

FRAUNHOFER-INSTITUT FÜR KERAMISCHE TECHNOLOGIEN UND SYSTEME IKTS

BIOAKTIVER KARDIOVASKULÄRER STENT ZUR BEHANDLUNG VON ATHEROSKLEROSE UND ZUR VORBEUGUNG VON RESTENOSE

Degradation von Stents und funktionalisierte Nanodiamanten

Anita Stoppel, Aidee Itandehui Garcia-Zintzun, Dr. Muhammad Saqib, Dr. Natalia Beshchasna

Fraunhofer-Institut für Keramische Technologien und Systeme IKTS
Maria-Reiche-Straße 2, 01109 Dresden

Projekträger/Auftraggeber: Deutsches Zentrum für Luft- und Raumfahrt e.V. (DLR), DLR-Projekträger
Internationales Büro
Heinrich-Konen-Straße 1
53227 Bonn

Förderkennzeichen/Auftragsnummer: 01DJ21012
Zuwendungsbescheid/Auftrag vom: 19.07.2021
Unsere Projektnummer: 10-00741

Dresden, 31.01.2025

Externe Freigabe

Projektleiter

Projektmitarbeiter



Zusammenfassung

Atherosklerose, eine systematische degenerative Erkrankung im Zusammenhang mit der Bildung von Plaques in menschlichen Gefäßen, bleibt die Hauptursache für Morbidität und Mortalität im Bereich der kardiovaskulären Gesundheitsprobleme mit der Sterblichkeitsrate von 55%. Die Implantation von Stents ist eine übliche Methode, verengte oder verschlossene Blutgefäße für den Blutfluss zu öffnen. Sie hat das Risiko von Komplikationen und Restenosen deutlich gesunken. Allerdings existiert noch keine wirksame Therapie zur Entfernung von atherosklerotischen Plaques in menschlichen Gefäßen und die Verengung der Blutgefäße ist jedoch auch bei Stentimplantation immer noch ein medizinisches Problem, dem mit der Beschichtung der Stents begegnet werden soll.

CARANAT zielt auf die Entwicklung, Charakterisierung und Untersuchung einer neuen Generation von bioaktiven Stents ab, die in der Lage ist, mit dem Cholesterin der atherosklerotischen Plaque in einem menschlichen Blutgefäß zu interagieren und deren Abbau und Verstoffwechslung auszulösen. Das Ziel des Teilprojektes IKTS besteht darin, eine chemische Funktionalisierung von Nanodiamanten (DND) zu entwickeln, die mit lipophilen organischen Gruppen den Abtransport von Cholesterin fördert. In Kooperation mit den anderen Projektpartnern arbeitet IKTS an der Definition des Anforderungsprofils an die Stentbeschichtung, Spezifikation und ihrer regelmäßigen Aktualisierung. Um das Abbauverhalten der Stentbeschichtungen *in vitro* zu untersuchen, wird ein Konzept eines experimentellen, modellbasierten Flüssigkeitszirkulationssystems am Fraunhofer IKTS entwickelt und angewendet. Die Stents werden unter isothermen und isobaren Bedingungen und pulsierendem Strömungsprofil einer künstlichen Körperflüssigkeit ausgesetzt.

Der Bericht stellt die wesentlichen wissenschaftlichen und technischen Ergebnisse aus der Bearbeitung des Teilprojektes des Fraunhofer IKTS dar. Der Bericht bezieht sich auf den Projektzeitraum 01.08.2021 – 31.07.2024.

Keywords

Atherosklerose, Plaque, kardiovaskulärer Stent, Stent-Beschichtung, Biokompatibilität, Biodegradation, Nanopartikel, Nanodiamant.

1 Darstellung der wichtigsten wissenschaftlich-technischen Ergebnisse

1.1 Aufgabenübersicht

Zu den Hauptaufgaben des IKTS im Verbundvorhaben gehört

- **Im Arbeitspaket 3: Chemische Funktionalisierung von Nanopartikeln**
 - Chemische Funktionalisierung von DND entsprechend Funktionalisierungsschema zum Abtransport von Cholesterin mit lipophilen organischen Gruppen
 - Abscheidung organischer Rückstände mittels kovalenter Modifikation von Diazoniumsalzen
 - Untersuchung der funktionellen Oberflächengruppen mit FTIR und thermogravimetrischer Analyse
 - Kontaktwinkelmessung zur Bestimmung der Benetzbarkeit der Endbeschichtung
 - Analytische Titration zur Bewertung der Oberflächenbelastbarkeit
 - Untersuchung der Stabilität der Beschichtungen und Kinetik der ND-Freisetzung mithilfe von UV/Vis- und Fluoreszenzspektroskopie, vitro-fluiddynamischen Tests, SEM und dynamischer Lichtstreuung.
- **Im Arbeitspaket 4: Entwicklung einer biologisch abbaubaren Stent-beschichtung mit eingebeteten Nanopartikeln (in Kooperation mit Konsortiumpartnern)**
 - Entwicklung von biologisch abbaubaren Kompositbeschichtungen auf der Basis von Polylaktid (PLA) oder Polycaprolacton (PCL) und dem Einbau von funktionalisierten DND
 - Bestimmung einer geeigneten ND-Konzentration zur physikalisch-chemischen und mechanischen Eigenschaftsoptimierung sowie zur gewünschten biologischen Aktivität
 - Vergleich der Eigenschaften der Beschichtungen in unterschiedlichen Konzentrationen
 - Herstellung der Proben in folgenden Schritten
 - Entwicklung der Technologie für die Herstellung von homogenen Kompositen aus NP und Polymer unter Verwendung von Ultraschalldispersion
 - Auswahl der Parameter für die Beschichtungsabscheidung (aerodynamische, geometrische Parameter, thermische Parameter (Heizen-Kühlen), um eine Beschichtung ohne Tropfen, mit guter Haftung und optimaler Dicke zu erreichen, Kofferdämme, Inhomogenitäten und Delamination zu vermeiden, während die homogene Verteilung von NP im gesamten Volumen der Polymermatrix gewährleistet ist
 - Untersuchung der physikalisch-chemischen Eigenschaften der Beschichtungen
 - Optische Analyse zur Untersuchung der Stentpolymerzusammensetzung und aufgetragenen Schichtdicke des Stent-Polymer-NP-Systems durch Licht- und SEM-Untersuchungen
 - Durchführung von Röntgenbild Strukturanalyse, FTIR-Spektroskopie, Thermogravimetrie, Differential-Scanning-Kalorimetrie, Prüfung der Beschichtung nach Stent-Deformation (Crimpen, Dilatation), sowie *in vitro*- und *in vivo*-Studien zur weiteren Charakterisierung.

- **Im Arbeitspaket 5: Versuchsaufbau und Experimente zur Untersuchung der in-vitro-Degradation**
 - Entwicklung und Anwendung eines experimentellen, modellbasierten Flüssigkeitszirkulationssystems zur Untersuchung des Abbauverhaltens der Stentbeschichtungen *in vitro*
 - Untersuchung der Stents in einer künstlichen Körperflüssigkeit (künstliches Blutplasma, Hank's Balanced Salt Solution, Dulbecco's Modified Eagle Medium, Eagle's Minimum Essential Medium) unter isothermen und isobaren Bedingungen und pulsierendem Strömungsprofil
 - Durchführung von Mittel- und Langzeitexperimenten (bis zu 3 Monate) sowie beschleunigte Tests unter verschiedenen Belastungsfaktoren
 - Periodische Probenentnahme aus dem fluidischen System für eine detaillierte Bildanalyse, Massenverlustuntersuchungen (gravimetrische Analyse) und Abschätzung der wichtigsten Materialeigenschaften (chemische Veränderungen, mechanische Eigenschaften des gesamten Stents, Dicke der verbleibenden Beschichtung, Kristallinitätsgrad etc.) zur Überwachung des Degradationsprozesses
 - Einsatz von Energiedispersive Röntgenanalyse (EDX), Röntgenphotoelektronenspektroskopie (XPS), XRD, FTIR und Raman-Spektroskopie
 - Durchführung von ICP-MS-Experimenten zur Untersuchung von chemischen Veränderungen
 - Korrelation zwischen den Ergebnissen der Degradationstests und die Untersuchung des Plaqueauflösungsvermögens in AP6
 - Erstellung von Degradationsprofilen der Stentoberflächen.

1.2 Stand der Arbeiten im Arbeitsplan IKTS

Alle Arbeiten haben einen guten Stand der Bearbeitung. Es bestehen gute Aussichten innerhalb des verbleibenden Zeitraums die Bearbeitung des Projektes erfolgreich abzuschließen. In der nachfolgenden Tabelle (Abb. 1) sind die Arbeitspakete mit Status aufgelistet

| Arbeitspaket | Status |
|--|---------------|
| AP3 Chemische Funktionalisierung von Nanopartikeln | abgeschlossen |
| AP4 Entwicklung einer biologisch abbaubaren Stent-beschichtung mit eingebetteten Nanopartikeln | abgeschlossen |
| AP5 Versuchsaufbau und Experimente zur Untersuchung der in-vitro-Degradation | abgeschlossen |

Abb.1 Status der Bearbeitung von Arbeitspaketen IKTS

1.3 Beschreibung der Projektergebnisse in den Arbeitspaketen IKTS

1.3.1 Arbeitspaket 3: Chemische Funktionalisierung von Nanopartikeln

1.3.1.1 Verwendung von Nanopartikeln für biomedizinische Anwendungen

Herz-Kreislauf-Erkrankungen

Herz-Kreislauf-Erkrankungen sind nach wie vor die häufigste Todesursache weltweit (EUROSTAT, 2009). Sie umfassen eine Vielzahl von Problemen, die das Kreislaufsystem betreffen; allein im Jahr 2016 gab es in der Europäischen Union 1,38 Millionen Todesfälle im Zusammenhang mit kardiovaskulären Erkrankungen, was 35,7 % aller Todesfälle

weltweit und 37,2 % in Deutschland entspricht (Wilkins et al., 2017). Die Mehrzahl der Todesfälle steht im Zusammenhang mit der obstruktiven koronaren Herzkrankheit (KHK). Die koronare Herzkrankheit ist die Verengung oder Obstruktion einer oder mehrerer Koronararterien die für die Blutversorgung des Herzmuskels verantwortlich sind (Bowen et al., 2016). Eine allmähliche Obstruktion der Blutgefäße wird in der Regel durch Atherosklerose verursacht (Hansson, 2005). Je nach dem Schweregrad der Erkrankung gibt es viele Möglichkeiten der Behandlung. Dazu gehören oral verabreichte Medikamente, Angioplastie, Stentimplantation, Katheterisierung, Atherektomie und Bypass-Operation (de Mel et al., 2008; laizzo, 2015).

Atherosklerose ist ein chronischer Entzündungszustand, bei dem sich die Arterienwände aufgrund von Immunzellen, Fett und Cholesterinablagerungen, entlang der Arterien ansammeln (Lobatto et al., 2011; Sanchez-Gaytan et al., 2015). Es handelt sich in erster nie um einen lipidgesteuerten Mechanismus, der durch die Anhäufung von Lipoprotein-Partikeln niedriger Dichte und Restlipoprotein sowie einen aktiven Entzündungsmechanismus in den arteriellen Schwerpunktbereichen (Pahwa und Jialal, 2020). Diese Plaques können verkalken, an Größe zunehmen, die Arterie verstopfen und die Sauerstoff- und Nährstoffzufuhr des Blutes behindern (laizzo, 2015). Wenn die Läsionen ausreichend groß werden, kann es zu einer akuten Verstopfung durch eine Plaqueruptur auftreten, die einen Thrombus bildet, der zu einem Infarkt oder Schlaganfall führen kann (Frias et al., 2004).

Das initiiierende Element der Atherogenese ist die Ansammlung von Lipoproteinpartikeln, die ApoB enthalten, in der Arterienwand. Zu den schädlichen lokalen Auswirkungen der Partikelretention gehört nicht nur die Aggregation der in den Partikeln enthaltenen Lipidmoleküle, sondern auch eine verlängerte Anfälligkeit dieser Partikel für lokale Enzyme und andere Faktoren in der Gefäßwand. Dadurch wird ihre Retention erhöht, und Makrophagen und glatte Gefäßmuskelzellen nehmen das Protein-Lipid-Material auf, was zur Entwicklung von Schaumzellen und letztlich zum Wachstum atherosklerotischer Plaques beiträgt (Ala-Korpela, 2019).

Kardiovaskuläre Operationen, Herzoperationen und Angioplastie sind Techniken zur Behandlung von arteriosklerotischen Gefäßschäden und zur Öffnung oder Erweiterung von Blutgefäßen, die im Allgemeinen eine langanhaltende Wirkung auf den Empfänger haben. In einigen Fällen können diese Behandlungen Nebenwirkungen haben, die eine Verengung des Gefäßes oder eine Restenose begünstigen. Restenose ist ein weit verbreitetes Problem im Zusammenhang mit dem erneuten Auftreten einer Stenose, einer Verengung der Blutgefäße als Reaktion auf eine mechanische Beschädigung, die zu neointimaler Hyperplasie und einem Umbau der Gefäßwände führt, was wiederum eine Entzündung und einen verminderten Blutfluss zur Folge hat (Lobatto et al., 2011). Neointimale Hyperplasie ist das Wachstum und die Invasion von glatten Gefäßmuskelzellen in der Tunica intima, die zu einer Verdickung der Arterienwände führt und somit das Lumen der Arterie verengt, und die Hauptursache für Restenose nach Koronarchirurgie wie Angioplastie oder Stenting ist (laizzo, 2015; Libby et al., 2011; Prabhu und Hossainy, 2007).

Für die Durchführung von interventionellen Verfahren zur Behandlung koronarer Herzkrankheiten sind spezielle medizinische Instrumente erforderlich. Bei der koronaren Angioplastie wird die Arterie mit Hilfe von Ballonkathetern aufgeblasen und wieder geöffnet, so dass der natürliche Blutfluss wieder möglich wird. Eine weitere gängige Technik ist die Verwendung von Koronarstents, die eingesetzt werden, um eine Arterienverengung zu verzögern oder Atherosklerose zu behandeln (siehe Abbildung 2).

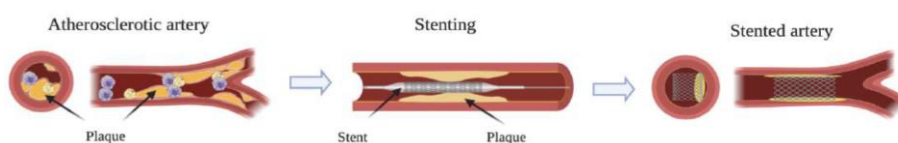


Abb.2 Schematische Darstellung einer atherosklerotischen Arterie und des Stenting-Verfahrens

Nanodiamanten

Die aktuelle Forschung konzentriert sich auf verbesserte Stent-Beschichtungen, die es ermöglichen, dass Stents als Vektoren für die lokale Verteilung von Medikamenten dienen und als induktives Gerüst für die endotheliale Reparatur fungieren können. Die Integration von Mikro- und Nanotechnologie in der Stentarchitektur könnte die Vielseitigkeit der lokalen Medikamentenfreisetzung erhöhen und das Potenzial für eine gezielte Therapie am implantierten Stent aufzeigen. Die Modifizierung der Stentoberfläche könnte auch zu Veränderungen der Eigenschaften der Blutinteraktion und der Medikamentenverteilung führen, um die Restenose zu verringern und die Endothelialisierung zu beschleunigen (Moravej und Mantovani, 2011).

Der Schwerpunkt liegt auf Nanopartikeln und Nanogeräten für ein breites Spektrum biomedizinischer Anwendungen wie Bildgebung, Tissue Engineering, Kosmetik, Pharmazie, Medikamentenabgabe und antimikrobielle Beschichtungen (Choi et al., 2009). Nanopartikel haben verschiedene Eigenschaften und unterschiedliche Funktionalitäten mit Variationen in (1) Größe, die von einigen zehn Nanometern bis hin zu Partikeln im Mikrometerbereich reichen; (2) Formen, die von klassischen kugelförmigen Partikeln bis hin zu zylindrischen und konischen Partikeln reichen; (3) Oberflächenfunktionalisierungen mit einer Vielzahl von elektrostatischen Ladungen und biomolekularen Konjugationen (Godin et al., 2010).

Diamant-Nanopartikel nehmen eine besondere Nische unter den Nanomaterialien ein, da sie eine Kombination aus ausgezeichneter mechanischer Belastbarkeit, chemischer Beständigkeit, dynamischer Oberflächenchemie, Biokompatibilität und einzigartigen optischen und elektronischen Eigenschaften aufweisen (Nunn et al., 2017). Es besteht ein wachsendes Interesse an Nanodiamanten als mögliche Alternative für die Verbesserung von biomedizinischen Anwendungen.

1960 wurden Nanodiamanten (ND) erstmals durch Detonation mittels Graphitstoßkompression synthetisiert. Kommerziell erhältliche Nanodiamanten können heutzutage durch verschiedene Methoden gewonnen werden: unterstützte chemische Gasphasenabscheidung, Hochenergie-Kugelmahlen bei hohem Druck und hoher Temperatur, Ionenbestrahlung von Grafit, Laserablation, Autoklavensynthese aus überkritischen Flüssigkeiten, Chlorierung von Carbiden, aber die häufigste Methode ist die Detonation. Detonations-ND werden mit Sprengstoffen wie 2,4,6-Trinitrotoluol (TNT) und 1,3,5-Trinitro-1,3,5-Triazacyclohexan (RDX) in Gegenwart von N_2 , CO_2 und festem H_2O in einer geschlossenen Metallkammer hergestellt. Die erhaltenen Nanopartikel haben eine Größe von 4-5 nm, was klein genug ist, um in den menschlichen Körper einzudringen (Danilenko, 2004; Mochalin et al., 2012).

Detonations-ND sind im Handel als Pulver mit einer durchschnittlichen Einheitsgröße von 4-5 nm erhältlich und können kostengünstig und in großen Mengen synthetisiert werden. Im Gegensatz dazu weisen ihre Partikel- und Filmformen eine hohe Biokompatibilität und geringe Toxizität auf. (Busch et al., 2014; Jeewandara et al., 2014).

Weitere nützliche Eigenschaften von NDs sind ihre große funktionelle Oberfläche (300 bis 400 m^2/g) und ihre hohe Affinität zur Adsorption von Proteinen, Enzymen und anderen biologischen Molekülen. Gut kontrollierte Größen und Formen können das Potenzial für die Verabreichung von Medikamenten in biologischen Anwendungen verbessern (Schrand et al., 2009). Auf der DND-Oberfläche finden sich verschiedene funktionelle Gruppen, darunter Wasserstoff-, Carboxyl-, Hydroxy-, Keton-, Lacton- und manchmal auch Alkylgruppen. Diese Gruppen können über intermolekulare Oberflächenkräfte wie van der Waals, Dipol-Dipol-Wechselwirkungen, Wasserstoff und kovalente Bindungen miteinander interagieren und Kernaggregate bilden. Diese funktionellen Gruppen können modifiziert werden, oder es können neue Gruppen angefügt werden (Badea und Kaur, 2013).

Es wurde eine Vielzahl von Funktionalisierungsverfahren entwickelt, um Oberflächengruppen an NDs anzubringen, unter anderem Aminofunktionalitäten für die Bioanwendung und die Anbringung von Biotin, Streptavidin und Peptidnukleinsäuren. Diese und viele andere Eigenschaften zeigen, dass NDs in einer Vielzahl von Klassen verwendet werden können und auch für zukünftige Implementierungen in verschiedenen Umgebungen ideal sind (Nunn et al., 2017).

Nanodiamanten sind ein aussichtsreiches Material für biologische Anwendungen im Allgemeinen, da sie mechanisch und chemisch stabil sind und nur in sehr geringem Maße unspezifisches biologisches Material an ihrer Oberfläche adsorbieren. Im Vergleich dazu gelten Diamantverbindungen als wenig oder gar nicht schädlich für lebende Zellen, so dass es möglich ist, das Material für Implantatbeschichtungen und andere biologische Anwendungen zu nutzen (Krüger et al., 2006).

In der Natur sind High-Density-Lipoproteine (HDL), bestehend aus Apolipoprotein A1 (apoA1) und Phospholipiden, die einen Kern aus Cholesterinestern und Triglyceriden umgeben, dafür verantwortlich, überschüssiges zelluläres Cholesterin aus den peripheren Geweben zu entfernen und zurück zur Leber zu transportieren, und zwar in einem atheroprotektiven Prozess, der als reverser Cholesterintransport (RCT) bezeichnet wird. Es wird angenommen, dass der RCT ein Schutzmechanismus gegen Herz-Kreislauf-Erkrankungen ist. Die Erhöhung des HDL-Spiegels ist eine vielversprechende therapeutische Strategie zur Vorbeugung und möglichen Umkehrung der Atherosklerose durch die Erhöhung des RCT.

Der Hauptzweck der hergestellten, modifizierten Nanodiamanten ist die Nachahmung der HDL-Cholesterin-Wechselwirkung, die im menschlichen Blut, während der RCT natürlich auftritt. Es ist davon auszugehen, dass die modifizierten NanopartikelND,s aufgrund des biologischen Abbaus der Beschichtung von der Oberfläche der Stents eluiert werden und den Cholesterinausfluss erleichtern.

1.3.1.2 Chemische Funktionalisierung von Nanopartikeln

Chemische Funktionalisierung von Nanodiamanten

Nanodiamanten sind ein kostengünstiges und vielversprechendes Material für medizinische und biologische Anwendungen, das in großem Maßstab synthetisiert werden kann und über hervorragende optische Eigenschaften und eine einzigartige Struktur verfügt. Ihre Oberflächenchemie ist die Grundlage für die Funktionalisierung, da sie mehrere kovalente Abschlüsse auf ihrer Oberfläche enthalten, doch sind für praktische Anwendungen möglicherweise bestimmte Modifikationen erforderlich. Diverse biomedizinische Anwendungen wie die Verabreichung von Medikamenten und Bio-Imaging hängen von der Modifizierung der Oberfläche ab und können durch die Verteilung, Stabilität und Art der chemischen Funktionalisierung beeinflusst werden (Lai und Barnard, 2015).

Um NDs funktionalisieren zu können, muss die Ausgangsoberfläche modifiziert werden. Diese Veränderung kann mit verschiedenen Techniken erfolgen. In dieser Arbeit wird die Oberflächenchemie durch Oxidations- und Reduktionstechniken verändert. Um eine einheitliche Schicht von COOH-Gruppen auf der Diamantoberfläche zu erzeugen, ist eine maximale Oxidation erforderlich, die mit Hilfe der Luftoxidationstechnik durchgeführt wird. Eine weitere Reduktion bestehender Oberflächengruppen, die C=O-Gruppen wie Ketone tragen, ist notwendig. Die OH-Gruppen könnten dann für weitere Reaktionen genutzt werden. Diese Reduktion der Säuregruppen wird mit der Boran-Reduktionsmethode durchgeführt. Nach den Oxidations- und Reduktionsschritten erfolgt die abschließende Funktionalisierung der Nanodiamanten, um aromatische Gruppen auf der Oberfläche durch Arylierung einzuführen. Die erfolgreiche Modifizierung der ND wird mit Hilfe der Fourier-Transformierten-Infrarot-Spektroskopie bewertet.

Die Oberfläche von Detonation ND weist eine Vielzahl von funktionellen Gruppen auf, die ihr Biofunktionspotenzial verringern. Da die ursprüngliche Oberflächenbeschaffenheit die Qualität des endgültigen funktionalisierten Materials und dessen Anwendungen beeinflusst, muss die Oberfläche der Nanopartikel möglichst homogen sein. In dieser Arbeit wurden unbehandelte ND einer Trockenoxidation und Hydroxylierung unterzogen, um vor der endgültigen Funktionalisierung mit aromatischen Diazoniumsalzen eine homogene Oberfläche zu erhalten.

Oxidation der Nanodiamanten

Um eine homogene Schicht von COOH-Gruppen auf der Nanodiamantenoberfläche zu erzeugen, wird das Verfahren der Hochtemperatur-Luftoxidationstechnik angewandt. Dazu wurde eine Schicht unbehandelter Nanodiamanten (ND) in Keramikschaalen gefüllt, so dass der Boden weitgehend bedeckt war, und in einen Hochtemperaturofen gegeben. Es wurden mehrere Keramikschaalen verwendet, um eine Anhäufung der Nanodiamanten in einer dicken Pulverschicht zu vermeiden und damit die Chance zu erhöhen, dass die Nanodiamanten der Luftoxidation in höherem Maße ausgesetzt werden. In jede Schale (Durchmesser: ca. 6 cm) wurden ca. 800 mg detonierte Nanodiamanten, wie in Abbildung 3a, gegeben. Die Oxidation erfolgte in einem HTK 17/17-Ofen durch Ausglühen an der Umgebungsluft bei 415° C für 5 Stunden mit einer Heizrate von 20 K/min. Die Oxidation erfolgt auf diesem Wege jedoch nur unzureichend. Manche funktionellen Gruppen, wie zum Beispiel tertiäre Alkohole sind der Oxidation nicht zugänglich. Aus diesem Grund wird zusätzlich zur Oxidierung eine Reduktion zur Erzeugung einer homogenen Oberfläche durchgeführt.

Hydroxylierung der Nanodiamanten

Um die Menge an OH-Gruppen an der Oberfläche der Nanodiamanten zu erhöhen wurde die Hydroxylierung nach dem Protokoll der Boranreduktion durchgeführt, das zuvor von Krüger et al. (2006) und Edington et al. beschrieben wurde. Durch den Einsatz von Boran als Reduktionsmittel ist es möglich, die vorhandenen Carbonylgruppen beinahe vollständig in Alkoholfunktionen umzuwandeln. In einem Rundkolben wurden 2 g oxidierte Nanodiamanten (ND-COOH) in 120 ml trockenem Tetrahydrofuran (THF) suspendiert. 5 ml 1,0 M Borantetrahydrofuran (BH₃ • THF) wurden tröpfchenweise unter Rühren hinzugefügt. Um ein Sieden der Mischung zu verhindern, wurde der Kolben mit der ND-Suspension mit einem Glaskondensator verbunden und dann mit Hilfe von Kühlerhaltern über einem Ölbad fixiert, wie in Abbildung 3b zu sehen ist. Das Gemisch wurde 24 Stunden lang in einer inerten Umgebung (Stickstoff) bei 64 °C unter Verwendung des Ölbad zur Temperaturerhaltung refluxiert.

Anschließend wurde das Gemisch nach Abkühlung auf Raumtemperatur mit 2 M HCL hydrolysiert, bis die Wasserstoffentwicklung beendet war und keine deutlichen Luftblasen mehr zu sehen waren. Das feste Produkt wurde mittels Zentrifugierung isoliert. Anschließend wurden die hydroxylierten Nanodiamanten (ND-OH) viermal mit ultrareinem Wasser (ddH₂O) und dreimal mit Aceton gewaschen. Jeder Waschzyklus umfasste eine 10-minütige Resuspendierung mit Ultraschall, eine 30-minütige Zentrifugation bei 15000 U/min und den Austausch des Überstands durch frisches Lösungsmittel. Die Probe wurde über Nacht im Vakuumexsikkator getrocknet



Darstellung der wichtigsten wissenschaftlich-technischen Ergebnisse

Abb.3 Versuchsaufbau zur a) Oxidation b) Hydroxylierung. c) Arylierung

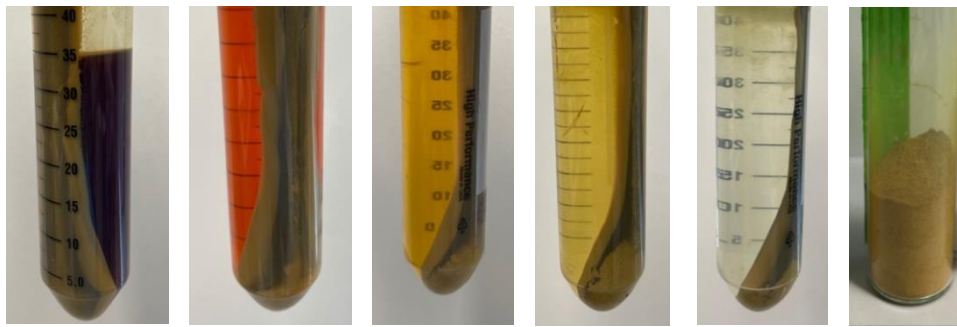
Arylierung der Nanodiamanten

Nachdem durch Homogenisierung eine einheitliche Oberfläche zur Verfügung steht, kann diese gezielt durch Arylierung modifiziert werden. Durch eine Diazoniumsalzreaktion werden aromatische Gruppen an die Oberfläche gebunden. Die Arylierung von Diamantpulver erfolgte durch Zugabe von 10 g Aminobenzoesäure und 5 mL Amylnitrit zu 10 mL einer wässrigen Diamantsuspension, die 1,5 g Diamant enthielt. Amylnitrit wurde für die In-situ-Erzeugung von Diazoniumsalzen verwendet (Liang et al. 2009). Das von der Aminobenzoesäure abgeleitete Diazoniumsalz wurde über die Click-Chemie-Methode (Poonthiyil et al. 2018) an die NDs konjugiert, wobei die Suspension 15 Stunden lang bei 80 °C auf einer Heizplatte gerührt wurde, wie in Abbildung 3c zu sehen.

Das im obigen Abschnitt beschriebene Waschverfahren wurde nach dem Abkühlen durchgeführt. Bis zu 5 Waschzyklen in Wasser und 15 in Aceton waren nötig, um nach der Zentrifugation einen transparenten Überstand zu erhalten und sicherzustellen, dass überschüssige Aminobenzoesäure und andere Reste entfernt wurden. Abbildung 4 zeigt den Überstand nach unterschiedlicher Anzahl von Waschzyklen. Dieser war zunächst dunkelrot bis bräunlich und veränderte sich mit mehrmaligem Waschen hin zu gelb, bis er schließlich transparent war. Nach dieser Prozedur wurden die arylierten Nanodiamanten über Nacht in einem Vakuum-Exsikkator getrocknet. Nach dem Trocknen wurde das ND-Pulver durch Zerkleinern der agglomerierten Probe in einem nicht reaktiven Stößel hergestellt, wie in Abbildung 4a dargestellt.



Abb.4a Herstellung von ND-Pulver durch Zerkleinern der agglomerierten Probe in einem nicht reaktiven Stößel



Darstellung der wichtigsten
wissenschaftlich-technischen
Ergebnisse

Abb.4b Arylierte Nanodiamanten und Überstand nach dem Zentrifugieren von links nach rechts: nach jeweils einem, zwei, fünf, zehn und zwanzig Waschzyklen sowie finale getrocknete arylierte Nanodiamanten

Deagglomeration der Nanodiamanten

Die Partikelgröße von Detonations-Nanodiamanten liegt zwischen 4 und 5 nm, aber sie aggregieren in der Regel zu großen Agglomeraten, die eine Größe im Mikrometerbereich erreichen können. Wie zuvor beschrieben, besitzen NDs eine große Oberfläche, die von einer Vielzahl funktioneller Gruppen bedeckt ist. Diese Oberflächengruppen einer ND interagieren und verbinden sich mit funktionellen Gruppen benachbarter NDs durch verschiedene Arten von intermolekularen Wechselwirkungen wie van der Waals, Dipol-Dipol- und Wasserstoffbrückenbindungen (Badea, 2013). Zusätzlich können kovalente Bindungen zwischen Primärteilchen gebildet werden, die so genannte Kernagglomerate bilden. Hauptgrund für die Agglomeration sind elektrostatische Kräfte die durch entgegengesetzt geladene Facetten polyedrisch geformter NDs hervorgerufen werden (Chang, 2011).

Wie bereits erwähnt, sind große ND-Agglomerate für ihre Verwendung in biomedizinischen Anwendungen nicht wünschenswert, da sie die Fähigkeit dieser Partikel behindern können, biologische Barrieren zu überwinden und ihr beabsichtigtes Ziel zu erreichen, um den beabsichtigten therapeutischen Zweck zu erreichen. In diesem Fall zeigten die DLS-Ergebnisse das Vorhandensein von Agglomeraten mit einer Größe von mehreren 100 nm in der carboxylierten ND-Probe, so dass zwei Deagglomerationstechniken separat getestet wurden, um diese großen Agglomerate zu beseitigen. Es ist erwiesen, dass die Deagglomeration von NDs nicht durch einfache Bad-Ultraschallbehandlung erreicht werden kann (Krüger, 2005), weshalb drei fortschrittlichere Techniken mit nachgewiesener Wirksamkeit zur Deagglomeration von NDs eingesetzt wurden: Salzunterstützte Oxidation (SAAO), Salzunterstützte Ultraschalldeaggregation (SAUD), Sonden-Ultraschallbehandlung und Purifikation mit HCL. Die versuchte Deagglomeration wurde bewusst im ersten Schritt der Funktionalisierung angesetzt, damit weitere Funktionalisierungen homogen über die ganze Oberfläche der separaten ND erfolgen kann und nicht bloß an den äußeren Kanten der Agglomerate stattfindet. Zwei der Verfahren wurden bereits vor bzw. während dem ersten Funktionalisierungsschritt (Oxidation) angewandt, die anderen beiden danach. Die unterschiedlichen Verfahren wurden durchgeführt und bereits zu Teilen untersucht. Ein ganzheitlicher Vergleich ist im nächsten Schritt geplant, nachdem alle ND mittels DLS auf ihre Partikelgröße bestimmt wurden.

Salzgestützte Luftoxidation

Die NDs wurden einer salzunterstützten Luftoxidationsbehandlung (SAAO) unterzogen, um die graphitische Schale und die amorphen Kohlenstoffspuren auf den Partikeln zu reduzieren. Darüber hinaus ist diese Behandlung nützlich, um die Oberflächenchemie der NDs zu homogenisieren, indem ein Großteil der Carboxylgruppen auf ihrer Oberfläche eingeführt wird (Zhang, 2021). Bei der SAAO-Behandlung werden NaCl-Kristalle mit NDs gemischt und das Gemisch einige Stunden lang in einer sauerstoffhaltigen Atmosphäre Temperaturen zwischen 400 und 500 °C ausgesetzt. Das NaCl erzeugt beim Erhitzen eine "Ätzatmosphäre", die die Oxidation der NDs beschleunigt und die Kohlenstoff- und

Metallverunreinigungen auf der Oberfläche der NDs ätzt. Sie soll vor allem der Deagglomeration der ND dienen und zusätzlich eine glattere Oberfläche erzeugen. Als Ausgangsmaterial dienen 140 nm große Detonations-Nanodiamanten mit einem negativen Zetapotenzial von 2 % Asche, die von Adámas Nanotechnologies bezogen wurden. Die NDs in Pulverform wurden mit NaCl in Laborqualität (Carl Roth) in einem Massenverhältnis von 1:5 (NDs:NaCl) gemischt. Das Gemisch wurde in Keramiktiegeln deponiert und an der Luft bei 415 °C 5 Stunden lang erhitzt. Das Gemisch wurde bei Raumtemperatur abgekühlt und anschließend gewogen, um den Masseverlust nach der thermischen Behandlung zu berechnen. Die Mischung wurde in Reinstwasser (Direct-Q 3 UV von Merck Millipore) dispergiert und in einem Wasser-Ultraschallgerät (Bandelin Sonorex RK 100) bei 45 kHz für 1 Stunde bei Raumtemperatur beschallt. Dann wurden die NDs gewaschen, um das NaCl in der Probe zu entfernen mit ultrareinem Wasser durch Zentrifugation mit einer Sigma 3-16p Zentrifuge (Sigma Laborzentrifugen GmbH) wie folgt: 1000 RCF für 5 min., 3000 RCF für 5 min., 8000 RCF für 10 min. und 8000 RCF für 20 Min. Der Überstand wurde nach jedem Zentrifugationsschritt aufgefangen und die NaCl-Konzentration wurde mit einer Standardtitrationmethode für die Quantifizierung von Chloridionen, der so genannten Mohr'schen Titration, gemessen. Das Präzipitat der Probe wurde 48 Stunden lang in einem Exsikkator getrocknet. Um mit den nächsten Schritten im Funktionalisierungsschema der NDs fortzufahren, muss der NaCl-Gehalt entfernt werden. Um sicherzustellen, dass kein NaCl mehr mit den NDs vermischt ist, wurde eine Analysetechnik, die so genannte Mohrsche Titration, verwendet, um den NaCl-Gehalt des Überstandes nach jedem Zentrifugationsschritt im ND-Waschprozess zu quantifizieren.



Abb.5 Mohrsche Titration

Die Mohrsche Titration ist eine analytische Standardmethode, die die Quantifizierung von Chloridionen in einer Lösung unter Verwendung einer Silbernitratlösung (AgNO_3) als Titriermittel und einer Kaliumchromatlösung (K_2CrO_4) als Indikator ermöglicht. Die Ag^+ -Ionen aus AgNO_3 reagieren bevorzugt mit den Cl^- -Ionen von NaCl in der Lösung und bilden AgCl , einen weißen Niederschlag. Wenn dann keine freien Cl^- -Ionen mehr in der Lösung vorhanden sind, reagiert Ag^+ mit den Chromat-Ionen aus Kaliumchromat und bildet Ag_2CrO_4 , einen roten Niederschlag. Dieser Farbumschlag bestimmt das Ende der Titration. Zu diesem Zweck wurde eine 0,1 M Silbernitratlösung hergestellt, indem 9 g AgNO_3 (Alfa Aesar) in 500 ml ultrareinem Wasser. In ähnlicher Weise wurde 1 g K_2CrO_4 (EMSURE) in 20 ml ultrareinem Wasser gelöst, um eine 5%ige K_2CrO_4 -Lösung zu erhalten. Der nach jedem Zentrifugationsschritt aufgefangene Überstand wurde verdünnt, indem 20 ml der Probe in einen 100-ml-Messkolben pipettiert und mit DI-Wasser aufgefüllt wurde, bis der Kolben voll war. Dann wurden 25 ml der verdünnten Probe in einem

Erlenmeyerkolben überführt und 40 µl der Kaliumchromatlösung zugegeben. Anschließend wurde das Gemisch unter ständigem Rühren mit 0,1 M Silbernitratlösung titriert, bis die Probe eine rotbraune Farbe angenommen hat. Dann wurde die NaCl-Konzentration anhand des aufgezeichneten Volumens an Silbernitrat berechnet, das zur Beobachtung der um den Farbumschlag in der Probe zu beobachten.

Nachdem die Abwesenheit von NaCl in den ND-Proben durch die Mohrsche Titrationmethode bestätigt wurde, wurde die Oberflächenchemie der ND-Probe mittels FTIR analysiert. Zusätzlich wurde die Probe durch DLS und TEM charakterisiert, um Informationen über die Morphologie und Größe der NDs zu erhalten, nachdem sie durch die NaCl-Kristalle während der SAAO geätzt wurden.

Purifikation mit HCL

Die unbehandelten Detonationsnanodiamanten wurden mit 40%iger HCL Lösung gewaschen. Hierzu wurden jeweils 25 ml HCL mit 300 mg Nanodiamanten gemischt und anschließend für 30 Minuten im Ultraschallbad behandelt. Die ND wurden dann mittels Zentrifugation von der Flüssigkeit separiert. Das Prozedere wurde so oft wiederholt bis der Überstand nicht mehr gelb war, was induzierte, dass Eisenverschmutzungen eliminiert wurden. Anschließend erfolgte die Oxidation in einem HTK 17/17-Ofen durch Ausglühen an der Umgebungsluft bei 415° C für 5 Stunden mit einer Heizrate von 20 K/min.

SSAD

SAUD ist eine Deagglomerationstechnik für ND, die erstmals von Turcheniuk et al. (Turcheniuk, 2016) beschrieben wurde. Sie besteht in der Verwendung einer übersättigten NaCl-Lösung als Mahlwerkzeug, um die NDs zu zerkleinern und zu zerbrechen, während sie mit Ultraschall behandelt werden. Das NaCl liefert auch Na⁺-Ionen, die Natriumsalze mit den Oberflächencarboxylgruppen der NDs bilden können, was die kolloidale Stabilität der ND-Kolloidlösungen erhöht. Die Hauptvorteile dieser Technik bestehen darin, dass eine einstellige kolloidale Lösung von NDs mit einer geprüften kolloidalen Stabilität von bis zu 4 Monaten bei Umgebungsbedingungen hergestellt werden kann; das Verfahren erfordert keine pH-Einstellung und das zugesetzte NaCl kann leicht durch Zentrifugieren entfernt werden.

10 g NaCl (Carl Roth) wurden mit 0,25 g carboxylierten NDs vermischt und in einem Mörser kurz zerkleinert. 5 ml ultrareines Wasser (Direct-Q 3 UV von Merck Millipore) wurden zu der NaCl-ND-Mischung gegeben, so dass ein Brei entstand, und mit einem Wasserultraschallgerät (Bandelin Sonorex RK 100) bei 45 kHz 100 Minuten lang beschallt. Anschließend wurde die NaCl-ND-Aufschlammung mit ultrareinem Wasser verdünnt und mit einer Sigma 3-16p Zentrifuge (Sigma Laborzentrifugen GmbH) wie folgt zentrifugiert: 4000 rpm für 10 Minuten und dann bei 12000 rpm für 1 Stunde, um das NaCl zu entfernen. Ein Teil der ND wurde für die DLS Messung entnommen und resuspendiert. Der Rest wurde im Vakuumtrockner über Nacht getrocknet und für die weitere Funktionalisierung verwendet.

Sonden-Ultraschallbehandlung

Die Sonden-Ultraschallbehandlung wurde wie SSAD nach der eigentlichen Carboxylierung vorgenommen. Bei dieser Technik wird eine Sonde in eine Probe eingetaucht, die mit einer bestimmten Frequenz schwingt und Ultraschallenergie in die Probe überträgt, um die agglomerierten Partikel aufzubrechen. 15 mg carboxylierte NDs wurden in 30 ml ultrareinem Wasser dispergiert und die Lösung wurde mit einem Sonopuls HD 2200 Ultraschallhomogenisator (Bandelin electronic GmbH und Co.) 30 Minuten lang bei 20 kHz und 70 % der Geräteleistung in einem gepulsten Zyklus mit 0,7 s aktiven und 0,3 s passiven Pausen beschallt. Die Probe wurde in ein Eisbad gelegt, um die Verdunstung der Lösung durch die Erwärmung durch die Ultraschallbehandlung zu vermeiden. Ein Teil der Lösung wurde für die DLS Messung zur Seite gelegt. Der Rest der Lösung wurde zentrifugiert und über Nacht in einem Exsikkator getrocknet.

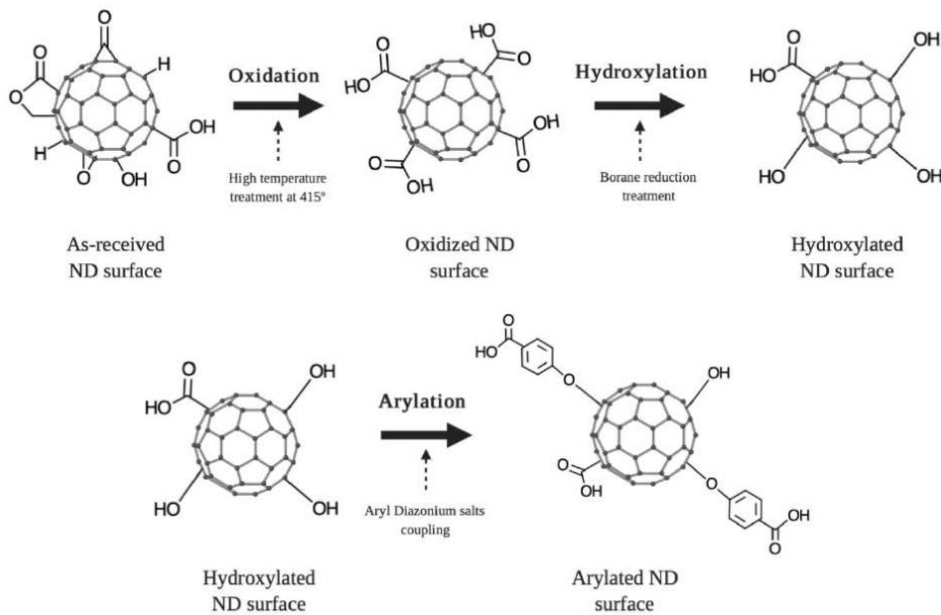
Charakterisierung der Nanodiamanten

Alle im Rahmen des Projektes hergestellten ND wurden hinsichtlich ihrer Oberflächenfunktionalisierung charakterisiert. Die Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie (FT-IR) ist eine Charakterisierungsmethode, mit der ein Infrarot-Absorptions- oder Emissionsspektrum von festen, flüssigen oder gasförmigen Stoffen erzeugt wird. Sie kann für die qualitative und quantitative Analyse eingesetzt werden. Sie bestimmt funktionelle Gruppen und mögliche molekulare Bindungen zwischen chemischen Verbindungen. Bei dieser Technik wird ein IR-Strahl erzeugt, der viele Lichtfrequenzen auf einmal umfasst, und es wird gemessen, wie viel von diesem Strahl von der Probe absorbiert wird. Die Probe absorbiert bestimmte Energiefrequenzen, die für sie eindeutig charakteristisch sind (Mohamed et al., 2017).

Die Oberflächencharakterisierung der Nanopartikel wurde mittels FT-IR durchgeführt, um funktionelle Oberflächengruppen auf funktionalisierten Nanodiamanten (funkt. ND), Detonations-Nanodiamanten (ND) zu identifizieren. Die Infrarot-Absorptionsspektren der Nanopartikel wurden von 450 cm^{-1} bis 4000 cm^{-1} mit 4 Scan-Zyklen und einer Auflösung von 2 cm^{-1} mit einem Spectrum Two FT-IR-Spektrometer in Pellets mit KBr (1:40 Massenverhältnis von Probe zu KBr).

Detonations-Nanodiamanten (DND) enthalten auf ihrer Oberfläche verschiedene funktionelle Gruppen, vorwiegend sauerstoffhaltige, die für eine kovalente Funktionalisierung genutzt werden können. Um die Oberfläche zu homogenisieren und die Anzahl der carbonylhaltigen Gruppen zu erhöhen, können Oxidations- oder Reduktionsverfahren durchgeführt werden (Krüger et al., 2006; Mochalin et al., 2012). Nanodiamanten, die Carboxy- und Hydroxygruppen enthalten, sind die am häufigsten verwendeten funktionalisierten Nanomaterialien in der Biomedizin. Um die Oberfläche zu homogenisieren, wurden die Nanodiamanten (ND) im Ausgangszustand durch Hochtemperaturoxidation modifiziert und durch die Boran-Reduktionsmethode hydroxyliert. Schließlich wurden aromatische Gruppen durch Arylierung an die Oberfläche gebunden. Die chemisch modifizierte Oberfläche wurde mittels Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie (FT-IR) untersucht, um die funktionellen Gruppen zu bestimmen. Abbildung 5 zeigt einen schematischen Überblick über die ND-Modifikationsschritte.

Wie in Abbildung 6 dargestellt, führt die Oxidation mit Hochtemperatur-Luftbehandlung sauerstoffhaltige Oberflächengruppen auf dem ND ein. Nach der Oxidation sind die meisten der vorhandenen Oberflächengruppen neben Aldehyden, Ketonen, Ethern und Alkoholen vor allem COOH-Gruppen. Die homogene Bedeckung der ND-Oberfläche mit OH-Gruppen ist eine der am häufigsten verwendeten Homogenisierungstechniken, für die es mehrere Ansätze gibt. Der Hydroxylierungsschritt mit Boran reduziert vorhandene C=O Gruppen, wie z. B. Ketone, zu Hydroxylgruppen, was verschiedene Folgereaktionen ermöglicht, z. B. Amidierung, Veresterung, Acylierung oder Silanisierungsreaktionen (Krueger und Lang, 2012).



Darstellung der wichtigsten wissenschaftlich-technischen Ergebnisse

Abb.6 Schematische Darstellung der Schritte, die zur Funktionalisierung von Nanodiamanten der ursprünglichen NDs dienen.

Abbildung 7 vergleicht die Infrarotspektren der detonierten, oxidierten, hydroxylierten und arylierten NDs. Wie in Abbildung 7(a) gezeigt, besitzen detonierte, oxidierte und hydroxylierte NDs ähnliche Streckschwingungen von $\nu\text{O-H}$ bei 3420 cm^{-1} , $\nu\text{C=C}$ bei 1622 cm^{-1} und $\nu\text{C-O}$ bei 1115 cm^{-1} .

Bei 1791 cm^{-1} zeigen oxidierte und hydroxylierte ND Carbonyl-Streckschwingungen $\nu\text{C=O}$, wobei das C=O Teil von Aldehyd-, Keton-, Ester-, Carbonsäure-, Anhydrid- oder zyklischen Ketongruppen sein kann (Mochalin et al., 2012; Nguyen et al., 2008). Abbildung 7(b) zeigt einen genaueren Blick auf die FT-IR-Spektren im Bereich von $2000\text{--}1400\text{ cm}^{-1}$, wo die Zunahme der Intensität der Carbonylspektren bei 1791 cm^{-1} und eine geringe Abnahme der C=C -Gruppe bei 1622 cm^{-1} in oxidiertem (ND-COOH) und hydroxyliertem ND (ND-OH) im Vergleich zu DND sichtbar ist (Eldawud et al., 2016). Wie man beobachten kann nimmt die Intensität der Carbonyl-Streckschwingungen $\nu\text{C=O}$ bei 1791 cm^{-1} zu, während der sp^2 -Kohlenstoff $\nu\text{C=C}$ sowohl für ND-COOH als auch für ND-OH im Vergleich zu DND abnimmt. Die trockene Oxidationsmethode führt zur Umwandlung in Säureanhydride, was an der Verschiebung des $\nu\text{C=O}$ -Peaks zu einer höheren Wellenzahl (von 1733 cm^{-1} zu 1791 cm^{-1}) zu erkennen ist.

Der Bereich zwischen 900 und 1500 cm^{-1} weist eine breite Absorption auf und wird auch als ‚Fingerprint‘ Region bezeichnet. Dieser IR-Bereich ist bei Nanodiamanten bekanntermaßen schwierig zu interpretieren, da sich viele Komponenten aus dem Inneren des Diamanten und der Oberfläche überschneiden. In dieser Region überlappen sich deformierende O-H- und C-O-C-Streckschwingungen, Epoxid-C-O-Streckschwingungen, C-C-Streckschwingungen, Amid C-N-Streckung und C-N-H Verformungsschwingungen zusammen mit NO_2 , SO_2 und anderen Gruppen (Mochalin et al., 2012).

Nach der Reduktion mit Boran ist die Konzentration der Hydroxylgruppen erhöht. Produzierte Boransäure kann problemlos durch Purifikation (Waschen, Zentrifugieren) entfernt werden. Dadurch, dass stark gebundenes Wasser auf der Diamantenoberfläche sitzt eignete es sich als schwierig Hydroxylgruppen im Spektrum zu erkennen. Selbst wenn die Diamanten exzessiv im Vakuum getrocknet werden sind die Proben nicht wasserfrei.

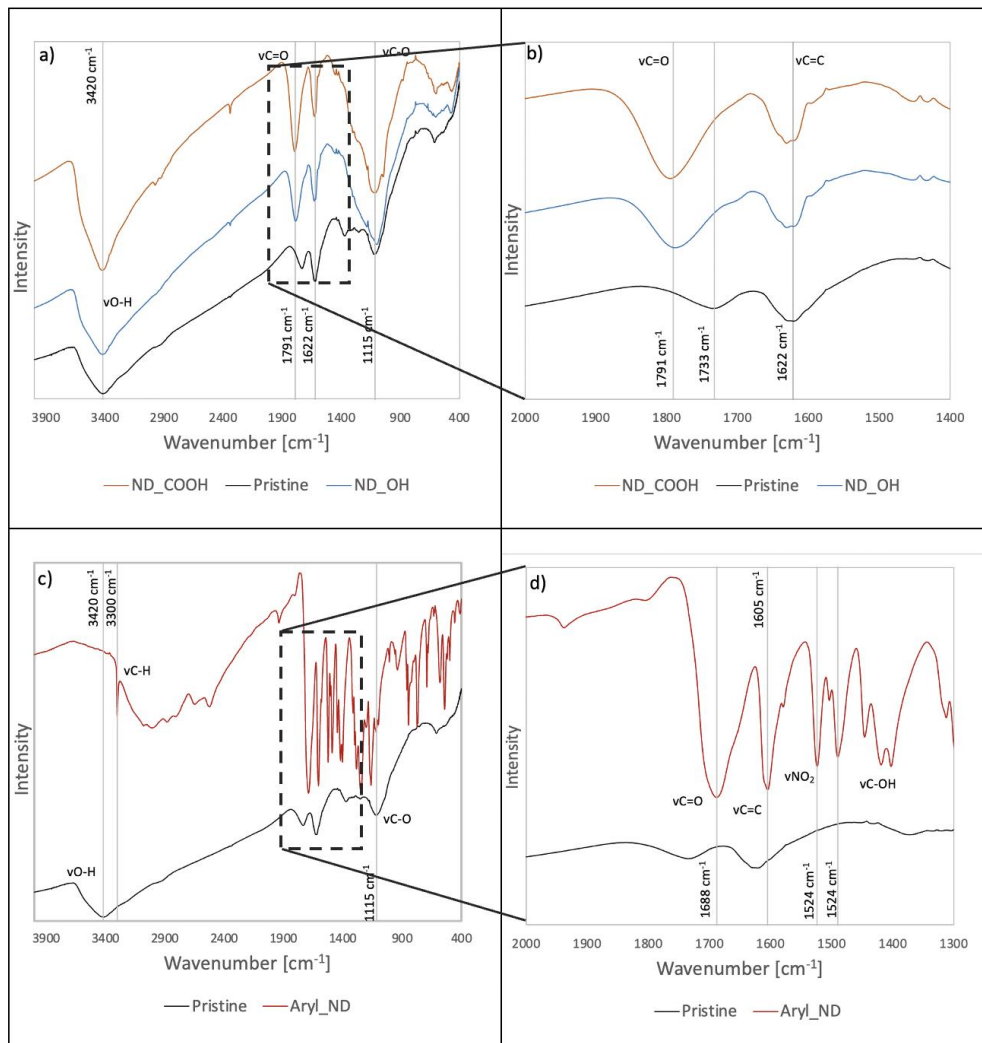


Abb.7 (a) Infrarotspektren von detonierten (schwarz), oxidierten (orange) und hydroxylierten (blau) NDs. (b) Die rechten Kästen zeigen eine genauere Betrachtung der FT-IR-Spektren im Bereich von 2000-1400 cm⁻¹. (c) Infrarotspektren von detonierten (schwarz) und arylierten (rot) NDs. (d) zeigt einen genaueren Blick auf die FT-IR-Spektren im Bereich von 2000-1300 cm⁻¹.

Im nächsten Schritt der chemischen Funktionalisierung wurden OH-ND verwendet, um C-C-Bindungen und aromatische Gruppen einzuführen. Dazu wurden aromatische Amine in Gegenwart von 4-Aminobenzoesäure und Isoamylnitrit umgesetzt. Dieses Verfahren basiert auf der in-situ-Erzeugung von Diazoniumsalzen. Wenn hydroxylierte Nanodiamanten verwendet werden, können auch C-O-C-Bindungen gebildet werden, aber das Ergebnis hängt von der Einheitlichkeit und Reinheit der Oberfläche des Ausgangsmaterials ab (Fraczyk et al., 2018; Liang et al., 2011, 2009).

Abbildung 7 (c) vergleicht die Infrarotspektren von arylierten ND und DND. Bei 3420 cm⁻¹ weisen DND vO-H-Streckschwingungen auf, ebenso bei 1115 cm⁻¹, was vC-O entspricht. Diese Schwingungen sind bei arylierten ND nicht deutlich zu erkennen. Aryl-ND zeigen einen Peak bei 3300 cm⁻¹, der zu vC-H gehört. Aromatische Verbindungen sind durch diese Bande charakterisiert, werden aber oft von den Banden anderer Gruppen überdeckt (Fraczyk et al., 2018). Abbildung 6(d) zeigt einen genaueren Blick auf die FT-IR-Spektren im Bereich von 2000-1300 cm⁻¹, wo Aryl ND aromatische Säure vC=O-Gruppen bei 1688 cm⁻¹, Stickstoffdioxid vNO₂-Gruppen, die für Diazoniumsalze charakteristisch sind, bei 1524 cm⁻¹ und vC-OH bei 1400 cm⁻¹ aufweisen (Girard et al., 2011; Liang et al., 2011, 2009). Modifizierte Aryl ND enthalten aromatische Gruppen auf der Oberfläche durch Verwendung von p-Aminobenzoesäure Säure in Kombination mit Isoamylnitrit, das einen Benzoesäurerest an die Oberfläche bindet.

Um ein hohes Oberflächen-Volumen-Verhältnis zu erhalten, das sowohl für homogene Beschichtungen als auch für Funktionalisierungsverfahren erforderlich ist, müssen stabile ND-Suspensionen mit möglichst geringer Partikelgröße erzielt werden. Daher ist eine Deagglomeration zwingend erforderlich.

FT-IR Probenvorbereitung

Für die FT-IR-Spektroskopie wurde die Probe durch Mischen von 1-2 mg des ND-Pellets mit 100 mg KBr-Pellet vorbereitet. Die Probe wurde mit einem Mörser und einem Stößel zermahlen und in eine Vakuumpresse gegeben. Anschließend wurde das Probenpellet mit einer manuellen hydraulischen Presse unter Druck gesetzt, um eine homogene Scheibe der analysierten Probe herzustellen. Schließlich wurde die vorbereitete Scheibe auf der Öffnung der Vorrichtung mit einem Durchmesser von 1 cm befestigt und in das Spektrometer eingesetzt. Vor der Messung des Infrarotextinktionsspektrums der Probe wurde das FT-IR-Gerät kalibriert, indem das Spektrum der reinen KBr-Probe als Hintergrundspektrum gemessen wurde. Für jede Probe wurden jeweils drei Messungen durchgeführt und der Mittelwert zur weiteren Analyse bestimmt.

Stabilität der Nanodiamanten

Je nach Zusammenspiel von elektrostatischen und van der Waals-Wechselwirkungen können Nanodiamanten in wässrigen Medien aggregieren oder als homogene Dispersionen bestehen (Thess et al., 1996). Zur Untersuchung und weiteren Verwendung der NDs wurde die Stabilität zunächst in zwei Medien (Aceton und Wasser) getestet. Hierzu wurden die Nanodiamanten mittels Ultraschalles in den jeweiligen Medien suspendiert und anschließend ruhig positioniert. Bereits nach zwei Minuten im Aceton ließ sich, wie in Abbildung 8a, erkennen, dass die Nanodiamanten sich von der Lösung abscheiden und ein Zweistoffgemisch bilden, bis sie sich nach innerhalb kurzer Zeit vollständig am Boden des Behälters abgesetzt hatten. Somit lässt sich schließen, dass arylierte Nanodiamanten keine Stabilität in Aceton aufweisen. Im destillierten Wasser bestanden die Nanodiamanten auch nach Stunden in einer homogenen Dispersion (Abbildung 8b), was indiziert, dass arylierte Nanodiamanten eine stabile Suspension in Wasser bilden, was hilfreich für die weitere Charakterisierungen ist, wie zum Beispiel für die DLS Messung.

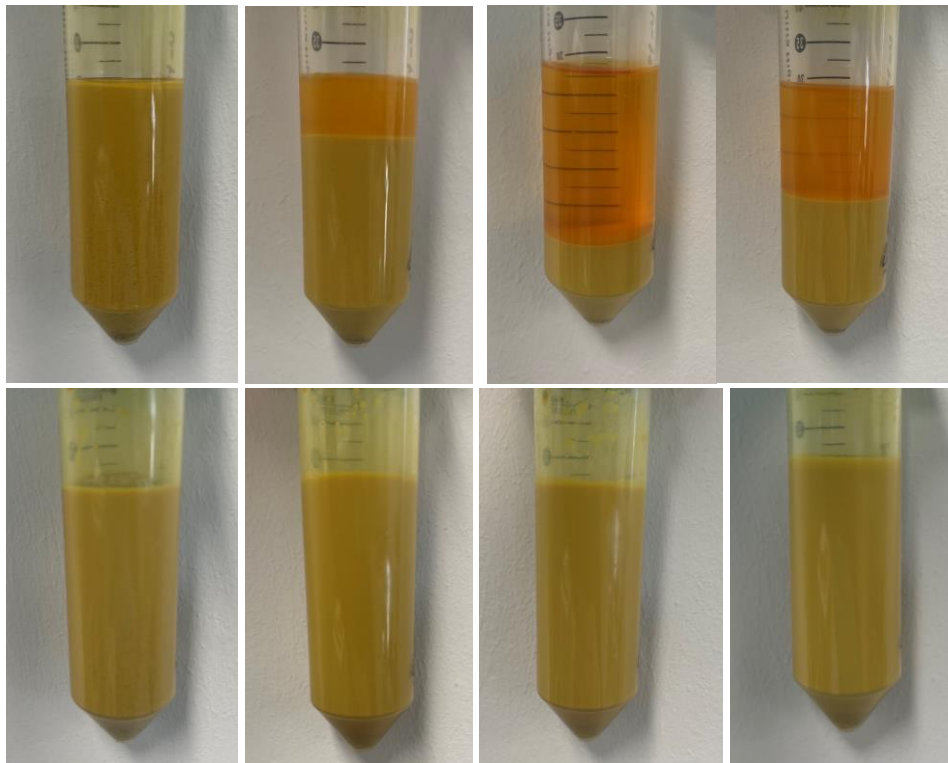


Abb.8(a) Versuchsaufbau zur Untersuchung der Stabilität der arylierten Nanodiamanten in (a) Aceton und (b) Destilliertem Wasser direkt nach der Suspendierung, nach 2 min, 30 min und 10 h (von links nach rechts)

Die Kolloidstabilität von NDs in Wasser wurde weiter optimiert. Die vakuumgetrockneten NDs wurden in doppelt destilliertem Wasser mit einer Konzentration von 1 mg/ml erneut dispergiert und 30 Minuten lang mit Sonden-Ultraschall unter denselben Parametern wie zuvor beschrieben behandelt. Vor der US-Behandlung wurde der pH-Wert in zwei verschiedenen Bereichen eingestellt, um die optimale ionische Umgebung für die Stabilität der NDs zu bestimmen (siehe Abbildung 9). Arylierte ND-Lösungen können in alkalischen Umgebungen über lange Zeiträume (Monate) stabil sein. Bei einem pH-Wert von 12 zeigte die Suspension eine höhere Stabilität über einen längeren Zeitraum mit einer klaren, transparenten, gelblichen Suspension. Hier konnten nach einer Woche keine Ablagerungen festgestellt werden. Im Gegensatz dazu hatte die Suspension bei einem pH-Wert von 3 eine hellgelbe Farbe und ein trübes Aussehen, was auf eine Agglomeration der Partikel und damit auf eine schlechte Stabilität über einen längeren Zeitraum hinweist; bereits nach wenigen Stunden wurden Ablagerungen beobachtet.

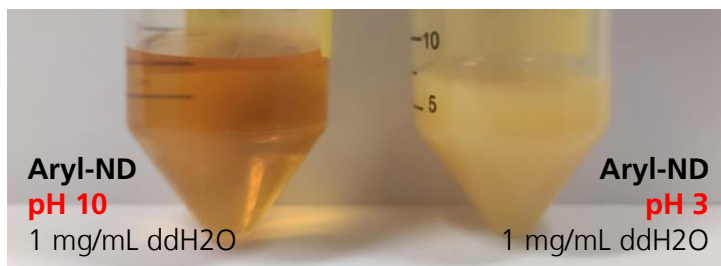


Abb.9 Arylierte NDs bei 1 mg/mL in bidestilliertem Wasser, der pH-Wert wurde auf 12 (links) und 3 (rechts) adjustiert. Die Suspension im basischen Milieu zieht höhere Stabilität nach gewissen Zeit mit einer klaren, transparenten Lösung.

Zur Erleichterung der CVD, bei der die NDs in Chloroform als Lösungsmittel verwendet werden, wurden vakuumgetrocknete Aryl-NDs in Chloroform zu 1 mg/ml redispersiert. Die resultierende Suspension hatte eine hellgelbe Farbe, ein undurchsichtiges Aussehen und Sedimente am Boden. Trotz der langsamen Sedimentation im Laufe der Zeit wurde die Lösung beim manuellen Dispergieren wieder homogen. Die Stabilität der Lösung ist nicht mit derjenigen in Wasser vergleichbar, wobei letztere stabiler ist, wie in Abbildungen 10 und 11 dargestellt.

| Parameter | Label | Probe A | Probe B |
|--|-------|--|------------------------|
| Konzentration [mg/mL] | | 1 | 1 |
| Lösungsmittel | | Chloroform | bidestilliertes Wasser |
| Volumen | | ~180 mL | ~200 mL |
| pH | | Nicht adjustiert | 10 |
| Größe des Clusters von DLS Messungen [nm im Durchmesser] | | Messungen waren auf Grund des Lösungsmittels nicht möglich | 77,5 ± 0,8 |
| Polydispersität (PDI) | | | 0,5 |
| Zeta potential | | | - 26 ±0,8 |

Abb.10 Nanodiamanten dispersiert in a) Chloroform oder b) bidestilliertem Wasser mit einer Konzentration von 1 mg/mL.

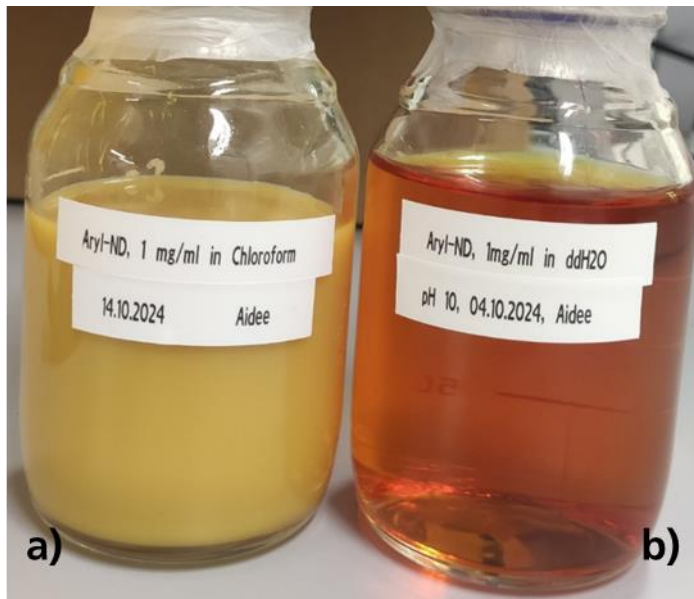


Abb.11 Eigenschaften der Suspensionen mit arylierten ND bezüglich der zeitlichen Stabilität.

Aufgrund der Beschaffenheit des Lösungsmittels hat die in Chloroform hergestellte Probe a) eine geringere zeitliche Stabilität als die Probe b), siehe Abbildung 11.

Das Kolloid auf Wasserbasis deagglomerierte sofort, wenn ein pH-Wert ≥ 10 erreicht wurde, und wurde sofort transparent. Ein Kolloid auf der Basis von Chloroform könnte möglicherweise durch die Einstellung des pH-Werts stabilisiert werden, was jedoch mit NaOH nicht möglich ist, da es das Lösungsmittel oxidieren und Natriumformiat bilden würde.

Die Hydrophobie von Chloroform und der pH-Wert scheinen die Agglomeration von ND zu fördern, so dass eine Sedimentation im Laufe der Zeit zu erwarten ist. Dennoch reicht ein manuelles Mischen aus, um beide Proben im Falle einer Sedimentation im Laufe der Zeit erneut zu dispergieren und die Homogenität des Kolloids zu gewährleisten.

Bestimmung der Partikel Größerverteilung und Messung des Zetapotentials mittels DLS

Dynamische Lichtstreuung (DLS) ist ein optisches Messverfahren, das zur Bestimmung der Größenverteilung und des Zetapotenzials von kleinen Partikeln in Lösung eingesetzt wird. Ein DLS-Gerät strahlt monochromatisches Licht durch einen Polarisator, bevor es auf eine Probe trifft. Wenn das einfallende Licht auf Schwebeteilchen in der Probe trifft, die weniger als $1/10$ der Wellenlänge des einfallenden Lichts groß sind, streuen sie das Licht elastisch. Die Intensität der Streuung wird von einem Detektor erfasst. Diese Streuungsintensität schwankt mit der Zeit, da die in der Probe schwebenden Teilchen einer Brown'schen Bewegung unterliegen, die bei ihrer Bewegung destruktive und konstruktive Interferenz verursachen.

Zur Bestimmung der Partikelgröße wurde das Gerät ZetaView PMX120 Nanoparticle Tracking Analyzer (NTA) verwendet. Zur Vorbereitung für die Messung wurde 1 mg ND mit ultrareinem Wasser gemischt und ausreichend verdünnt. Folgend sind die Ergebnisse für die Größerverteilung der ND mit unterschiedlichen Funktionalisierungen gezeigt. Gemessen wurde bei Raumtemperatur (25°C) und einem neutralen pH-Wert von 7. Die Wellenlänge des Lasers betrug 488 nm.

Um eine hohe Funktionalisierungsrate zu gewährleisten, ist ein ND mit einem hohen Verhältnis von Oberfläche zu Volumen erforderlich. Um die hydrodynamischen Durchmesser der funktionellen ND zu bewerten, wurde NTA durchgeführt. Abbildung 12 zeigt die Sedimentationsreihen, die Partikelgrößenverteilung und das Zetapotenzial von ND, ND-

COOH, ND-OH bzw. ND-Aryl. Unveränderte ND weisen einen mittleren hydrodynamischen Durchmesser von etwa 170 nm auf. Die modifizierten ND weisen alle eine geringere mittlere Größe auf als die ursprüngliche ND. ND-COOH mit 106 nm, ND-OH 89 hydroxyliert und ND-Aryl mit 135 nm.

Laut Hersteller haben ND eine Partikelgröße von 4-5 nm, weshalb sie große Agglomerate bilden, was auf verschiedene Arten von intermolekularen Wechselwirkungen wie van der Waals, Dipol-Dipol und Wasserstoffbrückenbindungen zurückzuführen ist (Badea, 2013). Oxidation und Hydroxylierung führen zu einer Homogenisierung der Oberfläche, was zu einer Verringerung der Agglomeratgröße führt. ND-Aryl-Aggregate sind kleiner als unbehandeltes ND, aber größer als oxidierte und hydroxylierte. Ein Grund dafür könnte sein, dass die dem ND-Kern hinzugefügten funktionellen Gruppen (4-Carboxyphenyl) größer sind.

Unveränderte ND weisen einen mittleren hydrodynamischen Durchmesser von 170 nm auf. Die modifizierten ND weisen geringere mittlere Größen auf als die ursprünglichen ND, wobei ND-COOH einen mittleren Durchmesser von 106 nm, ND-OH von 89 nm und ND-Aryl von 135 nm haben. Nach Angaben des Herstellers haben die ND eine Partikelgröße von 4-5 nm. Die ND bilden größere Agglomerate aufgrund verschiedener Arten von intermolekularen Wechselwirkungen wie van der Waals, Dipol-Dipol und Wasserstoffbrückenbindungen (Badea, 2013). Oxidation und Hydroxylierung führen zu homogenisierten ND mit einer hohen Anzahl sauerstoffhaltiger Oberflächengruppen, was ihre Agglomeratgröße verringert. ND-Aryl-Aggregate sind im Vergleich zu unbehandeltem ND kleiner und größer als ND-OH. Dieses Phänomen lässt sich durch die hinzugefügten funktionellen Gruppen (4-Carboxyphenyl) erklären, die den hydrodynamischen Durchmesser erhöhen.

Unbehandelte ND weisen aufgrund der Herstellerangaben ein positives Zetapotenzial von +15 mV auf. ND-COOH haben ein Zetapotenzial von -36 mV, ND-OH von -35 mV und ND-Aryl von -40 mV. Die Oberflächenfunktionalisierung führte zu einem negativen Zetapotenzial aufgrund der sauerstoffreichen Oberflächengruppen. Wenn der absolute Wert des Zetapotenzials über ± 30 mV liegt, stoßen sich die Partikel in der Suspension gegenseitig ab und bilden stabile Suspensionen.

Die Sedimentationsreihe gibt ein deutlicheres Bild von der Stabilität der Suspension. Reine ND sind instabil und werden ausgeschieden, während ND-OH, ND-OH und ND-Aryl eine stabile Suspension bilden.

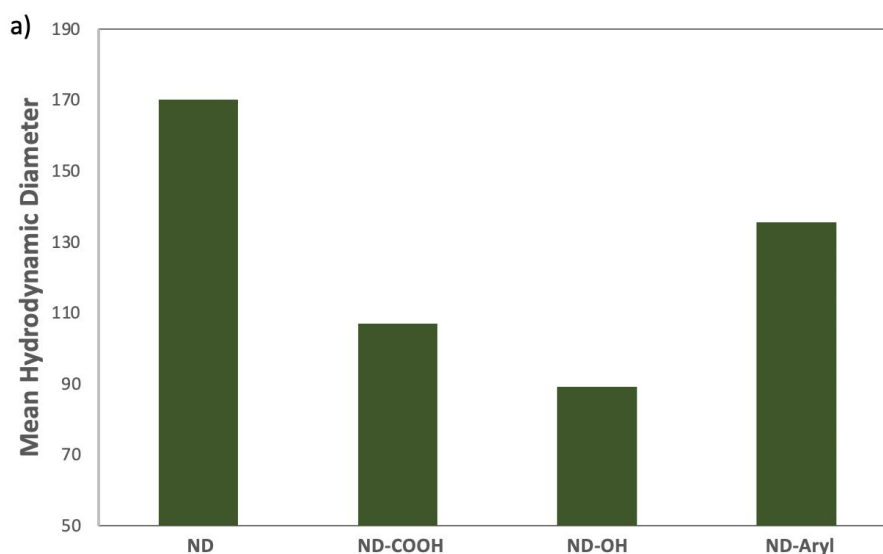
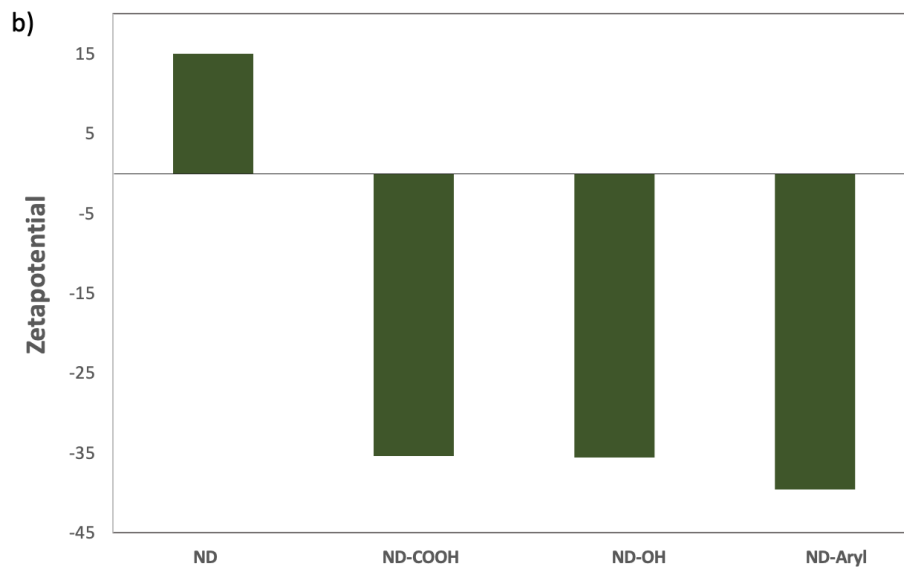


Abb.12 (a) Partikelgrößenverteilung und (b) Zetapotenzial mittels DLS für ND, ND-COOH, ND-OH und ND-Aryl



Unbehandelte ND weisen aufgrund der Herstellerspezifikation ein positives Zetapotenzial von +15 mV auf. ND-COOH haben ein Zetapotenzial von -36 mV, ND-OH von -35 mV und ND-Aryl von -40 mV. Die Oberflächenfunktionalisierung führte zu einem negativen Zetapotenzial, was auf die sauerstoffreichen Gruppen auf der Oberfläche zurückzuführen sein könnte. Wenn der absolute Wert des Zetapotenzials größer als 0,30 mV ist, stoßen sich die Partikel in der Suspension so weit ab, dass sie stabile Suspensionen bilden und die Agglomerate kleiner werden.

Die Löslichkeit wird durch stark negative Zetapotenziale begünstigt. Die Sedimentationsreihe gibt einen genaueren Aufschluss über die Stabilität der Suspension. ND sedimentieren weniger, wenn das absolute Zetapotenzial höher ist. Unberührte ND sind instabil und fallen aus. Dies ist aus den Messungen der Teilchengröße und des Zetapotenzials ersichtlich. Die Größe der Agglomerate in der Suspension überschreitet die Zuverlässigkeitsgrenze des Geräts.

Fazit

Die Nanodiamanten wurden erfolgreich oxidiert, hydroxyliert und anschließend mit Diazoniumsalzen funktionalisiert. Diese Modifizierungsschritte wurden mittels Fourier-transformierter Infrarotspektroskopie überprüft. Die Oberflächenchemie von detoniertem ND, trocken oxidiertem und hydroxyliertem ND ist ähnlich, wobei alle O-H-, C-O- und C=C-Gruppen aufweisen, während ND-COOH und ND-OH zusätzlich C=O-Verbindungen aufweisen. Arylierte Nanodiamanten weisen im Vergleich zu den zuvor erhaltenen ND C-H-, C=O-, C=C-, NO₂- und C-OH-Gruppen auf.

1.3.2 Arbeitspaket 5: Versuchsaufbau und Experimente zur Untersuchung der in-vitro-Degradation

Laut Projektantrag sollte eine in-vitro-Plattform für die Untersuchung der Biodegradation entwickelt werden, die die Einflüsse der wichtigsten physiologischen Parameter und Faktoren auf die Resorbierbarkeit von Stents berücksichtigen lässt. Die Nachteile der bisher existierenden Methoden sollten analysiert und bei der Entwicklung korrigiert werden. Im Rahmen des Projektes wurde daher eine Literaturstudie durchgeführt. Diese ergab, dass die Stentimplantate eine dynamische Beanspruchung im flüssigen Medium mit einer kontrollierbaren und einstellbaren pH-Umgebung von essenzieller Bedeutung war und in der Literatur noch nicht beschrieben war.

Abbildung 13 zeigt den im Rahmen des Projektes entwickelten Versuchsaufbau des fluiddynamischen Systems (in-vitro-Plattform), mit dem die physiologische Umgebung mit Überwachung verschiedener Parameter und Kontrolle des pH-Werts konzipiert und aufgebaut wurde. Der Versuchsaufbau umfasst: 1) eine Peristaltikpumpe (um die Pumpwirkung des Herzens zu simulieren); 2) Puriflex-Schläuche (als künstliche Blutgefäße); 3) Sensoren (für Druck, Temperatur, Strömungsgeschwindigkeit, pH-Wert); 4) Probenkammer; 5) ein zirkulierendes Wasserbad (um eine konstante Temperatur aufrechtzuerhalten); 6) ein Flüssigkeitsreservoir; 7) ein Magnetventil; 8) einen Behälter mit verdünnter Säure; 9) eine Mikrocontroller-Einheit; 10) eine pH-Kontrolleinheit; und 11) ein Computersystem (LabVIEW-Programm oder VI zur Steuerung und Überwachung der Parameter und zur Anzeige der Ergebnisse).

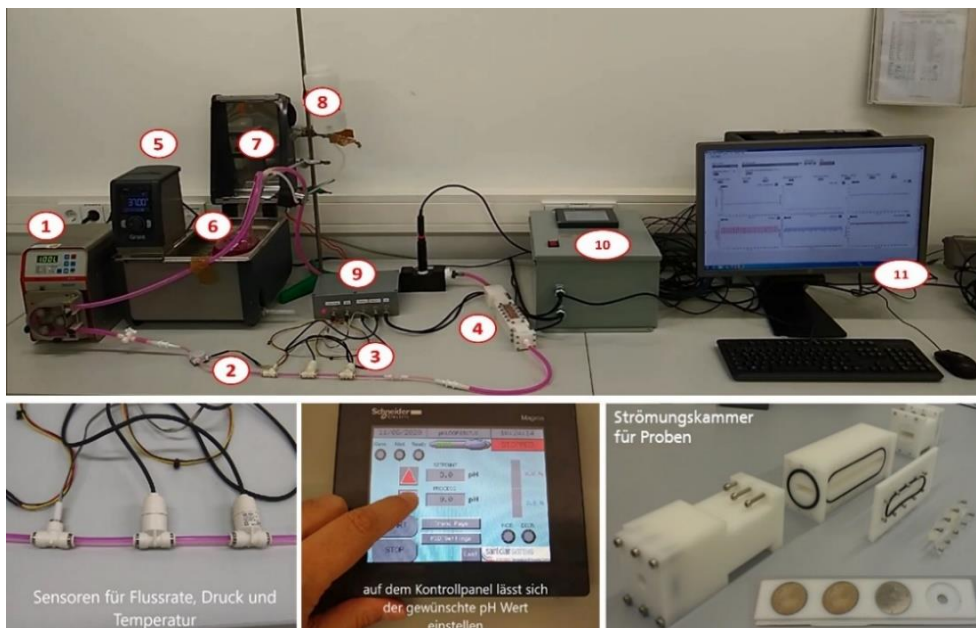


Abb.13 Fluid-dynamisches System für Degradationsversuche

Das vorgestellte fluiddynamische System ist in der Lage, physiologische Bedingungen der einzelnen Parameter durch die Kontrolle des pH-Werts zu gewährleisten. Eine parallele Anordnung von Proben in der Probenkammer macht eine laminare Umströmung von Probekörpern von beiden Seiten möglich. Bei einer Änderung des pH-Werts setzt die pH-Kontrolleinheit (Saint Clair System, USA) des Aufbaus ein und fügt der Flüssigkeit verdünnte Salzsäure (HCl), zur Senkung des pH-Werts, oder eine andere Pufferlösung hinzu, bis der Soll-Wert erreicht ist. Die Menge der Pufferlösung kann je nach experimentellen Anforderungen eingestellt werden. Mit diesem Aufbau können Proben verschiedener Geometrien (quadratische, rechteckige und runde Scheiben, hohle Röhren, Polymerfolien und komplexe Implantatstrukturen, z. B. Stents) geprüft werden. Der Aufbau kann sowohl für Kurzzeit- als auch für Langzeitexperimente verwendet werden und wurde für die Untersuchung von hergestellten Proben im CARANAT-Projekt eingesetzt. Abb. 14 zeigt die typischen Wertebereiche der verschiedenen Parameter, die mit dem Aufbau möglich sind.

Alle Parameter werden während des gesamten Experiments kontinuierlich in der Excel-Datei unter dem angegebenen Speicherpfad gespeichert, bis der Benutzer die Schaltfläche ENDE drückt. Während des Experiments kann die Anzeige der Graphen durch verschiedene Optionen, die in der Graphenpalette für jeden Graphen zur Verfügung stehen, manipuliert werden (z.B. Vergrößern, Verkleinern, Skalieren, etc.). Die Diagrammwerte können während des Experiments auch manuell in die Zwischenablage kopiert oder in eine Excel-Datei exportiert werden. Der Benutzer kann die Diagrammdaten auch

während der Durchführung des Experiments löschen, falls zu Beginn des Experiments fehlerhafte Werte vorliegen.

Darstellung der wichtigsten wissenschaftlich-technischen Ergebnisse

| Parameter | Bereich und Werte |
|------------------------|-------------------|
| Umgebungstemperatur | 0 °C bis +60 °C |
| Flüssigkeitstemperatur | 0 °C bis +120 °C |
| Flüssigkeitsviskosität | Bis zu 35 cP |
| pH | 0-14 |
| Flüssigkeitsdruck | ≤ 2.0MPa |
| Versuchsdauer | bis zu 6 Monaten |

Abb.14 Einstellbare Systemparameter des fluid-dynamischen Systems

Physikalisch-chemische Charakterisierung von beschichteten Stents

Oberflächenmorphologie des unbeschichteten und beschichteten Drahtes

Zu Testzwecken wurden zunächst Nitinoldrähte beschichtet. Diese wurden mittels SEM auf ihre Morphologie und Homogenität untersucht. Abbildung 15 zeigt die Oberfläche des unbeschichteten Drahtes mit unterschiedlicher Vergrößerung. Der Nitinoldraht selbst weist große Risse auf. Die Risslänge liegt teilweise im Mikrometerbereich. Der Draht scheint keine gute Qualität zu haben.

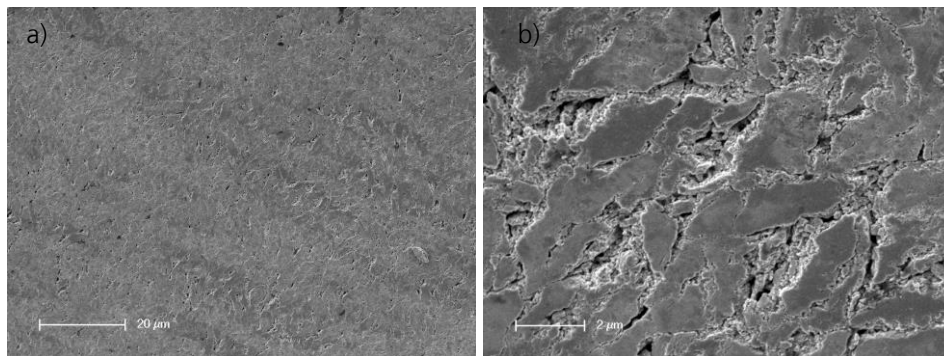
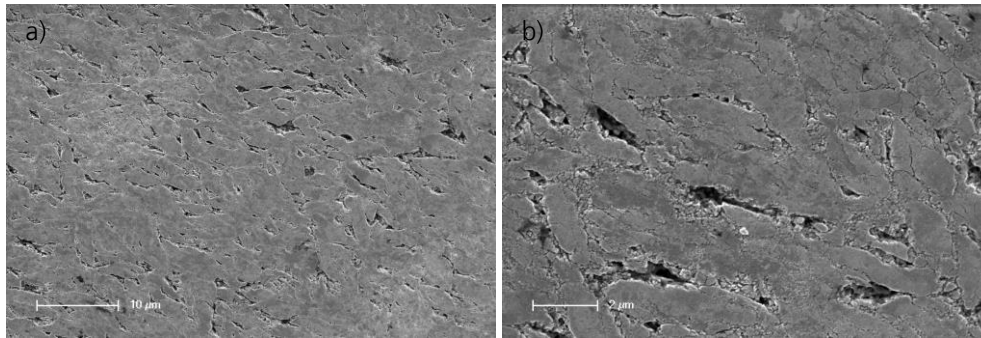


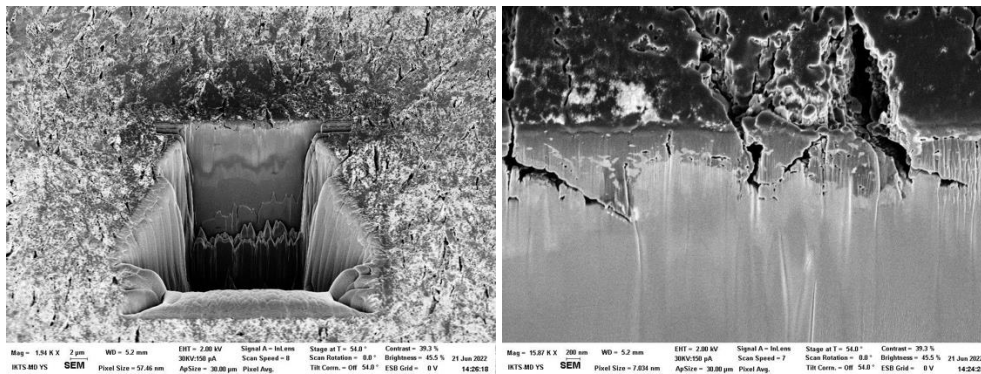
Abb.15 SEM-Aufnahme des unbeschichteten Drahtes mit a)5k-facher Vergrößerung und b) 20k-facher Vergrößerung

Abbildung 16 zeigt den beschichteten Draht mit 5k-facher und 20k-facher Vergrößerung. Trotz erfolgter Beschichtung sind teils sehr große Risse zu erkennen. Das Polymer ND Gemisch füllt die Kavitäten nicht vollständig auf und dort, wo ursprünglich Risse im Draht sind auch Risse in der Beschichtung zu erkennen. Die Beschichtung ist demnach weder gleichmäßig noch homogen. Es ist jedoch zu erwähnen, dass die Risse in der Beschichtung kleiner sind als im Draht selbst. Um die Schichtdicke zu bestimmen wurde der Draht eingeschnitten. Hier ist noch einmal deutlich zu erkennen, dass die Risse nicht von der Beschichtung aufgefüllt wurden. An den Stellen wo im Draht Risse sind weist auch die Beschichtung Risse auf.



Darstellung der wichtigsten wissenschaftlich-technischen Ergebnisse

Abb.16 SEM-Aufnahme des beschichteten Drahtes mit a)5k-facher Vergrößerung und b) 20k-facher Vergrößerung



XPS Röntgenphotoelektronenspektroskopie des Nitinoldrahtes

Die Röntgenphotoelektronenspektroskopie (XPS) ist ein Verfahren zur chemischen Analyse, welches sich durch besondere Oberflächenempfindlichkeit mit einer Signaltiefe von nur ca. 5 nm auszeichnet. Durch Röntgenbeschuss werden Photoelektronen erzeugt, deren Energie aufgrund elementspezifischer Energieniveaus Rückschlüsse auf die Materialzusammensetzung zulässt (alle Elemente außer H und He). Da die chemische Umgebung eines Atoms die Energieniveaus der Elektronen beeinflusst, bietet XPS auch die Möglichkeit, Aussagen über Bindungszustände, Oxidationszustände oder den Anteil unterschiedlicher Bindungspartner zu treffen.

XPS wurde angewandt um die Komponenten im Nitinoldraht zu ermitteln. Es erfolgte ein vollständiger Scan des Spektrums mit einer Unsicherheit von 1 %. Die Proben wurden vor der Messung gereinigt. Es wurde an zwei Stellen gemessen. Nachstehend sind beide Messungen (MP1 und MP2) aufgeführt.

- MP1: Ni: 5.4 %, Ti: 4.4 %, O: 31.3 %, C: 56.2 %, N: 1.8 %, Cl: 1.0 %
- MP2: Ni: 7.6 %, Ti: 5.5 %, O: 35.5 %, C: 49.2 %, N: 1.3 %, Cl: 0.9 %
- Verhältnis der Metalle im Detail:
 - MP1: Ni59:Ti41
 - MP2: Ni55:Ti45

Die Kohlenstoffkontamination ist überbewertet. Die Konzentrationen der einzelnen Komponenten schwanken über den Draht verteilt und weisen unterschiedliche Werte an den gemessenen Stellen auf.

Degradationstests der beschichteten Drähte

Zunächst wurden Nitinoldrähte (Durchmesser: 0,8 mm, Länge 3cm) mit Nanodiamanten und dem Resomer 502 beschichtet. Es wurden statische Degradationstests durchgeführt. Hierzu wurden etwa 1 cm lange Stücke des Drahtes abgeschnitten. Getestet wurden sowohl einfach Beschichtete Drähte als auch doppelt Beschichtete Drähte. Die Proben wurden über 30 Tage in verschiedenen Medien bei einer konstanten Temperatur von

37 °C gelagert. Zur Untersuchung der Beschichtung wurden anschließend REM-Aufnahmen getätigt.

Es stellte sich heraus, dass die Beschichtung durch die zuvor erfolgte Reinigung vollständig entfernt wurde. Abbildung 17 zeigt, wie die Beschichtung durch unterschiedliche Lösungsmittel beeinträchtigt wird. Ein neuer effektiver Reinigungsprozess muss ermittelt werden, um die Sterilisation in Zukunft zu gewährleisten. Da der Draht wie bereits oben beschrieben große Risse aufweist und keine homogene Beschichtung erzielt wurde, wurde entschieden, dass weitere Degradationstests direkt am beschichteten Stent erfolgen sollen. Geplant sind statische und dynamische Degradationstests. Für die nächsten Schritte wurden bereits Protokolle erarbeitet.

Darstellung der wichtigsten wissenschaftlich-technischen Ergebnisse

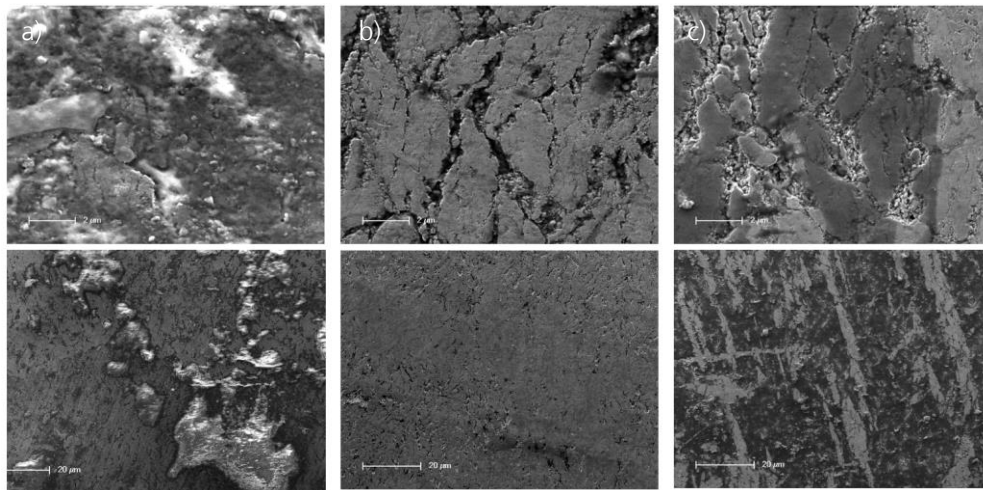


Abb.17 SEM-Aufnahme des doppelt beschichteten Drahtes a) teilweise mit Aceton gereinigt, b) vollständig mit Aceton gereinigt c) mit Ethanol gereinigt

Beschichtete Stents

Der Eindraht-Nitinol-Stent wurde mit PLGA und Nanodiamanten beschichtet. Abbildung 18 zeigt SEM-Aufnahmen mit unterschiedlicher Vergrößerung an drei gemessenen Stellen. Anders als beim beschichteten Draht sind hier keine Risse zu erkennen. Die Schicht ist nicht glatt und weist eine hügelige Landschaft auf. Es sind deutlich Nanodiamantagglomerate zu erkennen, die scheinbar nicht genügend deagglomeriert wurden. Verschiedene Verfahren wurden hier bereits wie zuvor beschrieben getestet und sollen in Zukunft auf die ND-Lösung angewandt werden, um eine homogene Verteilung der ND in der Schicht zu gewährleisten und große Agglomerate zu vermeiden, um die gewünschte Funktion der Stentbeschichtung zu gewährleisten.

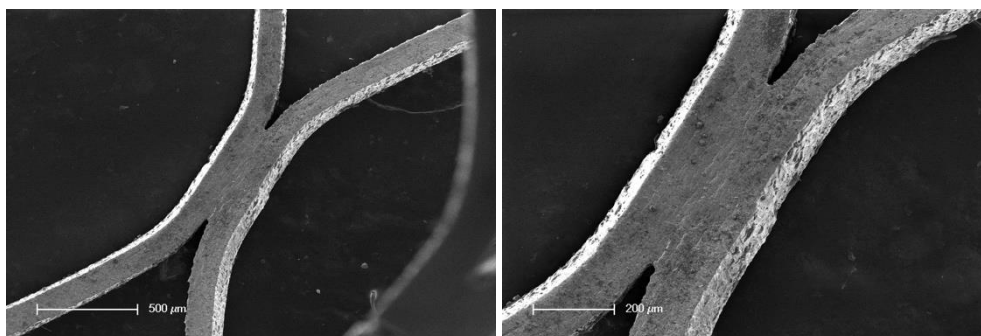
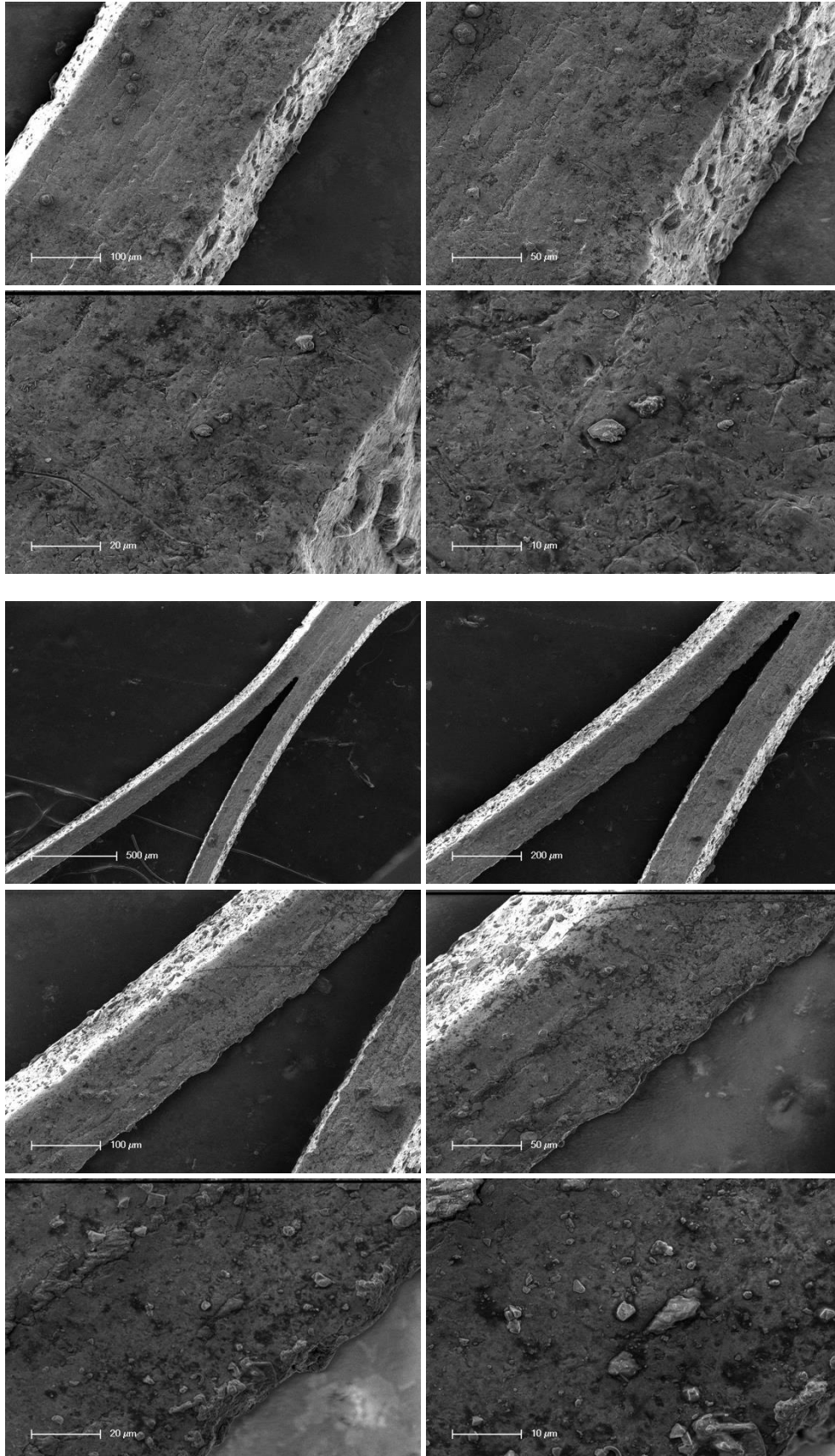
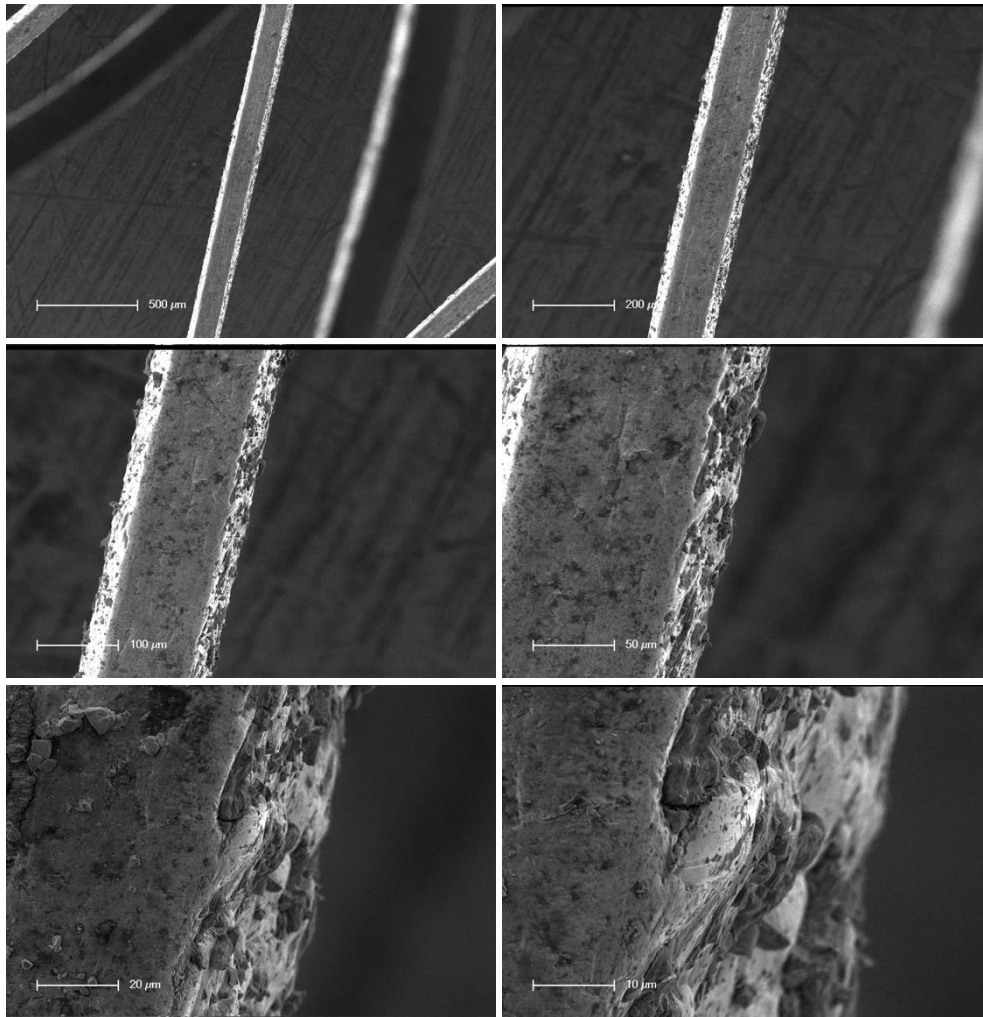


Abb.18 SEM-Aufnahme des beschichteten Stents an Position 1 mit unterschiedlicher Vergrößerung





Degradationsverhalten des Polymers und der ND-Glasproben

Zum Testen des Degradationsverhaltens im Allgemeinen wurden Glasproben ($D=12\text{mm}$) mit dem Polymer und den Nanodiamanten beschichtet. Zunächst erfolgte die Bestimmung der Korrelation zwischen der Konzentration der ND in der Ausgangslösung und in der Schicht. Dieser Arbeitsschritt befindet sich noch in der Entwicklungsphase. Die Optimierung der Beschichtungslösung erfolgte unter medizinischen Gesichtspunkten (Reinheit usw.) Zur Sterilisation wurden bis dato noch keine Tests durchgeführt. Dies ist in Planung.

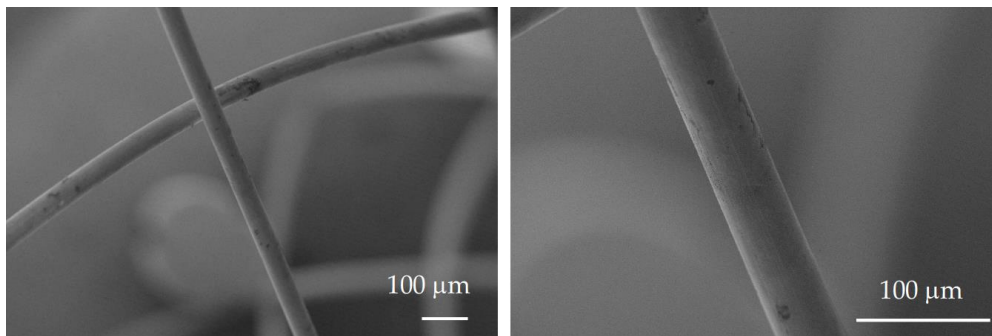
Zur Optimierung der Viskosität der Beschichtungslösung wurden Tests mit unterschiedlichen Resomerkonzentrationen durchgeführt. Es wurden 33,3 mg, 66,7 mg und 133,3 mg pro Lösungsmittel erprobt. Die Lösungen mit 33,3 mg und 66,7 mg eignen sich für die Beschichtung. Höhere Resomerkonzentrationen führen zu inhomogenen Schichten. Mit dem der Beschichtungsmaterial RG 502 H wurden verschiedene Lösungen angesetzt und auf Glassubstraten getestet. Das Resomer wurde zusammen mit den ND in Chlorophorm gelöst und die Beschichtung anschließend auf die Substrate gebracht.

Die Detektion der ND, welche sich von der Beschichtung lösen wird mit optischer Detektion geschehen.

Charakterisierung der beschichteten Stents

In enger Zusammenarbeit zwischen MAT und IKTS wurden mehrere Versuche zur Beschichtung von Nitinolstents vorgenommen. Der Prozess zur Optimierung der Beschichtung und Problemstellungen, die während des Prozesses auftraten, ist hier beschrieben.

Der eindrätige Nitinol-Stent wurde, wie zuvor beschrieben, mittels CVD mit PLGA und Nanodiamanten beschichtet. Abbildung 19 zeigt REM-Aufnahmen mit unterschiedlicher Vergrößerung: Im Gegensatz zu dem beschichteten Draht sind hier keine Risse zu erkennen. Die Beschichtung ist relativ glatt und wird großflächig aufgetragen. An den Stellen, an denen sich die Drähte treffen, gibt es Defekte in der Beschichtung. Dies lässt sich dadurch erklären, dass diese Stellen aneinander reiben und die hohe Reibungskraft die Beschichtung an diesen Stellen abträgt.

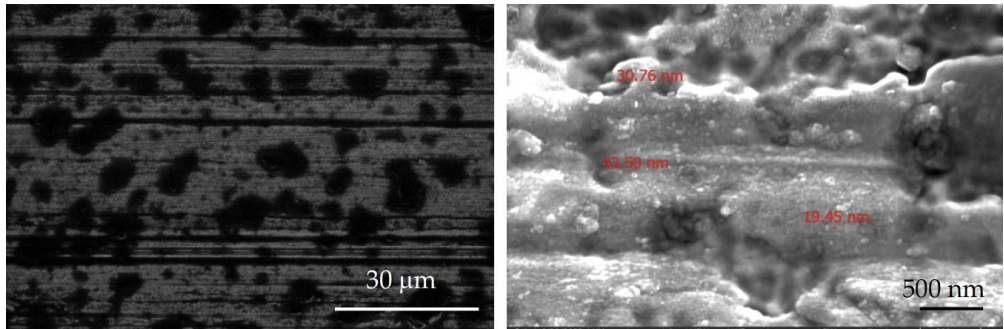


Darstellung der wichtigsten
wissenschaftlich-technischen
Ergebnisse

Abb. 19 SEM-Aufnahmen des beschichteten Nitinol-Stents mit unterschiedlicher Vergrößerung

Ein genauere Blick auf die Beschichtung der Stents zeigt, dass die Schicht nicht homogen ist und eine gesprenkelte Oberfläche hat. Dunkle Flecken weisen auf dickere, helle Flecken auf eine dünnere Beschichtung hin. Dies deutet auf eine inhomogene Schichtdicke hin. Vor dem FIB-Schneiden wurde zum Schutz der Beschichtung eine Mischung aus Platin und Kohlenstoff auf den gelb markierten Bereich aufgetragen. Es ist schwierig, zwischen PLGA (Poly(lactid-co-glycolid)) und Nanodiamanten zu unterscheiden, da beide aus Kohlenstoff bestehen. Auf dem Bild sind Partikel in der Beschichtung zu sehen, die markiert wurden. Die Beschichtung selbst ist glatt. Es scheint jedoch, dass Unebenheiten und Rillen im Stent während der Beschichtung aufgefüllt wurden, was zu einer dickeren Beschichtung an Stellen führte, an denen sich Löcher im Stent befanden. Um dies zu vermeiden, könnte ein Polieren des Stents in Erwägung gezogen werden, um eine bessere Qualität zu erreichen.

Die polymerbeschichtete Oberfläche wies sowohl unregelmäßige Poren (Hohlräume) als auch eine raue beschichtete Oberfläche auf. Die physikalische Integrität der Beschichtungsoberfläche ist für die klinische Anwendung von Stents von grundlegender Bedeutung. Bei einer unregelmäßigen Beschichtung besteht ein hohes Risiko, dass der Stent während der Implantation reibt und sich ein Thrombus bildet, während eine raue Oberfläche die Gefäßwand beschädigen kann. Der Stent muss eine glatte Oberfläche haben, um eine Aktivierung von Immunreaktionen wie Thrombozytenaggregation und VSMC-Proliferation zu vermeiden. Verschiedene Verfahren wurden bereits getestet und werden in Zukunft auf die ND-Lösung angewandt, um eine homogene Verteilung der ND in der Schicht zu gewährleisten und große Agglomerate zu vermeiden, um die gewünschte Funktion der Stentbeschichtung zu gewährleisten. Der Querschnitt wurde weiter mit TEM analysiert, um ein klareres Bild zu erhalten, wie in Abbildung 20 zu sehen ist. Die kleinen Punkte oben sind mit Kohlenstoff vermishtes Platin (dunkel). Der dunkle Bereich in der Mitte ist die Polymerschicht. Die hellere Schicht ist das Substrat.



Darstellung der wichtigsten wissenschaftlich-technischen Ergebnisse

Abb. 20 REM-Aufnahmen des Querschnitts der Beschichteten Stents

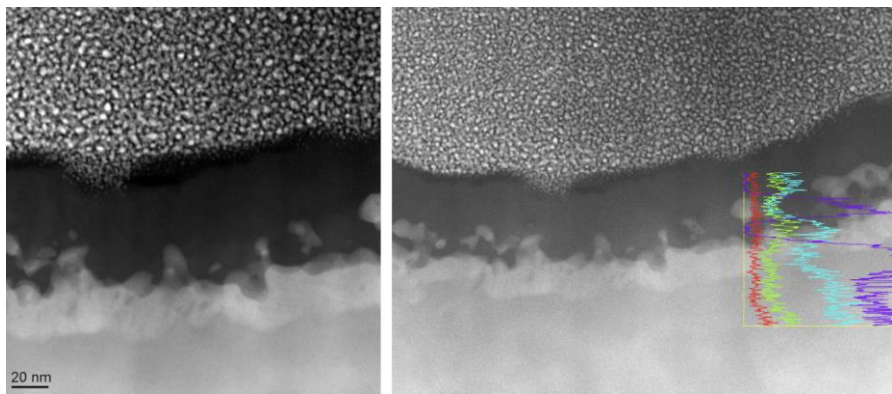
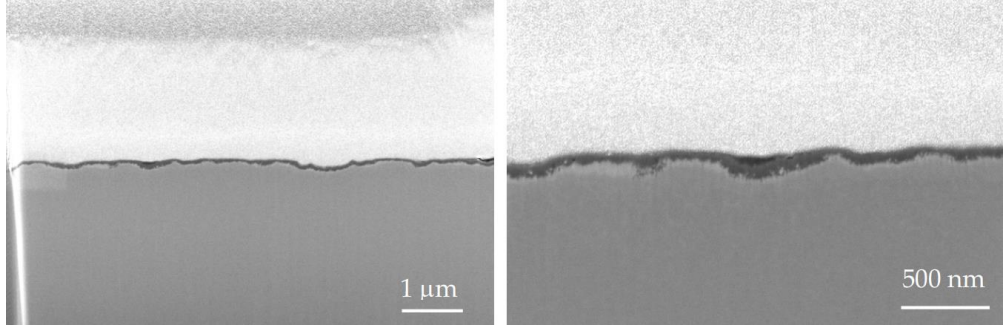
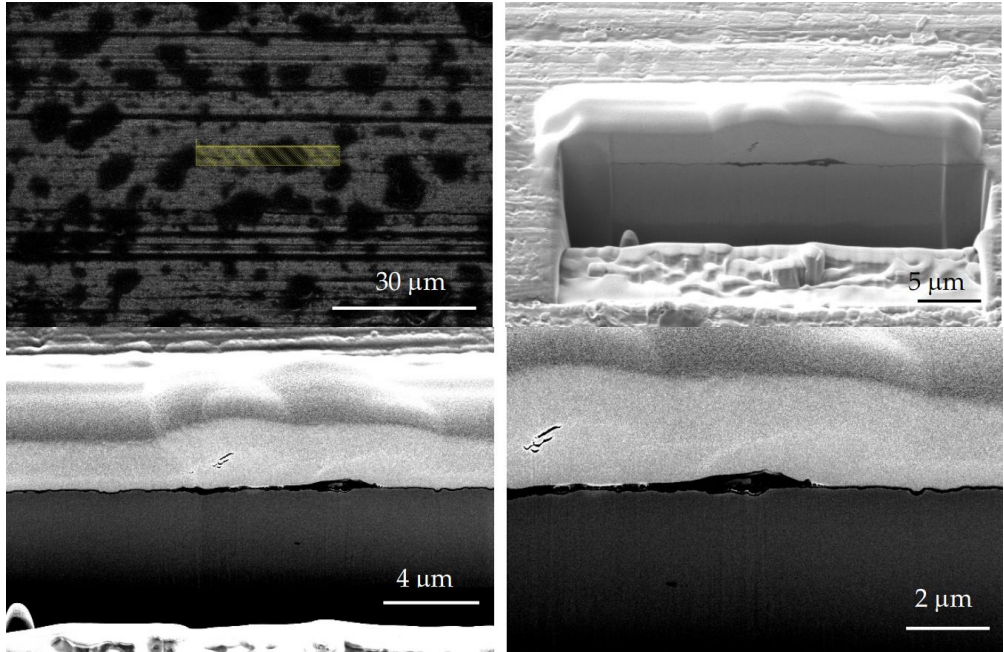


Abb. 21 REM-Aufnahmen des beschichteten Nitinol-Stents mit unterschiedlicher Vergrößerung des Querschnitts mit eingezeichnetem EDX-Linien-Scan.

Ein EDX-Linienscan wurde am Querschnitt durch die Polymerschicht und das Substrat durchgeführt (Abb. 21). Das Substrat weist sowohl Titan- als auch Nickelanteile auf. Ein größerer Peak für Nickel ist im helleren grauen Bereich des Substrats zu erkennen. Es gibt auch einen großen Peak für Nickel in einem hellen Punkt innerhalb der Polymerschicht. In den helleren grauen Bereichen ist der Nickelgehalt höher, während der Titangehalt deutlich niedriger ist als in den grauen Bereichen. In den grauen Bereichen ist der Nickelgehalt etwas höher als der Titangehalt im Substrat, aber fast gleichmäßig verteilt. Die hellere graue Schicht oberhalb des Substrats ist reicher an Nickel und enthält weniger Titan. Der runde Bereich ist das nickelhaltige Teilchen. Im polymeren Bereich (schwarz) ist ein gewisser Titananteil, z. B. in Form von Sauerstoff, zu erkennen. Der Kohlenstoffgehalt ist in dem gesamten Bereich gering. Es könnte sein, dass sich Titanoxid in der Polymerschicht befindet.

Um die Kristallstruktur zu erkennen, wurde ein hochauflösendes TEM durchgeführt (Abbildung 22). Links oben ist die Platinbeschichtung zu sehen. Das größere nickelhaltige Teilchen in der Beschichtung ist zu erkennen und mit einem violetten Kreis markiert. Innerhalb der Polymerstruktur ist ebenfalls eine gewisse Kristallstruktur vorhanden, was darauf hindeutet, dass sich in der Beschichtung Nanopartikel befinden (türkisfarbene Kreise). Es ist schwer zu sagen, ob die Struktur von Kohlenstoff stammt und auf Nanodiamanten in der Beschichtung hinweist oder ob sie von anderen Partikeln stammt. Außerdem wurden EDX-Punktspektren aufgenommen (Abbildung 23). Die Punkte, an denen die Spektren aufgenommen wurden, sind in Abbildung 22 zu sehen. Spektrum 1 wurde im Substrat aufgenommen (grauer Bereich). Es ist reich an Titan und Nickel, mit einem etwas größeren Nickelpeak. Es ist ein geringer Sauerstoffgehalt und ein sehr niedriger Kohlenstoffgehalt zu erkennen.

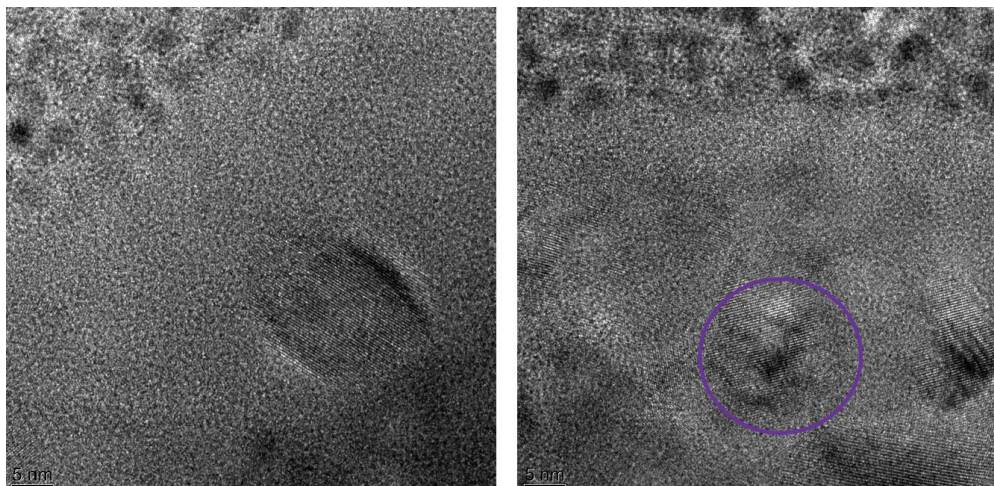


Abb. 22 HRTEM Aufnahmen des Querschnitts des beschichteten Stents mit Nickelhaltigen Partikeln lila umkreist und Nanopartikel türkis umkreist

Darstellung der wichtigsten wissenschaftlich-technischen Ergebnisse

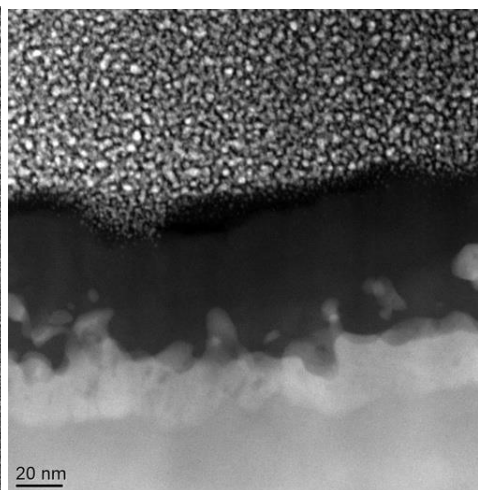
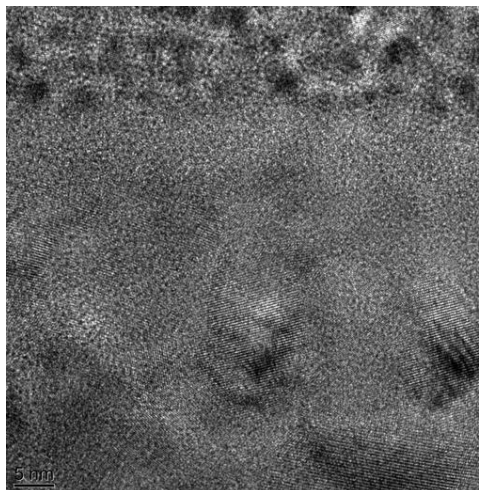
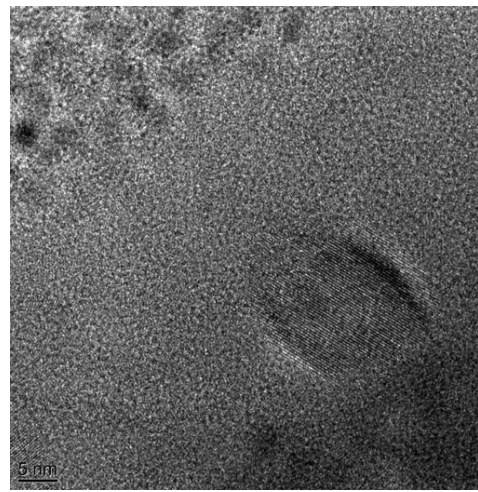
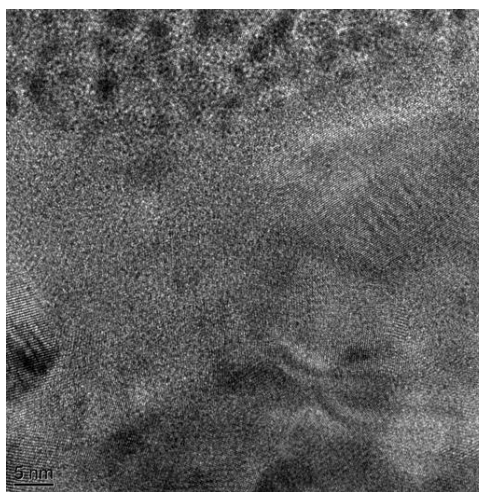
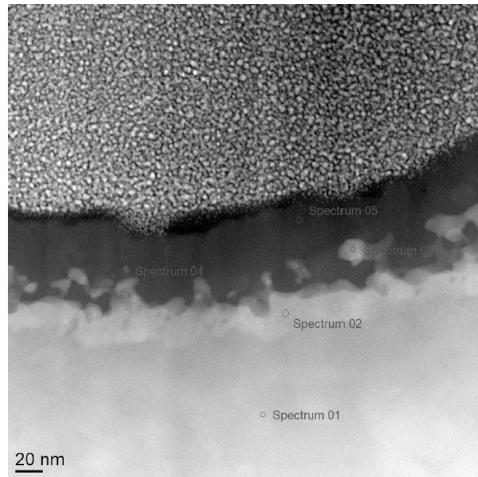
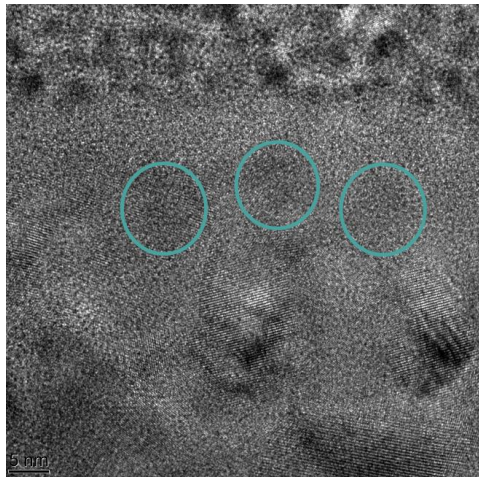
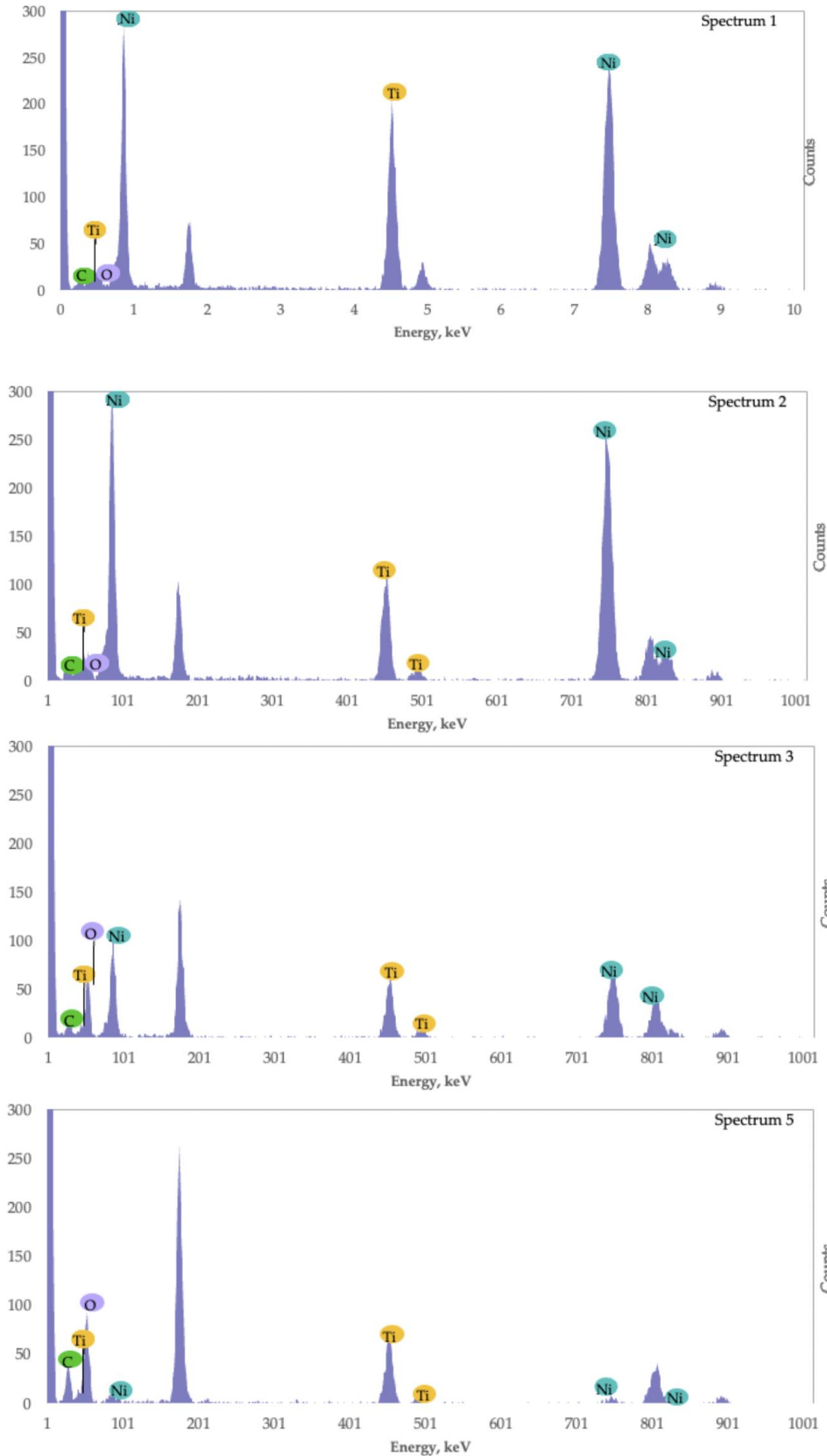


Abb. 23 EDX-Spektren von beschichteten Stents



Spektrum 2 wurde im helleren grauen Bereich, der Schicht über dem Substrat, aufgenommen. Hier ist das Verhältnis zwischen Titan und Nickel größer. Die Schicht ist reicher an Nickel, was mit dem Linienscan übereinstimmt. Spektrum 5 wurde in der

Polymerschicht aufgenommen und zeigt einen stärkeren Peak in Kohlenstoff, aber auch einen signifikanten Peak in Titan und Sauerstoff, was darauf hindeutet, dass sich einige titanhaltige Partikel in der Polymerschicht befinden. Da wir eine zufällige Ausrichtung des Diamanten haben, ist es schwierig zu unterscheiden, welche Art von Nanopartikeln zu sehen ist. Es sollten andere Techniken in Betracht gezogen werden, um das Vorhandensein von Nanodiamanten in der Beschichtung nachzuweisen.

Eine Bakterienkontamination verzögerte die Arbeit stark, da das Problem behoben werden musste, bevor weitere Versuche gestartet werden konnten. Abbildung 21 oben zeigt REM-Aufnahmen nach dem dynamischen Degradationsversuch in HBSS. Jedoch waren zuvor bereits Bakterien auf den Stents, wie in Abbildung 24 unten zu sehen ist, wenn auch nicht viele. Diese Bakterien haben sich folglich durch die guten Bedingungen im Degradationsversuch (pH und Temperatur) vermehrt, sodass es zu einem hohen Bakterienausbruch kam. In Zukunft war besonders darauf zu achten, dass es vor den Versuchen nicht zu einer Kontamination kommt. Wie zuvor beschreiben kann jedoch weder mit Ethanol noch Aceton gereinigt werden. In Zukunft sollen unterschiedliche Sterilisationsmethoden getestet werden.

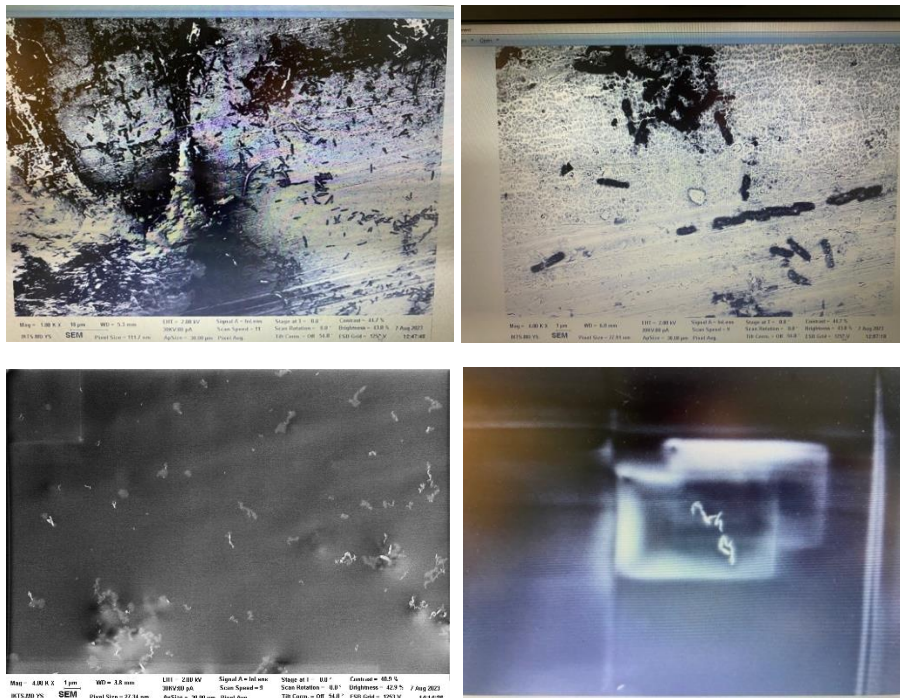


Abb. 24 REM-Aufnahmen des beschichteten Nitinol-Stents mit unterschiedlicher Vergrößerung und Bakterienkontamination

In der dritten Phase der Arbeit wurden Nitinol-Stents mit einer höheren Anzahl von CVD-Zyklen beschichtet, um zu sehen, ob die Dicke auf kontrolliertem Wege verändert werden kann. Abbildung 24 zeigt eine Vergrößerung der Stents, die mit einer Au-Oberfläche beschichtet wurden, da PLGA und Nanodiamant nicht leitend sind und die Beschichtung aufgeladen wurde. Die Beschichtung ist recht glatt (Topographie). Entlang des Drahtes sind einige Risse zu sehen, die jedoch von der Au-Beschichtung herrühren können. Eine andere Möglichkeit ist, dass die Risse aufgrund der größeren Dicke in der Beschichtung liegen. Da die Stents mit demselben Material beschichtet sind, ist es schwierig, Partikel mit einer anderen molekularen Ordnung, wie z. B. Nanodiamanten, zu untersuchen. Abbildung 25 wurde ohne die Au-Beschichtung aufgenommen. Wie man sieht, ist die Oberfläche aufgeladen, und es ist schwierig, gute Bilder zu machen. ND ist zu sehen. Es sind kleinere und größere Partikel zu sehen, bei denen es sich um Nanodiamanten handeln könnte.

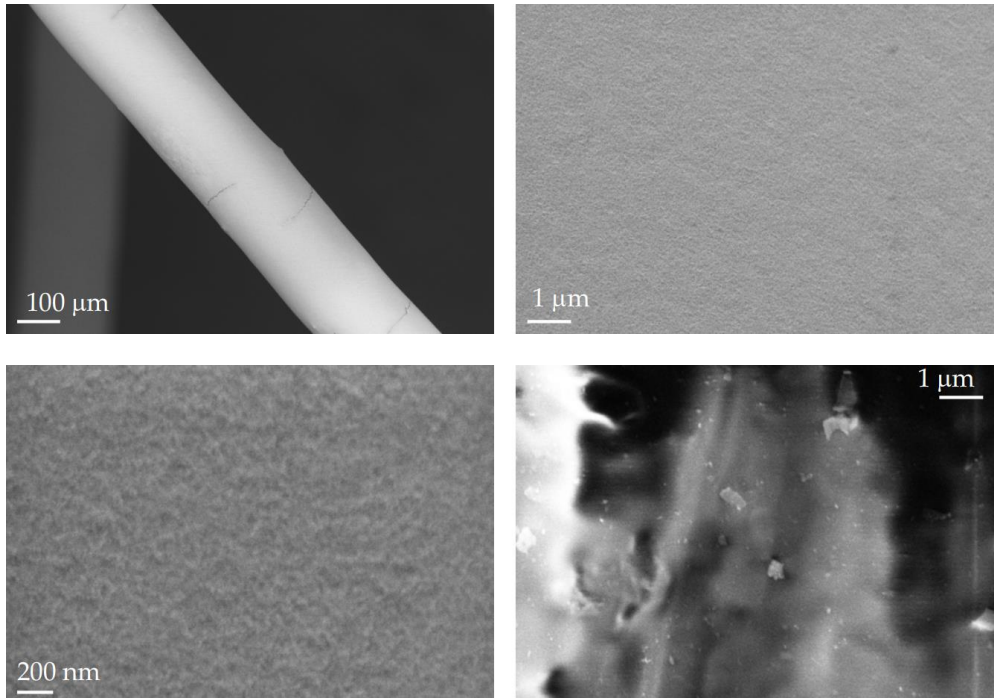


Abb. 25 REM-Aufnahmen des beschichteten Nitinol-Stents mit unterschiedlicher Vergrößerung

Nachdem die Stents mit 3 Zyklen beschichtet worden waren, wurde ein FIB-Querschnitt erstellt, wie in Abbildung 26 zu sehen ist. Die Beschichtung ist porös. Die Dicke der Beschichtung ist recht hoch, bis zu 3 µm. Die Oberfläche ist glatt. Es wurde festgestellt, dass die Beschichtung porös ist und interne Hohlräume aufweist. Diese Porosität kann auf mehrere Faktoren zurückzuführen sein. Eine mögliche Ursache für die Porosität könnte in der Beschaffenheit des Stents selbst liegen. Wenn der Stent Unebenheiten oder Rillen aufweist, können diese während des Beschichtungsprozesses nicht aufgefüllt werden, was zu porösen Bereichen führt. Eine Lösung könnte darin bestehen, den Stent vor dem Beschichtungsprozess zu polieren, um eine glattere Oberfläche zu erhalten und eine bessere Haftung der Beschichtung zu gewährleisten.

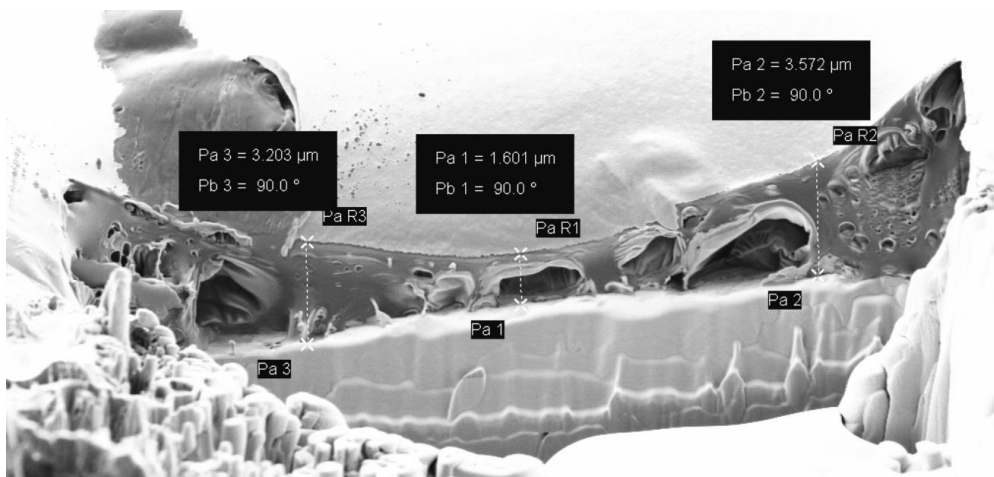


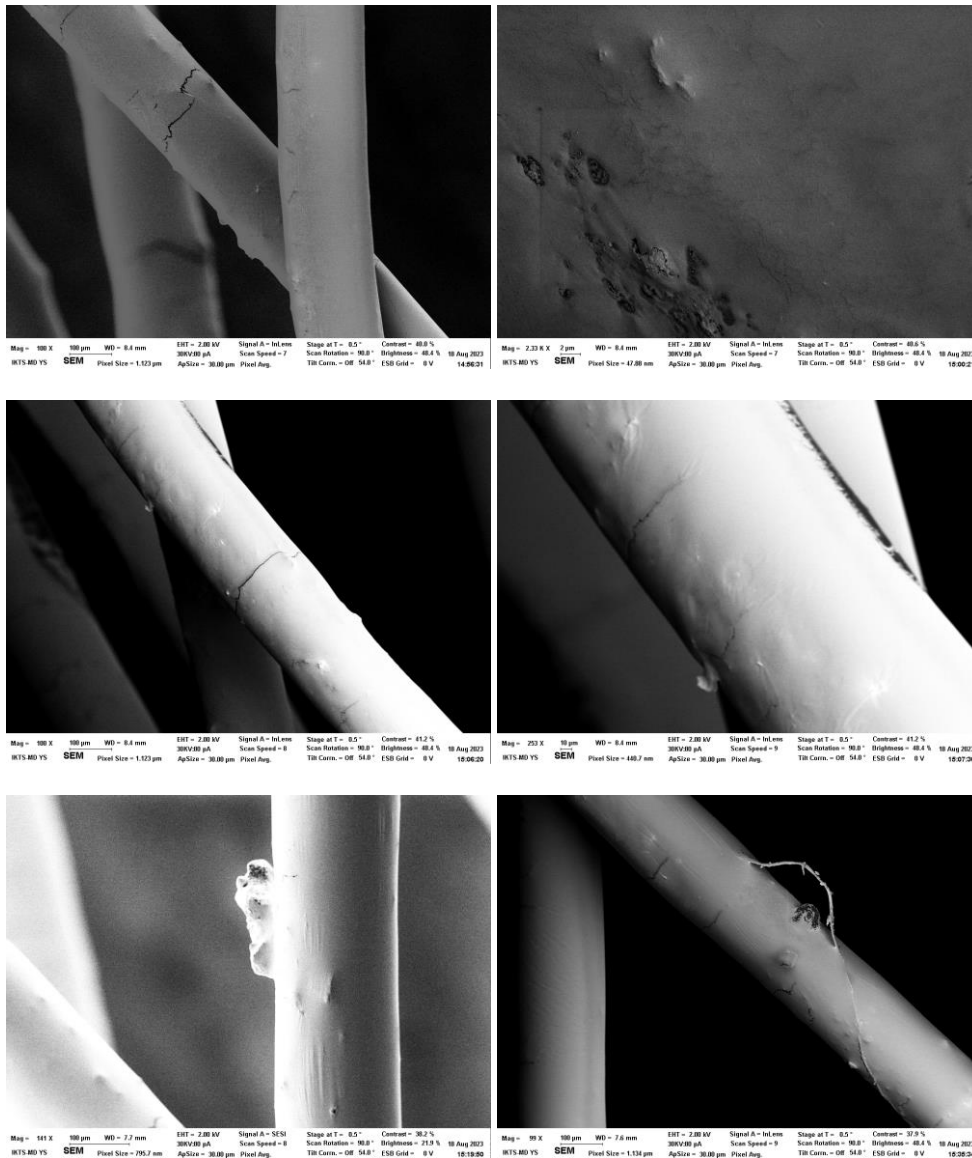
Abb. 26 REM-Aufnahmen des beschichteten Nitinol-Stents vom FIB-Schnitt mit eingezeichneten Größen für die Schichtdicke.

Eine weitere mögliche Ursache könnte der Beschichtungsprozess selbst sein. Wenn die Beschichtung nicht gleichmäßig aufgetragen oder die Schichtdicke nicht kontrolliert wird, können poröse Bereiche entstehen. Um dies zu vermeiden, könnte eine optimierte Beschichtungstechnik entwickelt werden, die eine homogene Verteilung der Beschichtung und eine gleichmäßige Schichtdicke gewährleistet. Außerdem könnte die poröse Oberfläche der Beschichtung zum Teil durch die schnelle Verdunstung des

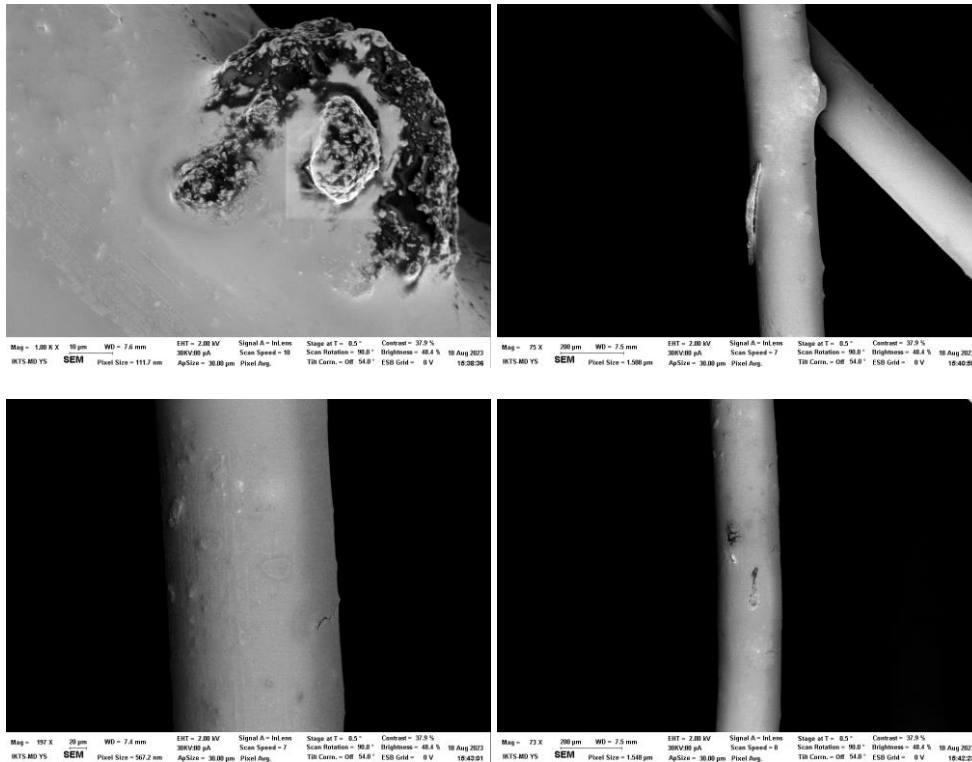
Lösungsmittels während des Trocknungsprozesses der Stents verursacht werden. Diese Oberfläche könnte durch eine Verlängerung der Verdunstungszeit des Lösungsmittels verbessert werden. Weitere Studien sind erforderlich, um die optimalen Beschichtungsbedingungen und fortschrittliche Trocknungsmethoden zur Überwindung poröser und unregelmäßiger Oberflächen zu finden. Die künftige Forschung könnte sich darauf konzentrieren, die genauen Ursachen für die Porosität der Beschichtung zu ermitteln und geeignete Maßnahmen zur Lösung dieses Problems zu ergreifen. Dazu könnten die Entwicklung neuer Beschichtungsmethoden, die Verwendung von Zusatzstoffen zur Verbesserung der Haftung oder die Optimierung der Prozessparameter gehören.

Darstellung der wichtigsten wissenschaftlich-technischen Ergebnisse

Abb. 27 REM-Aufnahmen des beschichteten Nitinol-Stents mit unterschiedlicher Vergrößerung von Charge 3.



Darstellung der wichtigsten wissenschaftlich-technischen Ergebnisse



Außerdem wurde ein EDX-Mapping der geschnittenen Stentdrähte durchgeführt. Abbildung 28 zeigt den unbeschichteten Stentdraht (oben) und den beschichteten Stentdraht (unten). Bei dem beschichteten Stent ist der Kohlenstoffgehalt (grün) im Vergleich zum unbeschichteten Stent hoch. Der Titan und Nitinolgehalt ist bei dem unbeschichteten Stent höher und bei dem beschichteten Stent niedriger, da die Beschichtung hauptsächlich aus Kohlenstoff besteht.

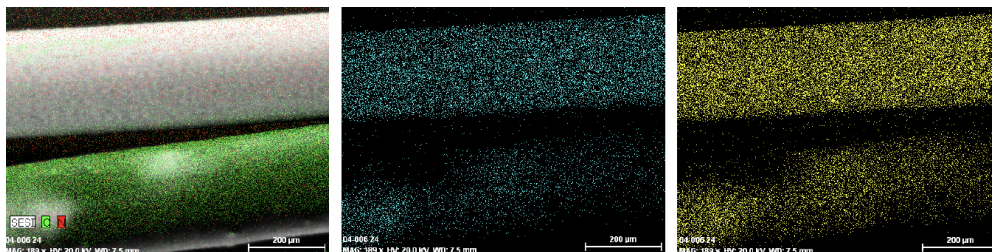


Abb. 28 REM-Aufnahmen des beschichteten Nitinol-Stents mit EDX-Mapping; grün: Kohlenstoff, rot: Stickstoff, Blau Nitinol, Gelb: Titan.

Es sind deutlich Nanodiamantenagglomerate zu erkennen, die scheinbar nicht genügend deagglomeriert wurden. Verschiedene Verfahren wurden hier bereits wie zuvor beschrieben getestet und sollen in Zukunft auf die ND-Lösung angewandt werden, um eine homogene Verteilung der ND in der Schicht zu gewährleisten und große Agglomerate zu vermeiden, um die gewünschte Funktion der Stentbeschichtung zu gewährleisten.

Raman-Spektroskopie

Die Raman-Spektroskopie wurde an dem beschichteten Stent durchgeführt, um festzustellen, ob Nanodiamanten in der Beschichtung vorhanden sind (Abbildung 29). Es sind verschiedene Peaks für das Polymer zu beobachten. Der Peak bei 1332 cm^{-1} zeigt, dass Nanodiamanten in der Beschichtung vorhanden sind. Der Peak ist im Vergleich zu den anderen Peaks nicht sehr groß, was auf die geringere Konzentration von ND im Vergleich zum Polymer zurückzuführen ist.

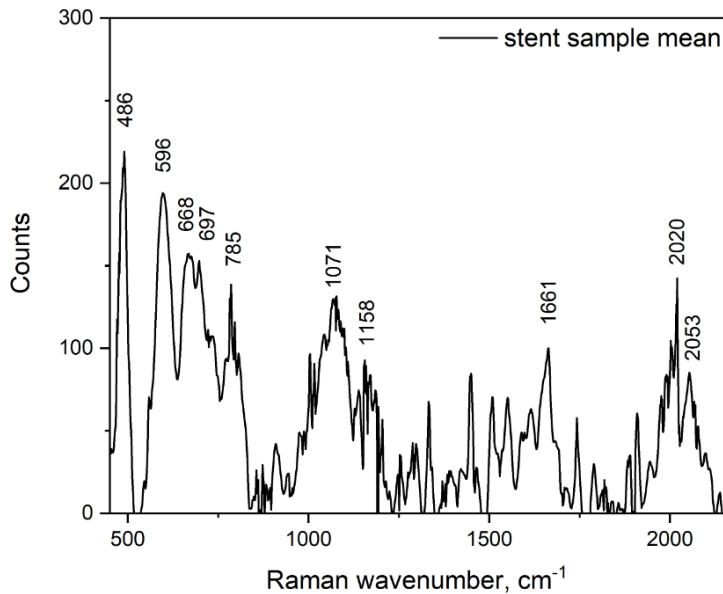


Abb. 29 Ramanspektrum eines beschichteten Stents.

Potentiodynamische Kurven

In Abbildung 30 sind die erhaltenen potentiodynamischen Kurven in HBSS-Lösung dargestellt. Das Korrosionsverhalten von Nitinolstents und beschichteten Stents wird durch das Durchbruchpotenzial charakterisiert. Die Polarisationskurven zeigen die Durchbruchpotentiale, die die Anfälligkeit der Stents für Lochfraßkorrosion in Abhängigkeit vom Oberflächenzustand zeigen. Die Analyse der Tafelkurve gibt Aufschluss über die Stabilität der Oxidbildung auf der Oberfläche und die Korrosionsanfälligkeit. Die Kurve ist für den beschichteten Stent nach rechts verschoben. Das bedeutet, dass die Korrosionsstromdichte höher ist und somit die Korrosionsrate höher ist (Montañez 2008).

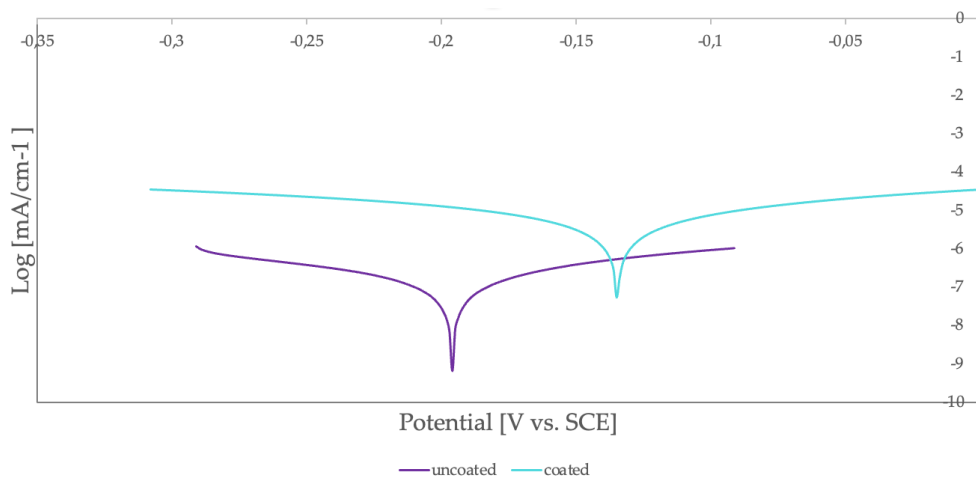


Abb. 30 Tafel-Plot für einen nicht beschichteten Stent (lila), Stent-Draht und beschichteten Stent-Draht (türkis) bei Raumtemperatur.

Die Korrosionsparameter sind der Abb. 31 zu entnehmen. Die erhaltene Korrosionsrate für den Nitinoldraht betrug $0,28 \mu\text{m}/\text{Jahr}$, wie für diese Zusammensetzung der Testlösung und die verwendeten Parameter erwartet (N. P. Montañez 2016). Die Korrosionsrate für den beschichteten Stent war mit $24,8 \mu\text{m}/\text{Jahr}$ deutlich höher.

Abb. 31: Korrosionsparameter

| | unbeschichteter Stent | beschichteter Stent |
|--|------------------------------|----------------------------|
| Corrosion Potential E_{corr}, Obs (V) | -0.19602 | -0.087798 |
| Corrosion current density j_{corr} | 2.1131E-07 | 1.1039E-05 |
| Corrosion current i_{corr} (A) | 8.1777E-08 | 3.1208E-06 |
| Corrosion rate (mm/year) | 0.0028113 | 0.24805 |
| Polarization resistance (Ω) | 180810 | 6825 |
| Corrosion Potential E_{corr}, Calc (V) | -0.19907 | -0.088438 |
| ba (V/dec) | 0.070517 | 0.095901 |
| bc (V/dec) | 0.065827 | 0.10037 |
| E Begin (V) | -0.23224 | -0.14114 |
| E End (V) | -0.15427 | -0.033264 |

Der Wert des Korrosionspotenzials ist für den beschichteten Stent niedriger, was darauf hindeutet, dass die Korrosionsanfälligkeit größer ist als bei dem unbeschichteten Stent. Das bedeutet, dass der Draht selbst anfälliger für die Angriffe der Salze in der Lösung ist. Ein höheres Potenzial kann ein Indikator für die Bildung einer Oxidschicht auf der Oberfläche des Stents sein, die ihn schützt. Diese Schicht enthält normalerweise Titandioxid und einige Spuren von Nickeloxid (Montanez 2008).

In-vitro-Degradationsstudie

Die In-vitro-Degradationsstudie wurde durchgeführt, um die Polymerabbaurate und somit die ND-Freisetzung im Laufe der Zeit zu evaluieren. Die prozentuale Menge des Gewichtsverlusts für den statischen und dynamischen (mit kontinuierlichem Fluss) Abbau ist in Abbildung 32 zu sehen. Die Kurven für die Abbauprofile folgen einer insgesamt linearen Regression, was ein Indikator dafür sein könnte, dass sich die Beschichtungen gleichmäßig abbauen. Nach 6 Tagen sind 17 % der Beschichtung bei statischer Degradation und 31 % bei dynamischer Degradation abgebaut. Stents mit dynamischer Degradation hatten eine höhere Degradationsrate als Stents mit statischer Degradation. Es muss jedoch erwähnt werden, dass der Massenverlust einige Sprünge aufwies, zum Beispiel nach drei Tagen beim dynamischen Abbau, was auf die Entfernung größerer Teile der Beschichtung zurückzuführen sein könnte. Weitere Untersuchungen müssten mit dem REM durchgeführt werden, um das Degradationsverhalten zu bestätigen.

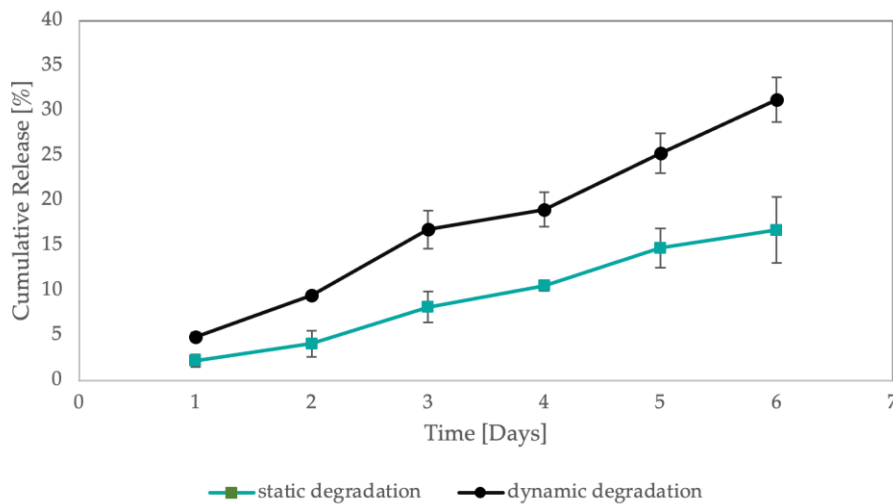
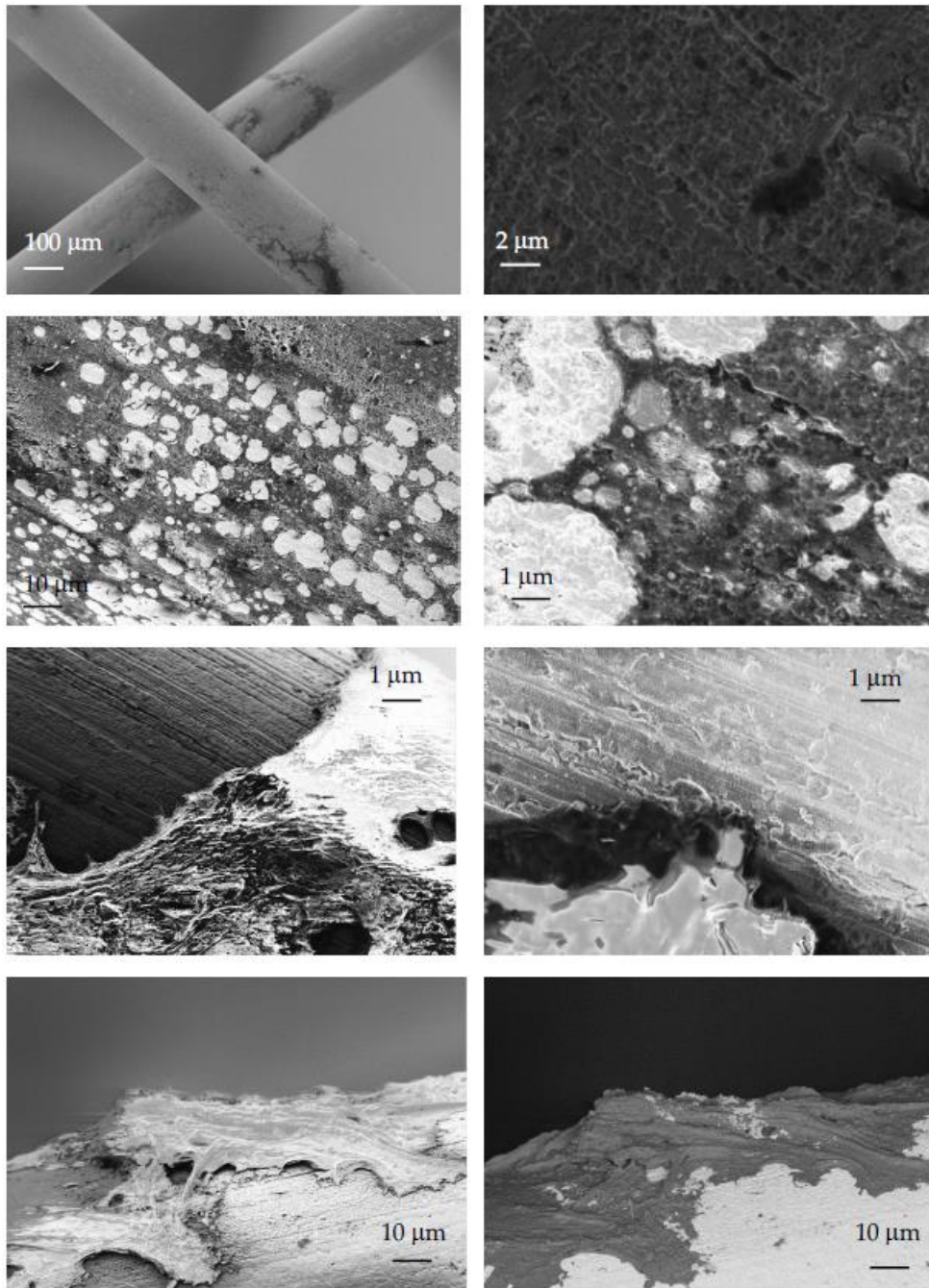


Abb. 32 Massenverlust bei statischer und dynamischer Degradation.

Von den abgebauten Proben wurden REM-Aufnahmen angefertigt, um die Degradation der Beschichtung zu bestätigen. Nach einem Tag des statischen Abbaus ist keine Entfernung der Beschichtung zu erkennen. In dem Bereich, in dem sich die Stentdrähte berühren und die Beschichtung bereits beschädigt war, ist nach drei Tagen statischer Degradation ein gewisser Abbau zu beobachten. Nach zehn Tagen statischer Degradation erfolgt der Abbau in Flecken, wie in Abbildung 33 zu sehen ist. Die ESB bestätigt, dass der dunklere Bereich die Beschichtung und der hellere Bereich das Metall ist.

Wie zuvor zu sehen war, ist die Beschichtung porös. Möglicherweise wird die Beschichtung in den Bereichen, in denen sie bereits dünn war, nach dem Abbau entfernt. In den hellen Bereichen wurde das Polymer vollständig entfernt. In den dunkleren Bereichen ist die Oberfläche sehr porös und weist Löcher auf. Es ist möglich, dass dies bereits vorher vorhanden war und nicht unbedingt auf Zersetzung zurückzuführen ist. Bei der dynamischen Degradation wird die Beschichtung in großen Bereichen entfernt. Es ist möglich dass sich größere Risse gebildet haben und durch die kontinuierliche Strömung größere Teile der Beschichtung abgetragen wurden.



Darstellung der wichtigsten wissenschaftlich-technischen Ergebnisse

Abb. 33 REM Bilder der beschichteten Stents nach a) einem Tag statischer Degradation; b) c) d) e-h) fünf Tage dynamischer Degradation; h) ESB.

Optischer Nachweis von Nanodiamanten

Zum Nachweis von Nanodiamanten in der Flüssigkeit wurde UV-Vis Spektroskopie durchgeführt. Die Kurven zeigen signifikante Peaks bei 268 nm, 361 nm und einen Peak bei 433 nm, der in Abbildung 34 als Schulter zu sehen ist. Abbildung 35 zeigt die Kalibrierungskurve von ND in Wasser. Auf der Grundlage der linearen Anpassung an die experimentellen Daten wurden die Absorptionsintensitäten der ND-Lösung in Wasser für ultraschallbehandelte Lösungen und deagglomerierte Lösungen berechnet.

Die Werte an den Peaks wurden für verschiedene Konzentrationen gesammelt und es wurde der Durchschnitt von drei Messungen berechnet. Auf diese Weise wird die Abhängigkeit der optischen Absorption von der Konzentration bestimmt. Die Abbildung

zeigt die Absorptionskonzentrationsbeziehung bei drei festen Wellenlängen, wie sie vor der Darstellung der Peaks ermittelt wurde. Die Absorption nimmt mit höheren Konzentrationen von ND in der Lösung zu. Im Bereich von 0 mg/ml bis 0,04 mg/ml ist die Beziehung linear. Bei höheren Konzentrationen ist die Abhängigkeit nichtlinear. Da bei den Abbaubersuchen nur niedrige Konzentrationen erreicht werden, genügt es, die Funktion für den linearen Teil der Kurve zu finden. Die Steigungen sind dementsprechend zu sehen.

Darstellung der wichtigsten wissenschaftlich-technischen Ergebnisse

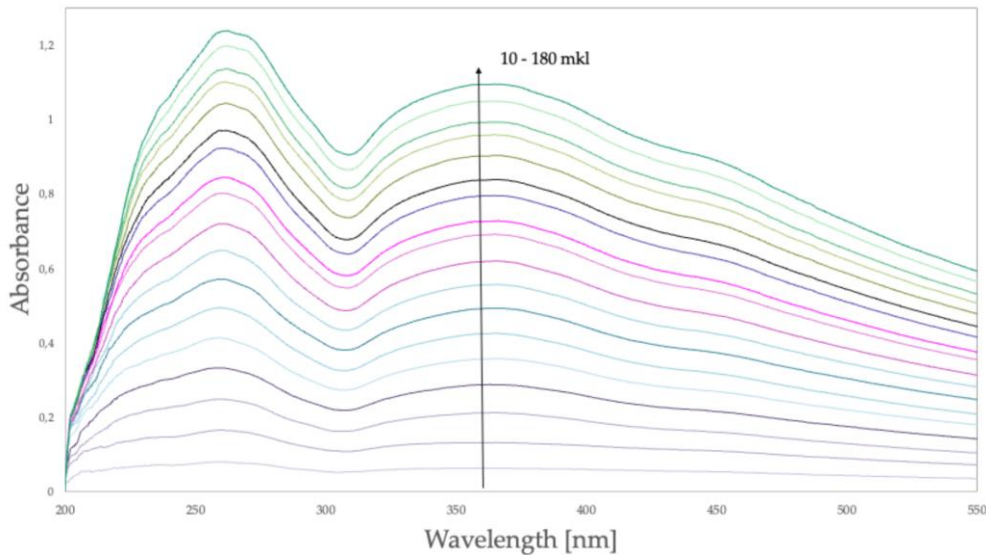


Abb. 34 UV/Vis Spektre von Acyl-ND in Wasser für verschiedene Konzentration, die von 10 mkl bis 180 mkl reichen.

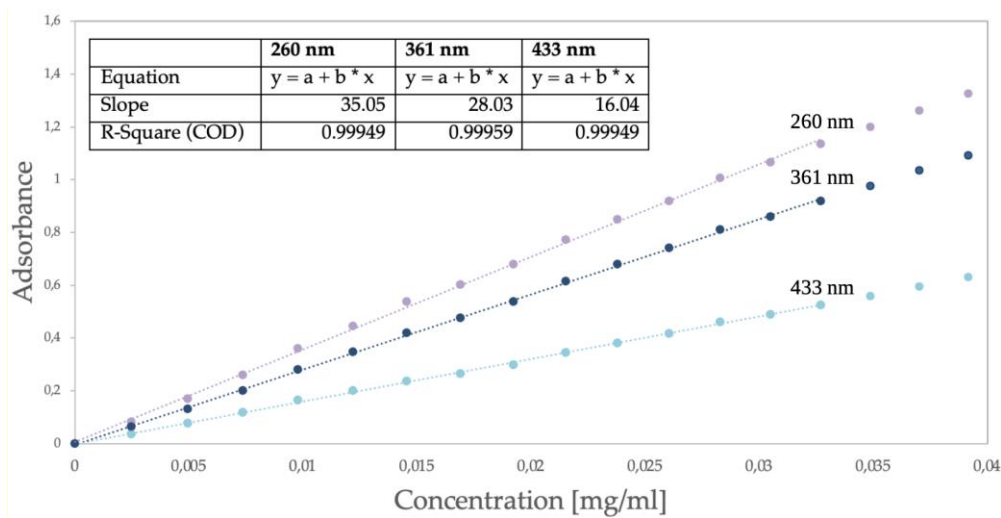


Abb. 35 UV/Vis-Kalibrierungskurve von ND-Konzentration in Wasser. Konzentration über Absorption wurde für drei Wellenlängen evaluiert (260 nm, 361 nm, und 433 nm). Die Neigung wurde via Origin bestimmt.

Die Freisetzung von Nanodiamanten aus beschichteten Stents wurde nach einem Tag, nach drei Tagen und nach fünf Tagen via dynamischen Abbau in HBSS untersucht. Da die Absorption bei 433 nm nahe an derjenigen liegt, die zur Kalibrierung der ND-Konzentration gewählt wurde, wurde sie für die Berechnung der ND-Konzentration in der Lösung gewählt. Wie zu erkennen ist, nimmt die Intensität des Peaks mit der Erhöhung der Konzentration der ND zu. Mit Hilfe der Korrelationsfunktion wurde die Konzentration der ND berechnet. Die erhaltenen Konzentrationen sind der Abbildung 36 zu entnehmen. Beim statischen Abbau wurden nur 2,9 µg/ml in der Lösung nachgewiesen. Bei den dynamischen Abbaubersuchen wurden höhere Mengen an ND in der Lösung gefunden. Bei längerer Eintauchdauer nahm die Menge an ND zu. Die Konzentration nahm um etwa 100 µg/ml pro Tag zu. Die Bestimmung der Konzentration auf der Grundlage von HBSS

als Hintergrund war schwierig, da sich der pH-Wert bei unterschiedlichen Konzentrationen von ND ändert.

Darstellung der wichtigsten wissenschaftlich-technischen Ergebnisse

| Probe | Konzentration [mg/ml] |
|------------------|-----------------------|
| 5 Tage dynamisch | 0,0687 |
| 3 Tage dynamisch | 0,0514 |
| 1 Tage dynamisch | 0,0429 |
| 4 Tage dynamisch | 0,0029 |

Abb. 36: Konzentration der ND in Lösung nach dem Abbau.

Beschichtung an Stents

Die Beschichtung von Stents müsste durch mehrere Optimierungsschritte der Beschichtungstechnologie vorgenommen werden. **Erste Beschichtungsreihe:** Die Beschichtung zieht sich zurück und ist nicht vollständig auf dem ganzen Stent aufgetragen. Dies kann mit der Oberflächenbeschaffenheit zu tun haben. Charge 2 war im Vergleich erfolgreicher. Die nun erhaltenen Stents wurden zuvor beschichtet und die nicht gelungene Beschichtung wurde entfernt und die Stents gereinigt. Es wird vermutet, dass während des Beschichtungsprozesses die Oberfläche des Stents insoweit verändert wird, dass diese eine geringere Adhäsion gegenüber dem Polymer aufweist als zuvor. Dieses Verhalten wird zum einen belegt indem die Grenzschicht zwischen der Beschichtung und dem Stent betrachtet wird.

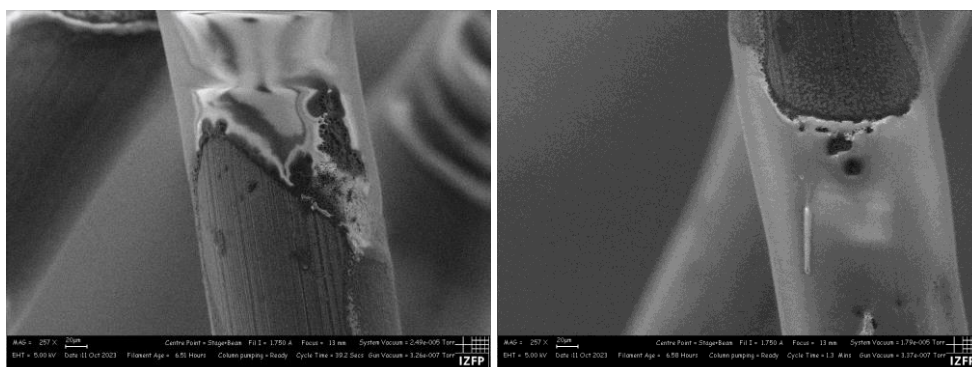
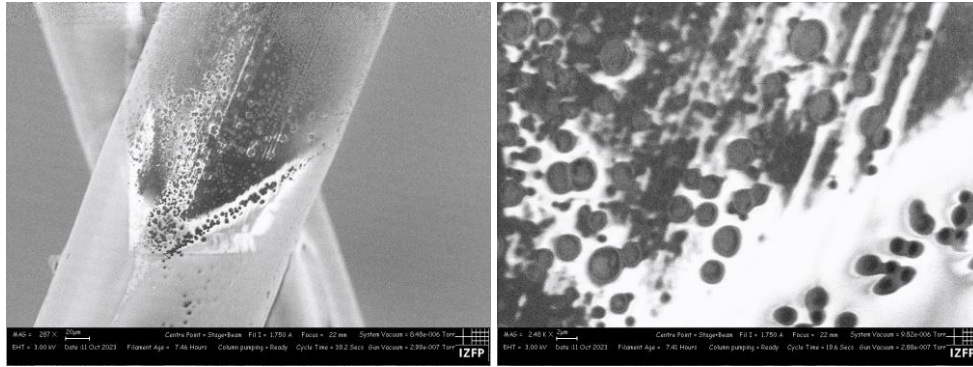


Abb. 37 REM-Aufnahmen des beschichteten Nitinol-Stents mit unterschiedlicher Vergrößerung



Darstellung der wichtigsten wissenschaftlich-technischen Ergebnisse

Zweite Beschichtungsreihe: Beschichtung von Stahlstents

Da sich die Beschichtung von Nitinol-Stents für den Partner MAT als schwierig erweist, wurden nun Stahlstents beschichtet. Dies diente dazu einen ‚Proof of Concept‘ zu erzielen und eine homogene Beschichtung mit incorporierten Nanodiamanten zu erhalten. In Abbildung 38 ist der beschichtete Stahl Stent zu sehen.

Die Beschichtung weist teils homogene Abschnitte auf dem Stent auf, teils ist jedoch wieder, dass Muster zu erkennen, welches zuvor gezeigt wurde, bei dem sich die Beschichtung zurück zu ziehen scheint und keine ausreichende Adhesion zwischen dem Polymer und dem Stent vorhanden ist. An den Enden des Stents ist zu viel Beschichtung vorhanden, sodass der Zwischenraum zwischen den Drähten voll mit Polymer ausgefüllt ist. Die Beschichtungsparameter müssen weiter optimiert werden.

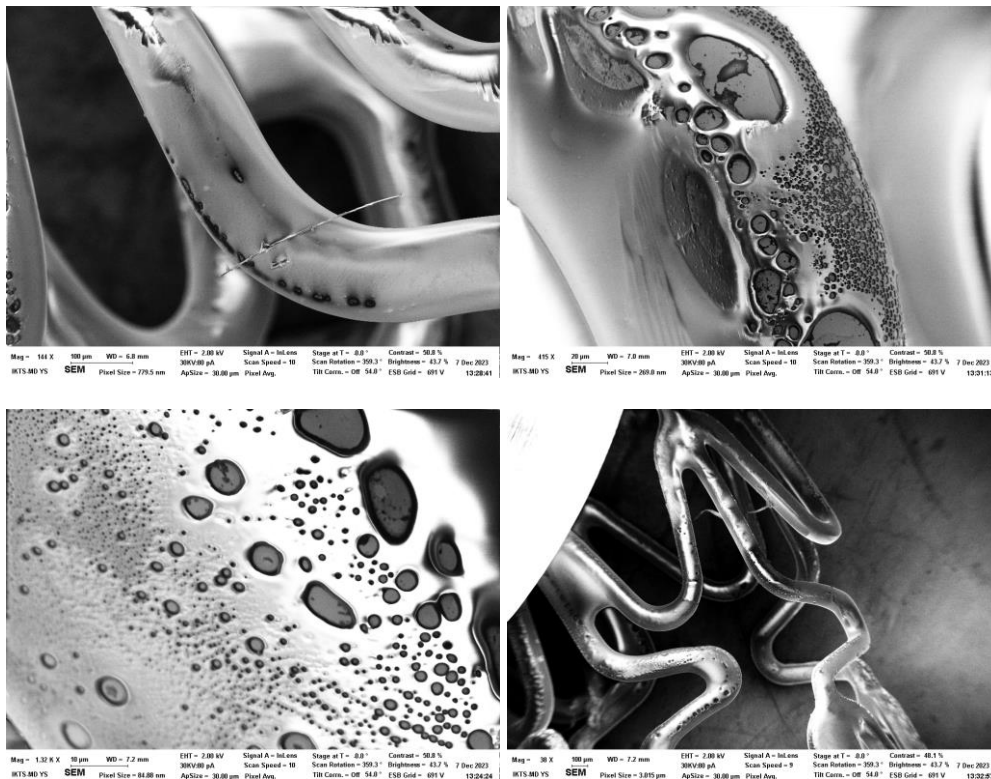
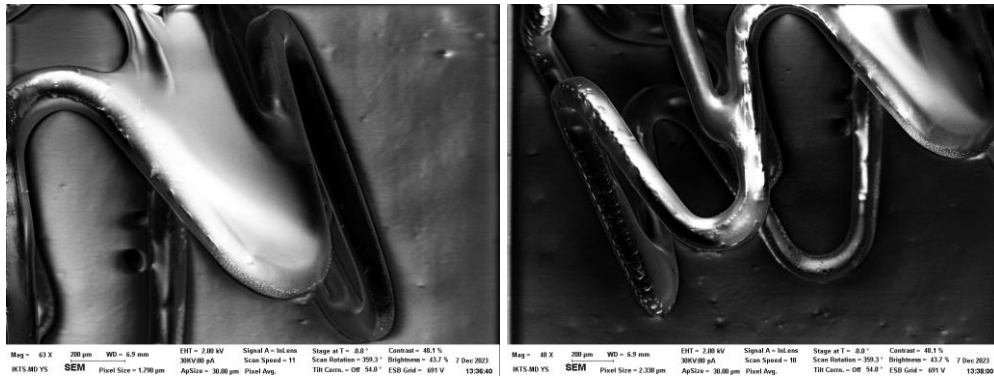


Abb. 38 REM-Aufnahmen des beschichteten Nitinol-Stents mit unterschiedlicher Vergrößerung



2. Vergleich des Standes des Vorhabens mit der ursprünglichen Arbeits-, Zeit- und Kostenplanung

Dritte Beschichtungsreihe: Beschichtung von Nitinol-Stents

Nach der Optimierung der Beschichtungsparameter wurde eine homogene Beschichtung auf der Stent-Oberfläche erreicht.

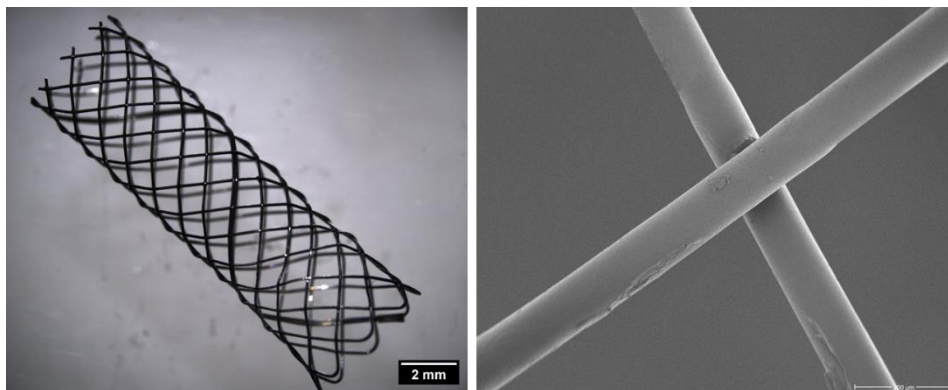


Abb. 39 Mikroskopische und REM-Aufnahme des beschichteten Nitinol-Stents mit eingebetteten ND

2 Vergleich des Standes des Vorhabens mit der ursprünglichen Arbeits-, Zeit- und Kostenplanung

Die Bearbeitung der Arbeitspakete ist planmäßig abgeschlossen. Die Arbeiten sind entsprechend des ursprünglichen Arbeits- und Zeitplanes durchgeführt worden. Die personellen Finanzmittel sind entsprechend der Planung abgerufen worden.

3 Haben sich die Aussichten für die Erreichung der Ziele des Vorhabens innerhalb des angegebenen Berichtszeitraums gegenüber dem ursprünglichen Antrag geändert?

Nein.

4 Sind inzwischen von dritter Seite FE-Ergebnisse bekannt geworden, die für die Durchführung des Vorhabens relevant sind?

4. Sind inzwischen von dritter Seite FE-Ergebnisse bekannt geworden, die für die Durchführung des Vorhabens relevant sind?

Nein.

5 Sind oder werden Änderungen in der Zielstellung notwendig?

Nein, sie sind nicht notwendig.

6 Jährliche Fortschreitung des Verwertungsplans

Das Projekt CARANAT hat eine für die industrielle Evaluation taugliche Technologie für die effiziente Beschichtung von Stentimplantaten entwickelt. Die wesentliche Zielanwendung des Projektergebnisses ist die Verbesserung der Qualität von kardiovaskulären Stents und Steigerung des Erfolgs bei deren Einsatz in Patienten. Die neue Technologie und die mit deren Hilfe hergestellten Produkte sollen einen wesentlichen Beitrag leisten, um eine optimale Behandlung von Gefäßerkrankungen zu ermöglichen. Weitere Einsätze ergeben sich auf Medizinprodukten wie z.B. Gelenkprothesen und Katheter.

Als Folgeschritt nach dem Projektende wird eine gemeinsame Validierung der Beschichtungstechnologie und ihre Integration in die Produktion vorgenommen. Die entwickelte Technologie für Stent-Beschichtungen wird ein hohes Potential für die Realisierung ursprünglicher Lösungen im Zusammenspiel mit neuen Trends der Medizintechnik entwickeln. Höhere Abscheidungsraten der Beschichtung, eine weitere Anhebung der Oberflächenhomogenität, die Anwendung in anderen Implantaten sowie der Einsatz für dünne Gefäße und klassische Stents sind nur einige Beispiele. Vielversprechend ist ebenso die Aufweitung des Verfahrens für die Produktion miniaturisierter Stents für zerebrale Gefäße und neurologische Anwendungen.

Durch den guten Industrienetzwerk des Fraunhofer IKTS wird nach dem Projektende eine enge Kooperation mit Industriepartnern etabliert. Es bestehen sehr gute Kontakte zu den Firmen MAT (deutscher Lohnbeschichter), Alvimedica und Balton Ltd. (europäischer Hersteller von Stent-Implantaten), die an Projektergebnissen interessiert sind.

7 Literaturverzeichnis

1. Basalus, M., van Houwelingen, K.G., Ankone, M., de Man, F., von Birgelen, C., 2009. Scanning electron microscopic assessment of the biodegradable coating on expanded biolimuseluting stents. *EuroIntervention* 5, 505–510. <https://doi.org/10.4244/EIJV5I4A80>
2. Wilkins, E., Wilson, L., Wickramasinghe, K., Bhatnagar, P, Leal, J, Luengo-Fernandez, R, Burns, R, Rayner, M, Townsend, N, 2017. *European Cardiovascular Diseases Statistics 2017*.
3. Bowen, P.K., Shearier, E.R., Zhao, S., Guillory, R.J., Zhao, F., Goldman, J., Drelich, J.W., 2016. Biod[®] Becraft, J., Tun Saung, M., Gordon, R.E., Stroes, E.S.G., Ma, M., Farokhzad, O.C., Fayad, Z.A., Mulder, W.J.M., Langer, R., 2014. Probing nanoparticle translocation across the permeable endothelium in experimental atherosclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111, 1078–1083. <https://doi.org/10.1073/pnas.1322725111>

6. Iazzo, P.A. (Ed.), 2015. Handbook of Cardiac Anatomy, Physiology, and Devices. Springer International Publishing, Cham. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-19464-6>
7. Ala-Korpela, M., 2019. The culprit is the carrier, not the loads: cholesterol, triglycerides and apolipoprotein B in atherosclerosis and coronary heart disease. *International Journal of Epidemiology* 48, 1389–1392. <https://doi.org/10.1093/ije/dyz068>
8. Prabhu, S., Hossainy, S., 2007. Modeling of degradation and drug release from a biodegradable stent coating. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 80A, 732–741. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.31053>
9. Moravej, M., Mantovani, D., 2011. Biodegradable Metals for Cardiovascular Stent Application: Interests and New Opportunities. *IJMS* 12, 4250–4270. <https://doi.org/10.3390/ijms12074250>
10. Choi, S.-J., Oh, J.-M., Choy, J.-H., 2009. Toxicological effects of inorganic nanoparticles on human lung cancer A549 cells. *Journal of Inorganic Biochemistry* 103, 463–471. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2008.12.017>
11. Godin, B., Sakamoto, J.H., Serda, R.E., Grattoni, A., Bouamrani, A., Ferrari, M., 2010. Emerging applications of nanomedicine for the diagnosis and treatment of cardiovascular diseases. *Trends in Pharmacological Sciences* 31, 199–205. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2010.01.003>
12. Nunn, N., Torelli, M., McGuire, G., Shenderova, O., 2017. Nanodiamond: A high impact nanomaterial. *Current Opinion in Solid State and Materials Science* 21, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.cossms.2016.06.008>
13. Danilenko, V.V., 2004. On the history of the discovery of nanodiamond synthesis. *Phys. Solid State* 46, 595–599. <https://doi.org/10.1134/1.1711431>
14. Busch, R., Strohbach, A., Rethfeldt, S., Walz, S., Busch, M., Petersen, S., Felix, S., Sternberg, K., 2014. New stent surface materials: The impact of polymer-dependent interactions of human endothelial cells, smooth muscle cells, and platelets. *Acta Biomaterialia* 10, 688–700. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.10.015>
15. Schrand, A.M., Hens, S.A.C., Shenderova, O.A., 2009. Nanodiamond Particles: Properties and Perspectives for Bioapplications. *Critical Reviews in Solid State and Materials Sciences* 34, 18–74. <https://doi.org/10.1080/10408430902831987>
16. Badea, I., Kaur, R., 2013. Nanodiamonds as novel nanomaterials for biomedical applications: drug delivery and imaging systems. *IJN* 203. <https://doi.org/10.2147/IJN.S37348>
17. Krüger, A., Liang, Y., Jarre, G., Stegk, J., 2006. Surface functionalisation of detonation diamond suitable for biological applications. *J. Mater. Chem.* 16, 2322–2328. <https://doi.org/10.1039/B601325B>
18. Lai, L., Barnard, A.S., 2015. Functionalized Nanodiamonds for Biological and Medical Applications. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 15, 989–999. <https://doi.org/10.1166/jnn.2015.9735>
19. Poonthiyil, V., Lindhorst, T.K., Golovko, V.B., Fairbanks, A.J. Recent applications of click chemistry for the functionalization of gold nanoparticles and their conversion to glyco-gold nanoparticles. *Beilstein J. Org. Chem.* 2018, 14, 11–24.
20. Mohamed, M.A., Jaafar, J., Ismail, A.F., Othman, M.H.D., Rahman, M.A., 2017. Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy, in: *Membrane Characterization*. Elsevier, pp. 3–29. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63776-5.00001-2>
21. Kim, Y., Lobatto, M.E., Kawahara, T., Lee Chung, B., Mieszawska, A.J., Sanchez-Gaytan, B.L., Fay, F., Senders, M.L., Calcagno, C., Becraft, J., Tun Saung, M., Gordon, R.E., Stroes, E.S.G., Ma, M., Farokhzad, O.C., Fayad, Z.A., Mulder, W.J.M., Langer, R., 2014. Probing nanoparticle translocation across the permeable endothelium in experimental atherosclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111, 1078–1083. <https://doi.org/10.1073/pnas.1322725111>
22. Eldawud, R., Reitzig, M., Opitz, J., Rojansakul, Y., Jiang, W., Nangia, S., Dinu, C.Z., 2016. Combinatorial approaches to evaluate nanodiamond uptake and induced cellular fate. *Nanotechnology* 27, 085107. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/27/8/085107>

23. Fraczyk, J., Rosowski, A., Kolesinska, B., Koperkiewicz, A., Sobczyk-Guzenda, A., Kaminski, Z., Dudek, M., 2018. Orthogonal Functionalization of Nanodiamond Particles after Laser Modification and Treatment with Aromatic Amine Derivatives. *Nanomaterials* 8, 908. <https://doi.org/10.3390/nano8110908>
24. Girard, H.A., Petit, T., Perruchas, S., Gacoin, T., Gesset, C., Arnault, J.C., Bergonzo, P., 2011. Surface properties of hydrogenated nanodiamonds: a chemical investigation. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 13, 11517. <https://doi.org/10.1039/c1cp20424f>