, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle (Saale) (2001).
103. S. Mordon, T. Desmettre, J. M. Devoisselle and V. Mitchell. Selective laser photocoagulation of blood vessels in a hamster skin flap model using a specific ICG formulation. *Lasers Surg. Med.* **21**: 365-373 (1997).
104. G. Kim, S. W. Huang, K. C. Day, M. O'Donnell, R. R. Agayan, M. A. Day, R. Kopelman and S. Ashkenazi. Indocyanine-green-embedded PEBBLEs as a contrast agent for photoacoustic imaging. *J. Biomed. Opt.* **12**: 044020 (2007).
105. V. B. Rodriguez, S. M. Henry, A. S. Hoffman, P. S. Stayton, X. Li and S. H. Pun. Encapsulation and stabilization of indocyanine green within poly(styrene-alt-maleic anhydride) block-poly(styrene) micelles for near-infrared imaging. *J. Biomed. Opt.* **13**: 014025 (2008).
106. D. Bauernschmitt, H. Hoffmann and G. Platz. Zur Dynamik des Aggregationsverhaltens zweikettiger ionogener Tenside. *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* **85**: 203-210 (1981).
107. V. Degiorgio and M. Corti. Physics of Amphiphiles: Micelles, Vesicles and Microemulsions. North-Holland Physics Publishing, Amsterdam (1985).

108. D. M. Small. Size and structure of bile salt micelles: influence of structure, concentration, counterion concentration, pH and temperature. *Adv. Chem. Ser. B.* **84**: 31-52 (1968).
109. D. M. Small, S. A. Penkett and D. Chapman. Studies on simple and mixed bile salt micelles by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta.* **176**: 178-189 (1969).
110. N. A. Mazer, M. C. Carey, R. F. Kwasnick and G. B. Benedek. Quasielastic light scattering studies of aqueous biliary lipid systems. Size, shape, and thermodynamics of bile salt micelles. *Biochemistry.* **18**: 3064-3075 (1979).
111. D. E. Cohen, G. M. Thurston, R. A. Chamberlin, G. B. Benedek and M. C. Carey. Laser light scattering evidence for a common wormlike growth structure of mixed micelles in bile salt- and straight-chain detergent-phosphatidylcholine aqueous systems: relevance to the micellar structure of bile. *Biochemistry.* **37**: 14798-14814 (1998).
112. R. P. Hjelm, P. Thiyagarajan and H. Alkan-Onyuksel. Organization of Phosphatidylcholine and Bile Salt in Rodlike Mixed Micelles. *J. Phys. Chem.* **96**: 8653-8661 (1992).
113. P. Mukerjee. Micellar properties of drugs: micellar and nonmicellar patterns of self-association of hydrophobic solutes of different molecular structures--monomer fraction, availability, and misuses of micellar hypothesis. *J. Pharm. Sci.* **63**: 972-981 (1974).
114. N. A. Mazer, G. B. Benedek and M. C. Carey. Quasielastic light-scattering studies of aqueous biliary lipid systems. Mixed micelle formation in bile salt-lecithin solutions. *Biochemistry.* **19**: 601-615 (1980).
115. C. Leggio, L. Galantini, E. Zaccarelli and N. V. Pavel. Small-angle X-ray scattering and light scattering on lysozyme and sodium glycocholate micelles. *J. Phys. Chem. B.* **109**: 23857-23869 (2005).
116. C. Gahwiller, C. von Planta, D. Schmidt and H. Steffen. [Size, structure, and dynamics of bile salt/lecithin mixed micelles (author's transl)]. *Z. Naturforsch.* **32**: 748-755 (1977).
117. A. A. Date and M. S. Nagarsenker. Parenteral microemulsions: An overview. *Int. J. Pharm.* **355**: 19-30 (2008).

118. C. von Corswant, P. Thoren and S. Engstrom. Triglyceride-based Microemulsion for Intravenous Administration of Sparingly Soluble Substances. *J. Pharm. Sci.* **87**: 200-208 (1997).
119. K.-M. Park and C.-K. Kim. Preparation and evaluation of flurbiprofen-loaded microemulsion for parenteral delivery. *Int. J. Pharm.* **181**: 173-179 (1999).
120. M. Trotta, M. R. Gasco and M. E. Carlotti. Study on an O/W microemulsion carrying Diazepam. *Acta Technol. Legis Medicamenti.* **1**: 137-148 (1990).
121. M. R. Gasco, F. Pattarino and F. Lattanzi. Long-acting delivery systems for peptides: reduced plasma testosterone levels in male rats after a single injection. *Int. J. Pharm.* **62**: 119-123 (1990).
122. H. N. Bhargava, A. Narurkar and L. M. Lieb. Using microemulsions for drug delivery. *Pharm. Technol.* **11**: 46-52 (1987).
123. R. G. Strickley. Solubilizing excipients in oral and injectable formulations. *Pharm. Res.* **21**: 201-230 (2004).
124. L. Zhang and P. Somasundaran. Adsorption of mixtures of nonionic sugar-based surfactants with other surfactants at solid/liquid interfaces: I. Adsorption of n-dodecyl- β -D-maltoside with anionic sodium dodecyl sulfate on alumina. *J. Colloid Interface Sci.* **302**: 20-24 (2006).
125. J. A. Cardillo, R. Jorge, R. A. Costa, S. M. Nunes, D. Lavinsky, B. D. Kuppermann, A. C. Tedesco and M. E. Farah. Experimental selective choriocapillaris photothrombosis using a modified indocyanine green formulation. *Br. J. Ophthalmol.* **92**: 276-280 (2008).
126. R. Weigand, F. Rotermund and A. Penzkofer. Degree of aggregation of indocyanine green in aqueous solutions determined by Mie scattering. *Chem. Phys.* **220**: 373-384 (1997).
127. F. Rotermund, R. Weigand and A. Penzkofer. J-aggregation and disaggregation of indocyanine green in water. *Chem. Phys.* **220**: 385-392 (1997).
128. M. Mauerer, A. Penzkofer and J. Zweck. Dimerization, J-aggregation and J-disaggregation dynamics of indocyanine green in heavy water. *J. Photochem. Photobiol. B.* **47**: 68-73 (1998).

129. P. E. Thoren, O. Soderman, S. Engstrom and C. von Corswant. Interactions of novel, nonhemolytic surfactants with phospholipid vesicles. *Langmuir*. **23**: 6956-6965 (2007).
130. W. C. Griffin. Calculation of HLB Values of Non-Ionic Surfactants. *J. Soc. Cosmet. Chem.* **5**: 259 (1954).
131. J. T. Davies. A quantitative kinetic theory of emulsion type, I. Physical chemistry of the emulsifying agent. Proc. Int. Congr. Surface Activity, London (1957).
132. S. Burghardt, A. Hirsch, B. Schade, K. Ludwig and C. Böttcher. Switchable Supramolecular Organization of Structurally Defined Micelles Based on an Amphiphilic Fullerene. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **44**: 2976-2979 (2005).
133. L. Sachs. Angewandte Statistik. Springer Verlag, Berlin (1992).
134. W. West and S. Pearce. The Dimeric State of Cyanine Dyes. *J. Phys. Chem.* **69**: 1894-1903 (1965).
135. S. Kirstein and S. Daehne. J-aggregates of amphiphilic cyanine dyes: Self-organization of artificial light harvesting complexes. *Int. J. Photoenergy*. **2006**: 1-21 (2006).
136. B. A. Lewis and D. M. Engelman. Lipid bilayer thickness varies linearly with acyl chain length in fluid phosphatidylcholine vesicles. *J. Mol. Biol.* **166**: 211-217 (1983).
137. K. Mitra, I. Ubarretxena-Belandia, T. Taguchi, G. Warren and D. M. Engelman. Modulation of the bilayer thickness of exocytic pathway membranes by membrane proteins rather than cholesterol. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **101**: 4083-4088 (2004).
138. F. Dumas, M. C. Lebrun and J. F. Tocanne. Is the protein/lipid hydrophobic matching principle relevant to membrane organization and functions? *FEBS Lett.* **458**: 271-277 (1999).
139. M. A. Yaseen, J. Yu, M. S. Wong and B. Anvari. Encapsulation of Indocyanine Green within nano-assembled capsules changes its optical properties. *Proc. SPIE*. **6449**: 1-9 (2007).
140. H. von Berlepsch, C. Böttcher, A. Quart, C. Burger, S. Daehne and S. Kirstein. Supramolecular structures of J-aggregates of carbocyanine dyes in solution. *J. Phys. Chem. B*. **104**: 5255-5262 (2000).

141. H. von Berlepsch, S. Kirstein and C. Böttcher. Supramolecular Structure of J-Aggregates of a Sulfonate Substituted Amphiphilic Carbocyanine Dye in Solution: Methanol-Induced Ribbon-to-Tubule Transformation. *J. Phys. Chem. B.* **108**: 18725-18733 (2004).
142. J. F. Zhou, M. P. Chin and S. A. Schafer. Aggregation and degradation of indocyanine green. *Proc. SPIE Laser Surg.* **2128**: 495-505 (1994).
143. W. C. Griffin. Classification of Surface-Active Agents by HLB. *J. Soc. Cosmet. Chem.* **1**: 311 (1949).
144. L. Sek, B. J. Boyd, W. N. Charman and C. J. Porter. Examination of the impact of a range of Pluronic surfactants on the in-vitro solubilisation behaviour and oral bioavailability of lipidic formulations of atovaquone. *J. Pharm. Pharmacol.* **58**: 809-820 (2006).
145. S. R. Croy and G. S. Kwon. Polymeric micelles for drug delivery. *Curr. Pharm. Des.* **12**: 4669-4684 (2006).
146. H. Schott. Comments on Hydrophile-Lipophile Balance Systems. *J. Pharm. Sci.* **79**: 87-88 (1990).
147. F. Ruchatz and H. Schuch. Physicochemical Properties of Solutol HS 15 and its Solubilizates. 2th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Paris, France (1998).
148. P. C. Lerk, H. H. Sucker and H. F. Eicke. Micellization and solubilization behavior of sucrose laurate, a new pharmaceutical excipient. *Pharm. Dev. Technol.* **1**: 27-36 (1996).
149. D. C. Litzinger, A. M. Buiting, N. van Rooijen and L. Huang. Effect of liposome size on the circulation time and intraorgan distribution of amphipathic poly(ethylene glycol)-containing liposomes. *Biochim. Biophys. Acta.* **1190**: 99-107 (1994).
150. H. Liu, S. Farrell and K. Uhrich. Drug release characteristics of unimolecular polymeric micelles. *J. Control. Release.* **68**: 167-174 (2000).
151. A. Lavasanifar, J. Samuel and G. S. Kwon. Poly(ethylene oxide)-block-poly(L-amino acid) micelles for drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **54**: 169-190 (2002).

152. S. Stolnik, L. Illum and S. S. Davis. Long circulating microparticulate drug carriers. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **16**: 195-214 (1995).
153. M. A. R. Meier, S. N. H. Aerts, B. B. P. Staal, M. Rasa and U. S. Schubert. PEO-*b*-PCL Block Copolymers: Synthesis, Detailed Characterization, and Selected Micellar Drug Encapsulation Behavior. *Macromol. Rapid Commun.* **26**: 1918-1924 (2005).
154. M. Rasa, M. A. R. Meier and U. S. Schubert. Transport of guest molecules by unimolecular micelles evidenced in analytical ultracentrifugation experiments. *Macromol. Rapid Commun.* **28**: 1429-1433 (2007).
155. G. Ralston. Beckman Instruments. Introduction to Analytical Ultracentrifugation, Fullerton, CA (1993).
156. M. J. Lawrence. Surfactant Systems: Their Use in Drug Delivery. *Chem. Soc. Rev.* **23**: 417-424 (1994).
157. K. Neimert-Andersson, S. Sauer, O. Panknin, T. Borg, E. Soderlind and P. Somfai. Synthesis of new sugar-based surfactants and evaluation of their hemolytic activities. *J. Org. Chem.* **71**: 3623-3626 (2006).
158. E. Soderlind, M. Wollbratt and C. von Corswant. The usefulness of sugar surfactants as solubilizing agents in parenteral formulations. *Int. J. Pharm.* **252**: 61-71 (2003).
159. E. J. Dial, S. H. Rooijackers, R. L. Darling, J. J. Romero and L. M. Lichtenberger. Role of phosphatidylcholine saturation in preventing bile salt toxicity to gastrointestinal epithelia and membranes. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **23**: 430-436 (2008).
160. G. P. Martin and C. Marriott. Membrane damage by bile salts: the protective function of phospholipids. *J. Pharm. Pharmacol.* **33**: 754-759 (1981).
161. A. J. ten Tije, W. J. Loos, J. Verweij, S. D. Baker, K. Dinh, W. D. Figg and A. Sparreboom. Disposition of polyoxyethylated excipients in humans: implications for drug safety and formulation approaches. *Clin. Pharmacol. Ther.* **74**: 509-510 (2003).
162. A. J. ten Tije, J. Verweij, W. J. Loos and A. Sparreboom. Pharmacological effects of formulation vehicles : implications for cancer chemotherapy. *Clin. Pharmacokinetics.* **42**: 665-685 (2003).

163. J. R. Bellare, H. T. Davis, L. E. Scriven and Y. Talmon. Controlled environment vitrification system: an improved sample preparation technique. *J. Electron. Microsc. Tech.* **10**: 87-111 (1988).
164. M. Adrian, J. Dubochet, J. Lepault and A. W. McDowell. Cryo-electron microscopy of viruses. *Nature*. **308**: 32-36 (1984).
165. J. Dubochet, M. Adrian, J. J. Chang, J. C. Homo, J. Lepault, A. W. McDowell and P. Schultz. Cryo-electron microscopy of vitrified specimens. *Q. Rev. Biophys.* **21**: 129-228 (1988).
166. M. Kellermann, W. Bauer, A. Hirsch, B. Schade, K. Ludwig and C. Bottcher. The first account of a structurally persistent micelle. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **43**: 2959-2962 (2004).
167. BASF AG. Technical Information Solutol HS 15, Deutschland (2004).
168. Y. Zheng, Y. Y. Won, F. S. Bates, H. T. Davis, L. E. Scriven and Y. Talmon. Directly Resolved Core-Corona Structure of Block Copolymer Micelles by Cryo-Transmission Electron Microscopy. *J. Phys. Chem. B.* **103**: 10331-10334 (1999).
169. I. W. Hamley, V. Castelletto, J. Fundin, Z. Yang, M. Crothers, D. Attwood and Y. Talmon. Cryo-TEM imaging of block copolymer micelles containing solubilized liquid crystal. *Colloid Polym. Sci.* **282**: 514-517 (2004).
170. Y.-Y. Won, A. K. Brannan, H. T. Davis and F. S. Bates. Cryogenic Transmission Electron Microscopy (Cryo-TEM) of Micelles and Vesicles Formed in Water by Poly(ethylene oxide)-Based Block Copolymers. *J. Phys. Chem. B.* **106**: 3354-3364 (2002).
171. J. L. Burns, Y. Cohen and Y. Talmon. Structure of Cubic Mesomorphic Phases Determined by Low-Temperature Transmission Electron Microscopy and Small-Angle X-ray Scattering. *J. Phys. Chem.* **94**: 5308-5312 (1990).
172. G. Battaglia and A. J. Ryan. Bilayers and interdigitation in block copolymer vesicles. *J. Am. Chem. Soc.* **127**: 8757-8764 (2005).
173. M. Johnsson and K. Edwards. Liposomes, disks, and spherical micelles: aggregate structure in mixtures of gel phase phosphatidylcholines and poly(ethylene glycol)-phospholipids. *Biophys. J.* **85**: 3839-3847 (2003).

174. O. Regev, J.-F. Gohy, B. G. G. Lohmeijer, S. K. Varshney, D. H. W. Hubert, P. M. Frederik and U. S. Schubert. Dynamic light scattering and cryogenic transmission electron microscopy investigations on metallo-supramolecular aqueous micelles: evidence of secondary aggregation. *Colloid Polym. Sci.* **282**: 407-411 (2004).
175. C. J. Rijcken, J. W. Hofman, F. van Zeeland, W. E. Hennink and C. F. van Nostrum. Photosensitiser-loaded biodegradable polymeric micelles: preparation, characterisation and in vitro PDT efficacy. *J. Control. Release.* **124**: 144-153 (2007).
176. O. G. Bjornsson, R. Murphy, V. S. Chadwick and S. Bjornsson. Physicochemical studies on indocyanine green: molar lineic absorbance, pH tolerance, activation energy and rate of decay in various solvents. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* **21**: 453-458 (1983).
177. V. P. Torchilin. Structure and design of polymeric surfactant-based drug delivery systems. *J. Control. Release.* **73**: 137-172 (2001).
178. G. S. Kwon. Polymeric micelles for delivery of poorly water-soluble compounds. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* **20**: 357-403 (2003).
179. D. Attwood and A. T. Florence. In: Surfactant Systems: Their chemistry, pharmacy and biology. Chapman and Hall, London (1983).
180. C. Allen, D. Maysinger and A. Eisenberg. Nano-engineering block copolymer aggregates for drug delivery. *Colloid. Surface B.* **16**: 3-27 (1999).
181. J. Liu, F. Zeng and C. Allen. In vivo fate of unimers and micelles of a poly(ethylene glycol)-block-poly(caprolactone) copolymer in mice following intravenous administration. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **65**: 309-319 (2007).
182. G. S. Kwon and T. Okano. Polymeric micelles as new drug carriers. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **21**: 107-116 (1996).
183. Krüss, Advancing Surface Science: Messung der Oberflächenspannung und CMC Bestimmung (<http://www.kruss.de>)
184. M. Deumie and M. El Baraka. Self-aggregation of R110 and R123 rhodamines with surfactants and phospholipid vesicles of negative charge : a qualitative fluorescence study. *J. Photochem. Photobiol. A* **74**: 255-266 (1993).

185. R. Lietzow. Herstellung von Nanosuspensionen mittels Entspannung überkritischer Fluide (RESSAS). Cuvillier Verlag, In: Bestimmung der Grenzflächenspannung von Tensidlösungen, 71-80 (2006).
186. K. Buszello, S. Harnisch, R. H. Müller and B. W. Müller. The influence of alkali fatty acids on the properties and the stability of parenteral O/W emulsions modified with Solutol HS 15®. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **49**: 143-149 (2000).
187. C. Kraus, W. Mehnert and K.-H. Frömming. Interactions of β -Cyclodextrin with Solutol HS 15 and their Influence on Diazepam Solubilization. *Pharm. Ztg. Wiss.* **4**: 11-15 (1991).
188. P. Opanasopit, M. Yokoyama, M. Watanabe, K. Kawano, Y. Maitani and T. Okano. Influence of serum and albumins from different species on stability of camptothecin-loaded micelles. *J. Control. Release.* **104**: 313-321 (2005).
189. R. Savic, T. Azzam, A. Eisenberg and D. Maysinger. Assessment of the integrity of poly(caprolactone)-b-poly(ethylene oxide) micelles under biological conditions: a fluorogenic-based approach. *Langmuir.* **22**: 3570-3578 (2006).
190. J. Liu, F. Zeng and C. Allen. Influence of serum protein on polycarbonate-based copolymer micelles as a delivery system for a hydrophobic anti-cancer agent. *J. Control. Release.* **103**: 481-497 (2005).
191. C. L. Lo, C. K. Huang, K. M. Lin and G. H. Hsiue. Mixed micelles formed from graft and diblock copolymers for application in intracellular drug delivery. *Biomaterials.* **28**: 1225-1235 (2007).
192. P. Stalmans, E. H. Van Aken, M. Veckeneer, E. J. Feron and I. Stalmans. Toxic effect of indocyanine green on retinal pigment epithelium related to osmotic effects of the solvent. *Am. J. Ophthalmol.* **134**: 282-285 (2002).
193. L. Kodjikian, T. Richter, M. Halberstadt, F. Beby, F. Flueckiger, M. Boehnke and J. G. Garweg. Toxic effects of indocyanine green, infracyanine green, and trypan blue on the human retinal pigmented epithelium. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* **243**: 917-925 (2005).
194. S. Peters, A. Altvater, S. Bopp, R. Vonthein, P. Szurman, M. S. Spitzer, M. Warga, M. Lueke, K. U. Bartz-Schmidt and S. Grisanti. Systematic evaluation of ICG and trypan blue related effects on ARPE-19 cells in vitro. *Exp. Eye Res.* **85**: 880-889 (2007).

195. C. Haritoglou and A. Kampik. [Staining techniques in macular surgery]. *Ophthalmologie*. **103**: 927-934 (2006).
196. S. N. Cheng, T. C. Yang, J. D. Ho, J. F. Hwang and C. K. Cheng. Ocular toxicity of intravitreal indocyanine green. *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* **21**: 85-93 (2005).
197. T. L. Jackson, J. Hillenkamp, B. C. Knight, J. J. Zhang, D. Thomas, M. R. Stanford and J. Marshall. Safety testing of indocyanine green and trypan blue using retinal pigment epithelium and glial cell cultures. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **45**: 2778-2785 (2004).
198. R. Uemoto, S. Yamamoto and S. Takeuchi. Changes in retinal pigment epithelium after indocyanine green-assisted internal limiting lamina peeling during macular hole surgery. *Am. J. Ophthalmol.* **140**: 752-755 (2005).
199. C. Haritoglou, A. Kampik and H. Langhals. II. Indocyanine Green Should Not Be Used to Facilitate Removal of the Internal Limiting Membrane in Macular Hole Surgery. *Surv. Ophthalmol.* **54**: 138-141 (2009).
200. E. Martin and S. Bhakdi. Quantitative analysis of opsonophagocytosis and of killing of *Candida albicans* by human peripheral blood leukocytes by using flow cytometry. *J. Clin. Microbiol.* **29**: 2013-2023 (1991).
201. V. Saxena, M. Sadoqi, J. Shao and S. Kumar. Enhanced Intracellular Uptake of Indocyanine Green by Polymeric Nanoparticulate Delivery Systems. *J. Biomed. Nanotechnol.* **1**: 168-175 (2005).
202. F. Liu and D. Liu. Long-Circulating Emulsions (Oil-in-Water) as Carriers for Lipophilic Drugs. *Pharm. Res.* **12**: 1060-1064 (1995).
203. X. Zhao, D. Chen, P. Gao, P. Ding and K. Li. Synthesis of Ibuprofen Eugenol Ester and Its Microemulsion Formulation for Parenteral Delivery. *Chem. Pharm. Bull.* **53**: 1246-1250 (2005).
204. Tierärztliche Vereinigung für Tierschutz e.V. Merkblatt 74: Empfehlung zur Blutentnahme bei Versuchstieren, insbesondere kleinen Versuchstieren (<http://www.tierschutz-tvt.de>)

205. J. S. Coon, W. Knudson, K. Clodfelter, B. Lu and R. S. Weinstein. Solutol HS 15, non-toxic polyoxyethylene esters of 12-hydroxystearic acid, reverses multidrug resistance. *Cancer. Res.* **51**: 897-902 (1991).
206. P. Ott. Hepatic elimination of indocyanine green with special reference to distribution kinetics and the influence of plasma protein binding. *Pharmacol. Toxicol.* **83**: 1-48 (1998).
207. B. Hollins, B. Noe and J. M. Henderson. Fluorometric determination of indocyanine green in plasma. *Clin. Chem.* **33**: 765-768 (1987).
208. S. Mordon, J. M. Devoisselle, S. Soulie-Begu and T. Desmettre. Indocyanine Green: Physicochemical Factors Affecting Its Fluorescence In Vivo. *Microvasc. Res.* **55**: 146-152 (1998).
209. G. Paumgartner. The handling of indocyanine green by the liver. *Schweiz. Med. Wochenschr.* **105**: 1-30 (1975).
210. L. Huang and M. Vore. Multidrug resistance p-glycoprotein 2 is essential for the biliary excretion of indocyanine green. *Drug Metab. Dispos.* **29**: 634-637 (2001).
211. M. Greulich. Einfluss von Tensiden auf die Resorption von Substraten der ABC-Transportproteine. Naturwissenschaftlich-Mathematische Gesamtfakultät, Ruprecht-Karls-Universität, Heidelberg (2003).
212. R. M. Szeimies, T. Lorenzen, S. Karrer, C. Abels and A. Plettenberg. Photochemotherapy of cutaneous AIDS-associated Kaposi sarcoma with indocyanine green and laser light. *Hautarzt.* **52**: 322-326 (2001).
213. C. Detter, S. Wipper, D. Russ, A. Iffland, L. Burdorf, E. Thein, K. Wegscheider, H. Reichenspurner and B. Reichart. Fluorescent cardiac imaging: a novel intraoperative method for quantitative assessment of myocardial perfusion during graded coronary artery stenosis. *Circulation.* **116**: 1007-1014 (2007).

Publikationen

Posterpräsentationen:

A.K. Kirchherr, A. Briel and K. Mäder. In vitro Characterization of a New Micellar Indocyanine Green Formulation. *BSP-Young Scientist-Poster Session*. Berlin, Deutschland (2008).

A.K. Kirchherr, J. Hütter and K. Mäder. In Vitro and In Vivo Characterization of a New Micellar Formulation for the Optical Contrast Agent Indocyanine Green. *CRS Local Chapter Annual Meeting*. Halle (Saale), Deutschland (2008).

Wissenschaftliche Artikel:

A.K. Kirchherr, A. Briel and K. Mäder. Stabilization of Indocyanine Green by Encapsulation within Micellar Systems. *Mol. Pharmaceutics*. **6**: 480-491 (2009).

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Karsten Mäder für die fachliche Unterstützung und konstruktiven Anregungen bei der Erstellung der Arbeit und für die Aufnahme in den Arbeitskreis der pharmazeutischen Technologie der Universität Halle. Weiterhin danke ich Herrn Dr. Andreas Briel für die Möglichkeit diese Arbeit im Forschungsbereich der Bayer Schering Pharma AG durchführen zu können, für die vielen Anregungen und seine motivierende Betreuung der Arbeit. Herrn Dr. Böttcher von der FU Berlin danke ich für die hervorragenden Kryo-TEM Aufnahmen und Herrn Dr. Schilling von der Firma Nanolytics für die Durchführung der Versuche mit der analytischen Ultrazentrifugation. Der Firma Bayer Schering Pharma AG danke ich für die Überlassung des Arbeitsplatzes und die großzügige finanzielle und materielle Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit.

Weiterhin möchte ich mich ganz herzlich bedanken bei:

- Jessica Lohrke, ohne deren Hilfe und Unterstützung diese Zeit nicht halb so schön und erfolgreich verlaufen wäre
- meinen BSP Kollegen Violetta Sudmann, Nicole Gehrke, Danielle Franke, Bernhard Vos, Matthias Urich und Oliver Schmücker für die tolle Arbeitsatmosphäre, die hilfreichen Gespräche und spaßigen Kaffeepausen
- der Arbeitsgruppe der Pharmazeutischen Technologie in Halle für die freundliche Aufnahme und die lustigen Bierabende
- meinen ehemaligen Kollegen aus der Entwicklung Sascha General, Thomas Trill und Stephan Elze, die meinen Weg bei BSP wesentlich beeinflusst haben und immer an mich geglaubt haben
- Robert Ivkic für die tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung der Tierversuche
- allen namentlich nicht genannten Kollegen und Kolleginnen der Bayer Schering Pharma AG, die auf vielfältige Weise zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben und für viele lustige Feierabendstunden gesorgt haben.

Letzten Endes danke ich meinem Freund und meiner Familie, die mich in allen Lebenslagen immer tatkräftig unterstützt haben.

Curriculum vitae

Persönliche Daten

Name: Anne-Katrin Kirchherr
Geburtstag: 16.06.1980
Geburtsort: Berlin, Deutschland
Nationalität: deutsch

Berufliche Erfahrungen

Seit 04/2009 Wissenschaftliche Mitarbeiterin bei der nanoPET Pharma GmbH, Berlin, Deutschland
10/2001 – 10/2004 Studentische Hilfskraft in der Median Apotheke, Berlin, Deutschland
08/1999 – 09/1999 Werkstudent bei der Schering AG, Berlin, Deutschland

Ausbildung

02/2006 – 02/2009 Promotion bei der Bayer Schering Pharma AG, Berlin in der Abteilung Cardiovascular Imaging & Contrast Media Research unter der Betreuung von Dr. Andreas Briel und Prof. Dr. Karsten Mäder von der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
02/2006 Approbation als Apothekerin
05/2005 – 10/2005 Pharmaziepraktikum bei der Schering AG, Pharmaceutical Development, Drug Delivery Systems, Berlin, Deutschland
11/2004 – 04/2005 Pharmaziepraktikum in der Median Apotheke in Berlin, Deutschland
04/2000 – 09/2004 Pharmaziestudium an der Freien Universität Berlin, Deutschland
10/1999 – 03/2000 Chemiestudium an der Freien Universität Berlin, Deutschland
09/1992 – 06/1999 Friedrich-Schiller Gymnasium Berlin, Deutschland (Abitur)

Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich gemäß § 5 (2) der Promotionsordnung der Naturwissenschaftlichen Fakultät I - Biowissenschaften der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, dass ich die Ergebnisse der vorliegenden Dissertationsarbeit

**Entwicklung und Charakterisierung neuer
kolloidaler Formulierungen für
Indocyaningrün als Kontrastmittel
für die optische Bildgebung**

bei der Bayer Schering Pharma AG unter der Betreuung von Dr. Andreas Briel und am Institut für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Karsten Mäder selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst und nur die in der Arbeit angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Die aus anderen Werken wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen wurden als solche kenntlich gemacht.

Weiterhin habe ich diese Arbeit bisher an keiner in- oder ausländischen Fakultät als Dissertationsschrift vorgelegt.

Halle (Saale), 15. Juli 2009

Anne-Katrin Kirchherr