

# **Modifizierte Edelmetalloberflächen für neuronale Elektroden**

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades  
Doktorin der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation  
von  
Kim Dana Kreisköther, M. Sc.

2021

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Peter Behrens

Korreferentin: Prof. Dr. med. Athanasia Warnecke

Tag der Promotion: 12.11.2021

## Kurzzusammenfassung

Ertaubung bedeutet nicht nur den Verlust eines Sinnesorgans, es führt in vielen Fällen zur gesellschaftlichen Isolation. Die Anzahl der Gehörgeschädigten steigt jedes Jahr an, weshalb die Weiterentwicklung von Hörhilfen eine wachsende gesellschaftliche Rolle spielt. Eine Maßnahme zur Wiedererlangung der auditiven Wahrnehmung ist das Einsetzen des Cochlea-Implantats, wodurch jedoch nicht der optimale biologische Zustand wiederhergestellt werden kann. Daher widmet sich der erste Teil der vorliegenden Arbeit der Etablierung eines implantatassoziierten Wirkstoff-freisetzungssystems, im zweiten Teil der Arbeit werden Ansätze zur biochemischen Modifizierung zur Verbesserung der Elektroden-Nerven-Interaktion untersucht.

Die Kontakte neuronaler Elektroden bestehen üblicherweise aufgrund seiner chemischen Inertheit, der sehr guten Leitfähigkeit und der guten Biokompatibilität aus dichtem Platin. Um eine Wirkstofffreisetzung von den Platin-Kontakten zu erreichen, werden diese in der vorliegenden Arbeit mit einer Beschichtung aus nanoporösem Platin versehen und charakterisiert. Poren mit unterschiedlichen Durchmessern können als Reservoir für Wirkstoffe variierender Größe genutzt werden. Durch die Kombination einer elektrochemischen Abscheidung und einer templatbasierten Synthese sollen die Vorteile einer kontrollierten Beschichtungsmethode zur Generierung von Poren genutzt werden. Durch die Schichtdickenvariation der nanoporösen Beschichtung sowie durch chemische Modifizierung soll ein einstellbares Wirkstofffreisetzungssystem erzeugt werden. Freisetzungsvorläufe zeigen, dass die chemische Modifizierung keinen Einfluss auf das Freisetzungsverhalten aufweist. Durch Variation der Beschichtungsdicke wird ein einstellbares Freisetzungssystem aus der nanoporösen Platinbeschichtung erzeugt. Die elektrochemischen Eigenschaften können durch die Beschichtung mit nanoporösem Platin verbessert werden, dies wird auf die erhöhte spezifische Oberfläche zurückgeführt. Zellkulturuntersuchungen zeigen eine gute Cytokompatibilität. Abschließend werden reale Elektrodenkontakte eines Cochlea-Implantats mit der entwickelten nanoporösen Platinbeschichtung versehen, um die Übertragbarkeit der entwickelten Beschichtung in die Anwendung nachzuweisen.

In einem zweiten Ansatz wird zur Verbesserung der Elektroden-Nerven-Interaktion die Modifizierung von Edelmetalloberflächen mit dem neuronalen Adhäsionsmolekül L1CAM untersucht. Qualitative Aussagen über die aufgebrauchte immunologisch aktive L1CAM-Menge können unter Verwendung eines antikörperbasierten Nachweisverfahrens getroffen werden. Zur Evaluierung der Ergebnisse wird dieser zum einen direkt auf der Substratoberfläche durchgeführt, zum anderen wird die Konzentration indirekt durch elektrochemische L1CAM-Ablösung ermittelt.

**Stichworte** neuronale Elektrode, Cochlea-Implantat, nanoporöse Platinbeschichtung, elektrochemische Abscheidung, Templat, Wirkstofffreisetzung, Rolipram, L1CAM, Zellkulturuntersuchungen

## Abstract

Deafness not only means the loss of a sensory organ, it also leads to social isolation in many cases. The number of people with hearing loss is increasing every year, which is why the development of hearing aids is playing a growing role in society. One method to regain auditory perception is the insertion of a cochlear implant, which, however, does not restore the optimal biological state. Therefore, the first part of the present work is devoted to the establishment of an implant-associated drug delivery system, and the second part of the work investigates approaches to biochemical modification to improve electrode-nerve interaction.

The contacts of neuronal electrodes are usually made of dense platinum due to its chemical inertness, excellent conductivity, and good biocompatibility. To achieve drug delivery from the platinum contacts, they are coated with a nanoporous platinum coating and characterized in the present work. Pores with different diameters can be used as reservoirs for active agents of varying size. The combination of an electrochemical deposition process and a template-based synthesis intends to exploit the advantages of a controlled coating method for the generation of pores. By variation of the thickness of the nanoporous coating as well as by chemical modification, an adjustable drug delivery system is generated. Release experiments show that chemical modification has no influence on the release behaviour. By varying the coating thickness, an adjustable delivery system is obtained from the nanoporous platinum coating. The electrochemical properties can be improved by coating with nanoporous platinum, which is attributed to the increased specific surface area. Cell culture investigations show good cytocompatibility. Finally, real electrode contacts of a cochlear implant are coated with the developed nanoporous platinum coating to demonstrate the transferability of the developed coating to applications.

In a second approach, the modification of precious metal surfaces with the neuronal adhesion molecule L1CAM is investigated to improve electrode-nerve interaction. Qualitative statements about the amount of the immunologically active L1CAM attached can be made using an enzyme-linked immunosorbent assay. To evaluate the results, this is performed on the one hand directly on the substrate surface, and on the other hand the concentration is determined indirectly by electrochemical L1CAM detachment.

**Keywords** neuronal electrode, cochlear implant, nanoporous platinum coating, electrochemical deposition, template, drug delivery, Rolipram, L1CAM, cell culture investigations

## Danksagung

Einen besonderen Dank möchte ich Professor Dr. Peter Behrens aussprechen, der mich nach Bachelor- und Masterarbeit auch zur Promotion in seinen Arbeitskreis aufnahm und mir die Möglichkeit gab, mich verschiedenen Fragestellungen bezüglich neuronaler Elektroden zu widmen, was mir sehr viel Freude bereitete.

Herrn Professor Dr. Thomas Scheper möchte ich für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes danken.

Frau Professorin Dr. Athanasia Warnecke danke ich für den regelmäßigen Austausch und die Unterstützung bei der Beurteilung der Cytokompatibilität der Materialien und Zellkulturuntersuchungen sowie die Übernahme des zweiten Gutachtens.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) sei für die finanzielle Unterstützung im Rahmen des Exzellenzcluster Hearing4all (H4a) – EXC 2177/1 – Project ID 390895286 gedankt. Durch das Arbeiten in diesem interdisziplinären Clusters, die Angebote der JRA sowie die Einbindung in die Begutachtung des aufbauenden Exzellenzclusters konnte ich wertvolle Erfahrungen sammeln und meinen Horizont auch in anderen Fachgebieten erweitern.

Ein besonderer Dank gilt Dr. Hans-Christoph Schwarz, der mir nicht nur wissenschaftlich während meiner gesamten Zeit im Arbeitskreis als Ansprech- und Diskussionspartner zur Verfügung standen und mich stark unterstützten, sondern auch immer für einen Scherz zu begeistern war. Auch bei Dr. Nina Ehlert möchte ich für den wissenschaftlichen Austausch bedanken.

Dr. Jennifer Harre aus der Arbeitsgruppe von Professorin Dr. Athanasia Warnecke möchte ich für die Durchführung der Zellkulturuntersuchungen und die Unterstützung bei der Auswertung und den vielen Diskussionen danken.

Carsten Zeilinger möchte ich für das Fluoreszenzlabeln des L1CAM und die damit verbundenen Diskussionen danken.

Zur Generierung der Ergebnisse, die im Rahmen dieser Arbeit entstanden sind, wurden für mich viele Messungen von Kollegen durchgeführt. Ein besonderer Dank gilt hierfür Dr. Dennis Nettelroth und Dr. Karen Besecke für die REM-Aufnahmen, Dr. Mandy Jahns und Dr. Alexander Mohmeyer für die Sorptionsmessungen, Philipp Abendroth und Saskia Zailskas für die XPS-Messungen, Katharina Nolte für die TG-Messungen sowie Julia Bode für die ICP-MS-Messungen.

Auch möchte ich mich bei meinem Abschlussarbeiter Dennis Müller und meinem Forschungspraktikant Dawid P. Warwas bedanken, die einen wichtigen Beitrag zu dieser Arbeit geleistet haben.

Für das Korrekturlesen danke ich Thomas S. Asche und Annette Kreisköther, die mich durch ihre Hinweise und in den anschließenden Diskussionen bei der Erstellung dieser Arbeit stark unterstützt haben.

Den Guten Seelen im Sekretariat, Birgit Zekoll und Merle Feldt, sowie Songül Noyun möchte ich für die Unterstützung bei administrativen und organisatorischen Fragen sowie den lieben Gesprächen und dem netten Miteinander danken.

Während meiner gesamten Zeit im Arbeitskreis habe nicht nur die wissenschaftliche Arbeit geschätzt, sondern auch das Miteinander bei gemeinsamen Grill- und Filmabenden, Fußballturnieren, Joggingrunden usw. war ein wichtiger Teil meines Lebens. Die Freundschaften, die in dieser Zeit entstanden sind, möchte ich nicht missen. Ganz besonders möchte ich mich bei Nadeschda Schmidt, Bastian Hoppe, Malte Schäfer, Lauritz Bußfeld und Arne Schierz hierfür bedanken.

Während meines gesamten Studiums haben mich Dr. Thomas S. Asche und Niklas Burbliès begleitet. Vielen Dank, dass ihr immer für mich da wart und wir über diese lange Zeit so viel erlebt haben. Auch Thea Bußfeld und Nina Boxhorn möchte ich danken: Ob im Labor, im Park, Schwimmbad, Fitnessstudio, auf dem Hockeyplatz oder einfach bei einer Tasse Kaffee oder einem Gläschen Wein - ihr hättet mir keine besseren Freundinnen sein können.

Auch meinem Vater Kurt-Dieter Kreisköther und Tanja Miller danke ich dafür, dass ihr Teil meines Lebens seid.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei den Menschen bedanken, die mich bereits mein gesamtes Leben begleiten und mich in wirklich jeder Situation unterstützt haben: meiner Mutter Annette Kreisköther sowie meinen Brüdern Kai und Lukas. Es ist schön zu wissen, dass ich mich auf euch immer verlassen kann.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Kurzzusammenfassung</b>	<b>III</b>
<b>Abstract</b>	<b>IV</b>
<b>Danksagung</b>	<b>V</b>
<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>VII</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>IX</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2 Allgemeine Grundlagen</b>	<b>5</b>
<b>2.1 Materialien und Funktionsweisen von neuronalen Elektroden</b>	<b>5</b>
2.1.1 Das Cochlea-Implantat.....	6
<b>2.2 Nanoporöse Platinbeschichtungen</b>	<b>12</b>
2.2.1 Platin als biomedizinisches Elektrodenmaterial.....	12
2.2.2 Etablierung eines implantatassoziierten Wirkstofffreisetzungssystems .....	20
2.2.3 Herstellung und Modifizierung.....	23
<b>3 Materialien und Methoden</b>	<b>41</b>
<b>3.1 Nanoporöse Platinbeschichtungen</b>	<b>41</b>
3.1.1 Substratherstellung und -reinigung .....	41
3.1.2 Präparation poröser Platinbeschichtungen mit kleinen Nanoporen.....	43
3.1.3 Präparation poröser Platinbeschichtungen mit großen Nanoporen.....	45
3.1.4 Chemische Modifizierung.....	46
3.1.5 Einlagerungs- und Freisetzungsexperimente mit Rolipram .....	47
3.1.6 Charakterisierungsmethoden .....	48
<b>3.2 L1CAM-modifizierte Goldoberflächen</b>	<b>60</b>
3.2.1 Anwendung als biomedizinisches Elektrodenmaterial.....	61
3.2.2 Cysteamin-Modifizierung und L1CAM-Immobilisierung.....	61
3.2.3 Präparation von L1CAM Modifizierungen auf Gold .....	62
3.2.4 Charakterisierungsmethoden .....	63

<b>4</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion</b>	<b>71</b>
<b>4.1</b>	<b>Nanoporöse Platinbeschichtungen</b>	<b>71</b>
4.1.1	Nanoporöse Platinbeschichtung mit kleinen Porendurchmessern .....	72
4.1.2	Nanoporöse Platinbeschichtung mit großen Porendurchmessern.....	141
4.1.3	Direkter Vergleich der nanoporösen Platinbeschichtungen mit unterschiedlichen Porengrößen.....	160
<b>4.2</b>	<b>L1CAM-modifizierte Goldoberflächen</b>	<b>165</b>
4.2.1	Flächenbedeckung und Verteilung .....	165
4.2.2	Bestimmung der immunologisch aktiven L1CAM Menge .....	171
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick</b>	<b>182</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>190</b>
<b>7</b>	<b>Anhang</b>	<b>206</b>
<b>7.1</b>	<b>Chemikalienverzeichnis</b>	<b>206</b>
<b>7.2</b>	<b>Ethische Erklärung über die Isolation der SGC aus neonatalen Ratten</b>	<b>207</b>
<b>7.3</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion</b>	<b>208</b>
7.3.1	Nanoporöse Platinbeschichtung mit kleinen Porendurchmessern .....	208
7.3.2	Nanoporöse Platinbeschichtung mit großen Porendurchmessern.....	215
7.3.3	L1CAM .....	216
<b>7.4</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>218</b>
<b>7.5</b>	<b>Veröffentlichungen und Konferenzbeiträge</b>	<b>219</b>

## Abkürzungsverzeichnis

a	Porenradius
ABI	<i>auditory brainstem implant</i> , Hirnstamm-Implantat
AFM	<i>atomic force microscopy</i> , Rasterkraftmikroskopie
ALD	<i>atomic layer deposition</i> , Atomlagenabscheidung
ANF	Anti-Neurofilament
BMDMSC	<i>bone marrow-derived mesenchymal stem cells</i> , mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark
BSA	<i>bovine serum albumin</i> , Rinderalbumin
BDNF	<i>Brain-derived neurotrophic factor</i> , vom Gehirn stammender neurotropher Faktor
bzw.	beziehungsweise
bspw.	beispielsweise
c	Konzentration
$C^d$	Deckschichtkapazität
$C_D$	Doppelschichtkapazität
CAM	<i>cell adhesion molecule</i> , neuronalen Zelladhäsionsmolekülen
CDC	<i>Charge delivery capacity</i> , Ladungsabgabekapazität
CFSE	Carboxyfluorescein Succinimidylester
CI	Cochlea-Implantat
$C_K$	frequenzabhängiger Kapazität
CNTF	<i>ciliary neurotrophic factor</i> , ziliärer neurotropher Faktor
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
CV	Cyclovoltammetrie
CVD	<i>chemical vapour deposition</i> , chemische Dampfabcheidung
DAPI	4',6-Diamin-2-phenylindol
DBS	<i>deep brain stimulation</i> , tiefe Hirnstimulation
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid

EIS	elektrochemische Impedanzspektroskopie
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> , antikörperbasiertes Nachweisverfahren
EZ 1	Erste verwendete Elektrolyse- bzw. Messzelle
EZ 2	Zweite verwendete Elektrolyse- bzw. Messzelle
FCS	<i>fetal calf serum</i> , fetales Kälberserum
FGF2	<i>fibroblast growth factor 2</i> , Fibroblasten-Wachstumsfaktor 2
GFP	<i>green fluorescent protein</i> , grün fluoreszierende Protein
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> , Meerrettichperoxidase
Hz	Hertz
$I$	Gleichstrom
ICP-MS	<i>inductively coupled plasma mass spectrometry</i> , Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma
$\hat{I}_m$	Maximale Stromamplitude
IMPT	Institut für Mikroproduktionstechnik
$j$	Stromdichte
LEI	<i>low energy image</i> Niedrigenergieaufnahme
lp-NPPt	<i>large pore nanoporous platinum</i> , poröses Platin mit großen Porendurchmessern
NHS	<i>N-Hydroxysuccinimid</i>
NPSNP	Nanoporöse Silica-Nanopartikel
NTF	neurotrophische Faktoren
OCP	<i>open circuit potential</i> , Leerlaufpotential
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , phosphatgepufferte Salzlösung
PBT	0.1% Triton X-100 in PBS
PEO	Polyethylenoxid
PLBs	<i>polystyrene latex beads</i> , Polystyrollatex-Kugeln
PPO	Polypropylenoxid
pPtNP	Poröse Platin-Nanopartikel
PVP	Polyvinylpyrrolidon
$Q$	Ladungsmenge

$Q_B$	Integrale Ladungsmenge
$R$	Ohmscher Widerstand
$R_D$	Durchtrittswiderstand
$R_E$	Elektrolytwiderstand
REM	Rasterelektronenmikroskop
$R_K$	Konzentrationswiderstands
rms	<i>root mean square</i> , quadratisches Mittel
SAM	<i>self-assembled monolayer</i> , selbstorganisierende Monoschicht
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> , Natriumdodecylsulfat
SEI	<i>secondary electron image</i> Sekundärelektronenaufnahme
SGN	Spiralganglienneurone
SGZ	Spiralganglienzellen
sp-NPPt	<i>small pore nanoporous platinum</i> , poröses Platin mit kleinen Porendurchmessern
sulfo-NHS	<i>N-Hydroxysulfosuccinimid</i> -Natriumsalz
sulfo-SDTB	Sulfosuccinimidyl-4-o-(4,4-dimethoxytrityl)butyrat
TBS	<i>tris-buffered saline</i>
TMB	Tetramethylbenzidin
ToF-SIMS	<i>Time-of-Flight secondary ion mass spectrometry</i> , Sekundärionenmassenspektrometrie
$U$	Spannung
$U_{\text{Gleichgewicht}}$	Ruhepotential
$\hat{U}_m$	Maximale Spannungsamplitude
UV-Licht	Ultraviolettes Licht
VNS	Vagusnervstimulation
vgl.	vergleiche
XPS	<i>X-ray photoelectron spectroscopy</i> , Röntgenphotoelektronenspektroskopie
$Z$	Impedanz
$Z'$	Realteil der Impedanz
$Z''$	Imaginärteil der Impedanz
$Z_W$	Warburg-Impedanz
$\kappa$	Leitfähigkeit des Elektrolyten
$\nu$	Potentialänderung
$\varphi$	Phasenverschiebung
$d\varphi$	Potentialbereich

$\omega$	Kreisfrequenz
----------	---------------

## 1 Einleitung

*„... mit einem feurigen lebhaften Temperament geboren [...] musste ich früh mich absondern, einsam mein Leben zubringen [...]. Wie hart wurde ich durch die verdoppelte traurige Erfahrung meines schlechten Gehörs dann zurückgestoßen. [...] Drum verzeiht, wenn ihr mich da zurückweichen sehen werdet, wo ich mich gerne unter euch mischte [...] für mich darf Erholung in menschlicher Gesellschaft, feine Unterredungen, wechselseitige Ergießungen nicht statthaben, [...] wie ein Verbannter muss ich leben.“<sup>1</sup>*

Ludwig van Beethoven, Heiligenstädter Testament, 1802

Ertaubung stellt seit Jahrhunderten für die Betroffenen nicht nur den Verlust eines Sinnesorgans dar, sondern vermittelt das Gefühl der Einsamkeit und gesellschaftlicher Isolation und kann laut aktuellen Studien sogar eine Demenz begünstigen.<sup>2,3</sup> Mit zunehmendem menschlichen Altersdurchschnitt und erhöhten Lärmbelastungen im Alltag steigt die Anzahl der Gehörgeschädigten jedes Jahr weiter an. 466 Millionen Menschen waren laut der *World Health Organization* 2019 weltweit von einem Hörverlust betroffen, für 2050 werden etwa 900 Millionen Menschen mit einer Einschränkung des Hörsinns prognostiziert.<sup>4</sup> Daher spielt die Weiterentwicklung von Hörhilfen eine immer bedeutendere gesellschaftliche Rolle. Bei einer Schädigung des Innenohrs und einer daraus resultierenden Ertaubung kann durch das Einsetzen eines Cochlea-Implantats die Taubheit von über 300 Millionen Menschen wirksam behandelt werden.<sup>5</sup> Seit den 70er Jahren wird das Cochlea-Implantat in der klinischen Anwendung im Patienten eingesetzt und zur Verbesserung des Hörempfindens stetig weiterentwickelt.<sup>6</sup> Ein Hauptfaktor für die Funktionsqualität des Cochlea-Implantats ist die Schnittstelle zwischen den Cochlea-Elektroden und den Innenohrnerven, die für die Übertragung der Hörsignale vom Implantat zum Hörnerv entscheidend ist.<sup>7</sup>

Im Fokus dieser Dissertation steht die Modifizierung der Cochlea-Elektrode zur Verbesserung der Funktionsweise sowie der Elektroden-Nerven-Interaktion. Hierfür sollen sowohl implantatassoziierte Wirkstofffreisetzungssysteme entwickelt werden, als auch die Elektrodenoberfläche mit einer biochemischen Modifizierung mit neuronalen Zelladhäsionsmolekülen (*cell adhesion molecule*, CAM) versehen werden. Durch die lokale Freisetzung können Wirkstoffe gezielt im benötigten Bereich des

## 1 Einleitung

Innenohrs ihren Effekt entfalten und belasten keine anderen Bereiche im menschlichen Körper.

Zur Verbesserung der Elektroden-Nerven-Interaktion ist es von Vorteil, wenn ein Nervenwachstum von den Nervenzellen hin zur Elektrode hervorgerufen werden kann, wodurch die Signalübertragung von der Elektrode zu den Innenohrnerven selektiver stattfinden kann. Als geeignete Wirkstoffe gelten die derzeit in der Forschung intensiv betrachteten Proteine, welche der Gruppe der neurotrophen Faktoren angehören. Diese können unter anderem das neuronale Überleben und Wachstum verbessern, sowie die Differenzierung von Nervenzellen beeinflussen.<sup>8-10</sup> Durch die Kombination dieser neurotrophen Faktoren mit Molekülen, die eine zusätzliche neuroprotektive Wirkung hervorrufen, kann das Nervenwachstum weiter erhöht werden.<sup>11</sup> Für die Wirkstofffreisetzung im Innenohr sind unterschiedliche Systeme wie Hydrogel-basierte oder nanopartikuläre Systeme sowie poröse Beschichtungen möglich, welche jedoch aktuell weiterhin ihre jeweiligen Probleme im Hinblick auf den klinischen Einsatz aufweisen.<sup>12</sup> Folglich liegt noch immer ein großes Potential in der Weiterentwicklung des Designs und der Materialien von lokalen Wirkstofffreisetzungssystemen zur Verbesserung der Funktionsweise des Cochlea-Implantats.

Im Rahmen dieser Arbeit sollen implantatassoziierte Wirkstofffreisetzungssysteme auf Basis der Elektrodenkontakte der Cochlea-Elektrode entwickelt werden. Die Elektrodenkontakte der Cochlea-Elektrode bestehen in den kommerziellen Implantaten aus Platin, da es neben der chemischen Inertheit sowohl eine gute Biokompatibilität als auch eine hohe elektrische Leitfähigkeit aufweist.<sup>13</sup> Folglich bietet sich die Entwicklung eines Wirkstofffreisetzungssystems aus nanoporösen Platinbeschichtungen zur Modifizierung der Elektrodenkontakte an, um weiterhin auf die guten Eigenschaften des Platins zurückzugreifen und die Poren als Wirkstoffreservoir nutzen zu können. Als geeignete Wirkstoffe wurden der neurotrophe Wachstumsfaktor BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*) und das neuroprotektive Agens Rolipram identifiziert, da für diese Wirkstoffkombination ein stark verbessertes Wachstum der im Innenohr liegenden Spiralganglienneuronen (SGN) nachgewiesen werden konnte.<sup>11</sup> Für Rolipram soll aufgrund seiner kleinen Molekülgröße die Herstellung einer nanoporösen Platinbeschichtung mit Porengrößen im unteren Nanometerbereich (*small pore nanoporous platinum*, sp-NPPT) untersucht werden. Die Herstellung kleinporiger Metallsysteme konnte bereits durch den Einsatz von weichen Templaten durch elektrochemische Abscheidung realisiert werden, daher wird sich die vorliegende Arbeit dieser Syntheseroute widmen.<sup>14</sup> Für die deutlich größeren Proteinmoleküle des neurotrophen Wachstumsfaktors BDNF hingegen soll ein Freisetzungssystem aus Platin mit größeren Nanoporen (*large pore nanoporous platinum*, lp-NPPT) entwickelt werden, weshalb hierfür der Einsatz eines kolloidalen, harten Templats

untersucht werden soll.<sup>14</sup> Durch eine anschließende Oberflächenmodifizierung der nanoporösen Platinbeschichtung soll eine gesteuerte Wirkstofffreisetzung ermöglicht werden. Hierfür soll ein konzeptionelles Verständnis über den Einfluss der Wechselwirkungen zwischen der modifizierten Platinoberfläche und dem Wirkstoff und der daraus resultierenden Wirkstofffreisetzung aufgebaut werden.

Neben Untersuchungen der Oberflächenbeschaffenheit und elektrochemischer Charakterisierung sowie der Langzeitstabilität der nanoporösen Platinbeschichtungen stehen, im Hinblick auf die Anwendung als Implantatmaterial, Untersuchungen der Cytokompatibilität im Fokus dieser Arbeit. Hierfür sollen *in vitro*-Experimente mit aus dem Innenohr stammenden Spiralganglienzellen durchgeführt werden, um die Eignung des Beschichtungsmaterials speziell für das Cochlea-Implantat zu evaluieren. Schlussendlich wird der Transfer der erfolgversprechendsten nanoporösen Platinbeschichtung von den im Labor verwendeten Platinsubstraten auf reale Elektrodenkontakte eines Cochlea-Implantats durchgeführt und beurteilt.

Das Ziel des ersten Abschnitts dieser Arbeit liegt somit in der Entwicklung und Charakterisierung von implantatassoziierten Wirkstofffreisetzungssystemen aus nanoporösen Platinbeschichtungen mit unterschiedlichen Porengrößen und dem Transfer in die Anwendung auf Cochlea-Elektrodenkontakten.

Des Weiteren soll zur Fixierung von möglicherweise bis an die Elektrodenoberfläche gewachsenen Nerven eine Modifizierung mit neuronalen Zelladhäsionsmolekülen entwickelt und auf der Elektrodenoberfläche aufgebracht werden. L1CAM wird beispielhaft aufgrund seines bereits nachgewiesenen positiven Einflusses auf das neuronale Überleben und das Nervenwachstum auf metallischen Mikroelektroden ausgewählt.<sup>15</sup> Exemplarisch soll die Modifizierung von Goldoberflächen mit L1CAM untersucht werden. Hierfür wird die Anbindung mittels eines Verbindungsmoleküls beurteilt, indem L1CAM durch einen fluoreszierenden Farbstoff markiert und die Verteilung sowie Flächenbedeckung bestimmt wird. Zur Evaluierung der angebondenen immunologisch aktiven L1CAM-Menge werden anschließend sowohl direkte als auch indirekte Nachweismethoden entwickelt. Als direkte Nachweismethode soll ein antikörperbasiertes Nachweisverfahren (*enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA) auf den modifizierten Goldoberflächen angewendet werden. Hierfür wird der Messaufbau und die Durchführung des ELISAs auf die verwendeten Goldsubstrate individuell angepasst. Eine Kombination aus Cyclovoltammetrie und ELISA dient als indirekte Nachweismethode. Durch eine vollständige elektrochemische L1CAM-Entfernung von der Goldoberfläche und dem anschließenden Nachweis in einem standardisierten ELISA sollen Vergleichsbestimmungen der immunologisch aktiven L1CAM-Menge durchgeführt werden. Die elektrochemische

## *1 Einleitung*

L1CAM-Entfernung beruht hierbei auf der Oxidation bzw. Reduktion des Verbindungsmoleküls.

Das Ziel des zweiten Abschnitts dieser Arbeit ist somit die biochemische Modifizierung von Goldoberflächen mit L1CAM und die anschließende Evaluation verschiedener qualitativer und quantitativer Nachweismethoden.

## 2 Allgemeine Grundlagen

Im folgenden Kapitel werden die für diese Arbeit relevanten Grundlagen vorgestellt. Im ersten Abschnitt werden zunächst die Materialien sowie Funktionsweisen neuronaler Elektroden erläutert, hierbei wird der Schwerpunkt auf das Cochlea-Implantat gelegt. Der zweite Abschnitt widmet sich den nanoporösen Platinbeschichtungen, insbesondere den Vor- bzw. Nachteilen der verschiedenen Herstellungsmethoden.

### 2.1 Materialien und Funktionsweisen von neuronalen Elektroden

Die ersten wissenschaftlichen Studien über elektrische Stimulation an Tieren wurden bereits 1791 von Luigi Galvani an Froschbeinen durchgeführt.<sup>16</sup> Daraufhin versuchte Alessandro Volta einige Jahre später mit zwei Drähten im äußeren Gehörgang ein elektrisches Hören auszulösen.<sup>6</sup> Über 100 Jahre später im Jahr 1939 folgten Veröffentlichungen von Hodgkin und Huxley, in denen es ihnen durch die Minimierung der Elektrodengröße gelang, elektrische Signale einzelner Nervenfasern zu untersuchen.<sup>17</sup> Seitdem herrscht ein großes Interesse an der Weiterentwicklung neuronaler Elektroden, wodurch heutzutage unterschiedlichste neuronale Erkrankungen durch elektrisch stimulierende und aufzeichnende Elektroden behandelt werden können.<sup>18-21</sup> Neben der Tiefen-Hirn-Stimulation (*deep brain stimulation*, DBS) zur Behandlung von Parkinson oder ähnlichen motorischen Syndromen<sup>22-25</sup> und der Vagusnervstimulation (VNS) gegen Epilepsie und Depressionen<sup>26-28</sup> können bei ertaubten Personen zur Erzeugung von Höreindrücken das Cochlea-Implantat (CI) und bei geschädigtem Hörnerv das Hirnstamm-Implantat (*auditory brainstem implant*, ABI) eingesetzt werden.<sup>29</sup>

Im Allgemeinen bestehen bei neuronalen Elektroden unabhängig von ihrem spezifischen Anwendungsgebiet (DBS, VNS, CI, etc.) ähnliche Anforderungen und Herausforderungen bezüglich der elektrochemischen Eigenschaften und Biokompatibilität.<sup>30</sup> Die primären Anforderungen an diese Elektroden sind die Kommunikation mit vielen einzelnen Neuronen unter Beibehaltung eines hohen Signal-Rausch-Verhältnis während eines möglichst langen Zeitraums.<sup>31</sup> Alle dem Körper ausgesetzten Materialien müssen biokompatibel und biostabil sein, sie dürfen keine schädlichen Reaktionen in der biologischen Umgebung hervorrufen.<sup>32</sup> Im

## 2 Allgemeine Grundlagen

genauen dürfen die Materialien vom Immunsystem des Körpers nicht abgelehnt oder aufgelöst werden. Auch eine mechanische Belastung der Nerven oder des umliegenden Gewebes durch das Elektrodenmaterial kann eine Schutzreaktion des Körpers hervorrufen, was letztendlich zu einer Zerstörung der Zellen durch das Implantat führt.<sup>33</sup> Außerdem müssen Materialien für neuronale Elektroden neben den chemisch und biologisch inerten Charaktereigenschaften eine hohe elektrochemische Stabilität während der elektrischen Belastung aufweisen, damit keine irreversiblen elektrischen Korrosionsreaktionen auftreten. Auch hohe Ladungsspeicherkapazitäten und geeignete mechanischen Eigenschaften müssen berücksichtigt werden. Für eine zerstörungsfreie Insertion der Cochlea-Elektrode in das Innenohr sollte die gesamte Elektrode möglichst weiche mechanischen Eigenschaften aufweisen. Die Diskrepanz zwischen den mechanischen Eigenschaften des weichen Gewebes und der steifen Implantate führt zu wiederkehrenden Elektrodenbewegungen, welche durch die natürlichen Körperbewegungen hervorgerufen wird. Dies kann längerfristig zu Gewebeveränderungen an dem Implantat und in der Folge zu neuronaler Degradation und Narbenbildung führen.<sup>34</sup> Folglich werden Elektroden aus Materialien mit möglichst weichen mechanischen Eigenschaften bevorzugt, weshalb die leitfähigen Elektrodenkontakte häufig in weiche Trägermaterialien integriert werden. Geeignete Materialien für die Elektrodenkontakte mit den aufgeführten Eigenschaften sind die Edelmetalle Platin und Gold, sowie Platin-Iridium-Legierungen und Iridiumoxid.<sup>33,35</sup> Das am häufigsten verwendete Elektrodenmaterial ist trotz seines vergleichbar hohen Preises Platin<sup>36</sup>, weshalb auf dieses in Abschnitt 2.2.1 (vgl. S. 12) näher eingegangen wird.

Da im Rahmen dieser Dissertation die Verbesserung der Funktionsweise des Cochlea-Implantats im Mittelpunkt steht, wird dieses im Folgenden genauer betrachtet.

### 2.1.1 Das Cochlea-Implantat

Bereits am Ende des 18. Jahrhunderts versuchte Alessandro Volta mit zwei Drähten im äußeren Gehörgang elektrisches Hören zu erzeugen. Da er diese Versuche jedoch an sich selbst und somit an einem voll funktionsfähigen Gehör durchführte, wurde zu diesem Zeitpunkt kein verbesserter Höreindruck durch elektrische Stimulation der Nerven erzeugt. Erst im Jahr 1957 wurden die ersten Versuche zur Stimulierung des Hörnervs und die erste Implantation einer Elektrode an den Hörnerv durchgeführt, klinische Anwendungen des Cochlea-Implantats folgten ab Anfang der 70er Jahre.<sup>6</sup>

Für ein besseres Verständnis der Funktionsweise des Cochlea-Implantat wird zunächst kurz der Hörvorgang eines vollständig intakten menschlichen Hörorgans anhand der Abbildung 2.1 erläutert.

## 2.1 Materialien und Funktionsweisen von neuronalen Elektroden

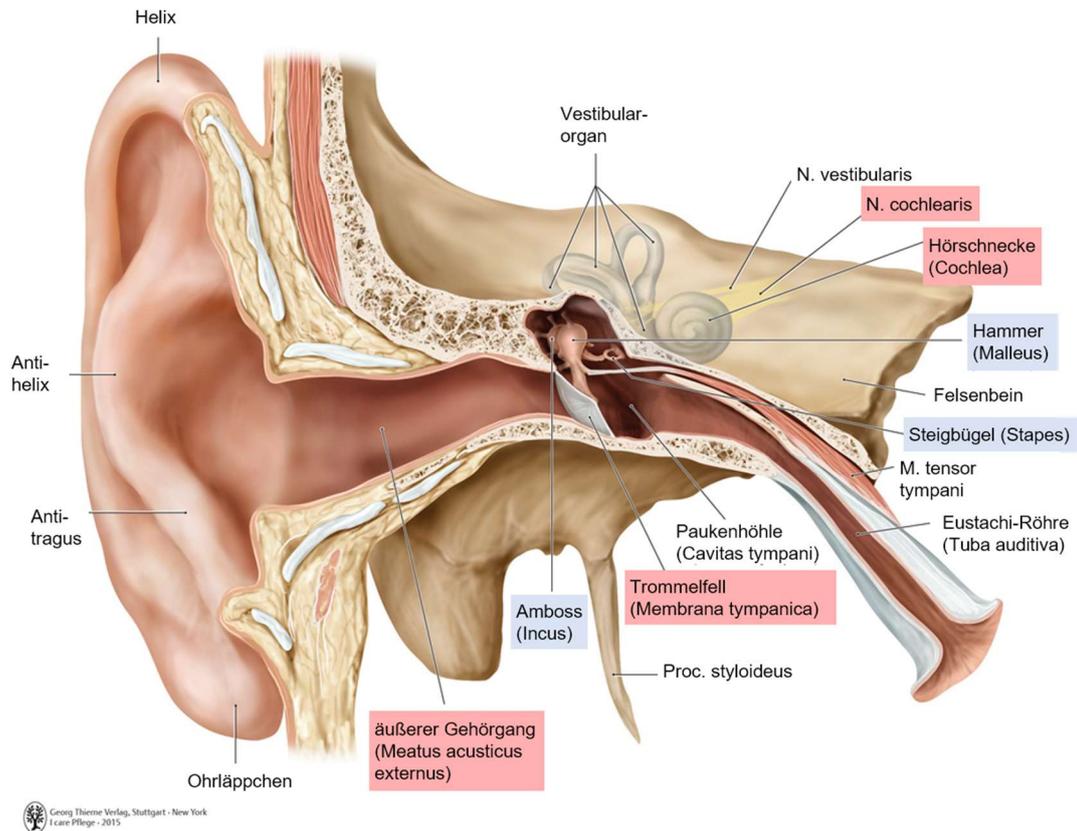


Abbildung 2.1: Schematische Anatomie eines gesunden menschlichen Hörorgans.<sup>37</sup>

Die Schallwellen aus der Umgebung gelangen durch den äußeren Gehörgang zum Trommelfell und versetzen dieses in Schwingung. Durch die Gehörknöchelchen bestehend aus Amboss, Hammer und Steigbügel, wird die Bewegung des Trommelfells auf die Flüssigkeit in der Hörschnecke (Perilymphe in der Cochlea) übertragen. Die hierdurch verursachte Volumenverschiebung der Perilymphe sorgt für eine Auslenkung der Basilarmembran, welche letztendlich eine ortsabhängige Ablenkung der Haarzellen durch das Amplitudenmaximum der Wanderwelle verursacht (Abbildung 2.2).<sup>6</sup> Das menschliche Gehör kann Schallwellen mit Frequenzen im Bereich zwischen 20 bis 20.000 Hz wahrnehmen. Je nach Frequenz der eintreffenden Schallwelle, werden die Haarzellen in bestimmten Bereichen der Cochlea ausgelenkt. Hohe Frequenzen werden an der Basis der Cochlea, niederfrequente Frequenzen werden am Scheitel der Cochlea detektiert.<sup>38</sup>

## 2 Allgemeine Grundlagen

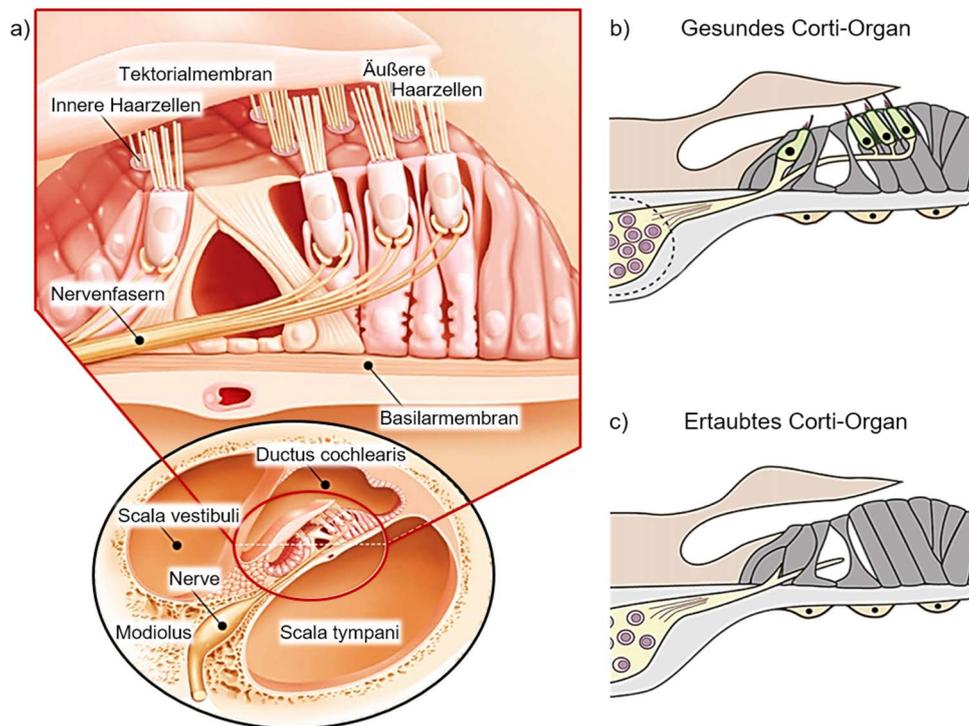


Abbildung 2.2: Schematischer Querschnitt der Hörschnecke und Vergrößerung des Corti-Organ (a), sowie der Vergleich zwischen gesundem Corti-Organ mit intakten Haarzellen (b) und ertaubtem Corti-Organ (c) nach Health Life Media Team and Shibata *et al.*<sup>39,40</sup>

Im Querschnitt der Cochlea (Abbildung 2.2a) sind die zwei mit Perilymphe gefüllten Gänge, Scala tympani und Scala Vestibuli erkennbar. Diese sind durch den Ductus cochlearis, in welchem sich das Corti-Organ befindet, voneinander getrennt. In der Vergrößerung des Corti-Organ sind die dort vorhandenen drei Reihen der äußeren Haarzellen und eine Reihe der inneren Haarzellen zu sehen. Durch die Ablenkung der Haarzellen wird die mechanische Energie der Wanderwelle durch ein chemisches Signal in elektrische Energie umgewandelt, indem ein Aktionspotential in den zugeordneten Nervenfasern bzw. Neuriten ausgelöst wird. Dies geschieht durch Öffnen von Ionenkanälen und einer anschließenden Kaskade verschiedener Ionen-Diffusionsprozesse. Die akustischen Informationen werden durch die Aktionspotentiale der einzelnen Nervenfasern an den Hörnerv und schlussendlich an das Gehirn weitergeleitet.<sup>41</sup>

Sind die Haarzellen von Geburt an nicht vorhanden oder wurden durch beispielsweise Infektionen, Überbeanspruchung durch laute Geräusche, Medikamente oder altersbedingt zerstört (Abbildung 2.2c), können die auditorischen Informationen der Umgebung nicht mehr an das Gehirn weitergeleitet werden, oder die Betroffene ertaubt.<sup>42</sup> Vorausgesetzt der Hörnerv ist intakt, kann ein Cochlea-Implantat die ausgefallene Innenohrfunktion ersetzen, indem durch direkte

## 2.1 Materialien und Funktionsweisen von neuronalen Elektroden

elektrische Reizung der Spiralganglienneuronen (SGN) ein Höreindruck erzeugt wird.<sup>43</sup> Der genaue Aufbau des Cochlea-Implantats ist in Abbildung 2.3 dargestellt.

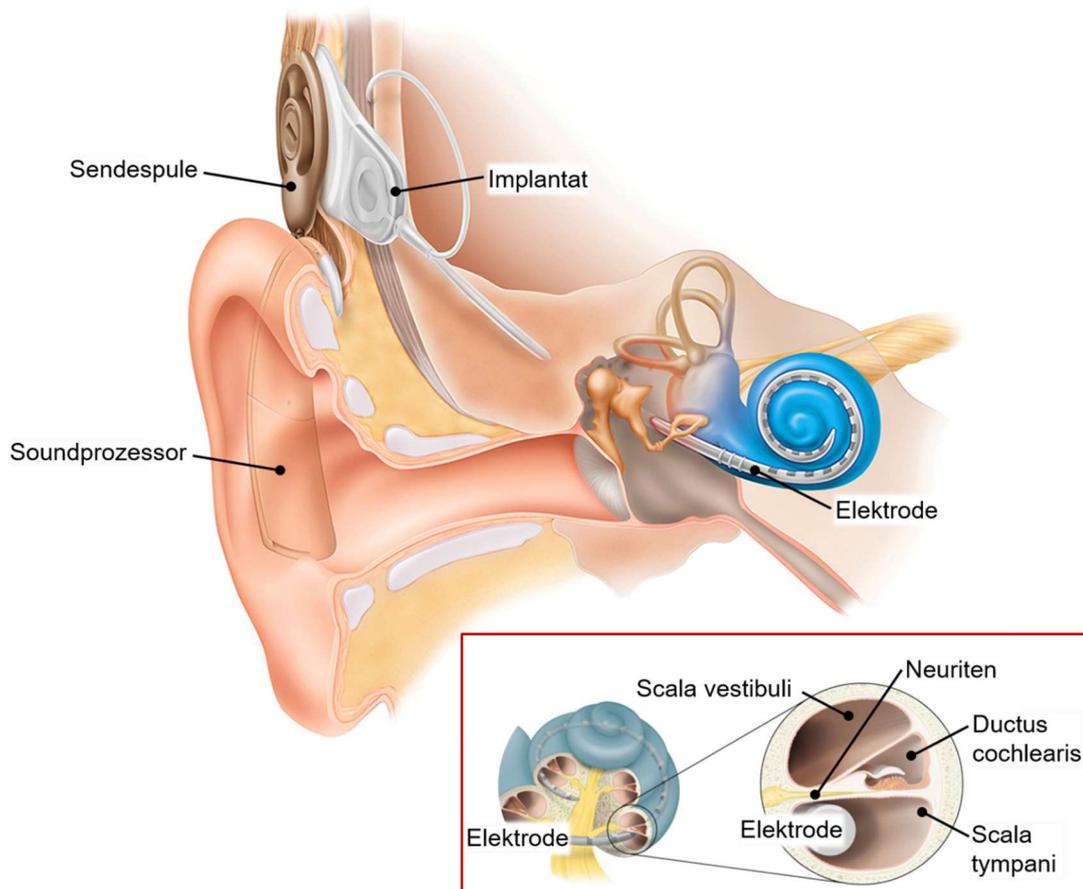


Abbildung 2.3: Schematische Anatomie eines menschlichen Hörorgans mit eingesetztem Cochlea-Implantat sowie Vergrößerungen der intracochleären Lage der Elektrode nach der Cochlea Deutschland GmbH & Co. KG.<sup>44</sup>

Der externe Soundprozessor hinter dem Ohr nimmt mit einem Mikrofon die Schallwellen aus der Umgebung auf und wandelt die auditorischen Informationen in elektrische Impulse um. Diese werden an die Sendespule übermittelt und in Form von Radiowellen transkutan auf das Implantat übertragen. Das Implantat dekodiert die elektrischen Impulse und sendet diese an den Elektrodenkontakt in der Hörschnecke. Je nach Frequenz des Umgebungsgeräuschs wird der entsprechende Elektrodenkontakt angesteuert. Bei niedriger Frequenz befindet sich der angesteuerte Elektrodenkontakt im oberen Bereich der Hörschnecke, bei hoher Frequenz wird der elektrische Impuls an einen Kontakt im unteren Bereich der Hörschnecke gesendet. Die in der Scala tympani liegenden Elektrodenkontakte regen durch elektrische Impulse die Neuriten der Spiralganglienzellen an. Durch die Weiterleitung der Nervenreizung an den Hörnerv entsteht ein Höreindruck im Gehirn.<sup>43</sup>

## 2 Allgemeine Grundlagen

Der generierte Höreindruck durch das heutzutage verwendete Cochlea-Implantat wird durch verschiedene Faktoren limitiert. Neben dem Zellüberleben der für den Höreindruck notwendigen Spiralganglienneuronen im Innenohr<sup>45</sup> spielt der technologische Aspekt des Implantats, im speziellen die Anzahl der aktiven Elektrodenkontakte, eine entscheidende Rolle.<sup>46</sup> Zwischen der Cochlea-Elektrode und den Neuriten der Spiralganglienzellen müssen häufig bei der elektrischen Stimulation große Distanzen überwunden werden. Hierfür werden hohe Ladungen an die Elektrodenkontakte angelegt, wodurch zum einen einige hundert bis tausend Neuriten pro Elektrodenkontakt stimuliert werden und es zum anderen zu Überlappungen der elektrischen Felder benachbarter Elektrodenkontakte kommen kann (Abbildung 2.4a).<sup>2,47,48</sup> Infolgedessen kann nicht jeder der typischerweise 22 Kontakte auf der Cochlea-Elektrode zur Nervenstimulation genutzt werden, einige Kontakte müssen nach der Implantation deaktiviert werden. Entsprechend ist die Selektivität der Nervenstimulation im Vergleich zum normalen Hörvorgang, bei welchem etwa 3400 Haarzellen und über 35 000 Spiralganglienneuronen spezifisch angeregt werden, sehr gering.<sup>49-51</sup> Daher ist das Hören von Musik für Implantat-Träger nur schwer möglich.<sup>52</sup> Das Verfolgen von Gesprächen mit Hintergrundgeräuschen wird durch eine erschwerte Detektion der temporalen binauralen Differenz eingeschränkt.<sup>53</sup> Ein weiterer Aspekt ist eine durch zu hohe Stromdichten hervorgerufene Zellschädigung der Spiralganglienneuronen, welche wiederum zu einem Verlust des Restgehörs führen kann.<sup>54</sup> Die maximale sichere Ladungsdichte beträgt in derzeit genutzten Implantaten etwa  $0.15 \text{ mC}\cdot\text{cm}^{-2}$ . Unter bestimmten Umständen kann diese Ladungsdichte aber auch zu niedrig sein, um eine ausreichend gute Anregung in den Nerven zu erzeugen.<sup>55</sup>

## 2.1 Materialien und Funktionsweisen von neuronalen Elektroden

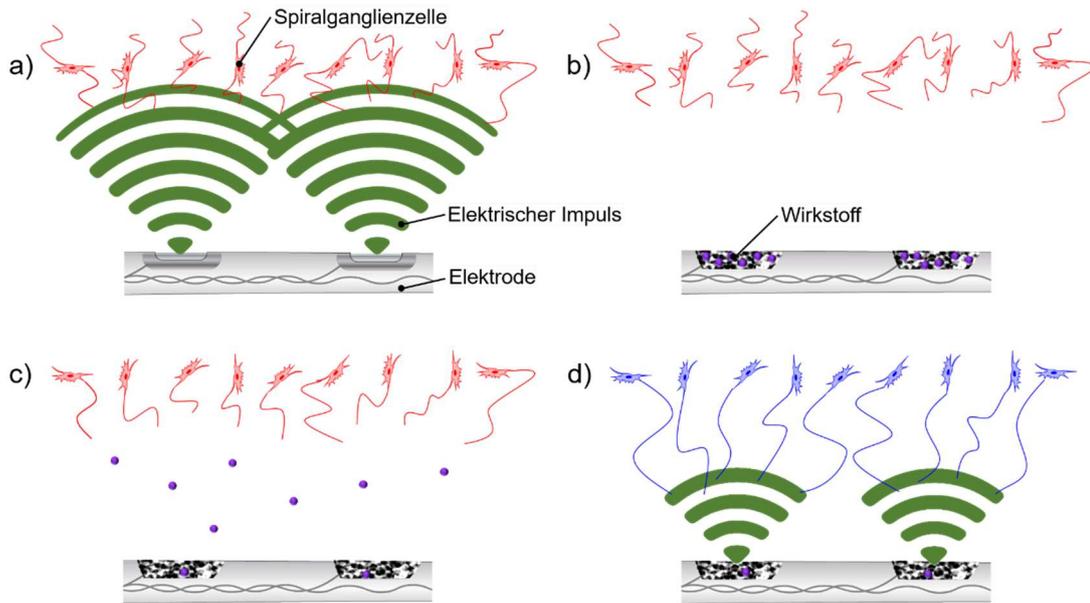


Abbildung 2.4: Schematische Darstellung der elektrischen Nervenstimulation von blanken Platin-Elektrodenkontakten (a), mit Wirkstoffen beladenen nanoporösen Platinbeschichtungen auf Elektrodenkontakten (b), von den aus Elektrodenkontakten freigesetzten Wirkstoffe (c) und elektrische Stimulation der in Richtung Elektrodenkontakte gewachsenen Neuriten (d).

Ein wichtiges Ziel des Elektrodendesigns ist es daher, die Anzahl der stimulierten Neurite unter Vermeidung einer Signalüberlappung zu maximieren. Durch Verringerung des Abstands zwischen Elektrode und Nerven kann eine selektivere Nervenstimulation unter Verwendung geringerer Stromdichten erzeugt werden.<sup>56,57</sup> Durch eine Modifizierung der Elektrodenoberfläche, beispielsweise durch Integration eines implantatassoziierten Wirkstofffreisetzungssystems, könnte das Neuritenwachstum in Richtung der Elektrodenoberfläche angeregt und somit die Elektroden-Nerven-Interaktion optimiert werden.<sup>58-62</sup> Auch das Zellüberleben der Spiralganglienneuronen kann durch die Freisetzung von neuroprotektiven Faktoren verbessert werden.<sup>5,11,63</sup> Hierfür eignen sich vor allem poröse Materialien, aus denen räumlich und zeitlich kontrolliert Wirkstoffe freigesetzt werden können. Zum einen kann die Siliconmatrix der Cochlea-Elektrode durch Beschichtung oder Einbettung von nanoporöser Silica-Nanopartikel als Wirkstoffreservoir genutzt werden.<sup>64</sup> Zum anderen können die Elektrodenkontakte mit einer nanoporösen Beschichtung ausgestattet werden, wodurch gezielt im Innenohr neuronale Wachstumsfaktoren und neuroprotektive Substanzen eingebracht werden können (Abbildung 2.4b,c). Durch den verminderten Elektroden-Neuriten-Abstand lässt sich die Nervenstimulation mit deutlich kleineren Stromdichten realisieren, was zu einer höheren Selektivität und letztendlich zu einem verbesserten Höreindruck führt (Abbildung 2.4d). Hierdurch ließen sich nicht nur alle Elektrodenkontakte der aktuellen

Implantate nutzen, eine deutliche Verkleinerung der metallischen Bereiche ohne Erhöhung der Impedanz wäre denkbar.<sup>65,66</sup> Zukünftig könnte infolgedessen die Anzahl der Kontakte stark erhöht werden, was wiederum in einer erheblichen Selektivitätserhöhung der Nervenregulation resultiert.<sup>2,42</sup>

Die im Cochlea-Implantat kommerziell verwendeten Elektrodenkontakte bestehen aus Platin, daher liegt die Modifizierung zur Etablierung eines implantat-assoziierten Wirkstofffreisetzungssystems mit nanoporösen Platinbeschichtungen nahe.

### 2.2 Nanoporöse Platinbeschichtungen

Nanoporöse Platinbeschichtungen spielen seit vielen Jahren in den Forschungsbereichen der biomedizinischen Elektrodenmaterialien eine große Rolle. Daher werden im ersten Abschnitt die Eigenschaften von Platin als biomedizinisches Elektrodenmaterial erläutert, sowie die Vorteile und Risiken von porösem Platin als Implantatbeschichtung diskutiert. Der zweite Abschnitt widmet sich anschließend der Etablierung eines implantatassoziierten Wirkstofffreisetzungssystems in porösen Platinbeschichtungen. Zu guter Letzt folgen im dritten Abschnitt die unterschiedlichen Herstellungsmethoden und möglichen Modifizierungen von nanoporösem Platin.

#### 2.2.1 Platin als biomedizinisches Elektrodenmaterial

Wie bereits im Abschnitt über neuronale Elektroden (vgl. S. 5f) erläutert, bestehen an biomedizinische Elektrodenmaterialien die Anforderungen einer guten Biokompatibilität und -stabilität, um keine Reaktion des körpereigenen Immunsystems auszulösen.<sup>32,33,67</sup> Zur Vermeidung von irreversiblen elektrischen Korrosionsreaktionen sollten die Materialien außerdem während der elektrischen Belastung eine hohe elektrochemische Stabilität aufweisen.<sup>68,69</sup> Hohe Ladungsspeicherkapazitäten führen zusätzlich zu einer besseren Nervenstimulation, geeignete mechanische Eigenschaften erlauben eine vorteilhafte Gestaltung der Elektrode und ein angepasstes Verhalten während der Insertion.<sup>18</sup>

Bereits 1829 konnte H.S. Levert *et al.* in *in vivo* Experimenten an Hunden eine sehr gute Biokompatibilität von Platin nachweisen.<sup>13</sup> Auch konnte in einer aktuelleren Studie aus 2013 durch Schlie-Wolter eine verbesserte Neuritenanhaftung auf strukturierten Platinoberflächen beobachtet werden.<sup>70</sup>

Trotzdem wird bis heute eine mögliche Freisetzung von elementarem Platin, Platin-Ionen oder Platin-Verbindungen aus Kontakten von neuronalen Elektroden unter elektrischen Stimulationsbedingungen und eine daraus resultierende Zytotoxizität kritisch diskutiert.<sup>71-75</sup>

Daher wird im Folgenden auf Studien über die Biokompatibilität von Platin im Genauen eingegangen.

Verschiedenste Studien über die Cytokompatibilität von Platinspezies liefern Hinweise auf langfristige toxische Auswirkungen auf Gewebe, Zellen und DNA.<sup>76</sup> Allerdings sollte bei der Betrachtung der Cytokompatibilität zwischen verschiedenen Platinspezies differenziert werden.<sup>77</sup> So zeigt die Betrachtung der Cytokompatibilität von Platin-Nanopartikeln (PtNP) bereits, dass diese von Partikelgröße und -konzentration beeinflusst wird. Hashimoto *et al.* zeigten 2016 *in vitro*, dass PtNP mit einem mittleren Partikeldurchmesser von 10 nm und 250 nm ab einer Partikelkonzentration von  $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  die Zellviabilität (L929 Fibroblasten, RAW264-Makrophagen) verringern. Bei niedrigeren Konzentrationen konnte kein Einfluss der PtNP auf die Cytokompatibilität festgestellt werden.<sup>78,79</sup> In einer Studie von Horie *et al.* zeigten PtNP mit einem Partikeldurchmesser zwischen 82 nm im Konzentrationsbereich zwischen  $3 - 17 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  in Zellkulturuntersuchungen (A549 und HaCaT Zellen) keinen Einfluss auf das Zellverhalten. Obwohl diese von den Zellen aufgenommen wurden, wurde kein oxidativer Stress induziert und kein Zelltod beobachtet. Auch wurden keine Platin-Ionen in das Zellmedium freigesetzt.<sup>80</sup> PtNP mit deutlichen kleineren Partikeldurchmessern von 5-8 nm verursachten ab einer Konzentration von  $80 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  eine Veränderung der Zellmorphologie und eine Cytotoxizitätserhöhung.<sup>81</sup> Die häufig diskutierte DNA-schädigende Eigenschaft von Platin werden von Gehrke *et al.* auf die Platin-Ionen-Freisetzung und der daraus resultierenden Pt-DNA-Komplexbildung zurückgeführt.<sup>82</sup> Frühere Studien bezogen die Veränderung der DNA durch PtNP auf Partikelgröße oder -konzentration. Allerdings wurde damals keine Betrachtung der Platin-Ionenkonzentrationen durchgeführt,<sup>83</sup> und festgestellte Befunde möglicherweise auf unterschiedliche Mengen an freigesetzten Platin-Ionen zurückzuführen sind. Die Verwendung von ionischem Platin, hauptsächlich Cisplatin, in der Krebstherapie zeigt unmissverständlich, dass dieser Platinkomplex hoch cytotoxisch ist.<sup>84</sup> Eine beobachtete Nebenwirkung des Chemotherapie-Medikaments Cisplatins ist die Verursachung einer Innenohrschwerhörigkeit. Dies ist auf einen hervorgerufenen oxidativen Stress im Innenohr mit daraus folgender Schädigung der äußeren Haarzellen bis hin zum Zelltod zurückzuführen.<sup>85</sup> Verständlicherweise wird die Cytokompatibilität von Platin im Hinblick auf die Anwendung im Innenohr daher stark diskutiert und sollte bei der Entwicklung neuer Elektrodenmaterialien berücksichtigt werden. Robblee *et al.* betrachtete bereits 1983 die Auflösung einer neuronalen Platinelektrode während der elektrischen Stimulation in der Großhirnrinde von Katzen. Hierfür wurde mit einer Platinscheibe (Durchmesser=1.1 mm) für 4.5 h, 9 h und 36 h mit biphasigen Impulsen ( $20 \mu\text{C}\cdot\text{cm}^{-2}$  oder  $100 \mu\text{C}\cdot\text{cm}^{-2}$  pro Phase, 50 Hz) stimuliert. Anschließend wurde das um die Platinscheibe liegende Gewebe (0–2 mm) entfernt und auf Platin analysiert. Es zeigte sich ein zeitabhängiger Platin-Konzentrationsanstieg zwischen

## 2 Allgemeine Grundlagen

4–20 ng nach 4.5 h und 50–339 ng nach 9 h ( $100 \mu\text{C}\cdot\text{cm}^{-2}$ ). Nach einer Stimulationszeit von 36 h hingegen sank die Platinkonzentration auf 43–175 ng. Da eine prozentuale Abnahme des Platinanteils im Kapselgewebe an der Elektrodenoberfläche und eine damit einhergehende Zunahme der Platinkonzentration im Hirngewebe unmittelbar unter der Elektrode beobachtet wurde, deutete dies auf eine gewisse Mobilität der gelösten Platin-Ionen im Gewebe hin. Diese Beobachtung kann mit einer möglichen Diffusion oder einem Flüssigkeitsaustausch begründet werden. Wären die Platin-Ionen zu festen Gewebekomponenten komplexiert worden, würden sich diese während der Stimulationszeit immer weiter im Kapselgewebe ansammeln. Ein Unterschied in der Platinkonzentration zwischen einer glatten oder angerauten Platinoberfläche konnte nicht festgestellt werden. Bei einer Stimulation mit einer geringeren Ladungsdichte von  $20 \mu\text{C}\cdot\text{cm}^{-2}$  wurde unabhängig von der Stimulationszeit sehr wenig bis kein Platin in dem umliegenden Gewebe nachgewiesen.<sup>86</sup> In einer Untersuchung an der Universität Melbourne aus dem Jahr 2014 wurden von Clark *et al.* sowohl das Schläfenbein, welches das Mittel- und Innenohr beinhaltet, sowie das Cochlea-Implantat eines verstorbenen Patienten analysiert. Dem Patienten wurde bereits 1978 ein Prototyp-Mehrkanal-Implantat eingesetzt, welches 1983 sowie 1998 ersetzt wurde. Durch rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen konnte eine erhöhte Oberflächenrauigkeit der Elektrodenkontakte festgestellt werden. Die pathologischen Untersuchungen des um die Elektroden liegenden Gewebes zeigten dunkle Partikel in den Makrophagen, welche mittels Röntgenfluoreszenz als Platin identifiziert werden konnten.<sup>87</sup> Beide Beobachtungen wurden auf eine mögliche Korrosion des Platins zurückgeführt. Durch die Analyse der Platinkontakte mittels Sekundärionenmassenspektrometrie (ToF-SIMS) wurden neben den zu erwartenden Platinsignalen deutlich intensivere Signale von Natrium, Calcium und Kalium sowie  $\text{PtO}^-$ - und  $\text{PtO}^{2-}$ -Ionen detektiert. Auch wurden Bereiche mit einem hohen Gehalt an Platin und organischen Verbindungen gefunden, welche auf eine mögliche Komplexbildung zwischen Platin und Proteinen hinweisen kann.<sup>88</sup> Für eine repräsentativere Beurteilung der Platinfreisetzung aus Elektrodenkontakten im menschlichen Körper wurde durch O'Malley *et al.* im Jahr 2017 an insgesamt 44 Schläfenbeinproben von 36 Patienten eine deutlich größere Studie durchgeführt. Es wurden sowohl in extrazellulären sowie intrazellulären Lokalisationen Untersuchungen vorgenommen. Dabei wurden in allen 44 Proben Platin nachgewiesen, sowohl in der Cochlea als auch im Mittelohr.<sup>89</sup> Die resultierenden Fremdkörperreaktionen zeigten Adsorption von Plasmaproteinen auf der Elektrodenoberfläche, Adhäsion von Makrophagen und deren Vorläuferzellen, den Monozyten, sowie Makrophagenfusion zur Bildung von Fremdkörper-Riesenzellen.<sup>90</sup> Diese auftretenden Reaktionen weisen auf eine chronische Entzündung hin, welche eine pH-Wert-Minimierung des umliegenden Milieus und damit auch an der Implantatoberfläche, verursachen können. Durch die

entstehenden sauren Bedingungen wiederum wird die Korrosion des Elektrodenmaterials erhöht.<sup>89</sup> In einer aktuellen *in vitro* Studie aus 2018 beschäftigt sich Wissel *et al.* mit dem Einfluss von Platin-Ionen und -Verbindungen auf den menschlichen Zellstoffwechsel.<sup>91</sup> Die durch Korrosion der Elektrodenkontakte freigesetzten Platinspezies stehen im Verdacht, Schädigungen im menschlichen Gewebe hervorzurufen. Daher wird insbesondere die Bildung von Platin-Korrosionsprodukten an der Schnittstelle zwischen Elektrode und Gewebe betrachtet, um deren Verteilung in der Cochlea sowie die Wechselwirkungen mit neuronalen Zellen nachzuvollziehen. Hierfür wurden die Elektrodenkontakte einer menschlichen Cochlea-Implantat-Elektrode vier Wochen lang in einer wässrigen Natriumchlorid-Lösung elektrisch stimuliert. Der Überstand wurde in unterschiedlichen Konzentrationen *in vitro* mit zwei unterschiedlichen Zelllinien (NIH 3T3 Fibroblasten, SH-SY5Y Zellen) auf seine potenzielle Cytotoxizität untersucht. Zusätzlich wurden Platin-Nanopartikel mit einem Durchmesser von 3 nm mit einer analogen Versuchsdurchführung begutachtet. Die Zellkulturuntersuchungen zeigten einen vernachlässigbaren oxidativen Stress bei einer Platin-Nanopartikelkonzentration bis  $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , wobei keine Diffusion der Platin-Nanopartikel in die Zellen beobachtet wurde. Bei den Überständen aus der elektrischen Stimulation hingegen trat bei beiden Zelllinien in dem Platin-Konzentrationsbereich von  $1.64 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  bis  $8.2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  Zellsterben auf. Trotzdem wurde die Korrosion der Platinkontakte als unbedenklich eingestuft, da in vorangegangenen *in vivo* Studien geringere Platin-Konzentrationen zwischen  $5 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  bis  $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  in dem um die Elektrode liegenden Gewebe nachgewiesen wurden.<sup>74,92</sup> Dennoch müssen weitere Studien bezüglich einer langfristigen Cytotoxizität über einen Zeitraum von mehreren Jahren durchgeführt werden. Auch die Wechselwirkungen der Korrosionsprodukte mit dem Gewebe des Hörnervs sollten im Hinblick auf eine mögliche Cytotoxizität der Platin-Spezies untersucht werden.<sup>91</sup> Die Korrosion der Platinelektroden und die daraus resultierende Platinauflösung ist nicht nur von der elektrischen Stimulation und mechanischen Beanspruchung abhängig. Bereits 1980 wurde durch Robblee *et al.* und 1984 durch Shepherd *et al.* ein Zusammenhang zwischen der Platinauflösung und der Anwesenheit von Proteinen *in vivo* festgestellt.<sup>93,94</sup> Hibbert *et al.* bestätigte die Hemmwirkung der Platinauflösung durch eine beobachtete Aminosäureadsorption auf der Platinoberfläche. Insbesondere die Anwesenheit der Aminosäure Cystein, welche eine Thiol-Gruppe besitzt und somit starke Wechselwirkungen zu Edelmetallen ausbilden kann, zeigte diesen Effekt.<sup>92</sup> Infolgedessen könnte durch eine Modifizierung der Platinoberfläche, mit beispielsweise organischen Molekülen unter Ausbildung einer selbstorganisierende Monoschicht (*self-assembled monolayer*, SAM), die Platinauflösung reduziert und die Biokompatibilität der Platinkontakte erhöht werden.

## 2 Allgemeine Grundlagen

Zusammenfassend kann somit festgehalten werden, dass bereits seit Jahrzehnten der toxische Effekt von Platin und Platinspezies erforscht wird. Eine konkrete Aussage über die Auswirkungen im menschlichen Körper konnte jedoch bis heute nicht getroffen werden. Somit wird der Einsatz von strukturiertem elementarem Platin nicht kategorisch ausgeschlossen. Die Biokompatibilität und mögliche toxische Effekte sollten bei der Materialentwicklung für neuronale Elektroden aber stets betrachtet und ausgiebig untersucht werden.

Über ihre Biokompatibilität hinaus erfordern Materialien für neuronale Elektroden eine sorgfältige Abstimmung von Leitfähigkeit, Stabilität und Ladungsspeicherkapazität, um irreversible Faraday'sche Reaktionen zu vermeiden. Im Allgemeinen spielen die Ladungsbilanz der für die Stimulierung verwendeten kathodischen und anodischen Phasen und das resultierende Elektrodenpotential eine wichtige Rolle, da diese die Beschädigung sowohl der Elektrode als auch des umgebenden Gewebes beeinflussen.<sup>95,96</sup> Liegt das Elektrodenpotential außerhalb des geeigneten Bereichs, können irreversible Oxidationsreaktionen unter Bildung von wasserlöslichen Metallkomplexen die Elektrode zersetzen. Außerdem kann die Elektrolyse von Wasser hervorgerufen werden, was zu einer pH-Änderung und Gasentwicklung führen kann.<sup>97</sup> Zur Bestimmung der elektrochemischen Eigenschaften des Elektrodenmaterials eignen sich insbesondere die elektrochemische Impedanzspektroskopie (EIS) und die Cyclovoltammetrie (CV), weshalb in den im Folgenden vorgestellten Studien auf diese Messmethoden näher eingegangen wird.<sup>7,98</sup>

In einer Studie von 2013 verglich Howlader *et al.* die elektrochemischen Eigenschaften von Platin, Gold und Titan. Hierfür wurden entsprechende Elektrodenkontakte auf flexiblem Flüssigkristallpolymer hergestellt und durch elektrochemische Impedanzspektroskopie, Cyclovoltammetrie und Rasterkraftmikroskopie (AFM) untersucht. Die EIS wurde für verschiedene Eintauchzeiten in phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) im Frequenzbereich von  $10^{-1}$  Hz bis  $10^5$  Hz bestimmt. In Kurzzeitstudien zeigte Platin im ausgewählten Frequenzbereich die niedrigste elektrochemische Impedanz, gefolgt von Titan und Gold. Erklärt wurde diese Beobachtung mit den unterschiedlichen Oberflächenrauigkeiten, da durch Vergrößerung der spezifischen Oberfläche eine Erhöhung der Reaktivität und Kapazität einhergeht. Durch Verlängerung der Eintauchzeit verschlechterte sich die Impedanz von Platin und Titan jedoch deutlich, die Impedanz von Gold hingegen wies keine nennenswerte Erhöhung auf. Die Impedanz-Erhöhung von Platin und Titan lässt auf eine geringere Langzeitstabilität der beiden Metalle vermuten, da die Erhöhung mit einer Oberflächenänderung der Elektroden erklärt werden kann. In cyclovoltametrischen Messungen konnte für Platin vor Gold und Platin die höchste Ladungsabgabekapazität (CDC) ermittelt werden. Da für die Auswahl des geeigneten Elektrodenmaterials sowohl eine hohe Ladungsübertragungsrate als auch eine gute

Langzeitstabilität eine wichtige Rolle spielt, gilt Platin für Kurzzeitanwendungen als das optimale Elektrodenmaterial. Für Langzeitanwendungen muss die Stabilität der Platinkontakte genauer untersucht und die Platinoberfläche gegebenenfalls modifiziert werden.<sup>99</sup> Daher gibt es eine Vielzahl verschiedener Ansätze, in denen Platinoberflächen physikalisch oder chemisch modifiziert werden.<sup>14,100</sup>

Die Veröffentlichung von Boehler *et al.* aus dem Jahr 2015 beschäftigte sich mit einer nanostrukturierten Platinbeschichtung auf neuronalen Mikroelektroden (Abbildung 2.5).<sup>101</sup>

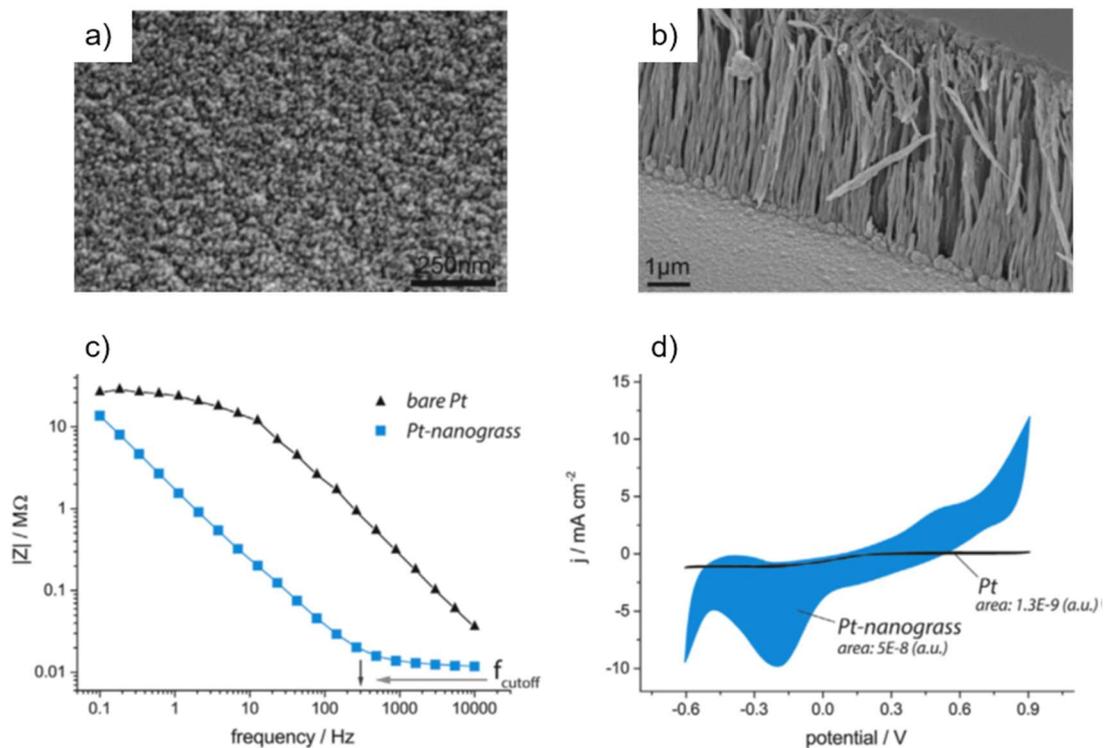


Abbildung 2.5: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der von Boehler *et al.* hergestellten Platingras-Beschichtung auf neuronalen Elektroden.<sup>101</sup>

Durch die templatfreie elektrochemische Platinabscheidung wurde eine Gras-ähnliche Struktur mit einer Stäbchenlänge von etwa 3 µm und einem Durchmesser von wenigen Nanometern erzeugt, welche eine hohe Oberflächenrauigkeit aufweist (Abbildung 2.5a, b). Messungen der Impedanz und Cyclovoltammetrie in PBS zeigten eine deutliche Veränderung durch die Beschichtung mit nanostrukturiertem Platin. Die erhöhte Oberfläche führte im Frequenzbereich von 0,1–10<sup>3</sup> Hz zu einer deutlich niedrigeren Impedanz im Vergleich zu blanken Platinoberflächen, in den Cyclovoltammogrammen konnte eine deutliche Erhöhung der Ladungsabgabekapazität beobachtet werden. Zellkulturuntersuchungen mit SH-SY5Y-Zellen zeigten keinen Unterschied zwischen der Platinbeschichtung und den blanken Platinoberflächen. Dies deutet darauf hin, dass keine toxischen Substanzen aus dem

## 2 Allgemeine Grundlagen

Pt-Nanogras freigesetzt wurden.<sup>101</sup> Vergleichbare Ergebnisse konnten durch Márton *et al.* durch die Herstellung rauer Platinoberflächen auf neuronalen Elektroden gezeigt werden.<sup>102</sup> Auch Xue *et al.* analysierte 2018 die Eigenschaften von Platin sowie Gold und zog zusätzlich auch poröses Platin, sogenanntes *platinum black*, als neuronales Elektrodenmaterial in Betracht. Die poröse Platinbeschichtung wurde elektrochemisch via einer wässrigen  $\text{H}_2\text{PtCl}_6$ -Lösung unter Zugabe von  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  abgeschieden. Auf rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen wurde eine poröse Beschichtung mit Porendurchmessern im Nanometerbereich gezeigt, welche ein dendritisches Wachstum aufweist. Die elektrochemische Impedanz wurde in PBS im Frequenzbereich von 0.5 Hz bis  $5 \cdot 10^5$  Hz gemessen, cyclovoltammetrische Messungen wurden im Potentialbereich von -0.6 V bis 0.6 V durchgeführt. Wie zu erwarten zeigte sich auch hier für Platin im Vergleich zu Gold eine niedrigere Impedanz. Die Erhöhung der spezifischen Oberfläche durch die Beschichtung mit *platinum black* resultierte in einer deutlich niedrigeren Impedanz im betrachteten Frequenzbereich. Auch die Ladungsabgabekapazität wurde durch die poröse Beschichtung signifikant erhöht. *In vitro* Zellviabilitätsuntersuchungen der *platinum black*-Beschichtung zeigten eine gute Biokompatibilität. Durch *in vivo* Kurzzeituntersuchungen am Hirnnerv *Nervus vagus* konnte eine erfolgreiche Stimulation durch *platinum black* nachgewiesen werden.<sup>103</sup> Zwei Jahre zuvor wurden durch Lee *et al.* *in vivo* Langzeit-Stimulationsversuche am Hüftnerf *Nervus ischiadicus* veröffentlicht, in denen durch die Verwendung von *platinum black* die Nervenschäden minimiert werden konnten. Aufgrund der auch in dieser Studie nachgewiesenen Impedanzminimierung, hohen Ladungsabgabekapazität, positiven Biokompatibilitätsuntersuchungen sowie der Abwesenheit offensichtlicher Auflösungserscheinungen wurde *platinum black* als biokompatibles Elektrodenmaterial mit einer guten Stabilität unter Stimulationsbedingungen eingestuft.<sup>104</sup> In einer aktuellen Studie von 2018 beschäftigte sich Zátónyi *et al.* hauptsächlich mit den Eigenschaften von *platinum black*, um die Stabilität der elektrochemisch abgeschiedenen Beschichtung nach *in vivo* Experimenten zu beurteilen. Die nanoporöse Platinbeschichtung wurde in einer wässrigen  $\text{H}_2\text{PtCl}_6$ -Lösung mit einem Drei-Elektroden-Aufbau durchgeführt. Als Gegenelektrode wurde ein Platinblech eingesetzt, als Referenzelektrode diente eine Silber/Silberchlorid-Elektrode. Für eine bessere Benetzbarkeit des zu beschichteten Platinsubstrats wurde Polyvinylpyrrolidon (PVP) als Additiv verwendet. Es wurde mit einem konstanten Strom für etwa 150 s beschichtet. Auf den rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen ist keine offensichtliche Porenstruktur, sondern viel mehr eine Strukturierung der Beschichtung erkennbar (Abbildung 2.6).

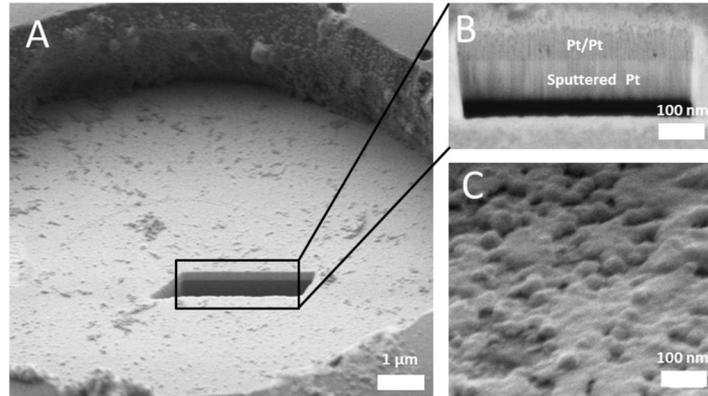


Abbildung 2.6: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme einer von Zátanyi *et al.* hergestellten *platinum black* Beschichtung.<sup>105</sup>

Es zeigt sich, dass durch vorherige Lagerung der *platinum black*-Beschichtung in wässrigem Medium eine deutliche Erhöhung der mechanischen Stabilität während der Implantation erzeugt werden konnte. Zur weiteren Beurteilung der Beschichtungsstabilität wurden elektrochemischen Messungen sowohl *in vivo* als auch vor und nach den *in vivo* Experimenten durchgeführt (Abbildung 2.7).

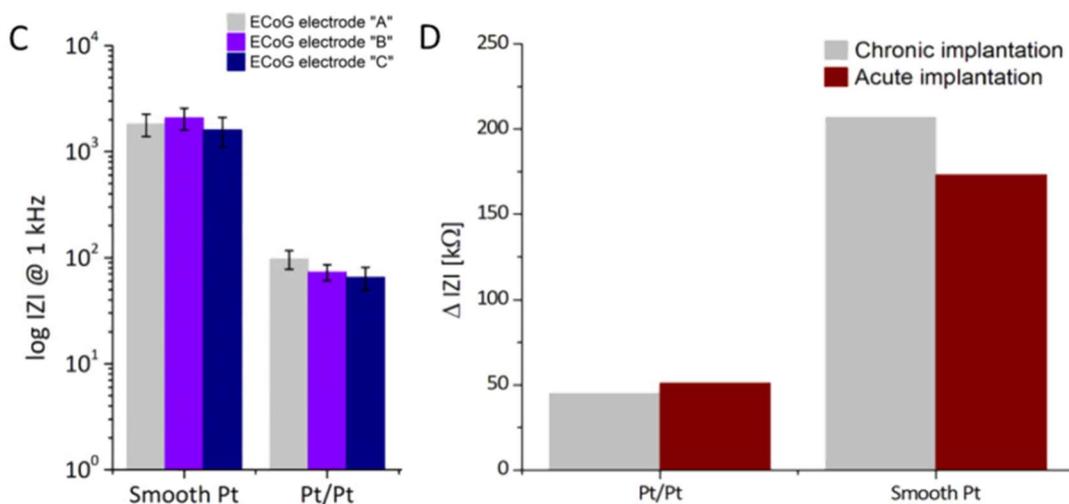


Abbildung 2.7: Elektrochemische Impedanz (*in vivo*) bei 1 kHz von dichten Platinoberflächen und von Zátanyi *et al.* hergestellten *platinum black* Beschichtung (links), sowie die Impedanzänderung durch eine akute bzw. chronische Implantation (rechts).<sup>105</sup>

Die *in vivo*-Messungen zeigen, dass die strukturierte Platinoberfläche im Vergleich zu der dichten Platinoberfläche eine deutlich geringere elektrochemische Impedanz aufweist. Die Messwerte der drei jeweils identischen Elektroden liegen innerhalb der Standardabweichung. Die durch die Implantation hervorgerufenen Impedanzerhöhung tritt sowohl bei akuten als auch chronischen Aufzeichnungen auf. Allerdings konnte die Impedanzerhöhung durch die Oberflächenmodifizierung mit *platinum black* um zwei Drittel verringert werden. Die nach der Implantation

aufgenommenen rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigten keine Veränderungen in den Oberflächenmorphologien und lassen folglich auf eine ausreichende Beschichtungsstabilität schließen. Infolgedessen kommen Zátonyi *et al.* zu dem Entschluss, dass *platinum black* eine stabile Schnittstelle zwischen Gewebe und Implantat bietet.<sup>105</sup> Auch Kelly *et al.* wies im Jahr 2020 verbesserte elektrochemische Eigenschaften physikalisch modifizierter Elektroden mit laserinduzierten periodischen Oberflächenstrukturen nach. Es konnten außerdem positive Effekte auf die Zellausrichtung und die Expression von Ionenkanälen, die an neuronalen Schlüsselfunktionen beteiligt sind, beobachtet werden.<sup>106</sup>

*In vivo* durchgeführte elektrochemische Impedanzmessungen können nicht nur zur Charakterisierung des Elektrodenmaterials dienen. Viel mehr bietet diese Messmethode eine Möglichkeit zur Beurteilung des an das Implantat angrenzenden Gewebes. Im Allgemeinen kann die Veränderung der elektrochemischen Impedanz neuronaler Elektroden Rückschlüsse auf die Bakterienadhäsion und das Biofilmwachstum liefern.<sup>107-109</sup> In einer Studie von 2011 analysierte Kim *et al.* die Veränderung der elektrochemischen Impedanz neuronaler Platinelektroden durch bakterielle Adhäsion und Biofilmreifung *in vitro*. Über die Erstellung eines Ersatzschaltbildes (vgl. Abbildung 3.5, S. 50) konnten Rückschlüsse auf die Doppelschichtkapazität geschlossen und der zeitliche Verlauf während der Bakterienadhäsion und der Biofilmbildung beobachtet werden.<sup>110</sup>

Demnach wäre als eine weitere Entwicklungsstufe des Cochlea-Implantats die Verwendung der Elektrodenkontakte nicht nur für die Stimulierung und als implantatassoziiertes Wirkstofffreisetzungssystem, sondern auch für die Charakterisierung der Schnittstelle zwischen Elektrode und Gewebe denkbar. Eine Bindegewebeinkapselung könnte durch Impedanzmessungen frühzeitig diagnostiziert werden.

### 2.2.2 Etablierung eines implantatassoziierten Wirkstofffreisetzungssystems

Eine systematische Behandlung des Innenohrs ist aufgrund der Blut-Labyrinth-Barriere nicht möglich. Durch das Einsetzen eines mit einem implantatassoziierten Wirkstofffreisetzungssystems ausgestatteten Implantats kann das Innenohr wirksam entlang der gesamten Cochlea behandelt werden.<sup>111</sup>

Es gibt unterschiedlichste Möglichkeiten, Wirkstoffe lokal im Innenohr freizusetzen. Einen ausführlichen Überblick über die große Bandbreite an Freisetzungsvorrichtungen, von Mikrokathetern, osmotischen Pumpen, über Hydrogel-basierte oder nanopartikuläre Systeme bis zu Beschichtungen des Cochlea-Implantats, geben Kechai *et al.* in ihrem Review von 2015.<sup>12</sup> Auch Freisetzungssysteme mit variablen Wirkstoffarten und -konzentrationen von der basalen hin zur apikalen Cochlea für eine örtliche anforderungsangepasste Wirkstofffreisetzung sind denkbar.

Durch eine gezielte lokale implantatassoziierte Wirkstofffreisetzung kann das Zellüberleben und Neuritenwachstum verbessert werden (vgl. S. 11). Eine entscheidende Rolle spielt die Auswahl der Wirkstoffe. Je nach Anwendungsfall und -ort müssen die Einflüsse der Wirkstoffe auf die entsprechenden Zellen untersucht und evaluiert werden.<sup>112</sup>

Daher soll im Rahmen dieser Arbeit ein implantatassoziiertes Wirkstofffreisetzungssystem durch Modifizierung der Cochlea-Implantat-Materialien entwickelt werden. Zunächst muss ein geeigneter Wirkstoff identifiziert werden, um die Entwicklung des Freisetzungssystems auf diesen abzustimmen.

Eine vielversprechende Wirkstoffgruppe zur Steigerung der Lebensfähigkeit von SGN sind Wachstumsfaktoren, insbesondere die des Zentralnervensystems, sogenannte neurotrophe Faktoren (NTF).<sup>8-10</sup> Vorangegangene Studien an Meeresschweinchen zeigten bereits, dass die neurotrophische Wirkung der NTF-Behandlung durch die Kombination mit elektrischer Stimulation verstärkt werden kann.<sup>113-115</sup> Daher bietet sich die Anwendung von NTF insbesondere in Wirkstofffreisetzungssystemen neuronaler Elektroden an. Auch die Kombination von Wachstumsfaktoren mit anderen Substanzen, sowie die Behandlung mit menschlichem Plasma, scheint einen erhöhten Einfluss auf die Förderung des SGN-Überlebens hervorzurufen.<sup>116</sup>

Ein häufig untersuchter vom Gehirn stammender neurotropher Faktor (*brain-derived neurotrophic factor, BDNF*)<sup>117</sup> ist bekannt für seinen positiven Effekt auf die im Innenohr liegenden Spiralganglienneuronen.<sup>118-121</sup> Die Arbeitsgruppe um Warnecke *et al.* beschäftigt sich mit der Erhöhung des BDNF-Einflusses durch die Kombination mit unterschiedlichsten Substanzen, beispielsweise dem Protein Artemin<sup>122</sup>, dem Regulator Aktivin A<sup>123</sup>, einem weiteren neurotrophen Faktor CNTF (*ciliary neurotrophic factor*)<sup>63</sup> sowie dem neuroprotektiven Wirkstoff Rolipram.

Der Einfluss von Rolipram, ein Phosphodiesterase-4-Inhibitor, auf das SGN-Überleben wurde in unterschiedlichsten Studien untersucht. Meyer *et al.* wies 2012 *in vitro* eine neuroprotektive Wirkung von Rolipram auf SGN nach, indem Rolipram aus lipidischen Nanokapseln in das Spiralganglienzellen-Plasma freigesetzt wurde.<sup>124</sup> Weder reines Rolipram noch reine lipidische Nanokapseln zeigten diese signifikante Erhöhung des neuronalen Überlebens, vermutlich ist der beobachtete Effekt auf die Kombination dieser beider Substanzen zurückzuführen.<sup>124</sup> Auch Warnecke *et al.* wies in einer Studie nach, dass eine Rolipramzugabe eine positive Wirkung auf das neuronale Zellüberleben hat. Durch die Kombination von BDNF und Rolipram konnte das Zellüberleben im Vergleich zu den unbehandelten sowie nur mit BDNF behandelten Zellen nochmals signifikant verbessert werden (Abbildung 2.8).<sup>11</sup>

## 2 Allgemeine Grundlagen

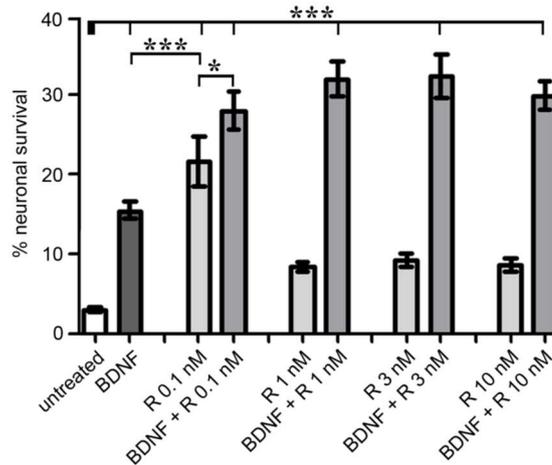


Abbildung 2.8: Beeinflussung des prozentualen Zellüberlebens durch eine konzentrationsabhängige Rolipramzugabe sowie durch die Kombination mit BDNF.<sup>11</sup>

Unbehandelte Spiralganglienneuronen weisen nach einer Kultivierungszeit von 48 h in Bezug auf die Einsaat ein Zellüberleben von unter 5% auf. Durch die Zugabe von BDNF konnte das Zellüberleben um mehr als das Dreifache gesteigert werden. Eine reine Rolipramzugabe mit einer Konzentration von  $0.1 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$  führte zu einem verbesserten Zellüberleben von über 20%. Bei höheren Rolipramkonzentrationen sank das neuronale Zellüberleben allerdings. Durch die Kombination von Rolipram und BDNF mit einer Rolipramkonzentration von  $1\text{--}3 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$  konnte das Zellüberleben sogar auf über 30% erhöht werden.

Basierend auf diesen Studien wurde die Kombination aus BDNF und Rolipram als eine sehr attraktive SGN-Behandlung eingestuft. Schmitt *et al.* konnten bereits ein Wirkstofffreisetzungssystem für BDNF aus Silica-Partikeln etablieren.<sup>64</sup> Durch die Einarbeitung der Silica-Partikel auf die Oberfläche der Siliconmatrix oder in eine poröse Beschichtung auf den Elektrodenkontakten des Cochlea-Implantats könnte BDNF lokal und intracochleär verabreicht werden. Eine weitere Möglichkeit zur Etablierung eines implantatassoziierten Wirkstofffreisetzungssystems im Cochlea-Implantat ist die Modifizierung der Cochlea-Elektrodenkontakte zur direkten Wirkstoffeinlagerung. Folglich soll im Rahmen dieser Arbeit ein Freisetzungssystem aus nanoporösem Platin zur Modifizierung der Elektrodenkontakte des Cochlea-Implantats entwickelt werden.

Die Wirkstofffreisetzung wird in den meisten Systemen durch die Diffusion von Wasser in das Freisetzungssystem und die Wirkstoffdiffusion aus dem Freisetzungssystem gesteuert. Hierbei wird zwischen Systemen mit einem Wirkstoffreservoir im Partikelkern und der Wirkstoffspeicherung in einer Partikelmatrix, beispielsweise bei porösen Materialien, unterschieden. Zusätzlich spielt das Design des Freisetzungssystems eine entscheidende Rolle.<sup>125,126</sup> Die Diffusion des Wasser als

auch des Wirkstoffs kann außerdem durch eine chemische Oberflächenmodifizierung des Freisetzungssystems beeinflusst werden.<sup>127</sup> Daher wird der folgende Abschnitt nicht nur der Herstellung des nanoporösen Platins als Freisetzungsmatrix gewidmet, es werden außerdem unterschiedliche Möglichkeiten einer chemischen Oberflächenmodifizierung erläutert.

### 2.2.3 Herstellung und Modifizierung

Die Herstellung oberflächenstrukturierter sowie poröser Platinmaterialien weist aufgrund ihrer vielfältigen Anwendungsbereiche in der Katalyse, Sensorik, und in Brennstoffzellen eine hohe technologische Bedeutung auf.<sup>128</sup> Daher wurden unterschiedlichste Synthesestrategien sowohl nach dem *Bottom-Up*- als auch dem *Top-Down*-Ansatz entwickelt. Beim *Bottom-Up*-Verfahren können leitfähige Elektrodenstrukturen entweder durch zuvor synthetisierte Platin-Nanopartikel (PtNP) oder durch die Verwendung von Platinsalz-Lösungen und anschließender Reduktion aufgebaut werden. Im Gegensatz hierzu geht der *Top-Down*-Ansatz von einer zusammenhängenden Substratstruktur aus, bei welchem beispielsweise durch Laserstrukturierung oder *Dealloying*-Prozesse Strukturen selektiv abgebaut werden.<sup>129</sup> Bevor in den folgenden Abschnitten die Synthesen unterschiedlicher poröser Systeme erläutert werden, müssen die Unterschiede zwischen strukturierten und porösen Materialien definiert werden. Poröse Materialien können in Abhängigkeit ihrer Porengröße in unterschiedliche Kategorien unterteilt werden. Liegen die Porendurchmesser unter 2 nm wird das Material als mikroporös beschrieben. Materialien mit Porendurchmesser zwischen 2–50 nm gelten als mesoporös. Weist das Material Porendurchmesser größer 50 nm auf, so wird von Makroporosität gesprochen.<sup>130</sup> Nanoporöse Materialien umfassen Porengrößen der drei genannten Kategorien, weisen aber eine maximale Porengröße von 100 nm auf.<sup>131</sup>

Für einen Überblick der Vor- und Nachteile der möglichen Herstellungsverfahren für poröse Platinbeschichtungen werden im Folgenden einige Synthesestrategien näher beschrieben.

#### Poröse Platin-Nanopartikel (pPtNP)

Generell basiert die Platin-Nanopartikelsynthese auf der Reduktion einer Platin-Vorläuferverbindung, häufig aus den Platinsalzen  $\text{H}_2\text{PtCl}_6$  oder  $\text{PtCl}_4$ , welche in Wasser gelöst werden. Die Zugabe eines Reduktionsmittels ruft die Bildung eines Kristallkerns hervor, an welchem das Partikelwachstum beginnt.<sup>14</sup> Durch die Verwendung von Templaten kann eine poröse Morphologie der Platin-Nanopartikel bewirkt und gesteuert werden. Die Templat-basierte Partikelsynthese kann grundsätzlich in drei Schritte gegliedert werden: (1) Ausbildung der originalen Templatstruktur, (2) Füllen der Templat-Hohlräume mit der Platin-Vorläuferverbindung mit anschließender Platinreduktion sowie (3) die Templat-Entfernung.<sup>132</sup> Die erhaltenen

## 2 Allgemeine Grundlagen

porösen Platinstrukturen bilden das Negativ der eingesetzten Templatstruktur ab. Im Allgemeinen können die zur Synthese pPtNP hauptsächlich verwendeten Template in zwei Kategorien eingeteilt werden: harte und weiche Template (Abbildung 2.9).<sup>133</sup>

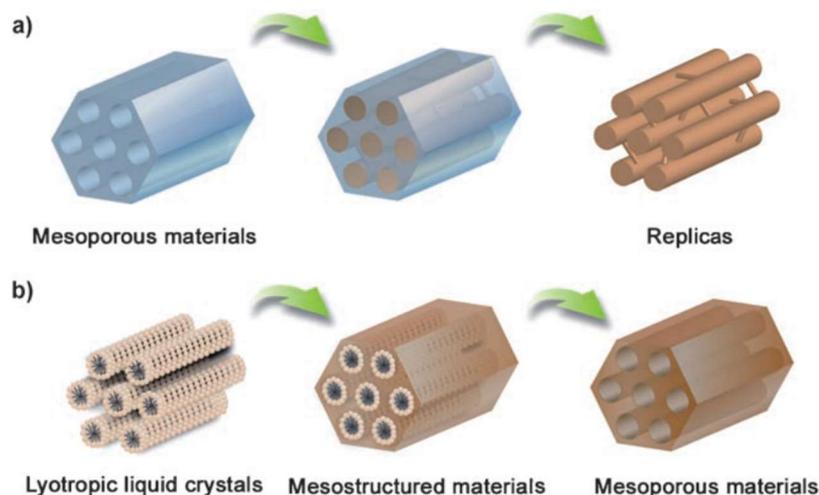


Abbildung 2.9: Synthese poröser Nanopartikel unter Verwendung von harten (a) und weichen (b) Templaten.<sup>133</sup>

Harte Template sind beispielsweise poröse Silicasphären, welche durch ihre Synthese eine poröse und strukturierte Morphologie aufweisen. Weiche Template ordnen sich in geeigneten Lösungsmitteln abhängig von Konzentration und funktionellen Gruppen zu Mizellen oder lyotropischen Flüssigkristallen an und können somit die Struktur der Platinpartikel steuern.

Durch die Verwendung des mesoporösen Silicas KIT-6 und Ascorbinsäure als Reduktionsmittel wurden durch Wang *et al.* die in Abbildung 2.10 gezeigten pPtNP synthetisiert.<sup>134</sup>

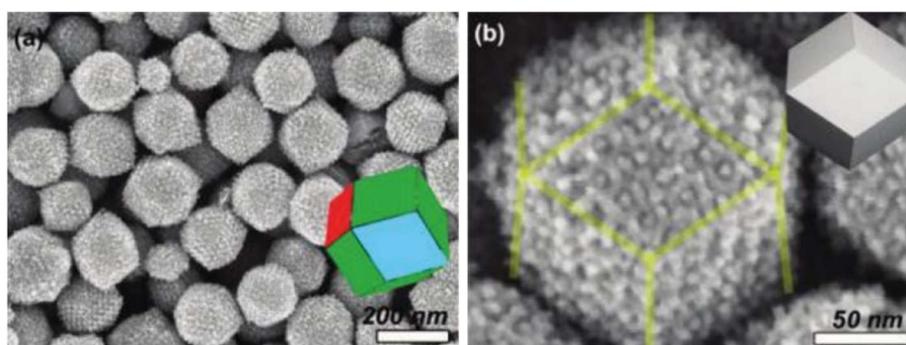


Abbildung 2.10: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der von Wang *et al.* unter Verwendung des mesoporösen Silica KIT-6 synthetisierten pPtNP.<sup>134</sup>

Die mesoporösen Platinpartikel liegen isoliert voneinander vor und weisen eine enge Partikelgrößenverteilung sowie ein geordnetes Porensystem auf. Fast alle pPtNP zeigen eine rhombische dodekaedrische Morphologie. Durch Kleinwinkel-Röntgenbeugungsmessungen konnten größtenteils die gleichen Signale wie bei dem eingesetzten Templat KIT-6 aufgenommen werden, was auf eine Beibehaltung der ursprünglichen Symmetrie des KIT-6 im Platin-Replikat schließen lässt.<sup>134</sup> Durch ähnliche Syntheseverfahren können Replikate aus mesoporösen Silica SBA-15 sowie sogenannte Platin-Nanodendriten hergestellt werden.<sup>135,136</sup> Zhuang *et al.* verwendete als Templat sogenannte poröse Silber-*mesoflowers*, bei welchen das Silber durch die Penetration mit einem Platinsalz teilweise ersetzt wurde. Als Zwischenprodukt entstand zunächst eine Silber-Platin-Legierung aus der elektrochemisch der Silberrestgehalt entfernt wurde. Die Morphologie der entstandenen Platin-*mesoflowers* entsprach auch hier dem Replikat des eingesetzten Templats.<sup>137</sup> Eine weitere Möglichkeit, nanoporöse Platinstrukturen zu erzeugen, wird durch Sree *et al.* beschrieben. Zunächst wurde das Silica-Templat Zeotile-4 synthetisiert, in welches durch Atomlagenabscheidung (*atomic layer deposition*, ALD) unter Verwendung einer Platinsalz-Vorläuferverbindung elementares Platin abgeschieden wurde. Anschließend wurde über die Behandlung mit Flusssäure das Silica-Templat entfernt, sodass ein aus Platin bestehendes Zeotile-4 Replikat mit einer 3-dimensionalen Porenstruktur hergestellt werden konnte. Die anschließende Elektrodenbeschichtung erfolgte durch Auftropfen einer Pt-Zeotile-4-Suspension auf die erhitzte Elektrodenoberfläche und anschließendes Tempern bei 250–575 °C.<sup>138</sup> Werden Kohlenstoffnanoröhren als hartes Templat eingesetzt, so können mittels ALD-Verfahren 3-dimensionale Platin-Nanodrähte hergestellt werden.<sup>139</sup>

Unter Verwendung des weichen Templats Octaethylenglykol Monohexadecylether (C<sub>16</sub>(EO)<sub>8</sub>; Abbildung 2.11a), welches eine hexagonale Mesophase ausbildet, konnten durch Attard *et al.* mesoporöse Platinpartikel mit einer hexagonalen Nanostruktur synthetisiert werden (Abbildung 2.11b).<sup>140</sup>

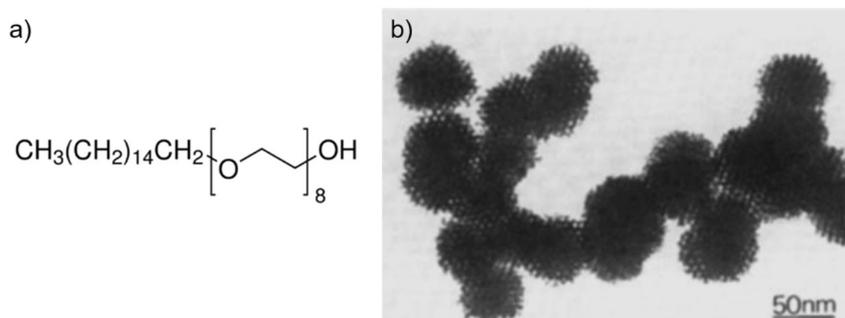


Abbildung 2.11: Strukturformel der verwendeten Flüssigkristall-Templats Octaethylenglykol Monohexadecylether (a) sowie eine TEM-Aufnahme der resultierenden pPtNP.<sup>140</sup>

## 2 Allgemeine Grundlagen

Auch der Einsatz von Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB) führte zu monodispersen Nanopartikeln, hier wurde Natriumborhydrid als Reduktionsmittel eingesetzt wurde.<sup>141</sup> Durch die Verwendung von Polyvinylpyrrolidon (PVP) konnten mesoporösen Nanoschwämmen erzeugt werden.<sup>142</sup> Ein Gemisch aus Nonaethylenglykol Monododecylether und Polysorbat 60 (Tween® 60) und dem Reduktionsmittel Hydrazin führte zu Platin-Nanoröhren.<sup>143</sup>

Auch eine templatfreie Herstellung von porösen Makroröhren durch eine Platinsalzkombination aus  $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_4][\text{PtCl}_4]$ <sup>144</sup> sowie von sphärischen porösen Nanopartikeln unter Verwendung von Ascorbinsäure<sup>145</sup> ist möglich.

Nach der pPtNP-Synthese können aus diesen Platinbeschichtungen erzeugt werden. So können die pPtNP beispielsweise mittels eines Binders durch Elektrosprühen durch ein starkes elektrisches Feld zwischen Düse und Substrat aus einer kolloidalen Lösung aufgebracht werden.<sup>146,147</sup> Weitere Möglichkeiten umfassen den Injektionsdruck, das Gießen oder einen Sprühprozess ohne elektrisches Feld.<sup>14</sup> Bindemittelfreie Bottom-up-Strategien können durch die kolloidale Selbstorganisation<sup>148,149</sup> sowie chemische Vernetzung durch Oberflächenfunktionalisierungen<sup>150</sup> oder Sintern der Platinpartikel<sup>151</sup> umgesetzt werden.

Für die Anwendung als neuronales Elektrodenmaterial sind diese Beschichtungen aufgrund ihrer geringen Langzeitstabilität oder hohen Synthesetemperaturen nicht geeignet.<sup>14</sup> Folglich müssen die porösen Platinbeschichtungen über andere Herstellungsverfahren direkt erzeugt werden.

### Poröse Platinbeschichtungen

Zur direkten Herstellung poröser Platinbeschichtungen eignen sich unterschiedlichste Strategien. Die Syntheseverfahren können in 5 Kategorien unterteilt werden: Stromlose Abscheidung, galvanischer Austausch, thermische Zersetzung, chemische Gasphasenabscheidung und elektrochemische Abscheidung.<sup>14</sup> Des Weiteren können strukturierte Platinoberflächen durch Laserstrukturierungsverfahren und Dealloying-Prozesse erzeugt werden, indem von einem Platinsubstrat kontrolliert Bereiche der Beschichtung entfernt werden.<sup>65,70,152</sup> Da im Rahmen dieser Arbeit jedoch ein 3-dimensionales Porensystem hergestellt werden soll, wird auf diese Strukturierungsverfahren nicht weiter eingegangen.

Die stromlose Abscheidung poröser Platinbeschichtungen erfolgt entweder auf dichten oder aber auf bereits porösen Substraten. Beispielsweise kann durch das Eintauchen der bereits porösen Struktur in eine Platinsalzlösung und anschließender Zugabe eines Reduktionsmittels eine Replikatstruktur aus Platin erzeugt werden.<sup>14</sup> Eine poröse Platinbeschichtung auf dichten Substraten wurde von Cho *et. al.* durch das Aufbringen einer Platinsalz-Lösung und anschließender Reduktion in Ethylenglykoldampf hergestellt.<sup>153</sup> Eine alternative Abscheidungstechnik stellt die Hydrothermalsynthese dar.<sup>128</sup> Unter erhöhter Temperatur und Druck wird das

Substrat in einer Platinsalzlösung mit einem Reduktionsmittel für mehrere Stunden in einem Autoklaven gelagert, wodurch Elektrodenbeschichtungen mit einem erhöhten Rauheitsfaktor entstehen.<sup>154,155</sup> Die Benetzung einer porösen Membran mit einer Platinsalzlösung und eine anschließende Reduktion sowie Templatentfernung durch Erwärmen führt außerdem zu einer porösen Platinbeschichtung. Je nach Membranstruktur können unterschiedlichste Morphologien, beispielsweise Platin-Nanoröhren, erzeugt werden. Zur Erhöhung der Wanddicken der Platin-Nanoröhren kann der Benetzungsreduktionszyklus wiederholt werden.<sup>156</sup> Der galvanische Austausch von unedleren Metallen in einer bereits bestehenden porösen Struktur durch den Kontakt mit einer Platinsalzlösung ist eine weitere Methode, um poröse Platinbeschichtungen zu erzeugen. Durch die elektrochemische Abscheidung von Nickel auf porösem Aluminiumoxid, die anschließende Entfernung des Aluminiumoxids in konzentrierter Natronlauge und das galvanische Ersetzen von Nickel durch Platin können so Platinstäbchen mit einem Durchmesser von 260 nm gebildet werden.<sup>157</sup> Ein ähnliches Verfahren wurde durch Kloke *et. al.*, Boretius *et. al.* und Eickenscheidt *et al.* angewendet. Hier wurde zunächst eine Platin-Kupfer-Legierung aus einer Platin- und Kupfersalzlösung elektrochemisch abgeschieden, um anschließend das weniger edle Kupfer selektiv aufzulösen. Abhängig von der eingesetzten Kupferkonzentration wurden unterschiedlichste Oberflächenmorphologien mit hohen spezifischen Oberflächen erzeugt. Allerdings wiesen die Beschichtungen entweder Risse in der Beschichtung auf bzw. es wurden eher Oberflächen mit erhöhter Rauigkeit und keine Porensystem erzeugt. Zusätzlich wurde in den Beschichtungen ein Restgehalt an Kupfer nachgewiesen.<sup>152,158,159</sup> Rissfreie Platinbeschichtungen mit Porendurchmessern von etwa 3 nm konnten von Pugh *et. al.* durch eine Entfernung von Kupfer aus Platin-Kupfer-Legierungen erzeugt werden. Jedoch wurden bei dem Herstellungsprozess Temperaturen von über 1000 °C eingesetzt, weshalb auch diese Syntheseroute für die Anwendung als neuronales Elektrodenmaterial nicht optimal ist.<sup>160</sup> Die thermische Zersetzung von Platinsalzlösungen bei hohen Temperaturen kann generell als weitere Syntheseroute von strukturierten Platinbeschichtungen genutzt werden. Durch Erwärmen der Platinsalzlösung auf dem Substrat oder durch Besprühen eines erhitzten Substrat können unter Anwesenheit eines Reduktionsmittels stark haftende raue Platinbeschichtungen erzeugt werden.<sup>161,162</sup> Doch wie auch bei der Syntheseroute von Pugh *et. al.* kommt dieses Verfahren aufgrund der hohen Synthesetemperaturen für die Modifizierung der Cochlea-Elektrode nicht infrage. Durch die metallorganische chemische Gasphasenabscheidung (*chemical vapour deposition*, CVD) können Platin-Nanostäbchen ohne die Verwendung von Templaten hergestellt werden.<sup>163</sup>

Alle zuvor vorgestellten Syntheseverfahren für die direkte Herstellung von porösen Platinbeschichtungen benötigen raue Reaktionsbedingungen, wie beispielsweise hohe Temperaturen, starke Reduktionsmittel oder Säuren bzw. Laugen zur

## 2 Allgemeine Grundlagen

Templatentfernung. Auch die teilweise langen Reaktionszeiten sowie viele Syntheseschritte verbunden mit einem hohen manuellen Arbeitsaufwand sprechen gegen diese Syntheseverfahren.

Die elektrochemische Platinabscheidung hingegen weist die Vorteile einer hohen Kontrolle während des Beschichtungsprozess unter milden Synthesebedingungen auf. In diesem Prozess werden Platin-Ionen elektrochemisch zu festem Platin reduziert und an der Arbeitselektrode, der Kathode, abgeschieden.<sup>164</sup>



Die für die Platinreduktion benötigten Elektronen werden von einer externen Stromquelle über die Arbeitselektrode auf die Platin-Ionen übertragen. Eine Platinabscheidung tritt dann auf, wenn das Kathodenpotential negativer als das Redoxpotential der jeweiligen Redoxreaktion ist. Daher können sowohl die Prozessparameter als auch die Prozessdauer über eine externe Stromquelle gesteuert werden. Ein weiteres Merkmal ist die Beschränkung der Beschichtung auf leitfähige Bereiche, wodurch die Herstellung strukturierter Elektroden ermöglicht wird. So können am Beispiel des Cochlea-Implantats ausschließlich die Platinelektrodenkontakte ohne eine Beeinflussung der Siliconmatrix beschichtet werden. Da das Substrat als Stromabnehmer fungiert, ist die Platinbeschichtung kovalent an dieses gebunden, wodurch eine stabile Beschichtung mit einem geringen elektrischen Widerstand erzeugt werden kann.<sup>14</sup> Die üblichen elektrochemischen Verfahren werden galvanostatisch bei konstantem Strom oder potentiostatisch bei konstantem Potential durchgeführt. Unter Verwendung der galvanostatischen Abscheidung wird der Abscheidungsstrom kontrolliert, wodurch ein lineares Verhältnis zwischen Abscheidungszeit und abgeschiedener Platinmenge vorliegt. Allerdings können durch Schwankungen des Abscheidungspotentials Veränderungen in dem Reaktionsmechanismus der Platinabscheidung auftreten. Die potentiostatische Abscheidung wird in einem Dreielektrodenaufbau durchgeführt, um mithilfe einer Referenzelektrode das Kathodenpotential zu steuern. Platin kann aufgrund seines sehr hohen Überpotentials im Gegensatz zu anderen Metallen nicht aus einer elementaren Platingenelektrode abgeschieden werden, sondern muss in der Elektrolytlösung ionisch vorliegen. Da Platin-Ionen in wässriger Lösung komplexieren, erfolgt die elektrochemische Platinreduktion in drei Schritten. Zunächst werden die komplexierten Platin-Ionen über diffuse und, falls vorhanden, konvektive Kräfte zur Kathodengrenzfläche transportiert. Anschließend werden die Liganden vom komplexierten Platin-Ion im elektrischen Feld entfernt, sodass eine elektroaktive Platinspezies vorliegt. Abschließend findet die Elektronenübertragung von der Arbeitselektrode auf das Platin-Ion statt. Hierbei findet eine Adsorption des Platin-Ions an der Kathodenoberfläche und eine Integration in die Elektrodenstruktur

statt.<sup>164</sup> Zur Minimierung der Oberflächenenergie des Festkörpers diffundiert das adsorbierte Platin-Ionen an eine Fehlstelle möglichst geringer Energie und wird dort im Rahmen des Kristallwachstums reduziert.<sup>164,165</sup> Um eine raue Platinoberfläche zu erzeugen, müssen Cluster aus adsorbierten Platin-Ionen bei hohen Geschwindigkeiten erzeugt werden. Generell findet die Bildung solcher Cluster nach den Regeln der Thermodynamik aufgrund der erhöhten Oberflächenenergie nicht statt. Ist jedoch eine kritische Clustergröße erreicht, kann der mit dem Clusterwachstum verbundene freie Energiegewinn den Anstieg der Oberflächenenergie ausgleichen. Sobald die Aktivierungsenergiebarriere zur Bildung von Kernen mit stabiler Größe überwunden ist, findet das anschließende Kristallwachstum nach der klassischen Nukleationstheorie statt. Nach diesem Mechanismus können durch elektrochemische Abscheidung raue Platinoberflächen gebildet werden. Die Anzahl der für ein Cluster mit kritischer Größe benötigten Moleküle  $N_C$  kann wie folgt definiert werden:

$$N_C = \frac{32\pi v_m^2 \sigma^3}{3|\Delta\mu|^3}$$

wobei  $v_m$  das Volumen pro Molekül,  $\sigma$  die Oberflächenspannung und  $\Delta\mu$  die Differenz der elektrochemischen Potentiale des gelösten und festen Zustands des Moleküls beschreibt.

Welcher dieser drei Vorgänge der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist, hängt von den jeweiligen Bedingungen und ablaufenden Reaktionen ab. So kann beispielsweise ein langsamer Massetransport oder eine starke Wechselwirkung zwischen Liganden und Platin-Ion zu einer reduzierten Konzentration der aktiven Platin-Spezies an der Kathodenoberfläche führen, woraus wiederum eine verlangsamte Platinabscheidung resultiert. Die Differenz des elektrochemischen Potentials durch das angelegte Überpotential  $\eta$  wird als

$$\Delta\mu = zF\eta$$

definiert. Die Anzahl der übertragenden Elektronen wird mit  $z$ , die Faraday-Konstante mit  $F$  beschrieben. Daher kann die Keimbildung erleichtert werden, indem die kritische Clustergröße durch die Verwendung hoher Überpotentiale verringert wird. Ist die Keimbildungsrate im Vergleich zur Kristallwachstumsrate erhöht, werden poröse Strukturen in den abgeschiedenen Beschichtungen erzeugt (Abbildung 2.12).

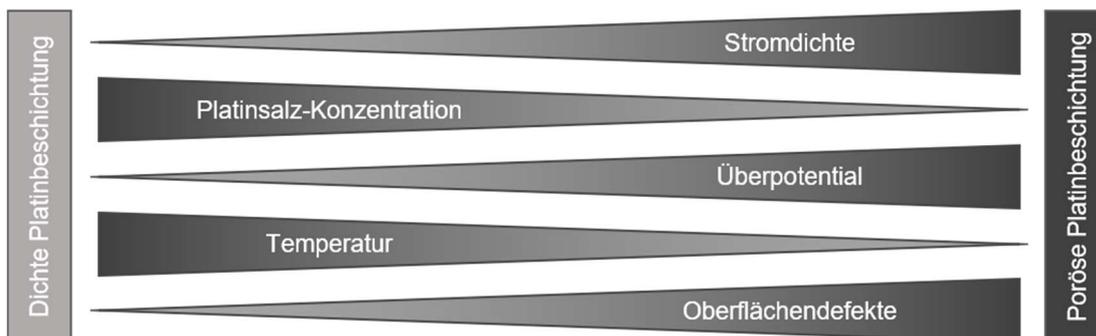


Abbildung 2.12: Schematische Darstellung der Einflussfaktoren auf die resultierende Beschichtungsmorphologie der elektrochemischen Abscheidung nach Paunovic *et al.*<sup>165</sup>

Außerdem beeinflusst die Wahl der Depositionsstromdichte die Oberflächenmorphologie der abgeschiedenen Beschichtung. Bei der sogenannten Grenzstromdichte wird die maximale Geschwindigkeit der Platinreduktion an der Elektrodenoberfläche hervorgerufen. Diese ist als

$$j_{\text{lim}} = \frac{nFDc_{\text{bulk}}}{\delta_{\text{Nernst}}}$$

definiert und ist von der Anzahl der übertragenden Elektronen pro Ion  $n$ , der Diffusionskonstante  $D$ , der Faraday-Konstante  $F$ , der Konzentration des Platin-Ions in der Elektrolytlösung  $c_{\text{bulk}}$  und der Dicke der Nernst-Diffusionsschicht  $\delta_{\text{Nernst}}$  abhängig. Ist also die Depositionsstromdichte im Größenbereich der Grenzstromdichte, werden die Platin-Ionen sofort beim Erreichen der Elektrodenoberfläche reduziert, sodass keine Oberflächendiffusion des adsorbierten Platin-Ions zu einer niederenergetischen Stelle stattfinden kann. Ein weiterer einflussnehmender Parameter sind Oberflächenfehler auf der Arbeitselektrode. Sie stellen zum einen bevorzugte Stellen der Keimbildung dar, zum anderen führen hervorstehende Punkte oder Kanten zu einer Konzentration des elektrischen Felds und resultierend daraus zu einem lokal erhöhten Abscheidestrom.<sup>14</sup>

Neben den üblichen potentiostatischen und galvanostatischen Verfahren können die Abscheidungsprozesse durch Modifikationen dieser Methoden verbessert werden. Beispielsweise kann durch eine gepulste elektrochemische Abscheidung der Konzentrationsgradient der Platin-Ionen and der Arbeitselektrode verringert werden. Wie beispielhaft in Abbildung 2.13 gezeigt, wird zunächst ein definierter Puls mit einem Potential von  $-0.2\text{ V}$  und einer Pulsdauer von  $0.1\text{ s}$  an die Arbeitselektrode (Abbildung 2.13, blau) angelegt, um eine elektrochemische Abscheidung hervorzurufen.

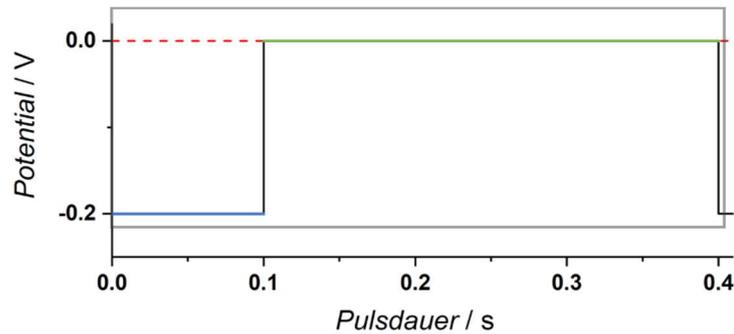


Abbildung 2.13: Darstellung eines Zyklus der gepulsten elektrochemischen Abscheidung, bestehend aus einem Puls mit  $-0.2\text{ V}$  und einer Dauer von  $0.1\text{ s}$  sowie einer Pulspause von  $0.3\text{ s}$ .

Durch die Reduktion der Platin-Ionen an der Elektrodenoberfläche verarmt die Platin-Ionenkonzentration der Elektrolyselösung, ein Konzentrationsgradient der Platin-Ionen wird hervorgerufen. Um diesem entgegenzuwirken folgt eine Pulspause von  $0.3\text{ s}$  (Abbildung 2.13, grün), in welchem sich durch Diffusionsprozesse eine möglichst homogene Platin-Ionenkonzentration an der Elektrodenoberfläche einstellen kann. Ein Potentialpuls gefolgt von einer Pulspause wird als ein Zyklus bezeichnet (Abbildung 2.13, grau), welcher mit beliebiger Anzahl wiederholt werden kann. Während der Pulspause können außerdem sich ausbildende Sperrschichten, wie bspw. Hydrathüllen, um die Platin-Ionenpartikel reduziert werden. Entsprechend können höhere Stromdichten und folglich höhere Überspannungen erzeugt werden, wodurch feinere Kristallkeime und daraus resultierend höhere spezifische Oberflächen gebildet werden können. Durch Kim *et. al.* wurden die Pulsabscheidungsparameter, wie Spitzenstromdichte, Gesamtladungsdichte und Dauer der Pulspause, genauer untersucht. Durch die Spitzenstromdichte und den Pulszyklus konnte die Keimbildung kontrolliert und das dendritische Wachstum reduziert werden. Wie zu erwarten war, konnte außerdem der Zusammenhang zwischen der abgeschiedenen Platinmasse und der Gesamtladungsdichte nachgewiesen werden.<sup>166</sup>

Durch die Doppelpulsstrategie kann eine enge Partikelgrößenverteilung erreicht werden. Die Keimbildung wird zunächst durch einen kurzen Impuls mit einem hohen Überpotential initiiert, auf den anschließend eine Wachstumszeit mit niedrigerem Überpotential folgt.<sup>167</sup>

Durch eine templatfreie elektrochemische Behandlung unter Variation des Abscheidungspotentials, der Elektrolyttemperatur und der Platinsalzkonzentration konnten unter anderem durch Ponrouch *et al.* und Boehler *et al.* unterschiedlichste Platinstrukturen sowohl mit hochgeordneter als auch polykristalliner Struktur sowie hohen Rauheitsfaktoren hergestellt werden. Allerdings wiesen keiner der gezeigten Platinbeschichtungen ein 3D-Porensystem auf.<sup>168-170</sup> Auch das elektrochemische Aufrauen der Platinoberfläche und die elektrochemische Abscheidung von

## 2 Allgemeine Grundlagen

Platinnanopartikeln auf der Elektrodenoberfläche führte zwar zu einer erhöhten spezifischen Oberfläche, jedoch konnte kein Porensystem erzeugt werden.<sup>171-173</sup> Die von Elyahoodayan *et al.* elektrolytisch abgeschiedenen Platin-Iridium Beschichtungen führten zu einem verbesserten Signal-Rausch-Verhältnis und niedrigeren erzeugten Spannungen für einen gegebenen Stimulus, sodass ein geringerer Energieverbrauch und eine elektrochemisch sicherere Stimulation erreicht werden konnte.<sup>174</sup> Doch auch durch dieses Verfahren wurden keine porösen Beschichtungen erzeugt. Desai *et al.* führte eine Studie zur Beschichtung eines Mehrelektroden-Arrays für die Anwendung als neuronale Elektrode durch. Es wurde gezeigt, dass durch die Behandlung mit Ultraschall während der elektrochemischen Platinabscheidung eine erhöhte Stabilität der porösen Platinbeschichtung erzeugt werden konnte. Die Verbesserungen der elektrischen Eigenschaften durch poröse Platinbeschichtung lässt zwar auf eine erhöhte spezifische Oberfläche schließen, jedoch wurden keine weiteren Untersuchungen hinsichtlich des Porensystems durchgeführt.<sup>175</sup> Auch durch die Verwendung eines organischen Lösungsmittels sowie durch die Zugabe von Bleiacetat konnte keine homogene Porenstruktur hervorgerufen werden.<sup>176,177</sup> Im Hinblick auf die Anwendung als neuronales Elektrodenmaterial, im speziellen im Innenohr, sollten toxische Zusätze wie bspw. Bleiverbindungen generell vermieden werden.

Für die Herstellung poröser Platinbeschichtungen bietet sich daher die templatbasierte elektrochemische Abscheidung an. Wie bereits bei der Herstellung poröser Platinpartikel erläutert (vgl. S.24 ff), können die erzeugten 3D-Platinstrukturen anhand des eingesetzten Templats bestimmt werden. Für die Herstellung poröser Platinbeschichtungen eignen sich sowohl harte, weiche als auch kolloidale Template.

Unter der Verwendung von harten Templaten wird Platin innerhalb einer bereits auf der Arbeitselektrode vorhandenen porösen Struktur elektrochemisch abgeschieden. Nach der Platinabscheidung wird das Templat entfernt und eine poröse Platinstruktur, welche der Hohlraumstruktur des Templats entspricht, bleibt auf der Arbeitselektrode zurück. Durch dieses Verfahren lassen sich aufgrund der Vielfalt an Templaten unterschiedlichste poröse Platinsysteme synthetisieren. Die am häufigsten verwendeten harten Template bestehen aus eloxierten Aluminiumoxidmembranen oder spurgeätzten Polycarbonatmembranen.<sup>178</sup> Diese sind nicht nur in Porendichte und Porendurchmesser einstellbar, sondern auch kommerziell erhältlich.<sup>14</sup> Yuan *et al.* konnte durch die Verwendung von 3-Aminopropyltrimethoxysilan-modifizierten eloxierte Aluminiumoxidmembranen Platin-Nanoröhren mit einem Innendurchmesser von  $70 \pm 10$  nm, einem Außendurchmesser von  $150 \pm 10$  nm und einer Länge von  $3 \mu\text{m}$  erzeugen (Abbildung 2.14a). Die Modifizierung diente als sogenannter molekularer Anker, durch welchen die Platinabscheidung entlang der Templat-Porenwände besser kontrolliert werden konnte.<sup>179</sup>

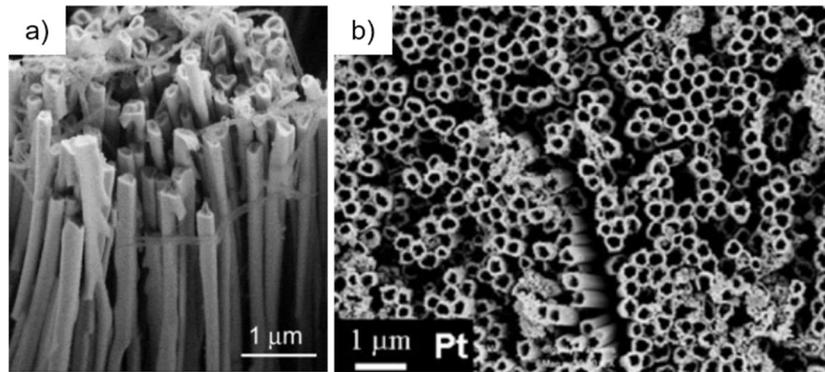


Abbildung 2.14: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Platin-Nanoröhren, welche unter Verwendung von harten Templaten von Yuan *et al.* und Cui *et al.* synthetisiert wurden.<sup>179,180</sup>

Auch Cui *et al.* synthetisierte Platin-Nanoröhren mit Außendurchmessern von 300 nm (Abbildung 2.14b). Als Lösungsmittel wurde hier Dimethylsulfoxid (DMSO) verwendet, welches eine erhöhte Wechselwirkung mit Edelmetalloberflächen aufweist. Durch die deutlich höhere Viskosität von DMSO im Vergleich zu Wasser wird die Platin-Ionen-Diffusion zur Elektrodenoberfläche verlangsamt, wodurch die elektrochemische Platinabscheidung auf der Templatoberfläche kontrollierter ablaufen kann. Daher ist keine Zugabe von weiteren Additiven zur Steuerung der elektrochemischen Abscheidung nötig.<sup>180</sup>

Zur Erzeugung größerer Nanoporen unter Verwendung harter Template eignen sich kolloidale Template, welche regelmäßige und periodisch angeordnete Strukturen bilden und aufgrund der dichtesten Kugelpackung häufig eine kubisch flächenzentrierte Ordnung aufweisen. Die eingesetzten kolloidalen Template weisen üblicherweise eine sphärische Form auf und bestehen meistens aus Silica oder Polymeren.<sup>178</sup> Beide Materialien lassen sich gut modifizieren, wodurch deren Oberflächenchemie recht einfach angepasst werden kann. Außerdem liegen beide Materialien als monodisperse Suspensionen vor.<sup>181</sup> Zusätzlich lassen sich beide Template mit unterschiedlichen Partikeldurchmessern zwischen wenigen Nanometern bis zu einigen Mikrometern gut synthetisieren und sind teilweise kommerziell erhältlich.<sup>182–184</sup> Die Sedimentation der kolloidalen Template basiert auf der Selbstanordnung durch die Gravitationskraft und kann bspw. durch das Anlegen von Ultraschall oder vertikale Deposition beeinflusst werden.<sup>183,185</sup> Die Bildung der Partikelbeschichtung wird zunächst durch die Verdampfung des Lösungsmittels gesteuert, welche einen konvektiven Partikelfluss von der kolloidalen Suspension zur Substratoberfläche hervorruft. Anschließend erfolgt die Selbstanordnung durch Wechselwirkungen zwischen den Partikeln, wie attraktiver seitlicher Kapillarkräfte und elektrostatische Abstoßung, und führt zu einer hexagonal dichtesten Anordnung.<sup>186</sup> Durch das Eintauchen des mit den Templatpartikeln beschichteten Substrats in die Metallpräkursor-Lösung werden die Zwischenräume der Partikel mit

## 2 Allgemeine Grundlagen

dieser gefüllt. Das Anlegen eines Potentials führt schließlich zu einer elektrochemischen Metallabscheidung. Im Vergleich zu anderen Reduktionsverfahren sorgt die elektrochemische Abscheidung innerhalb der Templatzwischenräume für eine hohe Dichte des Platins. Daher findet die anschließende Templatenentfernung, durch beispielsweise Extraktion oder Calcination, ohne Schrumpfen des Platins statt. Dies führt folglich zu einer porösen Platinbeschichtung, bei welcher die Porendurchmesser direkt durch die Größe der Templatpartikel bestimmt werden.<sup>187</sup> Hierbei ist der Grad der Porenvernetzung abhängig von der Qualität der kolloidalen Anordnung, da diese an den Berührungspunkten benachbarter Partikel entstehen. Durch diese Syntheseroute können beispielsweise poröse Edelmetalle, wie Platin und Gold, aber auch einige Übergangsmetalle sowie leitfähige Polymere erzeugt werden.<sup>188</sup>

Die in dieser Arbeit verwendete Synthese zur Herstellung von porösen Platinbeschichtungen mit Porendurchmessern ab 50 nm (*large pore nanoporous platinum*, lp-NPPt) wurde anhand der Durchführung von Bartlett *et al.* entwickelt.<sup>189</sup> Bartlett *et al.* verwendete als kolloidales Templat Polystyrolatex-Kugeln (*polystyrene latex beads*, PLBs) in wässrigem Medium mit unterschiedlichen Partikeldurchmessern. Diese wurden durch Verdampfen innerhalb von zwei Tagen auf einem Goldsubstrat aufgebracht. Anschließend wurde aus einer wässrigen Hexachloroplatinsäure-Lösung Platin elektrochemisch in die Zwischenräume der PLBs abgeschieden. Die Templatenentfernung erfolgte durch Extraktion mit Toluol. Durch diese Synthese konnten hochgeordnete dreidimensionale makroporöse Platinbeschichtungen mit der Struktur einer hexagonal dichtesten Kugelpackung erzeugt werden (Abbildung 2.15).

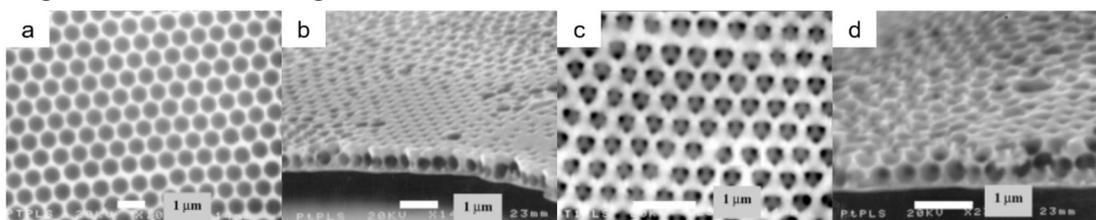


Abbildung 2.15: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der von Bartlett *et al.* elektrochemisch abgeschiedenen makroporösen Platinbeschichtungen. Als Templat wurden PLBs mit einem Durchmesser von 70  $\mu\text{m}$  (a) oder 40  $\mu\text{m}$  (b-d) verwendet. Durch Variation der Abscheidungsladungsdichte konnten sowohl Monolagen sphärischer Poren (a, b), als auch Multilagen (c, d) erzeugt werden.<sup>189</sup>

Diese weisen Porendurchmesser entsprechend den verwendeten PLB-Durchmessern auf. Durch eine geringe Abscheidungsladungsdichte von  $-1 \text{ C}\cdot\text{cm}^{-2}$  wurde durch eine geringere Platinabscheidung eine Porenmonolage gebildet (Abbildung 2.15a). Auf der Querschnittsaufnahme in Abbildung 2.15b ist deutlich erkennbar, dass mit etwa 50  $\mu\text{m}$  eine minimal dickere Platinschicht im Vergleich zu

den PLB-Durchmessern abgeschieden wurde. Bei einer höheren Abscheidungsichte von  $-2 \text{ C}\cdot\text{cm}^{-2}$  (Abbildung 2.15c) ist unter der oberen Porenlage eine weitere poröse Schicht zu sehen. Auch die Querschnittsaufnahme (Abbildung 2.15d) zeigt zwei übereinander liegende makroporöse Beschichtungen. In Abbildung 2.16 ist der gesamte Syntheseprozess einer lp-NPPt-Beschichtung schematisch dargestellt.

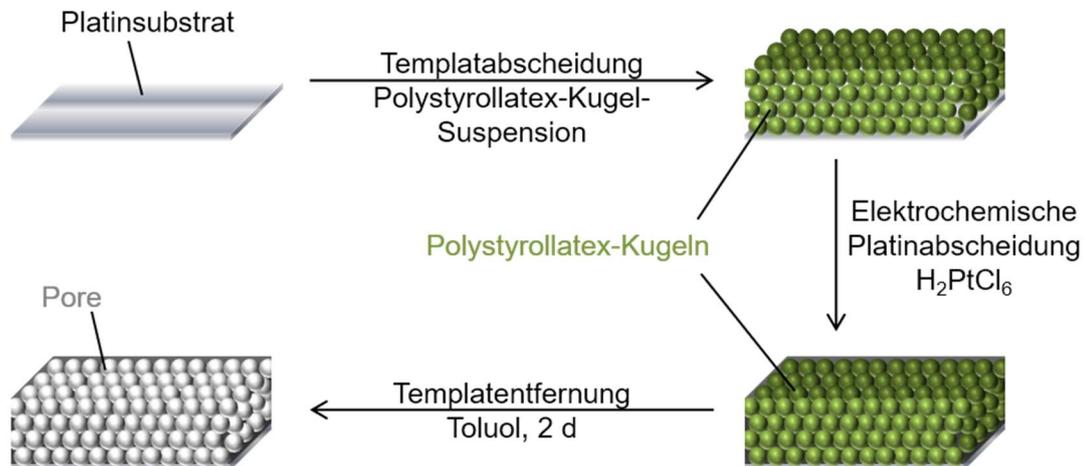


Abbildung 2.16: Schematische Darstellung der elektrochemischen Abscheidung von lp-NPPt unter Verwendung von Polystyrolatex-Kugeln auf einem Platinsubstrat.

Durch den Einsatz von weichen Templaten können definierte Porenstrukturen durch elektrochemische Abscheidung aus wässrigen Metallsalzlösungen unter Anwesenheit von Mizellen bzw. Flüssigkristallen erzeugt werden. Die Mizellen bzw. Flüssigkristalle werden konzentrationsabhängig durch die Zugabe von Tensiden, wie Natriumdodecylsulfat (SDS), Octaethylenglykol-Monohexadecylether ( $\text{C}_{16}\text{EO}_8$ ) oder Pluronic® F127, unter Selbstanordnung der Tensidmoleküle gebildet. Während der elektrochemischen Platinabscheidung werden die Tensidmoleküle simultan in der Edelmetallschicht eingelagert. Nach Beenden des Beschichtens können die Tenside entfernt werden, wodurch ein poröses Platinnetzwerk entsteht. Die daraus resultierenden Porensysteme weisen Durchmesser im unteren Nanometerbereich auf. Choi *et. al.* beschreibt ein Verfahren zur Synthese dünner leitfähiger mesoporöser Beschichtungen, welche unter Verwendung von SDS elektrochemisch abgeschieden wurden. Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen ein geordnetes hexagonales poröses Netzwerk.<sup>190</sup> Durch den Einsatz von  $\text{C}_{16}\text{EO}_8$  konnten durch Attard *et. al.* sowie Park *et. al.* ähnliche Beschichtungen bestehend aus einem geordneten hexagonalen Porensystem mit Porendurchmessern von 2.5 nm hergestellt werden. Wurden Tenside mit kürzeren Kohlenstoffketten eingesetzt ( $\text{C}_{12}\text{EO}_8$ ) resultierten kleinere Porendurchmesser mit etwa 1.7 nm. Durch die Zugabe eines hydrophoben Additivs, bspw. n-Heptan, hingegen, konnten die Porendurchmesser vergrößert werden. Diese Beobachtungen deuteten darauf hin,

## 2 Allgemeine Grundlagen

dass durch Änderung der Tensid- und resultierend daraus der Mizellengröße, sowie durch Änderung der Mizellenbildung durch Zugabe hydrophober Lösungsmittel die Porendurchmesser direkt beeinflusst werden können.<sup>191–193</sup>

Im Rahmen dieser Arbeit wurden basierend auf den beschriebenen Synthesemöglichkeiten sowohl nicht gepulste, wie auch gepulste elektrochemische Abscheidungen im Potentialbereich zwischen  $-0.5$  V bis  $+0.2$  V unter Verwendung der weichen Templaten SDS,  $C_{16}EO_8$  sowie Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB) durchgeführt. Diese Abscheidungen führten jedoch zu keinen porösen Strukturen, sondern riefen allerhöchstens eine erhöhte Oberflächenrauigkeit hervor. Daher wird auf diese Synthesen und die entsprechenden Ergebnisse nicht weiter eingegangen.

Durch den Einsatz von Pluronic® F127 hingegen konnte eine poröse Platinstruktur erzeugt werden, weshalb die Syntheseroute im Folgenden näher erläutert wird.

Pluronic® F127 findet, neben seiner Funktion als weiches Templat, unter anderem industrielle Anwendung als Stabilisator in Suspensionen und Emulsionen in Kosmetika sowie Arzneimitteln.<sup>194–196</sup> Es ist ein nicht-ionisches Triblock-Copolymer und besteht aus einem zentralen hydrophoben Polypropylenoxid (PPO)-Block sowie zwei lateralen hydrophilen Polyethylenoxid (PEO)-Blöcken (Abbildung 2.17a).

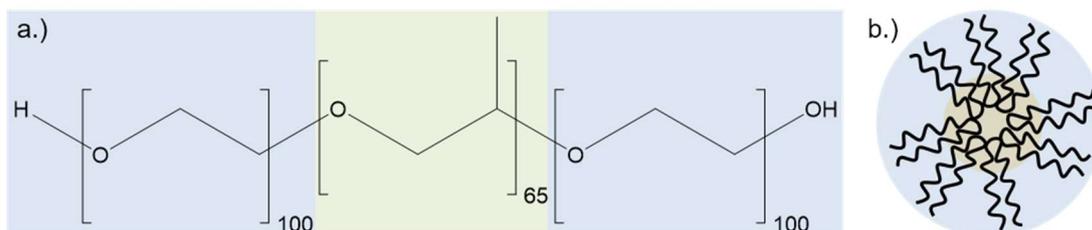


Abbildung 2.17: Struktur von Pluronic® F127, b aus einem zentralen hydrophoben Polypropylenoxid-Block (grün) sowie zwei lateralen hydrophilen Polyethylenoxid-Blöcken (blau).

Aufgrund seines amphiphilen Charakters weist Pluronic® F127 Tensideigenschaften auf und bildet in wässrigen Lösungen oberhalb einer kritischen Konzentration Mizellen aus. Hierbei bildet der zentrale hydrophobe PPO-Block den Kern der Mizelle, welcher durch die aus den lateralen hydrophilen PEO-Blöcken gebildete Hydrathülle von dem wässrigen Medium getrennt ist (Abbildung 2.17b).<sup>197</sup>

Zur Herstellung der Elektrolyselösung wurde Pluronic® F127 in einer wässrigen Platinsalzlösung unter Erwärmen und Rühren gelöst. Das gereinigte Platinsubstrat wurde als Arbeitselektrode in die Elektrolyselösung gehängt. Durch eine gepulste elektrochemische Abscheidung mit einem Potential von  $-0,2$  V (vgl. Abbildung 2.13, S. 31) wurde das Platinsalz zu elementarem Platin reduziert und simultan die Mizellen des Pluronic® F127 auf der Arbeitselektrode abgeschieden (Abbildung 2.18).

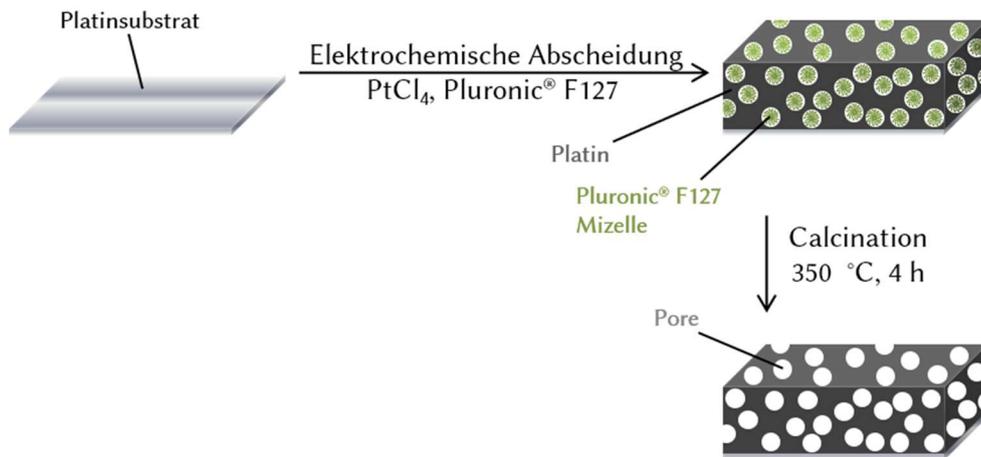


Abbildung 2.18: Schematische Darstellung der elektrochemischen Abscheidung von sp-NNPt unter Verwendung von Pluronic® F127 auf einem Platinsubstrat.

Durch die anschließende Calcination bei 350 °C für 4 h wurde Pluronic® F127 aus der Platinbeschichtung entfernt, wodurch sich eine poröse Platinstruktur mit Porendurchmessern von etwa 10 nm ausbildete. Diese Beschichtung wird im Folgenden als *small pore nanoporous platinum* (sp-NNPt) bezeichnet. Die Templatentfernung durch Calcination konnte bei der Beschichtung der Cochlea-Implantat-Elektroden nicht durchgeführt werden, da sich die Polytetrafluorethylen (PTFE)-Ummantelung des an dem Elektrodenkontakt angeschweißten Platindrahts ab etwa 300 °C zersetzt.<sup>198</sup> Daher widmet sich ein gesamter Abschnitt unterschiedlicher denkbarer Templatentfernungen (vgl. Abschnitt 4.1.1.7, S. 119), bei welchen die Calcinationstemperatur verringert sowie ein Extraktionsverfahren angewendet wurde. Die Extraktion erfolgte in einer angesäuerten Hexan / Isopropanol-Lösung, wobei das Lösungsmittel täglich ausgetauscht wurde, um die diffusionskontrollierte Auflösungsreaktion zu beschleunigen.

Für die Anwendung als biomedizinisches Beschichtungsmaterial ist kein geordnetes Porensystem notwendig, weshalb bei der Entwicklung der Synthesemethode hierauf kein Schwerpunkt gelegt wurde.

Nach der erfolgreichen Platinbeschichtung wurden die Proben zur Etablierung eines implantatassoziierten Wirkstofffreisetzungssystems mit unterschiedlichsten Thiolen modifiziert. Durch verschiedene endständige funktionelle Gruppen sollten Wechselwirkungen zwischen den funktionellen Gruppen und dem eingelagerten Wirkstoff hervorgerufen werden, wodurch die Freisetzungseigenschaften gesteuert werden sollen. In Abbildung 2.19 ist die gesamte Herstellungsrouten beginnend mit der elektrochemischen Abscheidung bis hin zur Rolipramfreisetzung dargestellt.

## 2 Allgemeine Grundlagen

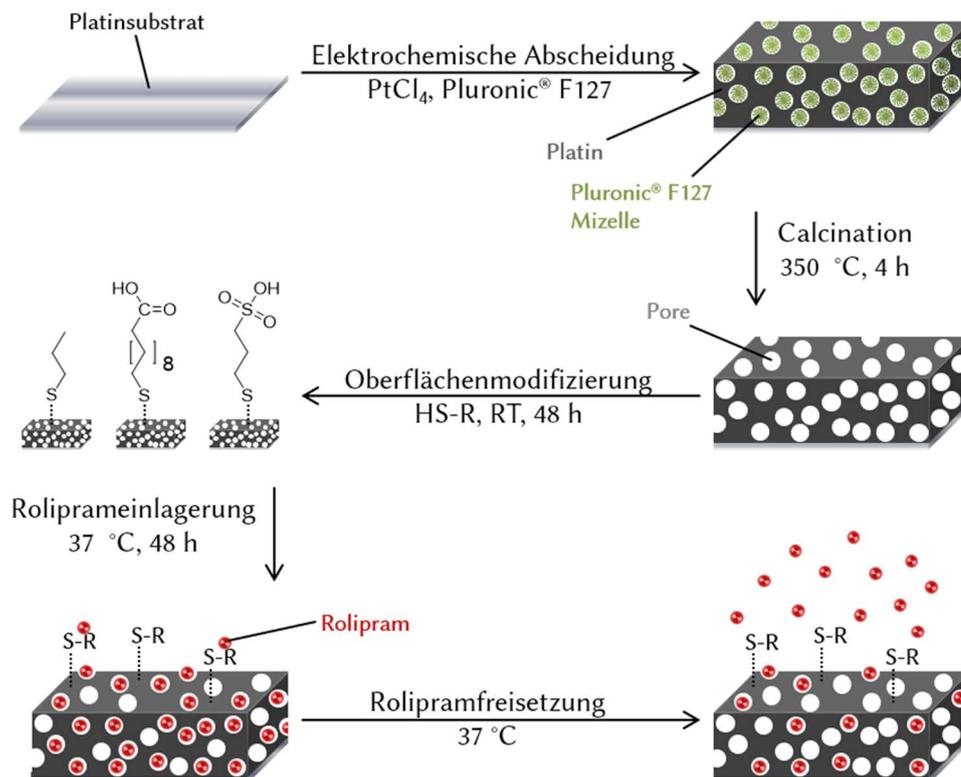


Abbildung 2.19: Schematische Darstellung der elektrochemischen sp-NPPt-Abscheidung unter Verwendung des weichen Templates Pluronic F127® mit anschließender Thiol-Modifizierung, sowie Roliprameinlagerung und Freisetzung.

Bereits 1987 wurde durch Nuzzo *et al.* die spontane Selbstanordnung von Alkanthiolen auf Edelmetalloberflächen beobachtet. Hierfür wurden Edelmetallsubstrate in einer millimolaren ethanolischen Lösung eines Alkanthiols gelagert, wodurch sich kristallin ähnliche selbstorganisierende Monoschichten (*self-assembled monolayer*, SAM) bildeten.<sup>199</sup> Seitdem wurde die Selbstanordnung der Alkanthiole bezüglich ihrer Struktur und des Winkels auf der Edelmetalloberfläche genauer untersucht. Es wurde gezeigt, dass der Aufbau der Monoschicht von den Funktionalitäten des Thiols abhängt. Der Prozess der Selbstanordnung wird durch inter- und intramolekulare Kräfte gesteuert, welche Wasserstoffbrückenbindungen, elektrostatische Wechselwirkungen und van der Waals-Kräfte beinhalten können.<sup>200</sup> Die stärkste Triebkraft für die Selbstanordnung von Thiolen ist die Affinität von Schwefel zu Edelmetalloberflächen.<sup>201</sup> Beispielsweise herrschen zwischen Gold und Schwefel Wechselwirkungen in der Größenordnung von  $44\text{ kcal/mol}$ , was einer stabilen, halbkovalenten Bindung entspricht.<sup>202</sup> Auch hydrophobe van der Waals-Wechselwirkungen zwischen den Methylgruppen der Alkanketten treiben die Selbstmontage der SAMs an. Bei Alkanthiolen wird hierdurch eine Verkippung der Alkanthiolketten bewirkt, um die Wechselwirkungen zwischen den Ketten zu maximieren und dadurch die Gesamtoberflächenenergie zu

senken. Ab einer Kohlenstoffkette mit 10 Methylgruppen kann von einer hochgeordneten Monolage ausgegangen werden, da die hydrophoben Wechselwirkungen zwischen den Kohlenstoffketten dieser Länge größer als die Kraft der Rotationsfreiheitsgrade sind.<sup>199</sup>

Durch unterschiedliche funktionelle Gruppen der Alkanthiole können verschiedene Oberflächeneigenschaften erzeugt werden, um die Haftung anderer Verbindungen an den modifizierten Oberflächen auf Grundlage von elektrostatischen Wechselwirkungen zu erhöhen oder zu vermeiden.<sup>203</sup> Folglich bieten SAMs ein geeignetes und flexibles System, mit dem die Grenzflächeneigenschaften von Metallen angepasst werden können.<sup>204</sup>

Auch wenn die Selbstanordnung vieler verschiedener Alkanthiole hauptsächlich auf Gold erforscht wurde, sollten im Rahmen dieser Arbeit die elektrostatischen Wechselwirkungen von Thiolen auf Platinoberflächen untersucht werden.<sup>204,205</sup>

Für die Untersuchung der Wechselwirkungen zwischen dem eingesetzten Wirkstoff Rolipram (vgl. Abschnitt 2.2.2, S. 20) und der Modifizierung wurden fünf verschiedene Thiole mit unterschiedlichen funktionellen Gruppen ausgewählt (Abbildung 2.20).

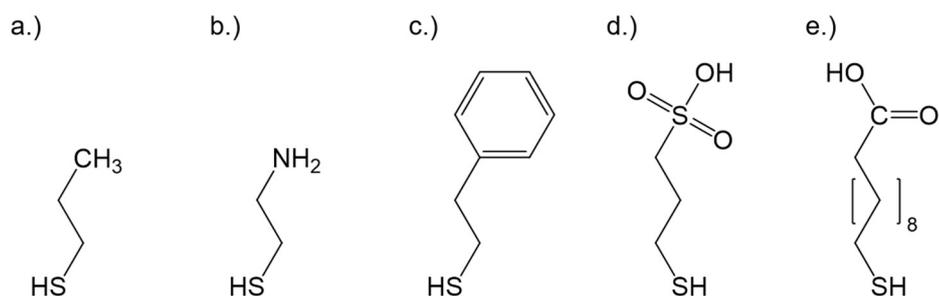


Abbildung 2.20: Strukturen der zur Modifizierung der sp-NPPt-Beschichtung verwendeten Thiole a.) 1-Propanthiol, b.) Cysteamin, c.) 2-Phenylethanthiol, d.) Natrium-3-mercapto-1-propansulfonat und e.) 11-Mercaptoundecansäure.

Es wurde 1-Propanthiol mit einer verhältnismäßig kurzen Kohlenstoffkette von zwei CH<sub>2</sub>-Gruppen und einer unpolaren endständigen Methylgruppe eingesetzt, um die Wechselwirkungen zu dem unpolaren Kohlenstoffgerüst des Roliprams (Abbildung 2.21) zu untersuchen.

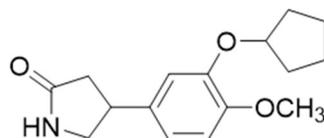


Abbildung 2.21: Struktur des neuroprotektiven Wirkstoffs Rolipram.

## 2 Allgemeine Grundlagen

Durch die Verwendung von Cysteamin konnte unter Beibehaltung der Kohlenstoffkettenlänge der Einfluss einer basischen Aminogruppe auf die Wechselwirkungen betrachtet werden. Die Phenylgruppe des 2-Phenylethanthiol sollte Aufschluss über mögliche  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen zu dem Phenylring des Roliprams geben.<sup>206</sup> Da Rolipram eine basische Aminogruppe aufweist, sollte außerdem der Einfluss einer Säuregruppe bestimmt werden. Hierfür wurde Natrium-3-mercapto-1-propansulfonat mit einer kurzen Kohlenstoffkette und einer Sulfonatgruppe und 11-Mercaptoundecansäure mit einer deutlich längeren Kohlenstoffkette von zehn CH<sub>2</sub>-Gruppen und einer Carbonsäuregruppe ausgewählt.

## 3 Materialien und Methoden

Dieses Kapitel unterteilt sich in einen Teil über poröses Platin und in einen Abschnitt über L1CAM Beschichtungen. Es werden die Präparationen sowie die Analysemethoden für die Untersuchung der Beschichtungen für die Anwendungen als biomedizinisches Elektrodenmaterial beschrieben.

### 3.1 Nanoporöse Platinbeschichtungen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Herstellungswege zur Präparation poröser Platinbeschichtungen verwendet, welche sich in der resultierenden Porengröße von ca. 10 nm und ca. 50 nm unterscheiden. Im Folgenden werden die Präparationschritte zur Herstellung dieser porösen Platinbeschichtungen näher erläutert und die anschließende Modifizierung sowie die Wirkstoffbeladung und -freisetzung vorgestellt. Abschließend werden die verwendeten Analyseverfahren und Parameter beschrieben.

#### 3.1.1 Substratherstellung und -reinigung

Die Platinsubstrate wurden am Institut für Mikroproduktionstechnik (IMPT) der Leibniz Universität Hannover durch Besputtern eines Siliciumwafers hergestellt. Dabei diente eine 50 nm dicke Titanbeschichtung auf dem Silicium als Haftschiicht, bevor eine 100 nm dicke Platinschicht aufgebracht wurden. Um die Platinbeschichtung im anschließenden mechanischen Schneidprozess zu schützen, wurde eine Schutzlackschicht aufgetragen.

Die Reinigung der gold-beschichteten Siliciumwafer und der durch das IMPT hergestellten Platinsubstrate erfolgte unmittelbar vor dem Beschichtungsvorgang. Die Substrate wurden mit Aceton gespült, um grobe Verunreinigungen sowie den Schutzlack zu entfernen, und anschließend für 15 min in Aceton gerührt. Durch die aufrechte Lagerung der Substrate in einer Teflonhalterung konnten die an der Substratoberfläche entstandenen Gasbläschen ungehindert aufsteigen. Anschließend wurden die Substrate zunächst mit Aceton, dann mit Isopropanol gespült und im Stickstoffstrom getrocknet. Die darauffolgende 25-minütige Behandlung mit Piranhasäure, welche zu 70% aus konzentrierter  $H_2SO_4$  und 30% aus  $H_2O_2$  (35%) bestand, diente der oxidativen Entfernung von Oberflächenverunreinigungen. Die Piranhasäure wurde unmittelbar vor jeder Reinigung frisch hergestellt. Nach der

### 3 Materialien und Methoden

anschließenden Substratlagerung in Reinstwasser für 5 min, Abspülen mit Iso-  
propanol und Trocknung im Stickstoffstrom wurden die Substrate unverzüglich  
weiterverwendet. Zu Beginn dieser Arbeit wurde die elektrolytische Abscheidung in  
der in Abbildung 3.1 dargestellten Elektrolysezelle (EZ 1) durchgeführt.

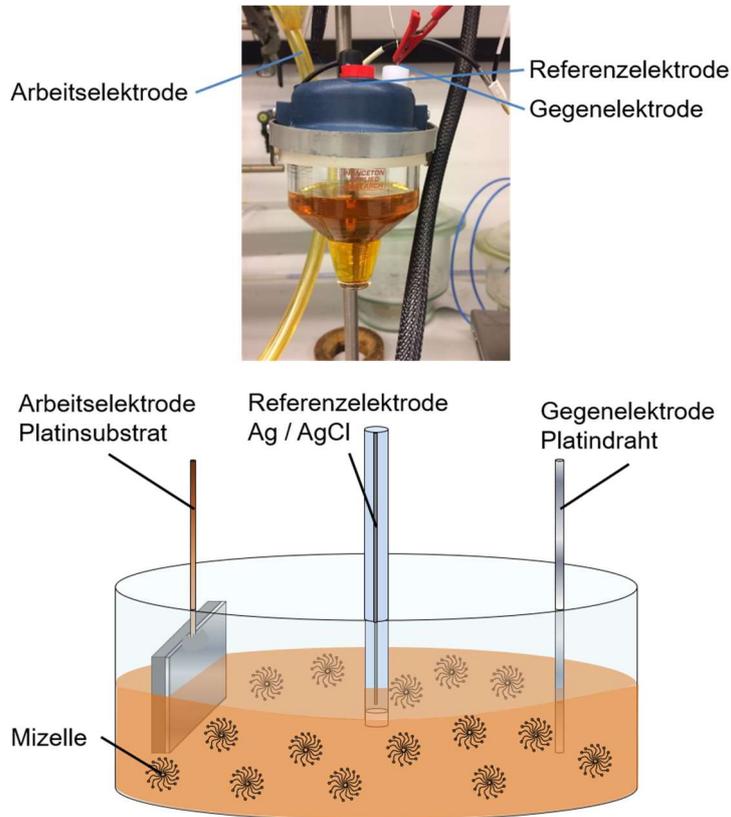


Abbildung 3.1: Fotografischer und schematischer Aufbau der ersten Elektrolyse- bzw. Messzelle (EZ 1).

Für die Verwendung der EZ 1 wurde, wie in Abbildung 3.2 schematisch  
dargestellt, ein Kupferdraht zur Kontaktierung mithilfe eines Silberleitlacks an den  
Substraten befestigt.



Abbildung 3.2: Schematische Darstellung der Kontaktierung des Substrats mit einem  
Kupferdraht unter Verwendung von Silberleitlack.

Die Trocknung des Leitlacks erfolgte über Nacht, anschließend wurde der  
Kontaktbereich mit Tesafilm® abgeklebt, um diesen vor der Elektrolyselösung zu  
schützen.

Im Laufe dieser Arbeit wurde die in Abbildung 3.3 dargestellte zweite  
Elektrolysezelle (EZ 2) entwickelt, bei welcher die Substrate unmittelbar nach der

Reinigung eingespannt und beschichtet werden konnten. So konnte eine optimale Benetzbarkeit der Substrate mit dem Elektrolyten durch eine deutlich kürzere Lagerung der Substrate an Luft erreicht werden.

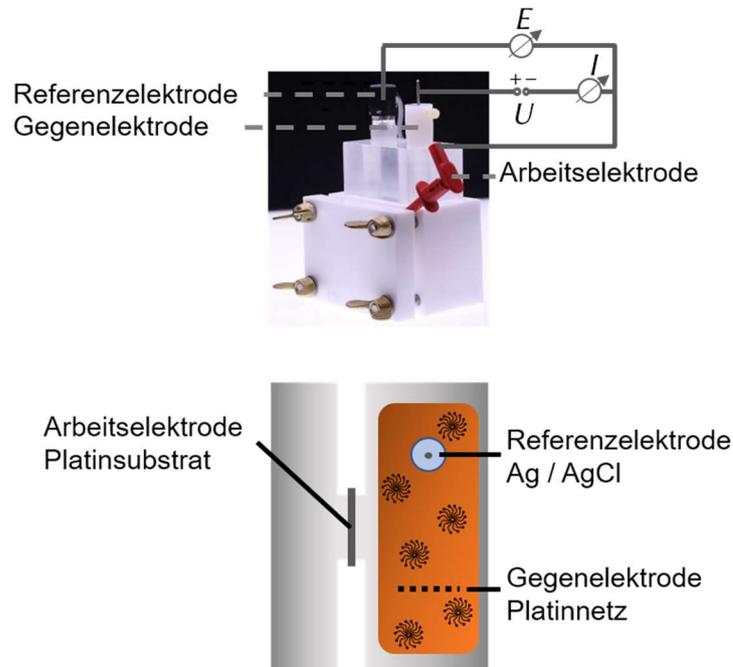


Abbildung 3.3: Fotografischer und schematischer Aufbau der zweiten Elektrolyse- bzw. Messzelle (EZ 2).

Die Öffnung des Elektrolyselösungsbeckens für die Beschichtung des Platinsubstrat (Arbeitselektrode) weist einen Durchmesser von 9.5 mm auf. Das Becken fasst ein Volumen von 60 mL der Elektrolyselösung. Durch Verwendung des Deckels wird ein definierter Abstand zwischen Arbeitselektrode, Gegenelektrode (Platinnetz) und Referenzelektrode (Silber/Silberchlorid) sichergestellt.

#### 3.1.2 Präparation poröser Platinbeschichtungen mit kleinen Nanoporen

Zur Herstellung einer nanoporösen Platinbeschichtung mit Porendurchmessern von etwa 10 nm (*small pore nanoporous platinum*, sp-NPPT) wurden, wie in Kapitel 2.2.3 beschrieben, verschiedene weiche Template verwendet. Der Beschichtungsvorgang erfolgte über ein zweistufiges Verfahren, der elektrochemischen Platinabscheidung und der Templatentfernung.

##### 3.1.2.1 Elektrochemische Platinabscheidung

Die elektrochemische Platinabscheidung wurde in 60 mL einer  $0.05 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ PtCl}_4$ -Lösung durchgeführt. Die unterschiedlichen weichen Template wurden mit einer Konzentration von  $0.004 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  in der Platinsalz-Lösung unter Rühren über Nacht

bei 50 °C gelöst. Die elektrochemische Abscheidung wurde zunächst in einer zum Potentiostaten zugehörigen Elektrolysezelle (EZ 1) von Ametek durchgeführt, welche in Abbildung 3.1 dargestellt ist. Im Verlauf dieser Arbeit wurde diese durch eine optimierte in Abbildung 3.3 gezeigte Teflonzelle (EZ 2) zur Minimierung der Wartezeiten zwischen Reinigung und Abscheidung ersetzt. In beiden Elektrolysezellen wurde die elektrochemische Platinabscheidung in einem Drei-Elektroden-Aufbau durchgeführt. Als Referenzelektrode wurde eine Silber/Silberchlorid-Elektrode und als Gegenelektrode ein ebenes Platinnetz mit einer Größe von 2.54 x 2.54 cm<sup>2</sup> verwendet. Das gereinigte Substrat diente als Arbeitselektrode. Unter Verwendung der EZ 1 wurde eine Fläche von 10 x 15 mm<sup>2</sup> beschichtet. Die runde Öffnung der EZ 2 zur Arbeitselektrode, welche die Fläche der nanoporösen Platinbeschichtung definierte, wies einen Durchmesser von 9.5 mm auf. Um Konzentrationsgradienten an der Arbeitselektrodenoberfläche zu verringern, wurde eine gepulste elektrochemische Platinabscheidung mit einer Pulsdauer von 0.1 s und einem Potential von -0.2 V sowie einer Pulspause von 0.3 s angewendet.<sup>190</sup> Die Folge eines Pulses und der anschließenden Pulspause wird als ein Zyklus bezeichnet. Unterschiedliche Beschichtungsdicken wurden durch Variation der Zyklenzahl erreicht. Nach der elektrochemischen Abscheidung wurde das beschichtete Substrat mit Reinstwasser abgespült. Bei Verwendung der EZ 1 wurde der Tesafilm® abgezogen und der Silberleitlack durch Spülen mit Aceton entfernt. Anschließend wurde die Probe mit Isopropanol abgespült und im Stickstoffstrom getrocknet.

Sofern nicht anders angegeben wurde diese Abscheidungsprozedur als Standardmethode verwendet.

#### 3.1.2.2 Templatentfernung

Zur Entfernung des Templats Pluronic® F127 wurde die Probe für 4 h bei 350 °C mit einer Aufheizrate von 1 °C·min<sup>-1</sup> calciniert. Die verwendete Calcinationstemperatur entspricht der Zersetzungstemperatur von Pluronic® F127, die mittels Thermogravimetrie bestimmt wurde (vgl. Abbildung 7.8, S. 214). Die Calcination wurde standardmäßig zur Templatentfernung verwendet.

In weiteren Versuchen wurden niedrigere Calcinationstemperaturen von 120 °C und 270 °C und Extraktionsverfahren mit organischen Lösungsmitteln zur Templatentfernung evaluiert, um hohe Prozesstemperaturen im Hinblick auf die hitzeempfindliche Siliconmatrix im Cochlea-Implantat zu umgehen.

In dem vierstufigen Extraktionsprozess wurden die Proben in verschiedenen organischen Lösungsmitteln zur Entfernung des Pluronic® F127 aus der Platinbeschichtung gelagert. Die Lösungsmittel wurden täglich ausgetauscht, um mögliche Auflösungs- und Diffusionsreaktionen zu beschleunigen. Zunächst wurden die

Proben für 3 d bei 70 °C in einer Lösung von Hexan /konzentrierter Salzsäure / Isopropanol im Verhältnis von 25:1:1 eingelegt, gefolgt von einer zweitägigen Lagerung in Isopropanol bei 37 °C. Durch die anschließende viertägige Behandlung bei 37 °C in Ethanol sollten die vorherig verwendeten Lösungsmittel entfernt werden. Die Proben wurden für einen Tag in Reinstwasser bei 37 °C gelagert und abschließend im Stickstoffstrom getrocknet. Zur Verkürzung der Extraktionszeit wurden die Proben in weiteren Versuchen für nur 1 d in der Hexan /konzentrierte Salzsäure / Isopropanol-Lösung gelagert; die Lagerung in Isopropanol für 2 d wurde beibehalten, die anschließende Behandlung in Ethanol auf 2 d verkürzt. Auf die Lagerung in Reinstwasser wurde vollständig verzichtet. In anschließenden Zellkulturuntersuchungen sollte der Einfluss möglicher Pluronic® F127-Reste auf das Zellüberleben bestimmt werden.

#### 3.1.3 Präparation poröser Platinbeschichtungen mit großen Nanoporen

Zur Herstellung einer nanoporösen Platinbeschichtung mit Porendurchmessern von größer 50 nm (*large pore nanoporous platinum*, lp-NPpT) wurden, wie in Kapitel 2.2.3 beschrieben, Polystyrolatex-Kugeln (*polystyrene latex beads*, PLBs) als Templat verwendet. Der Beschichtungsvorgang erfolgte über ein dreistufiges Verfahren, welches sich in die Beschichtung des Substrats mit dem Templat, die elektrochemische Platinabscheidung und die Templatentfernung gliedert.

##### 3.1.3.1 Templatbeschichtung

Zur Beschichtung des gereinigten Gold- oder Platinsubstrats mit PLBs wurde das Substrat unmittelbar nach der Reinigung in eine eigens konstruierte Trocknungszelle in Abbildung 3.4 eingespannt.

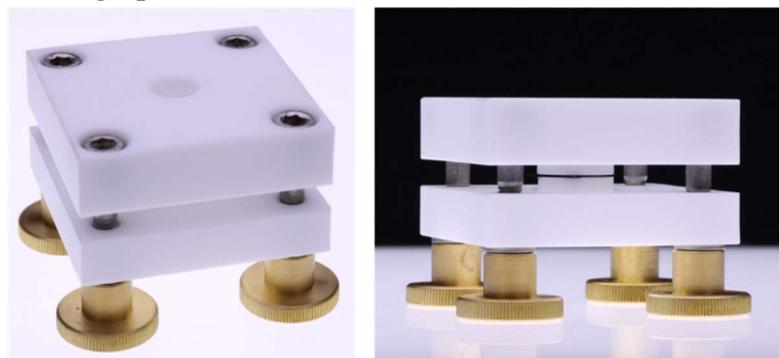


Abbildung 3.4: Fotografische Aufnahme der eigens konstruierten Trocknungszelle zur Aufbringung der Polystyrolatex-Kugel-Beschichtung auf dem Platinsubstrat.

Eine wässrige PLBs-Suspension (2.5 Gew.-%) wurde mit Reinstwasser auf 0.0625 – 0.5 Gew.-% verdünnt und 100 µL – 300 µL in die Öffnung der Trocknungszelle mit einem Durchmesser von 9.5 mm gegeben. Um möglichst dicht

gepackte PLBs zu erhalten, wurde die Trocknungszelle zunächst für 3 d in einer Klimakammer bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 87% gelagert. Der anschließende Trocknungsvorgang verlief über 4 d durch Öffnen der Klimakammer und einer dadurch resultierenden langsamen Reduzierung der Luftfeuchtigkeit auf 51%, bevor die elektrochemische Platinabscheidung durchgeführt wurde.

#### 3.1.3.2 Elektrochemische Platinabscheidung

Die elektrochemische Platinabscheidung in die Zwischenräume der PLBs wurde in 60 mL einer wässrigen  $0.05 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{H}_2\text{PtCl}_6$ -Lösung durchgeführt, welche durch Lösen des Platinsalzes in Reinstwasser unter Rühren über Nacht bei  $50 \text{ }^\circ\text{C}$  hergestellt wurde. Das PLBs-beschichtete Substrat wurde unmittelbar nach der Templatbeschichtung in die Elektrolysezelle (vgl. S. 43) eingespannt und als Arbeitselektrode in einem Drei-Elektroden-Aufbau kontaktiert. Die Abscheidungsfläche entsprach der Größe der Templatbeschichtung und wies entsprechend einen Durchmesser von 9.5 mm auf. Als Gegenelektrode wurde ein Platinnetz mit einer Größe von  $2.54 \times 2.54 \text{ cm}^2$  und einer Maschendicke von  $3 \text{ }\mu\text{m}$  verwendet, als Referenzelektrode wurde eine Silber/Silberchlorid-Elektrode eingesetzt. Die elektrochemische Platinabscheidung wurde gepulst durchgeführt, um Konzentrationsgradienten an der Arbeitselektrodenoberfläche zu verringern. Die Pulsdauer von 0.1 s wies ein Potential von  $-0.2 \text{ V}$ ,  $0.1 \text{ V}$  oder  $2 \text{ V}$  auf, die anschließende Pulspause betrug 0.3 s. Die Folge eines Pulses und der anschließenden Pulspause entspricht einem Zyklus, die Zyklenzahl wurde im Rahmen dieser Arbeit zur Beeinflussung der Beschichtungsdicke variiert. Zur Entfernung der Elektrolytreste wurde die Probe anschließend mit Reinstwasser abgespült. Die Trocknung erfolgte durch Spülen mit Isopropanol und eine kurze Behandlung im Stickstoffstrom.

#### 3.1.3.3 Templatentfernung

Die in den elektrochemisch abgeschiedenen Platinbeschichtungen eingeschlossenen PLBs wurden durch eine zweitägige Lagerung in Toluol bei Raumtemperatur entfernt. Anschließend wurde die Probe mit Aceton und Isopropanol gewaschen und im Stickstoffstrom getrocknet.

#### 3.1.4 Chemische Modifizierung

Die sp-NPPt beschichteten Substrate wurden zur chemischen Modifizierung in einer  $0.005 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  ethanolische Thiollösung für 48 h bei Raumtemperatur gelagert. Um ein einstellbares Wirkstofffreisetzungssystem zu erzeugen, wurden, wie in Kapitel 2.2.3 erläutert (vgl. S. 39), fünf verschiedene Thiole mit unterschiedlichen funktionellen Gruppen verwendet. Zur Entfernung der nicht angebondenen Thiole wurden die Proben anschließend in Ethanol für eine Minute im Ultraschallbad

behandelt. Weiterführende Versuche oder Analysen wurden umgehend nach der Modifizierung durchgeführt. Die Proben wurden hierfür nicht getrocknet.

Um die Ergebnisse der modifizierten Proben mit den unmodifizierten Proben vergleichen zu können, wurden diese möglichst gleichen Synthesebedingungen ausgesetzt. Daher wurden sp-NPPT-beschichtete Substrate als Blindprobe in Ethanol gelagert und im Ultraschallbad behandelt.

#### 3.1.5 Einlagerungs- und Freisetzungsexperimente mit Rolipram

In diesem Abschnitt wird sowohl die Vorgehensweise der Rolipram-Einlagerung und -Freisetzung unter nicht sterilen wie auch unter sterilen Bedingungen erläutert.

Rolipram wurde sowohl aus modifizierten wie auch unmodifizierten sp-NPPT-Beschichtungen freigesetzt. Die sp-NPPT-Beschichtungen wurden nach der Standardmethode mit 2000 Abscheidungszyklen hergestellt.

Zur Evaluierung der freigesetzten Rolipram-Konzentrationen in Abhängigkeit der chemischen Modifizierung und Beschichtungsdicke wurde unter nicht sterilen Bedingungen gearbeitet. Zur Herstellung einer  $0.001 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  Rolipram-Lösung wurden 27.54 mg Rolipram in 100 mL Reinstwasser durch Behandlung für 6 h bei  $40 \text{ }^\circ\text{C}$  im Ultraschallbad gelöst. Die modifizierten und unmodifizierten sp-NPPT-Proben wurden nach der Modifizierung mit Reinstwasser abgespült und in 2 mL der  $0.001 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  Rolipram-Lösung gelegt. Die Rolipram-Einlagerung erfolgte für 48 h bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  im Trockenschrank. Auf die Rolipram-Einlagerung folgte ein Waschschritt in 2 mL einer  $0.01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  phosphatgepufferten Salzlösung (*phosphate buffered saline*, PBS) für 3 s. Für die Rolipram-Freisetzung in simulierter Körperflüssigkeit wurden die Proben in 2 mL PBS gelegt und unter dynamischen Bedingungen in einem Schüttelbad bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  mit  $1 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$  bewegt. Die Rolipram-Konzentration im Überstand wurde am 1., 4., 10. und 17. Tag bestimmt, weshalb die Proben an diesen Tagen in 2 mL frisches PBS umgesetzt wurden. Bis zur Vermessung der Überstände wurden diese in 4 Aliquoten eingefroren.

Um den Einfluss des freigesetzten Roliprams auf Spiralganglienzellen (SGZ) zu bestimmen, wurde die Einlagerung sowie die Freisetzung unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Hierfür wurden die Proben nach der Modifizierung durch Waschen mit Ethanol sterilisiert und in die Sterilbank eingeschleust. Zur Entfernung des Ethanols von der Probenoberfläche wurden die Proben für 3 s in steriles Wasser gelegt. Die Rolipram-Einlagerung fand anschließend in 2 mL einer  $0.001 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  sterilen Rolipram-Lösung für 48 h bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  im Trockenschrank statt. Die Probengefäße wurden nach der Einlagerung von außen durch Besprühen mit 70% Isopropanol sterilisiert und in die Sterilbank eingeschleust. Die Freisetzung für Zellkulturuntersuchungen wurde sowohl in PBS als auch in Panzerin, dem in den Zellkulturuntersuchungen verwendeten Medium, durchgeführt. Daher wurden die

Proben in der Sterilbank entsprechend entweder für 3 s in sterilem PBS oder in Panserin gewaschen, um Ethanolreste von der Probenoberfläche zu entfernen. Die Freisetzung wurde in 2 mL des jeweiligen Mediums im Schüttelbad unter dynamischen Bedingungen bei 37 °C durchgeführt. Am 1., 4., 10. und 17. Tag wurden die Proben in frisches Medium umgesetzt, um die Rolipram-Konzentration im Überstand zu bestimmen und die Zellüberlebensrate in den Überständen zu untersuchen.

#### 3.1.6 Charakterisierungsmethoden

In diesem Abschnitt werden die verwendeten analytischen Methoden zur Charakterisierung der nanoporösen Platinbeschichtungen erläutert. Bei den allgemein bekannten Standardanalysemethoden wird der Schwerpunkt auf die gewählten Messparameter beziehungsweise den verwendeten Messaufbau gelegt.

Zunächst werden die Methoden zur Oberflächenanalyse betrachtet, worauf die elektrische Charakterisierung sowie Untersuchungen zur Zellkompatibilität folgen. Weiterführend werden die Nachweismethoden der chemischen Modifizierung erläutert, bevor die Analysemethoden der Freisetzungsüberstände vorgestellt werden.

Durch die potenzielle Anwendung der nanoporösen Platinbeschichtungen als neuronales Elektrodenmaterial spielen die elektrischen Charakterisierungen eine entscheidende Rolle. Daher wird ein besonderer Schwerpunkt auf die elektrochemische Impedanzspektroskopie sowie die Cyclovoltammetrie gelegt.

##### 3.1.6.1 Oberflächen- und Schichtdickencharakterisierung

Von den nanoporösen Platinbeschichtungen wurden sowohl rasterelektronenmikroskopische (REM) Aufnahmen in der Aufsicht als auch im Querschnitt von Dennes Nettelroth und Karen Besecke angefertigt. Hierfür wurde ein Feldemissionsrasterelektronenmikroskop vom Typ JSM-6700F der Firma Jeol mit einer Beschleunigungsspannung von 2 kV verwendet. Für Übersichtsaufnahmen wurde ein LEI-Detektor (*low energy image*) mit einem Arbeitsabstand von 8 mm eingesetzt. Höhere Vergrößerungen wurden mit einem SEI-Detektor (*secondary electron image*) mit einem Arbeitsabstand von 3 mm angefertigt. Für die Messung wurden die beschichteten Siliciumwafer mithilfe eines Diamantstifts angeritzt, gebrochen und mit einem Graphit-Klebepad auf einen Metallträger aufgebracht. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden mit der Software ImageJ 1.50i des National Institutes of Health (Bethesda, USA) grafisch ausgewertet.

Zur Schichtdickenbestimmung der sp-NPPT-Beschichtungen wurden mikroskopische Aufnahmen an einem Konfokalmikroskop vom Typ DCM 3D der Firma Leica angefertigt. Hierfür wurde eine Ecke des zu beschichteten Platinsubstrats mit Tesafilm® abgeklebt, um eine scharfe Kante der elektrochemisch abgeschiedenen sp-

NPPT-Beschichtung zu erhalten und diese im Höhenprofil am Konfokalmikroskop vermessen zu können. Vor der Messung wurde der Tesafilm® entfernt. Die Auswertung erfolgte mit der Software LeicaScan DCM3D 3.2.3.5 der Firma Sensofar.

Zur Bestimmung der spezifischen Oberfläche und des Porenvolumens der sp-NPPT wurden Physisorptionsmessungen an einer Autosorb 1 des Herstellers Quantachrome Instruments von Mandy Jahns und Alexander Mohmeyer durchgeführt. Aufgrund der dünnen sp-NPPT-Beschichtungen und der resultierenden geringen Probenmenge wurden die Beschichtungen mit Krypton als Adsorptiv bei 87 K charakterisiert. Für die Messungen wurden Proben aus EZ 1 mit einer beschichteten Oberfläche von insgesamt 12 cm<sup>2</sup>, sowie Proben aus EZ 2 mit einer beschichteten Oberfläche von 22 cm<sup>2</sup> im Vakuum bei 100 °C für 24 h aktiviert. Die spezifische Oberfläche wurde mit der Brunauer-Emmett-Teller-Methode<sup>207</sup> (BET) im Relativdruckbereich von 0.05-0.3 mit der Software ASiQwin von Quantachrome berechnet. Die Bestimmung der Porenvolumina erfolgte bei einem Relativdruck  $p/p_0$  von 0.97 (1000 Abscheidungszyklen) und 0.99 (2000 Abscheidungszyklen). Da für eine Physisorptionsmessung eine hohe Anzahl an beschichteten Platinsubstraten hergestellt werden musste, erfolgte diese Analysemerhode nur an ausgewählten Proben.

#### 3.1.6.2 Bestimmung der elektrischen Eigenschaften

Im Hinblick auf die potenzielle Anwendung der nanoporösen Platinbeschichtungen als neuronales Elektrodenmaterial wurde bei den Probencharakterisierungen die elektrochemische Impedanzspektroskopie (EIS) und die Cyclovoltammetrie (CV) angewendet. Da diese beiden Charakterisierungsmethoden eine entscheidende Rolle spielen, werden diese im Folgendem ausführlich erläutert.

In der elektrochemischen Impedanzspektroskopie (EIS) wird der frequenzabhängige Wechselstromwiderstand, welcher auch als Impedanz bezeichnet wird, eines zu untersuchenden elektrochemischen Systems bestimmt. Dies kann an Oberflächenbeschichtungen oder im Elektrolyten gelösten Substanzen erfolgen. Analog zum Ohmschen Widerstand  $R$ , welcher mit

$$R = \frac{U - U_{\text{Gleichgewicht}}}{I}$$

aus dem Quotienten der Differenz aus Spannung  $U$  und Ruhespannung  $U_{\text{Gleichgewicht}}$  und dem angelegten Gleichstrom  $I$  definiert ist, kann die Impedanz gemessen werden. Zur Bestimmung der Impedanz wird ein Potential definierter Frequenz und Amplitude an der Arbeitselektrode angelegt. Die resultierende Stromantwort mit entsprechender Phasenverschiebung  $\varphi$  und Amplitude wird aufgenommen. Entsprechend ergibt sich für die zeitlich veränderten Amplituden des Spannungs-  $u(t)$  bzw. Stromsignals  $i(t)$

$$u(t) = \hat{U}_m \sin(\omega t + \varphi_u)$$

### 3 Materialien und Methoden

$$i(t) = \hat{I}_m \sin(\omega t + \varphi_i)$$

wobei  $\hat{U}_m$  und  $\hat{I}_m$  die maximalen Amplituden und  $\omega$  die Kreisfrequenz sind. Somit ergibt sich für die Impedanz

$$Z(i\omega) = \frac{\hat{U}_m}{\hat{I}_m} \cdot e^{i(\varphi_u - \varphi_i)} = |Z| \cdot e^{i\varphi} = Z' + iZ''$$

Für den Betrag der Impedanz folgt

$$|Z| = \sqrt{(Z')^2 + (iZ'')^2}$$

bei welchem für den Realteil  $Z'$  und den Imaginärteil  $Z''$  folgende Zusammenhänge gelten:

$$Z' = |Z| \cos \varphi \quad (\text{Realteil})$$

$$Z'' = |Z| \sin \varphi \quad (\text{Imaginärteil})$$

Die zu untersuchenden elektrochemischen Systeme können durch Erstellen von Ersatzschaltbildern ausgewertet werden. Dabei handelt es sich um Reihen- und Parallelschaltungen von beispielsweise Ohmschen Widerständen und Kondensatoren. Zeigt das erstellte Ersatzschaltbild das gleiche frequenzabhängige Impedanzverhalten wie das untersuchte elektrochemische System, so können den einzelnen Bestandteilen des Ersatzschaltbildes physikalische Eigenschaften zugeordnet werden. Anhand eines klassischen Ersatzschaltbildes in Abbildung 3.5 werden zunächst die grundlegenden Bestandteile erläutert.

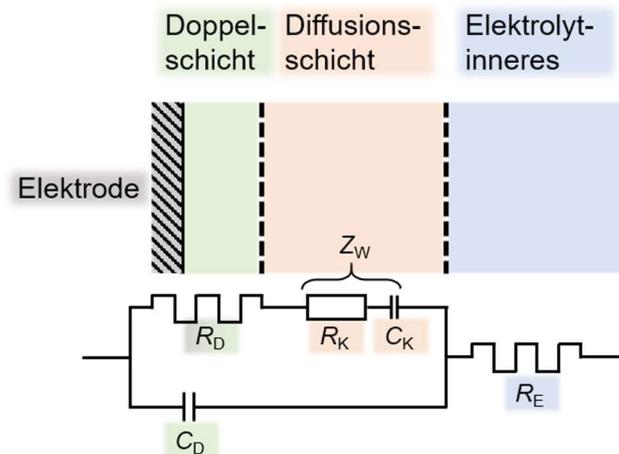


Abbildung 3.5: Wechselstrom-Ersatzschaltbild einer Halbzelle (Arbeitselektrode), bei welchem die Kapazität  $C_D$  der Doppelschicht (grün), der Durchtrittswiderstand  $R_D$  des Elektronenaustausch zwischen Elektrode (grau) und Ionen der Doppelschicht (grün), die Warburg-Impedanz  $Z_W$  (orange) sowie der Elektrolytwiderstand  $R_E$  (blau) berücksichtigt wurden.

Durch Anlegen einer Wechselspannung an ein System im chemischen Gleichgewicht reichern sich durch elektrostatische Anziehung Ionen aus der Lösung an der Elektrodenoberfläche an. Das elektrochemische Verhalten der Elektrode und

der Doppelschicht kann durch einen Plattenkondensator mit der Doppelschichtkapazität  $C_D$  beschrieben werden und wird auch als Helmholtz-Doppelschicht bezeichnet. Strom und Spannung sind in diesem Fall bei hohen Frequenzen nicht in Phase sondern um  $90^\circ$  phasenversetzt.

Die für den Elektronenaustausch zwischen Elektrode und Ionen erforderliche Aktivierungsenergie wird durch den Durchtrittswiderstand  $R_D$  dargestellt. Durch die angelegte Wechselspannung ergibt sich während der positiven Sinuswelle an der Arbeitselektrode eine erhöhte Konzentration der oxidierten Spezies. Um einen Konzentrationsausgleich zu erreichen, diffundieren die Ionen der oxidierten Spezies von der Elektrode weg in den Elektrolyten hinein. Während der negativen Sinuswelle hingegen stellt sich eine Konzentrationserhöhung der reduzierten Spezies vor der Elektrodenoberfläche ein, was entsprechend eine Diffusion der reduzierten Spezies in die Lösung verursacht. Somit treten an der Elektrodenoberfläche Konzentrationsschwankungen auf, welche sich als gedämpfte Welle bis zu einer gewissen Eindringtiefe in den Elektrolyten fortsetzt und diffusionskontrolliert stattfindet. Da das elektrochemische Verhalten dieser Diffusionsvorgänge auf kein Element aus der Elektrodynamik zutrifft, wird im Ersatzschaltbild die Warburg-Impedanz  $Z_W$  eingeführt. Diese besteht aus einer Reihenschaltung eines frequenzabhängigen Konzentrationswiderstands  $R_K$  und eines kapazitiven Widerstands mit ebenfalls frequenzabhängiger Kapazität  $C_K$  und ist entsprechend definiert als:

$$Z_W = R_K + \frac{1}{i\omega C_K}$$

Außerdem muss der Elektrolytwiderstand  $R_E$  berücksichtigt werden. Ohmsche Widerstände, wie beispielsweise der Elektrolyt oder elektrische Leiter, sind unabhängig von der Stromform bzw. dessen Frequenz und verhalten sich konstant. Infolgedessen weisen diese bei Anlegen einer sinusförmigen Wechselspannung keine Phasenverschiebung auf, Strom und Spannung sind in Phase.

Die impedanzspektroskopischen Messungen werden in einem Drei-Elektroden-Aufbau durchgeführt. Daher ergibt sich genaugenommen sowohl für die Arbeits- als auch für die Gegenelektrode das in Abbildung 3.5 gezeigte Ersatzschaltbild, welche über den Elektrolytwiderstand miteinander verbunden sind. Durch Verwendung einer großflächigen Gegenelektrode kann jedoch dieser Impedanzanteil vernachlässigt werden, weshalb das in Abbildung 3.5 gezeigte vereinfachte Ersatzschaltbild für das gesamte System verwendet werden kann.<sup>208,209</sup>

Während der impedanzspektroskopischen Messung wird eine sinusförmige Wechselspannung mit definierter Frequenz im Bereich von üblicherweise  $10^6$  Hz bis  $10^{-3}$  Hz und einer Amplitude zwischen 2 mV bis 10 mV an der Messzelle angelegt. Gemessen wird die Stromantwort mit deren Phasenverschiebung und zeitlich veränderte Amplitude.

### 3 Materialien und Methoden

Da in den meisten Fällen das zu untersuchende elektrochemische System komplexer als in Abbildung 3.5 dargestellt ist und unterschiedliche Ersatzschaltbilder dasselbe frequenzabhängige Impedanzverhalten zeigen können, muss die Zuordnung der Impedanzelemente gut durchdacht sein. Dabei spielen nicht nur physikalische, sondern auch mikroskopische Eigenschaften, wie Oberflächenrauigkeit und Porosität, eine entscheidende Rolle. Das beschriebene Modell geht von einer flachen Elektrodenoberfläche aus und berücksichtigt daher keine anderen Oberflächenmorphologien.<sup>210</sup> Das durch poröse oder raue Oberflächen verursachte nicht ideale kapazitive Verhalten wird häufig anstelle eines Kondensators als ein Element mit konstanter Phase beschrieben.<sup>211</sup> Beim Anlegen hoher Frequenzen nimmt die innere Porenoberfläche kaum an der Reaktion teil, wodurch die Umladung der Doppelschicht hauptsächlich an der äußeren Oberfläche stattfindet. Im Umkehrschluss findet die Reaktion bei niedrigen Frequenzen auch an der Oberfläche von tieferliegenden Poren statt. Folglich können durch Anlegen von Wechselspannung unterschiedlicher Frequenzen die jeweilige Oberfläche erfasst und durch den Vergleich mit elektrischen Modellen Rückschlüsse auf die Porosität geschlossen werden. Durch die Annahme, dass nur die Doppelschichtkapazität an den Porenwänden und der Elektrolytwiderstand in den Poren für den Stromfluss eine Rolle spielen, kann sowohl die Kapazität  $C'$ , als auch der Widerstand  $R'$  in Abhängigkeit des Porenradius  $a(x)$  gesetzt werden

$$C'(x)dx = 2\pi C_D a(x)dx$$
$$R'(x)dx = \frac{1}{\pi\kappa a^2(x)} dx$$

wobei  $C_D$  die Doppelschichtkapazität des glatten Porenmaterials und  $\kappa$  die Leitfähigkeit des Elektrolyten ist.

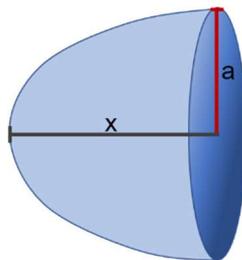


Abbildung 3.6: Schematische Darstellung der zur Berechnung der Kapazität  $C'$  und dem Widerstand  $R'$  verwendeten zylindrischen Pore mit dem Durchmesser  $a$  (rot) und der Länge  $x$ .

Entsprechend ist die Impedanz sowohl von der Porenform als auch von der Porengröße abhängig. Die Impedanz der porösen Elektrode setzt sich aus den Impedanzen der Einzelporen zusammen, welche wiederum im Ersatzschaltbild in einer Parallelschaltung angeordnet werden. Somit dürfen sich sowohl die Porenform, als auch der Porendurchmesser über die gesamte Elektrodenoberfläche nicht stark

unterscheiden und sollten möglichst in einem geordneten Porensystem vorliegen, um ein geeignetes Ersatzschaltbild erstellen zu können.<sup>212</sup> Außerdem führt eine Quervernetzung der Poren zu weiteren Abweichungen zwischen der realen und der für dieses Modell berechneten Impedanz.<sup>213</sup> Auch die Diffusion der elektroaktiven Spezies muss berücksichtigt werden.<sup>210</sup> Folglich stellen poröse Beschichtungen eine überaus komplexe Elektrodenoberfläche bezüglich der Auswertung impedanzspektroskopischer Messungen dar, weshalb bereits seit den sechziger Jahren Systeme mit unterschiedlichsten Oberflächenmorphologien untersucht werden.<sup>208,214,215</sup>

Das in dieser Arbeit untersuchte elektrochemische System ist in Abbildung 3.7 schematisch dargestellt und besteht zum einen aus der elektrochemisch abgeschiedenen nanoporösen Platinbeschichtung (NPt), welche ein ungeordnetes Porensystem mit einer zum Teil relativ breiten Porenweitenverteilung aufweist.

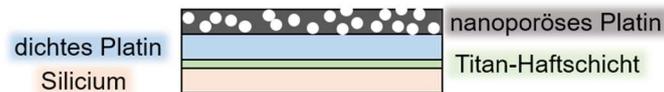


Abbildung 3.7: Schematische Darstellung der mittels Impedanzspektroskopie untersuchten Arbeitselektrode, welche aus der nanoporösen Platinbeschichtung (grau), dichtem Platin (blau), einer Titan-Haftschrift (grün) und dem Siliciumwafer (orange) besteht.

Unter der elektrochemisch abgeschiedenen NPt-Beschichtung befindet sich eine dichte Platinbeschichtung (100 nm), welche unter Verwendung einer Titanhaftschrift (50 nm) auf den Siliciumwafer aufgebracht wurde. Aufgrund der zusätzlichen Grenzfläche zwischen poröser und dichter Platinschicht und dem ungeordneten Porensystem mit zum Teil stark unterschiedlichen Porendurchmessern innerhalb einer Beschichtung ist das Erstellen eines Ersatzschaltbildes des im Rahmen dieser Arbeit untersuchten elektrochemischen Systems nicht sinnvoll. Auch eine quantitative Auswertung von beispielsweise Systemwiderstand und Phasenwinkel mithilfe der Nyquist-Auftragung (vgl. S. 208) ist nicht möglich, weshalb die aufgenommenen frequenzabhängigen Impedanzen der unterschiedlichen Probenarten ausschließlich qualitativ miteinander verglichen werden.<sup>216</sup>

Elektrochemische impedanzspektroskopische Messungen wurden an einem Versastat 4 von Princeton Applied Research in einem Drei-Elektroden-Aufbau durchgeführt. Als Arbeitselektrode diente die zu charakterisierende Probe, als Gegenelektrode wurde ein Platinnetz mit einer Größe von  $2.54 \times 2.54 \text{ cm}^2$  und einer Maschendicke von  $3 \mu\text{m}$  eingesetzt. Zwischen diesen beiden Elektroden fließt während der Messung der Strom. Die Referenzelektrode war ein Silber/Silberchlorid System mit gesättigter Kaliumchlorid-Silberchlorid-Lösung, welche das Potential kontrolliert und aufnimmt. Die Gegen- und Referenzelektrode wurden in einer eigens konstruierten Messzelle (vgl. S. 43) bei jeder Messung mit dem gleichen

### 3 Materialien und Methoden

Abstand zur Arbeitselektrode in den Elektrolyten gehängt. Als Elektrolyt wurde eine isotonische Natriumchlorid-Lösung (0.85%) verwendet, um die Körperbedingungen zu simulieren und infolgedessen anwendungsbezogene Messwerte zu erhalten. Bevor die EIS gestartet wurde, erfolgte die Messung des Leerlaufpotential (*open circuit potential*, OCP). Sobald das OCP für 120 s konstante Werte aufwies und sich folglich ein Gleichgewicht in der Messzelle eingestellt hatte, wurde die Messung gestartet. Die Impedanz wurde im Frequenzbereich von  $10^{-1}$  Hz bis  $10^5$  Hz mit 10 Frequenzen pro Dekade und alternierendem Strom mit einer Amplitude von 10 rms-mV gemessen.

Bei der Cyclovoltammetrie, oder auch Dreiecksspannungsmethode, wird ein dreieckförmiger Potential-Zeit-Verlauf an der Arbeitselektrode, hier an dem beschichteten Platinsubstrat, vorgegeben und durch Registrierung des resultierenden Strom-Potential-Diagramms charakterisiert. Diese Messmethode zeichnet sich durch ausgezeichnete Reproduzierbarkeiten an Platin als Elektrodenmaterial aus und hängt von der Reinheit des Elektrolyten, der Art des Elektrodenmaterials, der Wahl der Umkehrpotentiale sowie der Geschwindigkeit der Potentialänderung ab.<sup>217</sup> Der verwendete Potentialbereich sollte dabei immer zwischen den Zersetzungspotentialen des Lösungsmittels liegen, hier der Wasserstoff- bzw. Sauerstoffentwicklung, an der Messelektrode.<sup>218</sup> Sind während der cyclovoltammetrischen Messung keine elektrochemisch reaktiven Stoffe in dem System vorhanden, so können die gemessenen Ströme dem Auf- und Abbau von Wasserstoff- und Sauerstoffchemisorptionsschichten zugeordnet werden.

Für ein generelles Verständnis werden im Folgenden zunächst allgemeine Mechanismen an Platinoberflächen während der Cyclovoltammetrie erklärt. In Abbildung 3.8 ist ein Cyclovoltammogramm einer blanken Platinoberfläche gezeigt, welches in 1 molarer Kaliumhydroxid-Lösung mit einer Potentialänderung von  $0.1 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$  aufgenommen wurde.

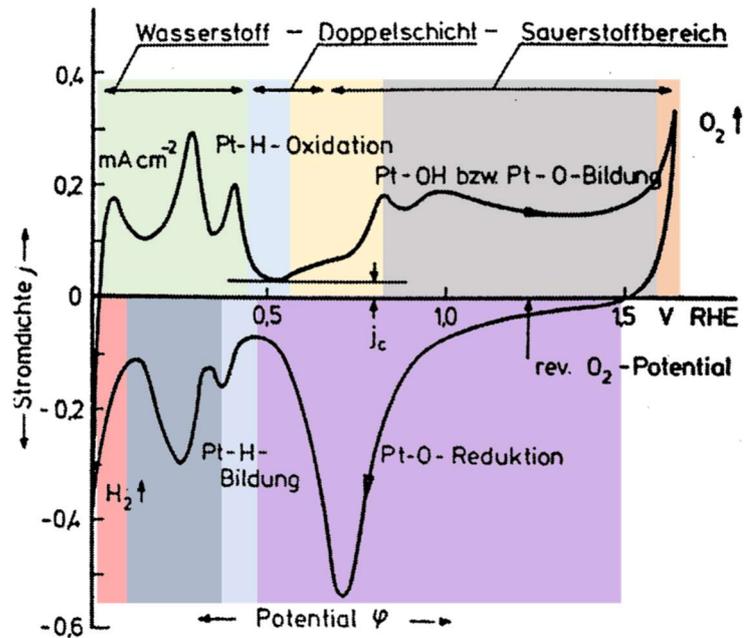
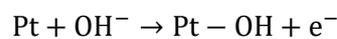
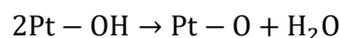


Abbildung 3.8: Cyclovoltammogramm von Platin in 1 molarer KOH unter Verwendung einer Potentialänderung von  $0.1 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$  nach Hamann & Vielstich.<sup>217</sup>

Mit einer positiven Potentialänderung findet zwischen dem Potential von 0.45 V und 0.55 V die Aufladung der elektrolytischen Doppelschicht statt (hellblau), woran die Bildung einer Sauerstoffchemisorptionsschicht anschließt. Zunächst findet bis zu einem Potential von 0.8 V die Anbindung von Hydroxid-Gruppen an der Platinoberfläche statt (gelb)

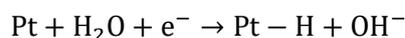


bevor anschließend bis zu einem Potential von 1.6 V eine Sauerstoffdeckschicht ausgebildet wird (grau).



Ab 1.6 V beginnt die Entwicklung von elementarem Sauerstoff (orange).

Beim Potentialrücklauf folgt mit einer Überspannung von mehreren 0.1 V die Reduktion der Sauerstoffbelegung in dem Potentialbereich von etwa 1.5 V bis 0.45 V (violett). Nach einem schmalen Doppelschichtbereich (hellblau) folgt ab 0.35 V die Bildung einer Wasserstoffdeckschicht (dunkelblau).



Bei etwa 0.1 V steigt der kathodische Strom stark an, es wird elementarer Wasserstoff entwickelt. Durch den anschließenden Spannungshinlauf findet die Oxidation des gebildeten Wasserstoffs sowie der atomaren Belegung auf der Platinoberfläche statt (grün).

Durch die in einem definierten Potentialbereich  $d\varphi$  an der Elektrodenoberfläche umgesetzten Ladungsmenge  $Q$  kann auf die differentielle Deckschichtkapazität  $C^d$  geschlossen werden,

$$C^d = C^d(\varphi) = \frac{dQ}{d\varphi} = \frac{j dt}{d\varphi} = \frac{j(\varphi)}{\nu}$$

wobei  $\nu$  die Potentialänderung und  $j$  die Stromdichte ist. Bei niedrigen Potentialänderungen ( $<0.5 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$ ) verhalten sich die Deckschichtströme proportional zur Potentialänderung. Mit diesen Zusammenhängen ist es möglich, die für den Aufbau bzw. Abbau der Oberflächenbelegung nötige integrale Ladungsmenge  $Q_B$  durch graphische Auswertungen des Cyclovoltammogramms zu bestimmen, wodurch wiederum Rückschlüsse auf die zugängliche Oberfläche der aufgerauten Elektrode gezogen werden können.<sup>217</sup>

Im Hinblick auf die Anwendung als biomedizinisches Elektrodenmaterial wurden die cyclovoltammetrischen Messungen in isotonischer Natriumchlorid-Lösung durchgeführt. Entsprechend kann ein anwendungsbezogener Vergleich zwischen blanken Platinoberflächen, welche heutzutage als Elektrodenmaterial eingesetzt werden, und den unterschiedlichen nanoporösen Platinbeschichtungen gezogen werden.<sup>219</sup> Hierfür wurde in Anlehnung an Boehler *et al.*, welcher nanostrukturierte Platinbeschichtungen für neuronale Elektroden hergestellt und charakterisiert hat, die gesamte Fläche des Cyclovoltammogramms über Integration bestimmt.<sup>101</sup>

Cyclovoltammetrische Messungen wurden, wie auch die EIS, an einem Versastat 4 von Princeton Applied Research in dem gleichen Drei-Elektroden-Aufbau durchgeführt. Auch hier diente die zu untersuchende Oberfläche als Arbeitselektrode, als Gegenelektrode wurde ein Platinnetz mit einer Größe von  $2.54 \times 2.54 \text{ cm}^2$  und einer Maschendicke von  $3 \mu\text{m}$  verwendet. Ein Silber/Silberchlorid System mit gesättigter Kaliumchlorid-Silberchlorid-Lösung wurde als Referenzelektrode eingesetzt. Ehe die Messungen der CV gestartet wurden, erfolgte analog zur EIS eine Messung des OCPs, bis dieses für 120 s konstant blieb. Die cyclovoltammetrischen Messungen wurden im Potentialbereich zwischen  $-0.6 \text{ V}$  bis  $0.9 \text{ V}$  mit einer Geschwindigkeit der Potentialänderung von  $0.1 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$  in einer Natriumchlorid-Lösung (0.85%) durchgeführt. Durch die Reduktion bzw. Oxidation während der ersten Zyklen jeder cyclovoltammetrischen Messung werden adsorbierte Verunreinigungen entfernt, wodurch Blockierungen der aktiven Oberflächenzentren und resultierende Störungen von Elektrodenprozessen ausgeschlossen werden können.<sup>217</sup> Infolgedessen wurden bei jeder Messung mindestens 10 Zyklen durchgeführt und zur Auswertung ausschließlich Cyclovoltammogramme ausgewählt, welche konstante Signale aufwiesen.

#### 3.1.6.3 Cytokompatibilitätsuntersuchungen

Zur Bestimmung der Cytokompatibilität der nanoporösen Platinbeschichtungen wurden unterschiedliche Zellarten verwendet. Zunächst wurden Zellkulturuntersuchungen mit NIH3T3-Fibroblasten aufgrund ihrer Robustheit durchgeführt.

Zeigten die Probenoberflächen eine positive Fibroblasten-Kompatibilität folgten weiterführende Untersuchungen mit den sensibleren Spiralganglienzellen, welche die für den Hörprozess entscheidenden Zellen im Innenohr sind. Abschließend wurde an ausgewählten Proben das Überleben und Differenzieren von mesenchymalen Stammzellen analysiert. Alle Zellkulturuntersuchungen wurden durch Jennifer Harre aus der Arbeitsgruppe von Dr. Athanasia Warnecke an der Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde (Leitung Prof. Dr. Thomas Lenarz) der Medizinischen Hochschule Hannover durchgeführt und gemeinsam ausgewertet.

Für die grundlegenden Zellkulturuntersuchungen der nanoporösen Platinbeschichtungen wurden murine NIH3T3-Fibroblasten verwendet, welche das grün fluoreszierende Protein (*green fluorescent protein*, GFP) exprimieren. Zunächst wurden die NIH3T3-Fibroblasten unter Standardbedingungen bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> in *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM), angereichert mit 10% fetalem Kälberserum (FCS) und 1% Penicillin und Streptomycin, kultiviert. Verwendet wurden die Zellpassagen drei bis acht. Pro Probe wurden die Fibroblasten mit einer Zelldichte von  $1.4 \cdot 10^4$  Zellen in einer 6-Well-Mikrotiterplatte eingesät, damit diese für 24 h an der Probenoberfläche adhären konnten. Anschließend wurden die Proben in eine neue 6-Well-Mikrotiterplatte umgesetzt, um nur die auf der Probenoberfläche adhärenen Fibroblasten zu untersuchen. Mithilfe eines Auflichtmikroskops des Typs BX51 des Herstellers Olympus wurde täglich die Zellmorphologie wie auch die Proliferation untersucht. Nach vier Tagen wurden die Zellen mit einer Trypsin / Ethylendiamintetraessigsäure-Lösung von der Probenoberfläche abgelöst und die Anzahl der lebenden Zellen in einer Neubauer-Zählkammer unter Verwendung des Trypan-Blau-Ausschlussverfahren (Verdünnung 2:1) bestimmt.

Im Hinblick auf die Anwendung als Elektrodenmaterial des Cochlea-Implantats im Innenohr wurden weiterführende Zellkulturuntersuchungen mit Spiralganglienzellen (SGZ) aus dem Innenohr von Ratten durchgeführt. Hierfür wurden Cochleae von neonatalen Sprague-Dawley Ratten (3-5 Tage alt) isoliert und mikroskopisch nach der Enthauptung sezirt. Die Prozedur der enzymatischen und mechanischen Vereinzelnung der Spiralganglia wird durch Wefstaedt *et al.* beschrieben.<sup>220</sup> Anschließend wurde die Anzahl der lebenden SGZ in einer Neubauerkammer unter Verwendung des Trypan-Blau-Ausschlussverfahrens bestimmt. Die frisch isolierten SGZ wurden auf der nanoporösen Platinoberfläche mit einer Dichte von  $4 \cdot 10^4$  Zellen pro Probe in einer 12-Well-Mikrotiterplatte ausgesät und unter Standardbedingungen im serumfreien Zellmedium Panserin für 48 h kultiviert. Das Panserin wurde vor der Verwendung mit 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES, 23.43 µM), Glukose (0.15%), Penicillin (30 U·mL<sup>-1</sup>), N<sub>2</sub>-Zusatz (0.1 µL·mL<sup>-1</sup>), und Insulin (8.7 µg·mL<sup>-1</sup>) angereichert. Als Blindprobe wurden

### 3 Materialien und Methoden

unbeschichtete Platinsubstrate verwendet, als Positivkontrolle dienten Zellkulturwells, welche mit für SGZ als Standardkultivierung verwendeten  $0.01 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  poly-D / L-Ornithin und  $0.1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  Laminin beschichtet wurden. Die verwendete aus Spiralgangliensträngen isolierte Zellsuspension, besteht sowohl aus Spiralganglien neurone (SGN), als auch aus sogenannten Stützzellen. Diese bestehen aus Fibroblasten und Gliazellen und werden für die erfolgreiche Kultivierung der SGN benötigt. Um die SGN von den Stützzellen zu unterscheiden, wurden diese nach der Kultivierung auf der Probenoberfläche mit dem Anti-Neurofilament-Antikörper (200 kDa, *monoclonal mouse, clone RT97*) angefärbt, der ein spezifischer Marker für Neurone ist. Hierfür wurden die SGZ nach der Kultivierung von 48 h mit 4% Paraformaldehyd-Lösung für 10 Minuten fixiert, mit phosphatgepufferter Salzlösung (*phosphate buffered saline*, PBS, 10 mM Phosphat, 140 mM Natriumchlorid, 2.68 mM Kaliumchlorid, pH=7.45) gewaschen und mit 0.25% Triton X-100 in PBS permeabilisiert. Anschließend wurden die Proben mit 0.1% Triton X-100 in PBS (PBT) für 5 min gewaschen und in einem Blockierungspuffer, bestehend aus 5% FCS in PBT, für 1 h inkubiert. Die Proben wurden wiederum dreimal für 3 min mit PBT gewaschen und mit dem primären Antikörper Anti-Neurofilament (1:500) bei 4 °C über Nacht inkubiert. Für die Antikörperverdünnung wurde eine Lösung bestehend aus 2% FCS und 1% Rinderalbumin (*bovine serum albumin*, BSA) in PBT verwendet. Nach einem weiteren dreifachen Waschschrift mit PBT für 5 min wurden die Zellen für 1 h bei Raumtemperatur mit dem sekundären fluoreszenzkonjugierten Antikörper Alexa Fluor®488 (1:1000, *goat-anti mouse*) sowie mit 4',6-Diamin-2-phenylindol (DAPI, 1:250) angefärbt. Abschließend wurden die Proben in PBS gewaschen und für die Charakterisierung am Auflichtmikroskop des Typs BX51 des Herstellers Olympus in PBS gelagert. Die Anzahl der SGN auf der Probenoberfläche wurden durch Zählen der Neurofilament-positiven Spiralganglien neurone, welche eine Neuritenlänge von mindestens drei Zellsoma-Durchmesser aufwiesen, bestimmt. Die ethische Erklärung für die Isolierung der SGZ aus neonatalen Ratten ist im Anhang aufgeführt (vgl. S. 207).

Weiterführende Untersuchungen zur Cytokompatibilität wurden mit mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark (*bone marrow-derived mesenchymal stem cells*, BMDMSC) an ausgewählten Proben durchgeführt. Sowohl auf unbeschichteten als auch sp-NPPT beschichteten Substraten wurden  $2000 \text{ BMDMSC}\cdot\text{cm}^{-2}$  eingesät, indem 200  $\mu\text{L}$  Zellsuspension auf die Probenmitte aufgetropft wurden. Nach 15 min wurden die Proben bei 37 °C und 5%  $\text{CO}_2$  für drei Tage inkubiert. Hierfür wurden pro Probe 800  $\mu\text{L}$  einer mit 10% FCS, 25 mM HEPES  $100 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$  Penicillin,  $100 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  Streptomycin und  $2 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  des rekombinanten menschlichen Fibroblasten-Wachstumsfaktor 2 (*fibroblast growth factor 2*, FGF2)

angereichertem DMEM hinzugegeben. Anschließend wurde eine Lebend-Fluoreszenzfärbung der adhären BMDMSC durch Zugabe von 10  $\mu\text{M}$  Carboxyfluorescein Succinimidylester (CFSE) für 15 min bei 37 °C durchgeführt, um sowohl die Zellproliferation als auch die Zellmorphologie der BMDMSC unter dem Auflichtmikroskop des Typs BX51 des Herstellers Olympus zu untersuchen. An Tag 7, 14 und 21 wurden die BMDMSC durch Zugabe von 4% PFA fixiert und in einer Dreifachbestimmung analysiert. Das Medium wurde während der Zellkulturuntersuchungen bei jeder Probe an Tag 3, 5, 10, 13 und 18 gewechselt.

#### 3.1.6.4 Chemische Modifizierung

Zur Quantifizierung der chemischen Modifizierung der nanoporösen Platinbeschichtung mit unterschiedlichen Thiolen wurden Kontaktwinkelmessungen am Gerät der Firma OEG vom Typ Surfens Universal durchgeführt. Eine Oberfläche wird als benetzbar bezeichnet, wenn der Kontaktwinkel  $\Theta$  zwischen Tropfen und Probenoberfläche in dem Bereich von 0° und 90° liegt. Es wird von hydrophilen Oberflächen gesprochen, sobald der Kontaktwinkel für Wasser  $<20^\circ$  ist. Liegt der Kontaktwinkel oberhalb von 90° ist eine Oberfläche hydrophob, übersteigt der Kontaktwinkel 120° wird von einer superhydrophoben Oberfläche gesprochen.<sup>221,222</sup>

Durch Aufbringen einer chemischen Modifizierung mit unterschiedlichen funktionellen Gruppen, wie beispielsweise das Aufbringen von verschiedenen funktionalisierten Thiolen, ändert sich durch die unterschiedliche Probenoberflächenladung die Wechselwirkung mit Wasser. Resultierend werden unterschiedliche Kontaktwinkel zwischen Wassertropfen und Probenoberfläche ausgebildet.

Für den Nachweis einer erfolgreichen Modifizierung wurden pro Probe drei Tropfen Reinstwasser aufgebracht, um den Kontaktwinkel zwischen Tropfen und Probenoberfläche mittels der Software Surfens42 zu bestimmen. Die Proben wurden direkt nach der Modifizierung vermessen und bis unmittelbar vor der Messung in Ethanol gelagert. Einige Sekunden vor der Messung wurde die Probenoberfläche mithilfe eines Stickstoffstroms getrocknet und der Wassertropfen sofort aufgebracht.

Als weitere quantitative Nachweismethode der Thiolmodifizierung der nanoporösen Platinbeschichtung wurde die Röntgenphotoelektronenspektroskopie (*X-ray photoelectron spectroscopy*, XPS) verwendet. Die Messungen wurden von Philipp Abendroth und Saskia Zailskas an einem XPS-Gerät des Herstellers Leybold mit einer nicht monochromatischen Al  $K_\alpha$  Röntgenquelle mit einer Energie von 1486.6 eV, einem Ausgangsstrom von 30 mA sowie einer Leistung von 210 W durchgeführt. Zur Detektion der Photoelektronen dient ein Halbkugelanalysator mit einem Radius von 100 mm. Mithilfe dieser Methode konnte die Schwefel S 2p

Emissionsbande der Thiolgruppe qualitativ bestimmt werden. Da die Messgenauigkeit jedoch für die geringen Thioldmengen auf den nanoporösen Platinbeschichtungen ihre Grenzen erreichte, wurde auf eine quantitative Auswertung verzichtet.

#### 3.1.6.5 Rolipram-Freisetzung

Die freigesetzten Rolipram-Mengen wurden aufgrund der UV-Aktivität des Roliprams bei 280 nm an einem Photometer des Typs EON™ des Herstellers BioTek gemessen. Hierfür wurde eine Doppelbestimmung mit jeweils 300 µL des Freisetzungüberstands in einer 96-Well-Mikrotiterplatte durchgeführt. Die Mikrotiterplatte wurde vor der Messung durch das Photometer auf 37 °C erhitzt und für 30 s geschüttelt. Die absolute Rolipram-Menge wurde durch eine Kalibrierung im Konzentrationsbereich von 0.94 µg·mL<sup>-1</sup> bis 30 µg·mL<sup>-1</sup> bestimmt.

#### 3.1.6.6 Stabilitätsuntersuchungen nach Lagerung unter Freisetzungsbedingungen

Im Hinblick auf die Anwendung als potenzielles Implantatbeschichtungsmaterial wurde die Stabilität der nanoporösen Platinbeschichtungen auf möglicherweise freigesetzte Platindmengen untersucht. Es wurden durch die Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (*inductively coupled plasma mass spectrometry*, ICP-MS) sämtliche Platinspezies, also elementares sowie ionisches Platin, in den Freisetzungüberständen durch Julia Bode aus dem Arbeitskreis Analytik nachgewiesen. Es wurde an einem ICP-MS des Gerätetyps Xseries 2 von Thermo Fisher Scientific Inc. mit Argon als Plasmagas und einer Generatorleistung von 1400 Watt gemessen. Da es sich bei der ICP-MS um eine sehr nachweisstarke Methode handelt, bei welcher Platin im Ultraspurenbereich bis in den unteren ng·kg<sup>-1</sup>-Bereich quantifiziert werden kann, wurden die Messungen unter Reinraumbedingungen durchgeführt.

Für die Platingehaltmessungen wurden Überstände aus der Rolipram-Freisetzung in PBS analysiert. Von den Freisetzungüberständen konnten 0.5 mL für die ICP-MS zur Verfügung gestellt werden. Um eine Doppelbestimmung zu ermöglichen, wurden die Proben vor der Messung etwa 1:6 mit 2 gew.-% Salpetersäure-Lösung verdünnt. Diese Lösung wurde als Blindprobe mitgemessen, damit etwaige Verunreinigungen mit Platin ausgeschlossen werden konnten. Der absolute Platingehalt wurde mittels einer externen Kalibrierung gemäß DIN 38402 Teil 51 mit einer kommerziell erhältlichen Platin-Stammlösung ermittelt.

## 3.2 L1CAM-modifizierte Goldoberflächen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde L1CAM als Adhäsionsmolekül auf Goldoberflächen aufgebracht. Im Folgenden wird zunächst kurz der theoretische

Hintergrund erläutert, bevor die Präparation der L1CAM-Beschichtung beschrieben und anschließend die Analyseverfahren mit den verwendeten Parametern benannt werden.

### 3.2.1 Anwendung als biomedizinisches Elektrodenmaterial

Eine weitere Modifizierungsmöglichkeit von neuronalen Elektroden ist das Aufbringen von L1CAM auf der Elektrodenoberfläche. L1CAM gehört den neuronalen Zelladhäsionsmolekülen (CAMs) der Immunglobulin-Superfamilie an und ist ein wichtiger Vermittler der Entwicklung des Nervensystems. Hierbei spielt es bei der Bildung und dem Wachstum neuronaler Axone sowie bei der neuronalen Zelladhäsion eine entscheidende Rolle. Daher wird es in vielen Studien für die Beeinflussung des Nervenwachstums im menschlichen Körper, beispielsweise im Gehirn, der Retina oder im Rückenmark, untersucht.<sup>223-225</sup> Durch die L1CAM-Modifizierung auf biodegradierbaren Polymergerüsten von Cherry *et al.* im Jahr 2012 konnte ein verbessertes Neuritenwachstum nachgewiesen werden.<sup>226</sup> Kolarcik *et al.* konnte bei metallischen Mikroelektroden durch eine L1CAM-Beschichtung eine Verringerung des neuronalen Zelltods und eine erhöhte Neurofilamentbildung an der Gewebe-Elektroden-Schnittstelle nachweisen.<sup>15</sup>

Basierend auf diesen Studien soll die Möglichkeit einer L1CAM-Modifizierung des Cochlea-Implantats untersucht werden.

### 3.2.2 Cysteamin-Modifizierung und L1CAM-Immobilisierung

Zur L1CAM-Modifizierung wurden goldbeschichtete Siliciumwafer verwendet, da die L1CAM-Beschichtung ihre Anwendung nicht auf den Platinkontakten des Cochlea-Implantats finden soll. Vielmehr sollen zusätzliche Anknüpfungspunkte in der Silikonmatrix geschaffen werden, um das implantatassoziierte Wirkstofffreisetzungssystem aus den Elektrodenkontakten nicht zu behindern. Daher wurden preisgünstigere und besser modifizierbare Goldoberflächen ausgewählt, anstelle der im Rahmen dieser Arbeit üblicherweise verwendeten Platinsubstrate (vgl. Kapitel 2.2.3).

Das Protein L1CAM setzt sich aus einer Sequenz an Aminosäuren zusammen, welche sowohl Amino- als auch Carbonsäure-Gruppen aufweisen. Für eine Anbindung auf Goldoberflächen werden aufgrund ihrer herausragenden Interaktion vorzugsweise Moleküle mit Thiol-Gruppen verwendet. Daher wurde Cysteamin als Anker-molekül ausgewählt, welches zum einen mit seiner Thiol-Gruppe Wechselwirkungen mit der Goldoberfläche eingeht. Zum anderen können zwischen der Aminogruppe des Cysteamins und der Carbonsäure-Gruppe des L1CAMs Wasserstoffbrückenbindungen und elektrostatische Wechselwirkungen, sowie zwischen den Kohlenstoffketten des Cysteamins und L1CAMs hydrophobe Wechselwirkungen ausgebildet werden (Abbildung 3.9).

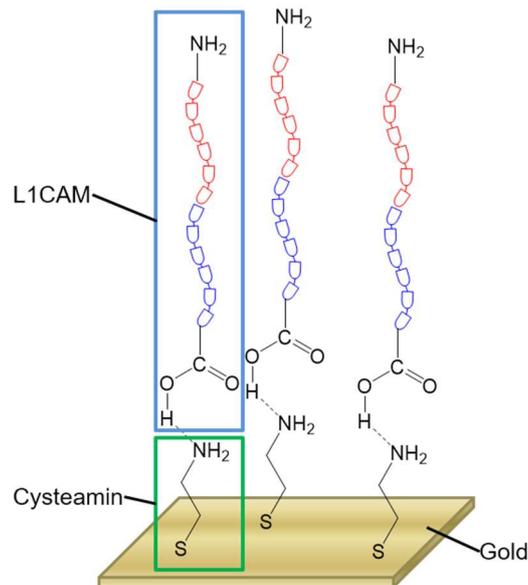


Abbildung 3.9: Schematische Darstellung der L1CAM (blau) - Immobilisierung auf Goldoberflächen durch die chemische Modifizierung mit Cysteamin (grün).

### 3.2.3 Präparation von L1CAM Modifizierungen auf Gold

Die Präparation der L1CAM-Beschichtungen ist ein zweistufiges Verfahren, welches aus der chemischen Modifizierung der Goldoberfläche und der Anbindung des L1CAMs besteht. Im Vorfeld wurde das Goldsubstrat gereinigt.

#### 3.2.3.1 Substratreinigung

Goldbeschichtete Siliciumwafer mit einer Größe von  $10 \times 10 \text{ mm}^2$  wurden mit Aceton ab gespült und für 15 min in Aceton stehend in einer Teflonhalterung gerührt. Die Substrate wurden mit Aceton und Isopropanol gespült und im Stickstoffstrom getrocknet. Anschließend wurden die Goldsubstrate für 25 min mit Piranhasäure, welche zu 70% aus konzentrierter  $\text{H}_2\text{SO}_4$  und 30% aus  $\text{H}_2\text{O}_2$  (35%) bestand, zur oxidativen Entfernung von Oberflächenverunreinigungen behandelt. Darauf folgend wurden die Substrate für 5 min in Reinstwasser gelagert. Zur Sterilisation wurden die Goldsubstrate mit Isopropanol ab gespült und unter der Sterilbank zur Entfernung der Isopropanolreste für 3 s in ethanolische Triethylamin-Lösung getaucht. Es folgte die unverzügliche Behandlung mit Cysteamin, um eine optimale chemische Modifizierung der gereinigten Goldoberfläche zu erreichen.

#### 3.2.3.2 Chemische Modifizierung mit Cysteamin

Zur Oberflächenmodifizierung der Goldoberfläche wurde eine ethanolische  $0.005 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  Cysteamin-Lösung durch eine 10-minütige Behandlung im Ultraschallbad hergestellt. Um eine optimale Modifizierung mit einer selbstorganisierenden Monoschicht (*self-assembled monolayer*, SAM) des Cysteamins zu erhalten, wurden

3 mL·L<sup>-1</sup> Triethylamin hinzugegeben und die Lösung nochmals zur Verbesserung der Durchmischung für 2 min im Ultraschallbad behandelt. Die Modifizierung erfolgte in luftdicht verschlossenen Glasgefäßen durch Einlagerung der gereinigten Goldsubstrate in 3 mL der Cysteamin-Lösung für 48 h bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die modifizierten Goldsubstrate zur Entfernung überschüssigen Cysteamins in ethanolischer Triethylamin-Lösung für 1 min im Ultraschallbad gereinigt und mit Ethanol abgespült. Die Immobilisierung von L1CAM wurde umgehend nach der Modifizierung mit Cysteamin durchgeführt.

### 3.2.3.3 Immobilisierung von L1CAM

Im Anschluss an die Oberflächenmodifizierung mit Cysteamin wurden die beschichteten Goldsubstrate für einige Sekunden mit steriler 0.01 mol·L<sup>-1</sup> phosphatgepufferter Salzlösung (*phosphate buffered saline*, PBS) abgespült, um restliches Ethanol von der Probenoberfläche zu entfernen. Die L1CAM-Immobilisierung erfolgte in einer sterilen PBS / L1CAM-Lösung für 24 h bei 3 °C. Es wurden unterschiedliche Konzentrationen im Bereich von 1–100 µg·mL<sup>-1</sup> eingesetzt. Um das verwendete Volumen der L1CAM-Lösung möglichst gering zu halten, wurden die Substrate in der in Abbildung 3.10 dargestellten eigens konstruierten Teflonhalterung eingespannt.



Abbildung 3.10: Fotografische Aufnahme der eigens konstruierten Teflonhalterung zur Beschichtung von Goldsubstraten mit L1CAM.

Die Öffnung der Teflonhalterung entsprach den Maßen einer 96-Wellplatte, weshalb zur L1CAM-Immobilisierung ein Volumen von nur 200 µL benötigt wurde. Ein weiterer Vorteil lag in der definierten Grenze zwischen dem Bereich der L1CAM-Beschichtung und dem nur modifizierten Teil der Goldoberfläche. Zur Überführung zu den jeweiligen Charakterisierungsmethoden wurden die Proben mit PBS gewaschen und bei 0 °C in PBS so kurz wie möglich gelagert.

### 3.2.4 Charakterisierungsmethoden

Im Folgendem werden die zur Analyse der L1CAM-immobilisierten Goldoberflächen verwendeten Charakterisierungsmethoden erläutert und die Aufbauten

sowie die gewählten Messparameter aufgeführt. Zur Beurteilung der L1CAM-Verteilung auf der Goldoberfläche wurde mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiertes L1CAM auf Goldsubstrate aufgebracht und unter einem Fluoreszenzmikroskop untersucht. Zur Unterscheidung der absoluten und der immunologisch aktiven L1CAM-Menge wurde im Rahmen der Masterarbeit von Dennis Müller<sup>227</sup> ein antikörperbasiertes Nachweisverfahren (*enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA) angewendet. Eine Kombination aus Cyclovoltammetrie und ELISA sollte zunächst für eine vollständige L1CAM-Entfernung von der Goldoberfläche und anschließend als Nachweis der immunologisch aktiven L1CAM-Menge dienen. Zur Überprüfung der erfolgreichen L1CAM-Entfernung durch die Oxidation des Cysteamins wurden Kontaktwinkelmessungen sowie eine kolorimetrische Analyse der Aminogruppen durchgeführt.

#### 3.2.4.1 Verteilung und Flächenbedeckung

Um die L1CAM-Moleküle fluoreszenzmikroskopisch nachweisen zu können wurden diese durch Carsten Zeilinger vom Institut für Biophysik mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy3<sup>®</sup> nach der Methode von Walter et al. markiert.<sup>228</sup> Bei der durchgeführten Reaktion reagierte, wie in Abbildung 3.11 gezeigt, eine Aminogruppe des L1CAMs mit der Estergruppe des Cyanin 3 NHS Esters Cy3<sup>®</sup>. Unter Bildung einer Amidbindung konnte so der fluoreszierende Farbstoff an das L1CAM kovalent angebunden werden. Als reaktive Abgangsgruppe entstand als Nebenprodukt *N*-Hydroxysuccinimid (NHS).

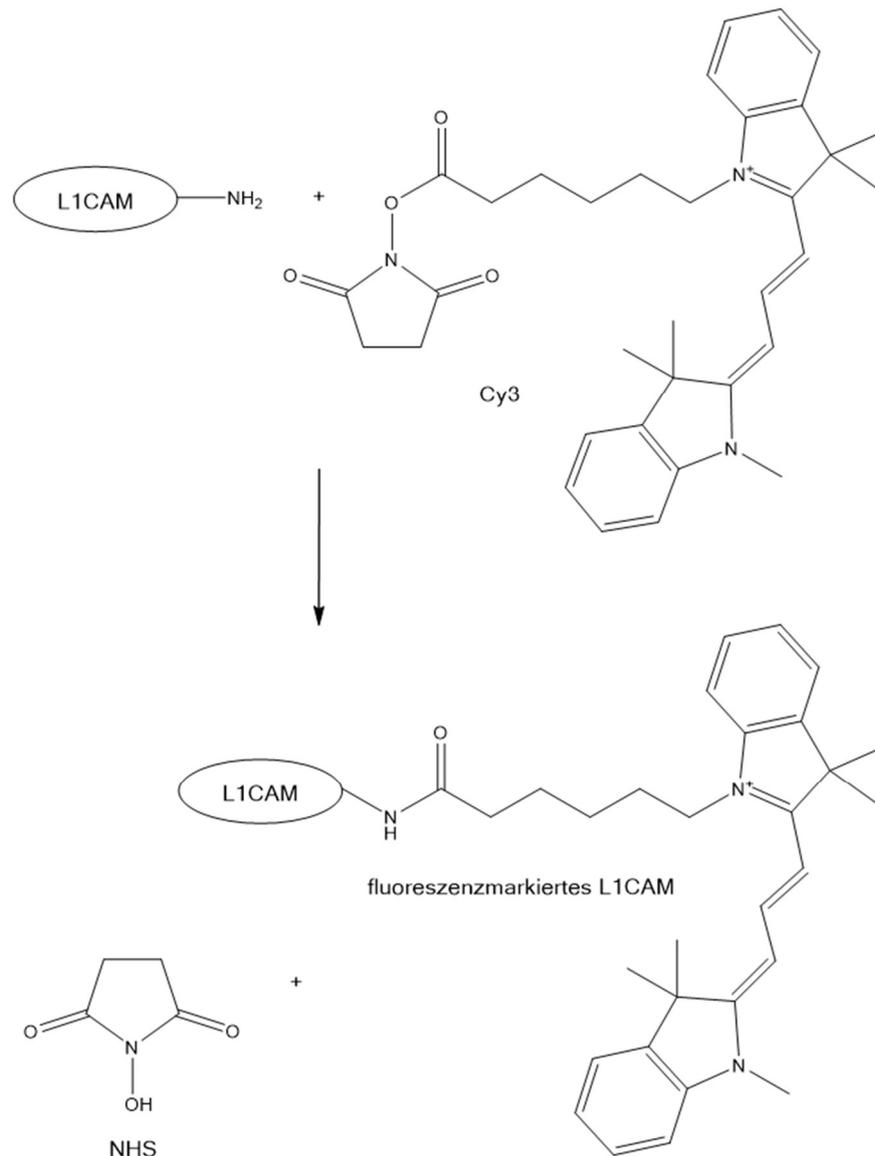


Abbildung 3.11: Reaktion des L1CAMs mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cyanin 3 NHS Ester ( $\text{Cy3}^{\text{®}}$ ), bei welcher unter Bildung einer Amidgruppe zwischen der Aminogruppe des L1CAMs und der Estergruppe des  $\text{Cy3}^{\text{®}}$  ein *N*-Hydroxysuccinimid (NHS) als reaktive Abgangsgruppe vom  $\text{Cy3}^{\text{®}}$  abgespalten wird.

Hierfür wurde das von Sino Biological Inc. bezogene L1CAM mit einer Proteinkonzentration von  $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  verwendet. Ungebundenes  $\text{Cy3}^{\text{®}}$  wurde durch Gel-Permeations-Chromatographie entfernt. Es resultierte ein  $\text{Cy3}^{\text{®}}$  / Protein-Verhältnis von 11.5, durchschnittlich wurden folglich 11.5 Farbstoffmoleküle an ein Protein gebunden.

Nach der Immobilisierung des farbstoffmarkierten L1CAM auf der modifizierten Goldoberfläche wurden die Proben mit PBS abgespült und mit ProLong<sup>®</sup> gold antifade Reagenz zwischen zwei Glasobjektträgern konserviert. Die Proben wurden

mithilfe eines Auflichtmikroskops des Typs BX51 des Herstellers Olympus bei 4- und 40-facher Vergrößerung untersucht, wobei Belichtung und Kontrast automatisch von der Gerätesoftware eingestellt wurden. Um für die Auswertung aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten, wurden jeweils zwei Proben mit identischen Parametern hergestellt und von jeder Probe jeweils drei Aufnahmen angefertigt. Für die Analyse wurden die Software cellSense von Olympus (Tokio, Japan) und ImageJ 1.50i des National Institutes of Health (Bethesda, USA) verwendet.

#### 3.2.4.2 Bestimmung der immunologisch aktiven L1CAM Menge

Zur Quantifizierung der immobilisierten immunologisch aktiven L1CAM-Menge wurde ein antikörperbasiertes Nachweisverfahren (*enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA) von antibodies-online GmbH (Aachen, Deutschland) direkt auf der mit L1CAM beschichteten Goldoberfläche durchgeführt (Abbildung 3.12).

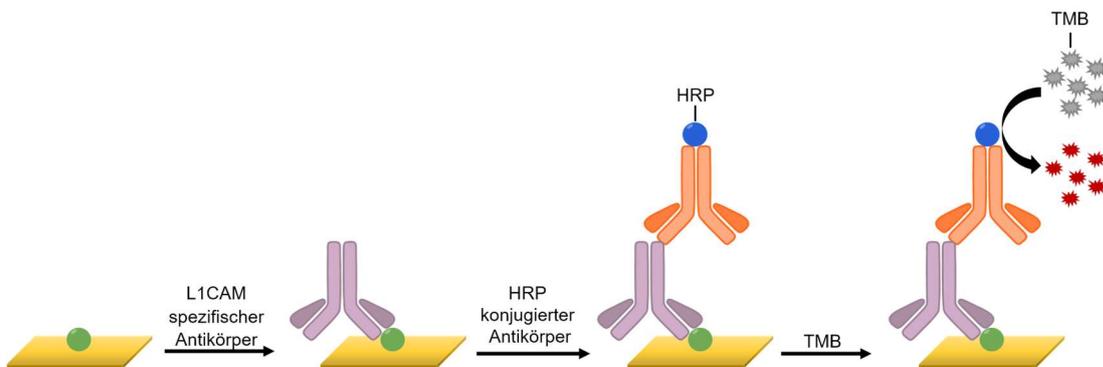


Abbildung 3.12: Schematische Durchführung der L1CAM-Quantifizierung via ELISA. An das auf der Goldoberfläche immobilisierte L1CAM (grün) bindet im ersten Reaktionsschritt selektiv ein Biotin-konjugierter Antikörper (violett). Im zweiten Reaktionsschritt wird ein Avidin-konjugierter Antikörper (orange) mit dem gebundenem Reporterezym HRP (blau) selektiv angebinden, an welchem im dritten Reaktionsschritt TMB (grau) enzymatisch unter Erzeugung eines Farbumschlags umgesetzt wird.

Die mit L1CAM modifizierten Goldsubstrate wurden in Teflonhalterungen (vgl. S. 63) eingespannt und 100  $\mu$ L des Detektionsreagenz A, welches einen Biotin-konjugierten L1CAM-spezifischen Antikörper enthält, in die Öffnung der Teflonzelle gegeben und für 1 h bei 37  $^{\circ}$ C gelagert. Nach dem dreimaligen Waschen mit 350  $\mu$ L TBS (*tris-buffered saline*) für 1 bis 2 min wurde der Waschpuffer vollständig entfernt und anschließend 100  $\mu$ L des Detektionsreagenz B, welches einen Avidin-konjugierten Antikörper mit gebundener Meerrettichperoxidase (*horseradish peroxidase*, HRP) enthält, für 30 min bei 37  $^{\circ}$ C auf der Probenoberfläche inkubiert. Anschließend wurden die Proben fünf weitere Male mit TBS gewaschen. Zur Erzeugung des Farbumschlags wurden zu jeder Probe 90  $\mu$ L Tetramethylbenzidin (TMB)-Substratlösung hinzugegeben und für 15 min bei 37  $^{\circ}$ C unter Lichtausschluss inkubiert. Die

Enzym-Substrat-Reaktion wurde durch Zugabe von 50  $\mu\text{L}$  einer  $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  Schwefelsäure beendet. Die Farbveränderung des Überstandes wurde an einem Photometer des Typs EON<sup>TM</sup> des Herstellers BioTek bei einer Wellenlänge von 450 nm detektiert.

Zur weiteren Quantifizierung der immobilisierten immunologisch aktiven L1CAM-Menge sollte diese durch Ablösen von der Goldoberfläche nachgewiesen werden. Da durch Cyclovoltammetrie bereits Thiole von Goldoberflächen entfernt werden konnten<sup>206</sup>, wurde eine Kombination aus Cyclovoltammetrie (CV) und ELISA angewendet. Zunächst wurde Cysteamin, welches als Verbindermolekül zwischen der Goldoberfläche und dem L1CAM fungiert, mittels CV an einem Versastat 4 von Princeton Applied Research durch Oxidations- oder Reduktionsprozesse von der Goldoberfläche gelöst. In dem verwendeten Drei-Elektroden-Aufbau diente das beschichtete Goldsubstrat als Arbeitselektrode, ein Platinnetz mit einer Größe von  $2.54 \times 2.54 \text{ cm}^2$  und einer Maschendicke von  $3 \mu\text{m}$  wurde als Gegenelektrode eingesetzt. Die Referenzelektrode bestand aus einem Silber/Silberchlorid System mit gesättigter Kaliumchlorid-Silberchlorid-Lösung. Um keine Änderung des Systemwiderstands zu erzeugen und folglich vergleichbare Ergebnisse zu erhalten, wurden bei jeder Messung die Abstände zwischen den Elektroden in einer eigens konstruierten Messzelle (vgl. S. 43) gleich gehalten. Da die Immobilisierung mit L1CAM bereits in PBS durchgeführt wurde und auch die immunologische Aktivität von L1CAM in PBS erhalten bleibt, wurde als Elektrolyt PBS eingesetzt. Vor Beginn der CV wurde das Leerlaufpotential (*open circuit potential*, OCP) gemessen. Sobald dieses für 120 s konstante Werte aufwies und sich somit ein Gleichgewicht in der Messzelle eingestellt hatte, wurde die CV zur oxidativen Entfernung in einem Potentialbereich von 0 V bis 1.2 V mit einer Geschwindigkeit der Potentialänderung von  $0.001 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$  gestartet. Die Entfernung der Thiolgruppe durch Reduktionsprozesse wurde in dem Potentialbereich von 0 V bis  $-1.2 \text{ V}$  durchgeführt.

Im Anschluss an die elektrochemische L1CAM-Entfernung durch die CV wurden die Elektrolyten hinsichtlich ihrer enthaltenden L1CAM-Konzentrationen mithilfe eines Sandwich-ELISAs von antibodies-online GmbH (Aachen, Deutschland) untersucht (siehe Abbildung 3.13).

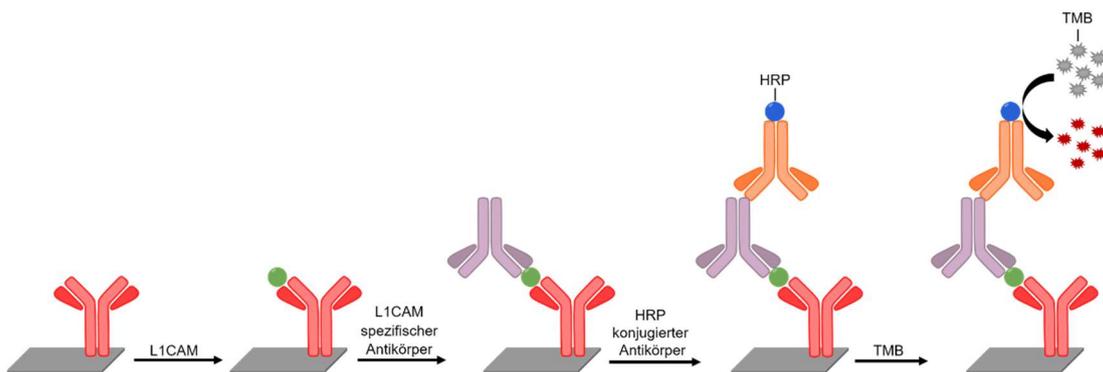


Abbildung 3.13: Schematische Durchführung der L1CAM-Quantifizierung via des Sandwich-ELISA. Mit dem bereits auf der Mikrotiterplatte immobilisierten primären Antikörper (rot) reagiert L1CAM (grün) spezifisch im ersten Reaktionsschritt, woraufhin im zweiten Reaktionsschritt selektiv ein Biotin-konjugierter Antikörper (violett) an das L1CAM gebunden wird. Im dritten Reaktionsschritt wird wiederum ein Avidin-konjugierte Antikörper (orange) mit dem gebundenem Reporterenzym HRP (blau) angelagert, an welchem im vierten Reaktionsschritt TMB (grau) enzymatisch unter Erzeugung eines Farbumschlags umgesetzt wird.

Zunächst wurden jeweils 100  $\mu\text{L}$  der zu untersuchenden Elektrolyten aus der CV, sowie acht Lösungen verschiedener L1CAM-Konzentrationen zwischen 0 und 1000  $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$  zur Anfertigung einer Kalibrierung für 2 h bei 37 °C in einer schon mit primären Antikörper ausgestatteten 96-Well-Mikrotiterplatte inkubiert. Nach Entfernen der Probenlösungen wurden, ohne einen Waschschrift durchzuführen, 100  $\mu\text{L}$  des Detektionsreagenz A, welches einen Biotin-konjugierten L1CAM-spezifischen Antikörper enthält, hinzugefügt und für 1 h bei 37 °C gelagert. Nach dem dreimaligen Waschen mit 350  $\mu\text{L}$  TBS für 1 bis 2 min wurde der Waschpuffer vollständig entfernt und anschließend 100  $\mu\text{L}$  des Detektionsreagenz B, welche Avidin-konjugierte Meerrettichperoxidase (*horseradish peroxidase*, HRP) enthält, für 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Platte fünf weitere Male mit TBS gewaschen. Zur Erzeugung des Farbumschlags wurden zu jeder Well 90  $\mu\text{L}$  TMB-Substratlösung hinzugegeben und für 15 min bei 37 °C unter Lichtausschluss inkubiert. Die Enzym-Substrat-Reaktion wurde durch Zugabe von 50  $\mu\text{L}$  einer 1  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  Schwefelsäure beendet. Die Farbveränderung wurde an einem Photometer des Typs EON<sup>TM</sup> des Herstellers BioTek bei einer Wellenlänge von 450 nm detektiert.

Um das Ablöseverhalten des Cysteamins von der Goldoberfläche durch die Cyclovoltammetrie genauer beurteilen zu können, wurden Kontaktwinkelmessungen durchgeführt. Hierfür wurden die mit Cysteamin beschichteten Goldoberflächen wiederum cyclovoltammetrisch behandelt und anschließend unter dem Kontaktwinkelmessgerät der Firma OEG vom Typ Surfens Universal mit Reinstwasser als Messmedium untersucht. Als Vergleichsproben wurden sowohl blanke als auch mit Cysteamin beschichtete Goldoberflächen analysiert. Um die

Herstellungsparameter der Proben möglichst vergleichbar zu halten, wurden die unbehandelten Goldsubstrate parallel zur Modifizierung der Cysteaminbeschichteten Proben in reinem Ethanol gelagert.

Zur weiteren Beurteilung des Ablöseverhaltens des Cysteamins durch Cyclovoltammetrie diente ein kolorimetrischer Nachweis von Aminogruppen nach Cook *et al.*<sup>229</sup>, welcher direkt auf der Goldoberfläche durchgeführt werden konnte. Zunächst wurden zur Herstellung einer Stammlösung 22.4 mg Sulfosuccinimidyl-4-o-(4,4-dimethoxytrityl)butyrat (sulfo-SDTB) und 1 mL Dimethylformamid (DMF) in 4 mL eines  $0.05 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  Natriumhydrogencarbonat-Puffers gegeben. Durch Verdünnung der Stammlösung mit 35% Perchlorsäure wurde eine Kalibrierung mit acht unterschiedlichen Konzentrationen zwischen  $0.33 \text{ nmol mL}^{-1}$  und  $41 \text{ nmol mL}^{-1}$  angefertigt. Um die Ablösung des Cysteamins zu analysieren, wurden sowohl cyclovoltammetrisch behandelte wie auch unbehandelte Cysteamin-modifizierte Goldsubstrate untersucht. Diese wurden für 10 min in 2 mL der oben beschriebenen sulfo-SDTB-Stammlösung gelegt, wodurch, wie in Abbildung 3.14 gezeigt, jede freie Aminogruppe mit einem sulfo-SDTB-Molekül reagierte und *N*-Hydroxysulfosuccinimid-Natriumsalz (sulfo-NHS) abgespalten wurde.

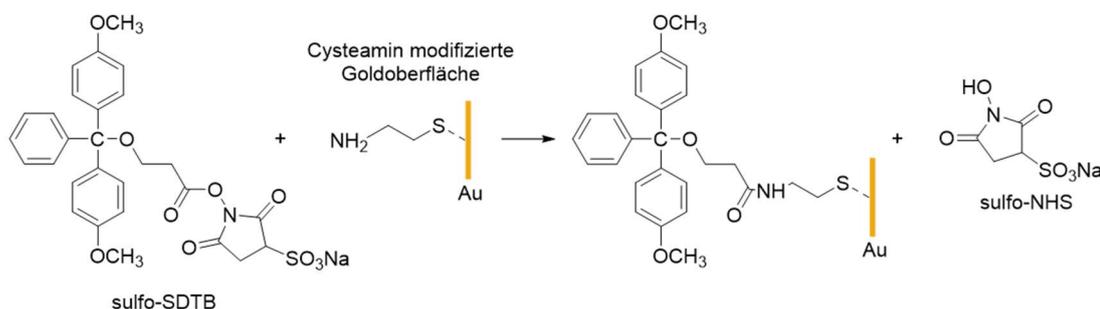


Abbildung 3.14: Reaktion der Cysteamin-modifizierten Goldoberfläche mit sulfo-SDTB während der kolorimetrischen Analyse von Aminogruppen.

Zur Entfernung der nicht angebondenen sulfo-SDTB-Moleküle wurden die Proben mit 1 mL Reinstwasser gespült und für weitere 10 min in 10 mL Reinstwasser gelagert. Durch Inkubieren der Proben in 2 mL 35% Perchlorsäure für 10 min wurden die an den Aminogruppen gebundenen 4,4'-Dimethoxytrityl-Kationen abgespalten, welche eine konzentrationsabhängige Farbveränderung hervorriefen (Abbildung 3.15).

### 3 Materialien und Methoden

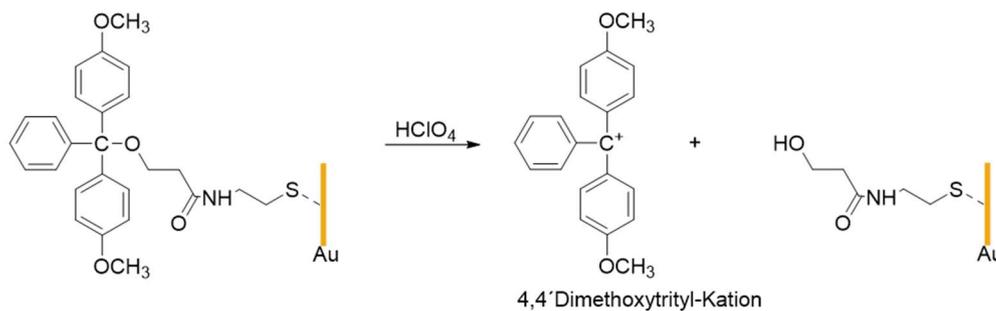


Abbildung 3.15: Abspaltung des an der Goldoberfläche angebundenen 4,4-Dimethoxytrityl-Kationen durch Zugabe von Perchlorsäure während der kolorimetrischen Analyse von Aminogruppen.

Die Farbveränderung der Probenüberstände wurde an einem Photometer des Typs EON™ des Herstellers BioTek bei einer Wellenlänge von 498 nm detektiert und die Konzentrationen der auf der Goldoberfläche angebundenen Aminogruppen mit Hilfe der Kalibrierung bestimmt.

## 4 Ergebnisse und Diskussion

In diesem Kapitel werden zum einen die Ergebnisse der elektrochemisch abgeschiedenen nanoporösen Platinbeschichtungen und zum anderen der Immobilisierung von L1CAM auf Gold vorgestellt und diskutiert.

Dabei werden zunächst die Oberflächen und Schichtdicken der nanoporösen Platinbeschichtung mit kleinen Porendurchmessern (*small pore nanoporous platinum*, sp-NPpt) sowie mit größeren Porendurchmessern (*large pore nanoporous platinum*, lp-NPpt) charakterisiert und der Einfluss des Porensystems auf die elektrischen Eigenschaften untersucht. Im weiteren Verlauf werden im Hinblick auf die Anwendung als neuronales Elektrodenmaterial Cytokompatibilitätsuntersuchungen der sp-NPpt und lp-NPpt ausgewertet. Für das sp-NPpt wird außerdem die chemische Modifizierung mit unterschiedlichsten Thiolen analysiert, sowie die Charakterisierung der Freisetzung überstände aus Rolipram-Freisetzungsversuchen vorgestellt. Zusätzlich werden die Einflüsse der Freisetzung auf das sp-NPpt durch weitere Oberflächenuntersuchungen und elektrische Charakterisierungen bestimmt.

Im zweiten Abschnitt wird die Immobilisierung von L1CAM auf Goldoberflächen charakterisiert, indem zunächst die Verteilung und die Flächenbedeckung des Proteins bestimmt wird. Anschließend wird die immobilisierte immunologisch aktive L1CAM-Menge durch ein antikörperbasiertes Nachweisverfahren direkt auf der Goldoberfläche, als auch durch Ablösen via Cyclovoltammetrie und Analyse der Überstände bestimmt. Um das Ablöseverhalten des L1CAMs genauer zu charakterisieren, werden abschließend Kontaktwinkelmessungen sowie kolorimetrische Analysen von Aminogruppen auf den Goldoberflächen dargestellt.

### 4.1 Nanoporöse Platinbeschichtungen

Für die Herstellung nanoporöser Platinbeschichtungen wurden im Rahmen dieser Arbeit elektrochemische Abscheidungsverfahren unter Verwendung unterschiedlicher Template entwickelt. Zunächst wurden die Beschichtungen auf käuflich erworbenen, mit Gold beschichteten Siliciumwafern durchgeführt. Im Laufe dieser Arbeit wurden die Goldsubstrate durch die vom IMPT hergestellten Platinsubstrate ersetzt, da somit ein näherer Bezug zur Beschichtung der Platinkontakte des Cochlea-Implantats geschaffen werden konnte.

#### 4.1.1 Nanoporöse Platinbeschichtung mit kleinen Porendurchmessern

Zur elektrochemischen Herstellung nanoporöser Platinbeschichtungen mit kleinen Porendurchmessern von 10 nm (*small pore nanoporous platinum*, sp-NPPt) wurde mit Pluronic® F127 ein Mizellenbildner als Templat in der Elektrolytlösung eingesetzt. Durch die anschließende Templatentfernung wurden poröse Beschichtungen erzeugt. Diese werden im Folgenden genauer erläutert und diskutiert.

##### 4.1.1.1 Oberflächen- und Schichtdickencharakterisierung

Zunächst wurden Goldsubstrate mit der in Abschnitt 3.1.2.1 erläuterten Standardmethode unter Anlegen von 2000 Abscheidungszyklen beschichtet. Der Vergleich der fotografischen Aufnahmen eines unbeschichteten Goldsubstrats und eines mit sp-NPPt beschichteten Goldsubstrats ist in Abbildung 4.1 zu sehen.

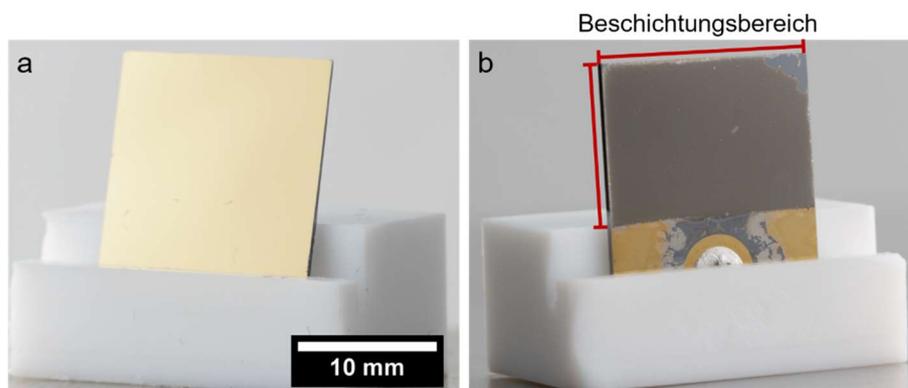


Abbildung 4.1: Fotografische Aufnahme eines unbeschichteten Goldsubstrats (a) und eines mit sp-NPPt beschichteten Goldsubstrats (b) unter Verwendung der Elektrolysezelle 1.

Durch die elektrochemische Platinabscheidung konnte eine homogene schwarzgraue Beschichtung erzeugt werden (Abbildung 4.1). An der oberen rechten Ecke der Probe löste sich während des Beschichtungsprozess ein Teil der Goldbeschichtung ab. Da der Großteil der Beschichtung eine gute mechanische Stabilität aufwies, wurde dieses Substrat zur weiteren Charakterisierung der Beschichtung im Rasterelektronenmikroskop (REM) untersucht (Abbildung 4.2).

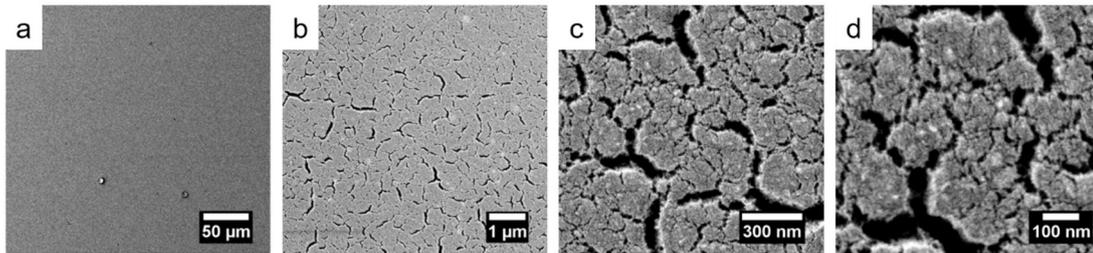


Abbildung 4.2: REM-Aufnahmen einer sp-NPPt-Beschichtung auf Gold unter Verwendung der Standardsynthesebedingungen in Elektrolysezelle 1.

Auf der Übersichtsaufnahme in Abbildung 4.2a ist eine homogene Beschichtung erkennbar. Diese weist statistisch verteilte Risse mit einer Breite zwischen 20 und 85 nm und einer Länge von 60 nm bis 400 nm (Abbildung 4.2b, c) auf. In Abbildung 4.2d ist keine dichte Schicht, sondern vielmehr eine poröse Beschichtung mit Porendurchmessern von kleiner 7 nm zu sehen.

Im Hinblick auf die Anwendung als Beschichtungsmaterial für neuronale Elektrodenkontakte, welche heutzutage aus Platin bestehen, wurden die Goldsubstrate durch Platin-beschichtete Siliciumwafer ersetzt und die gewonnenen Erkenntnisse bezüglich der Synthesebedingungen zur Beschichtung der Platinsubstrate angewendet. In Abbildung 4.3 ist der Vergleich eines unbeschichteten Platinsubstrats mit der durch elektrochemische Platinabscheidung erzeugten Beschichtung dargestellt.

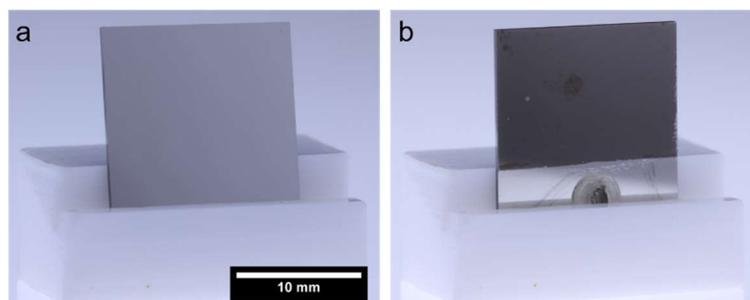


Abbildung 4.3: Fotografische Aufnahme eines unbeschichteten Platinsubstrats (a) und eines mit sp-NPPt beschichteten Platinsubstrats (b) unter Verwendung der Elektrolysezelle 1.

Auch auf dem Platinsubstrat konnte, analog zu den Goldsubstraten, eine homogene schwarz-graue Beschichtung erzeugt werden. Die Beschichtungen werden anhand der rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen, welche in Abbildung 4.4 gezeigt sind, genauer beurteilt.

#### 4 Ergebnisse und Diskussion

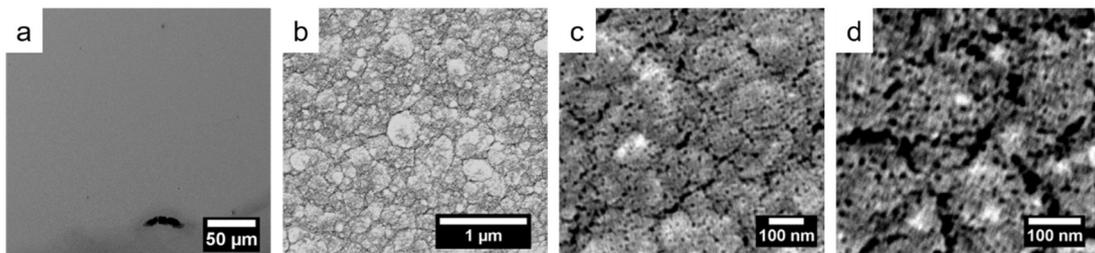


Abbildung 4.4: REM-Aufnahme einer sp-NPpt-Beschichtung auf Platin unter Verwendung der Standardsynthesebedingungen in Elektrolysezelle 1.

Bei höherer Vergrößerung wird sichtbar, dass sich die Oberflächenstruktur der homogenen Platinbeschichtung auf Platin von der auf Gold abgeschiedenen Platinbeschichtung (vgl. Abbildung 4.2) unterscheidet. Die hier gezeigte Oberfläche ist dichter, die einzelnen Bereiche mit unterschiedlichen Kontrasten lassen auf eine deutlich rauere Oberfläche schließen. Weitere Vergrößerungen zeigen gut erkennbare Poren mit Durchmessern von etwa 10 nm, welche wiederum unsystematisch verteilt vorliegen und im Vergleich zu der Beschichtung auf Gold größer sind. Die vorhandenen Risse weisen eine Breite zwischen 20 und 30 nm und eine Länge von 90 nm bis 250 nm auf und sind damit im Vergleich zu den Rissen der Beschichtung auf dem Goldsubstrat deutlich kleiner.

Zur Schichtdickenbestimmung eines mit 1000 Zyklen beschichteten Platinsubstrats wurden Höhenprofile am Konfokalmikroskop angefertigt. In Abbildung 4.5 ist eine fotografische Aufnahme (a) der vermessenen Probe sowie die drei konfokalmikroskopischen Bilder (b, c, d) mit Markierung an den jeweiligen gemessenen Bereichen dargestellt.

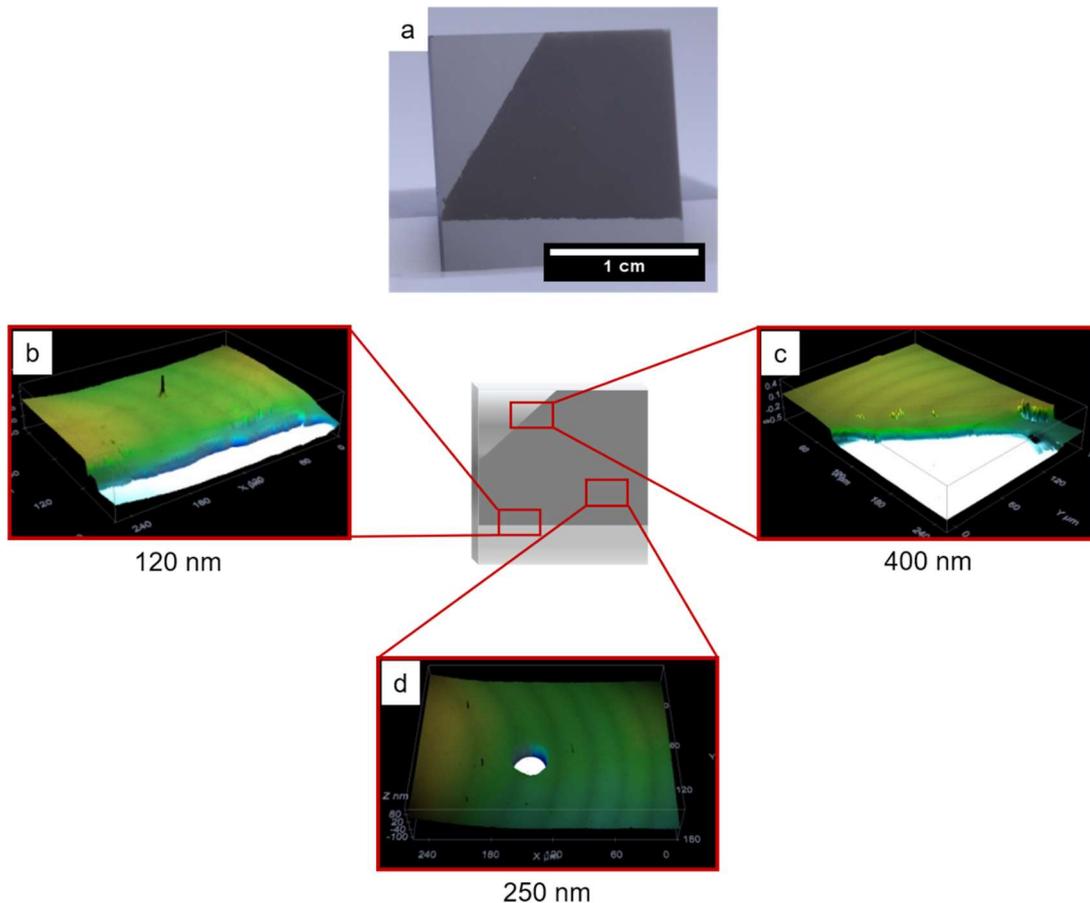


Abbildung 4.5: Konfokalmikroskopische Aufnahmen zur Schichtdickenbestimmung einer sp-NPpt-Beschichtung auf Platin, die unter Verwendung der Standardsynthesebedingungen mit 1000 Abscheidungszyklen in Elektrolysezelle 1 hergestellt wurden.

Auf den konfokalmikroskopischen Aufnahmen sind in allen drei Messbereichen scharfe Kanten erkennbar, an denen die Schichtdicke vermessen werden konnte. An der unteren Kante der sp-NPpt-Beschichtung (Abbildung 4.5b), die an den Tesafilm® zum Abdecken des Kupferdrahtkontakts grenzte, wurde die geringste Schichtdicke mit 120 nm gemessen. An der Kante des extra für die konfokalmikroskopische Messung abgeklebten Bereichs der sp-NPpt-Beschichtung (Abbildung 4.5c) ist die Schicht mit 400 nm mehr als doppelt so dick. Mittig auf der Probenoberfläche konnte ein unbeschichteter kreisförmiger Bereich gefunden werden (Abbildung 4.5d), welcher vermutlich durch eine an der Substratoberfläche anhaftende Luftblase während der elektrochemischen Abscheidung entstanden ist. An dieser zufällig entstandenen Kante wurde ergänzend die Schichtdicke bestimmt. Diese liegt mit 250 nm genau zwischen den Schichtdicken der beiden anderen Beschichtungskanten. Daher entsprechen die gemessenen Schichtdicken an künstlich erzeugten Kanten, wie durch Abkleben mit Tesafilm®, vermutlich nicht den tatsächlichen Schichtdicken

der Beschichtung. Möglicherweise beeinflusst der Tesafilm® bei der elektrochemischen Abscheidung die Benetzbarkeit der Substratoberfläche, wodurch an der oberen Kante eine deutlich dickere Beschichtung gebildet wurde. Da sich die untere Kante während der elektrochemischen Abscheidung an der Grenzfläche zwischen Elektrolytoberfläche und Luft befindet, sollte dort aufgrund der beeinflussten Benetzung mit Elektrolyselösung keine Schichtdicke bestimmt werden. Alle drei analog hergestellten sp-NPPt-Beschichtungen zeigten ähnliche Schichtdicken, daher lässt sich trotzdem anhand konfokalmikroskopischer Messungen eine Abschätzung der Schichtdicke im Bereich zwischen 100 und 400 nm vornehmen. Die Höhenprofile dieser konfokalmikroskopischen Messungen sind im Anhang in Abbildung 7.3 auf S. 210 aufgeführt.

Rückschlüsse auf die Porosität der sp-NPPt-Beschichtungen können durch die Bestimmung der spezifischen Oberfläche gezogen werden. Hierfür wurden Krypton-Physisorptionsmessungen an sp-NPPt-Beschichtungen mit 1000 sowie 2000 Abscheidungszyklen durchgeführt. Die Adsorptions- und Desorptionskurven dieser Messungen sind in Abbildung 4.6 dargestellt.

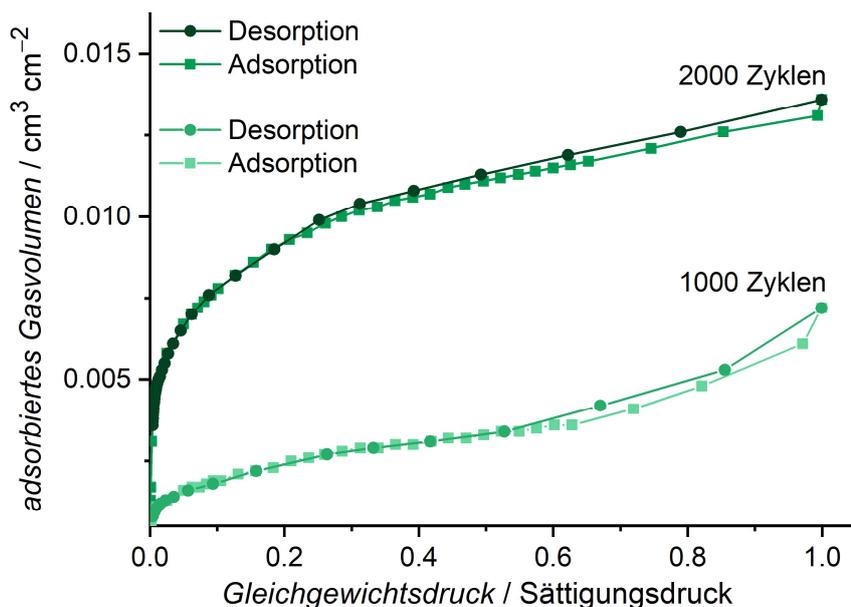


Abbildung 4.6: Krypton-Physisorptionsmessungen an sp-NPPt-Beschichtungen auf Platin, die unter Verwendung der Standardsynthesebedingungen mit 1000 (hellgrün) und 2000 (dunkelgrün) Abscheidungszyklen in Elektrolysezelle 1 hergestellt wurden.

An der mit 2000 Abscheidungszyklen hergestellten sp-NPPt-Beschichtung wurde deutlich mehr Krypton adsorbiert als an der mit 1000 Zyklen abgeschiedenen sp-NPPt-Beschichtung. Der direkte Vergleich der spezifischen Oberflächen und der Porenvolumina ist in Abbildung 4.7 gezeigt.

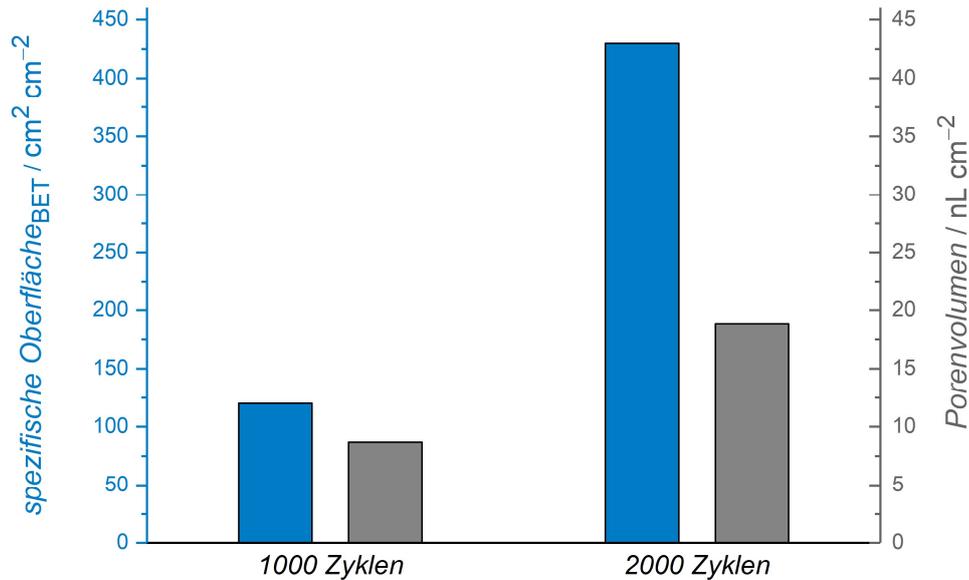


Abbildung 4.7: Vergleich der spezifischen Oberflächen und Porenvolumina von sp-NPPt-Beschichtungen auf Platin, die unter Verwendung der Standardsynthesebedingungen mit 1000 und 2000 Abscheidungszyklen in Elektrolysezelle 1 hergestellt wurden.

Die spezifische Oberfläche wurde durch die sp-NPPt-Beschichtung unter Verwendung von 1000 Abscheidungszyklen auf  $120 \text{ cm}^2 \cdot \text{cm}^{-2}$  erhöht, mit 2000 Abscheidungszyklen wurde eine spezifische Oberfläche von  $430 \text{ cm}^2 \cdot \text{cm}^{-2}$  erreicht. Somit wurde die spezifische Oberfläche durch Verdopplung der Zyklenzahl mehr als verdreifacht. Auch das erzielte Porenvolumen wurde von  $9 \text{ nL} \cdot \text{cm}^{-2}$  für 1000 Abscheidungszyklen auf  $19 \text{ nL} \cdot \text{cm}^{-2}$  für 2000 Abscheidungszyklen verdoppelt. Vergleichsmessungen an unbeschichteten Platinsubstraten lieferten keine auswertbaren Ergebnisse. Folglich wurde die spezifische Oberfläche der unbeschichteten Platinsubstrate auf  $1 \text{ cm}^2 \cdot \text{cm}^{-2}$  festgelegt. Die erhöhte spezifische Oberfläche kann daher auf die sp-NPPt-Beschichtung zurückgeführt werden.

Zur Reduzierung der Vorbereitungszeit und Optimierung der Prozessfähigkeit wurde im Rahmen dieser Arbeit die in Abbildung 4.8 dargestellte Elektrolysezelle konstruiert (EZ 2; vgl. Abschnitt 3.1.1, S. 41).

#### 4 Ergebnisse und Diskussion

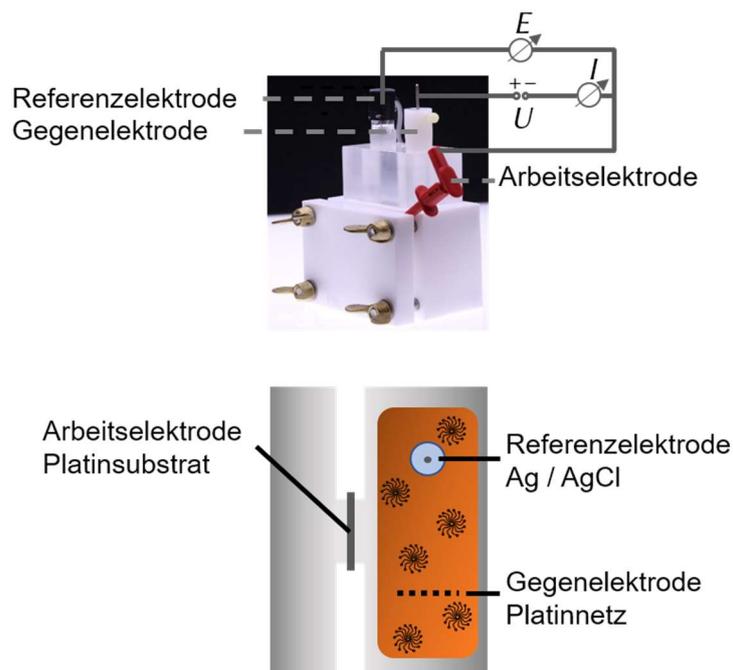


Abbildung 4.8: Fotografischer und schematischer Aufbau der zweiten Elektrolyse- bzw. Messzelle (EZ 2).

Der Aufbau erlaubt ein direktes Einspannen der Platinsubstrate ohne das vorherige Aufbringen eines Drahtes zur Kontaktierung der Arbeitselektrode. So kann eine optimale Benetzbarkeit der Substrate mit dem Elektrolyten durch eine deutlich kürzere Lagerung der Substrate an Luft erreicht werden, da der Trocknungsschritt des Leitlackes entfällt. Durch den passgenauen Deckel werden immer gleichbleibende Abstände zwischen der Arbeits-, Gegen- und Referenzelektrode sichergestellt. Dies ermöglicht einen definierten Systemwiderstand, wodurch eine direkte Vergleichbarkeit zwischen der Proben sowohl bei der elektrochemischen Abscheidung als auch bei den elektrochemischen Messmethoden ermöglicht wird.

Die Weiterentwicklung der Elektrolysezelle führte aufgrund des Aufbaus zu einer runden Beschichtung mit einem Durchmesser von 9.5 mm (Abbildung 4.9).

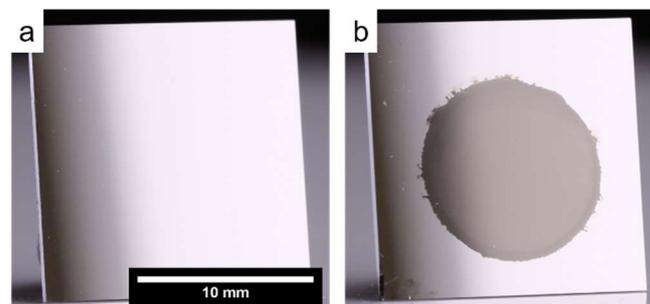


Abbildung 4.9: Fotografische Aufnahme eines unbeschichteten Platinsubstrats (a) und eines mit sp-NPPt beschichteten Platinsubstrats (b), das unter Verwendung der Standardsynthesebedingungen in Elektrolysezelle 2 hergestellt wurde.

Es bildete sich eine schwarz-graue Beschichtung mit einer guten makroskopischen Homogenität und Haftung auf dem Platinsubstrat. Die raster-elektronenmikroskopischen Aufnahmen in Abbildung 4.10 zeigen eine nanoporöse Beschichtung mit Porendurchmessern von etwa 10 nm, welche somit die gleiche Porengröße wie die sp-NPPt-Beschichtungen aus EZ 1 (vgl. Abbildung 4.4, S. 74) aufweisen.

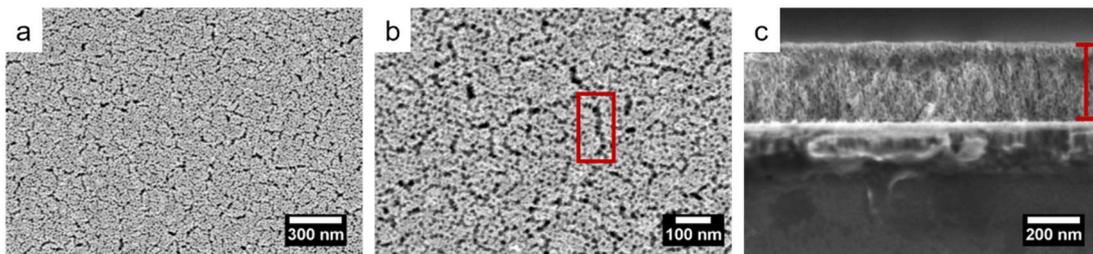


Abbildung 4.10: REM-Aufnahme einer sp-NPPt-Beschichtung, das unter Verwendung der Standardsynthesebedingungen mit 1000 Abscheidungszyklen in Elektrolysezelle 2 hergestellt wurden.

Im Vergleich zur sp-NPPt-Beschichtung aus EZ 1 erscheint die Oberfläche der Beschichtung aus EZ 2 aufgrund der geringen Kontrastunterschiede weniger rau. Auch fällt direkt auf, dass deutlich weniger Risse ausgebildet wurden und diese hier eher wie aneinander gereihete Poren wirken. Dies ist sehr gut in dem markierten Bereich in Abbildung 4.10b zu erkennen, in dem etwa 8-10 verknüpfte Poren vorliegen, wodurch sich ein Kanal mit einer Länge von 80 nm und einer dem Porendurchmesser entsprechenden Breite von 10 nm ausgebildet hat. Anhand der Querschnittsaufnahme (Abbildung 4.10c) kann die durch den roten Balken markierte Schichtdicke unter Verwendung von 1000 Abscheidungszyklen bestimmt werden, diese liegt bei etwa 310 nm. Das erkennbare Höhenprofil in der REM-Aufnahme zeigt in dem aufgenommenen Bereich mit einer Breite von 1,5  $\mu\text{m}$  eine gleichmäßige Schichtdicke, welche sich um maximal 10 nm unterscheidet. Dies entspricht einer Abweichung von 3%. Da dieser Ausschnitt nur einen geringen Bereich der Probe repräsentiert, kann bei dieser Messmethode nicht von einer global gültigen Aussage ausgegangen werden. Für die Querschnittsaufnahme wurde die Probe mittig zerbrochen, um Randeffekte zu vermeiden. Es ist in der Querschnittsaufnahme in Abbildung 4.10c deutlich erkennbar, dass die Beschichtung über die gesamte Dicke durchgehend nanoporös ist. Auch können in den Querschnittsaufnahmen keine Risse ausgemacht werden, welches die Annahme der verknüpften Poren bestätigt. Unter Verwendung von 2000 Potentialpulsen während der elektrochemischen Platinabscheidung ergibt sich, wie in Abbildung 4.11 zu sehen, eine ähnliche Oberflächenstruktur.

#### 4 Ergebnisse und Diskussion

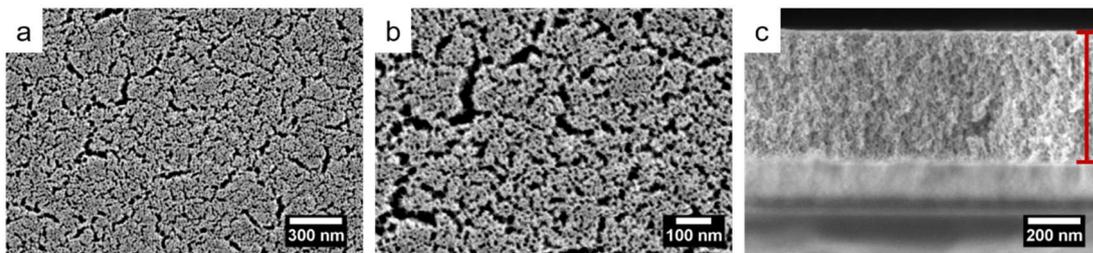


Abbildung 4.11: REM-Aufnahme einer sp-NPPt-Beschichtung auf Platin, das unter Verwendung der Standardsynthesebedingungen mit 2000 Abscheidungszyklen in Elektrolysezelle 2 hergestellt.

Schon in der Übersichtsaufnahme (Abbildung 4.11a) ist eine poröse Beschichtung erkennbar. Durch die Verdopplung der Abscheidungszyklen scheinen sich im Vergleich zu den bereits vorgestellten Beschichtungen (auf Gold: vgl. Abbildung 4.2, S. 73; EZ 1: vgl. Abbildung 4.4, S. 74) mehr Risse ausgebildet zu haben. Diese Risse weisen eine maximale Länge von etwa 230 nm und eine Breite von 50 nm auf. Die Porendurchmesser liegen wie schon bei den anderen sp-NPPt-Beschichtungen bei etwa 10 nm. Auf der Querschnittsaufnahme in Abbildung 4.11c kann entgegen der Aufsichtsaufnahme keine Rissbildung innerhalb der Beschichtung festgestellt werden. Somit handelt es sich entweder um oberflächliche Risse, oder die Aufnahme wurde entlang eines Risses aufgenommen. Außerdem kann es sich wiederum um die schon in Abbildung 4.10 besser erkennbaren Verknüpfungen von mehreren Poren handeln. Durch die Verdopplung der Abscheidungszyklen auf 2000 Potentialpulse wurde eine Beschichtung mit einer Dicke von 500 nm erhalten, welche wiederum über die gesamte aufgenommenen Breite um maximal 20 nm variiert. Dies entspricht einer Abweichung von 4%.

Krypton-Physisorptionsmessungen an in EZ 2 hergestellten sp-NPPt-Beschichtungen zeigten deutliche Unterschiede in der spezifischen Oberfläche im Vergleich zu in EZ 1 hergestellten sp-NPPt-Beschichtungen. (Abbildung 4.12, vgl. S. 76f).

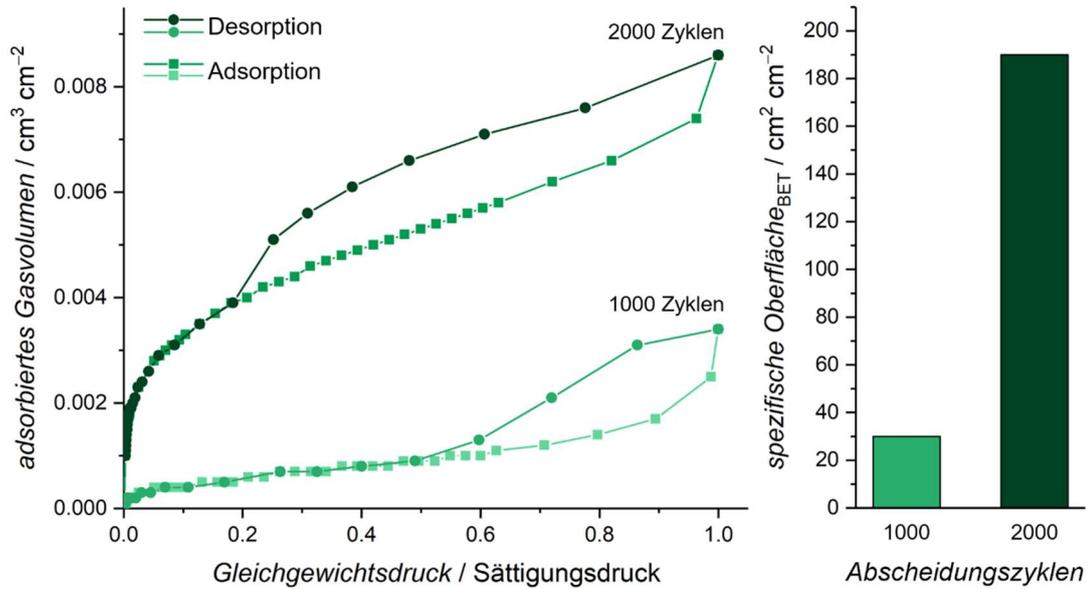


Abbildung 4.12: Krypton-Physisorptionsmessungen an sp-NPpT-Beschichtungen auf Platin, die unter Verwendung der Standardsynthesebedingungen mit 1000 (hellgrün) und 2000 (dunkelgrün) Abscheidungszyklen in Elektrolysezelle 2 hergestellt wurden.

Wie erwartet weist auch hier die sp-NPpT-Beschichtung, welche mit 2000 Zyklen abgeschieden wurde, eine deutlich höhere spezifische Oberfläche auf. Jedoch wurde die spezifische Oberfläche durch Verdopplung der Abscheidungszyklen von  $30 \text{ cm}^2 \cdot \text{cm}^{-2}$  auf  $190 \text{ cm}^2 \cdot \text{cm}^{-2}$  mehr als versechsfacht. Unter Verwendung der EZ 1 wurde durch Verdopplung der Abscheidungszyklen die spezifische Oberfläche ungefähr verdreifacht (vgl. Abbildung 4.7, S. 77). Der Vergleich der absoluten Werte zeigt, dass die sp-NPpT-Beschichtung aus EZ 1 mit  $120 \text{ cm}^2 \cdot \text{cm}^{-2}$  (1000) und  $430 \text{ cm}^2 \cdot \text{cm}^{-2}$  (2000) generell eine deutlich höhere spezifische Oberfläche aufweist. Vermutlich werden durch den veränderten Versuchsaufbau variierende Stromdichten an den Substraten erzeugt, weshalb in EZ 2 weniger sp-NPpT auf dem Platinsubstrat abgeschieden wurde. Dies bestätigt sich in den Schichtdickenmessungen. In EZ 1 wurden Schichtdicken von bis zu 400 nm bestimmt (vgl. Abbildung 4.5, S. 75), in EZ 2 wurde eine Schichtdicke von ungefähr 300 nm gemessen.

#### *Kurzzusammenfassung: Oberflächen- und Schichtdickencharakterisierung von sp-NPpT*

Zunächst wurde auf einem mit Kupferdraht kontaktierten goldbeschichteten Siliciumwafer eine homogene sp-NPpT-Beschichtung elektrochemisch abgeschieden. Diese wies verteilte Risse sowie zufällig verteilte Poren auf.

Durch den Transfer des Beschichtungsprozesses auf platinbeschichtete Siliciumwafer konnten homogene, vermutlich etwas rauere und dichtere sp-NPpT-Beschichtungen erzeugt werden. Diese Beschichtungen wiesen kleinere Risse auf.

Die Schichtdickenbestimmung über Konfokalmikroskopie zeigte, dass die Schichtdicke stark variiert. Diese deutlichen Schichtdickenunterschiede müssen nicht zwangsläufig durch den generellen Beschichtungsprozess hervorgerufen werden. Vielmehr können sie auf die Erzeugung der für die Konfokalmikroskopie nötigen Beschichtungskanten zurückgeführt werden. Somit eignet sich dieses Messverfahren ausschließlich für eine erste grobe Abschätzung der sp-NPPT-Schichtdicken. Durch Krypton-Physisorptionsmessungen konnten die durch die sp-NPPT-Beschichtungen hervorgerufenen Vergrößerung der spezifischen Oberfläche und Porenvolumen bestimmt werden. Hier konnte ein Zusammenhang zwischen der Erhöhung der Abscheidungszyklen und der daraus resultierenden Erhöhungen der spezifischen Oberfläche und des Porenvolumens gefunden werden.

Die Optimierung der Elektrolysezelle führte zu einer verbesserten Homogenität sowie einer minimierten Rissbildung der sp-NPPT-Beschichtungen. Durch raster-elektronenmikroskopische Querschnittsaufnahmen wurden die Schichtdicken dieser sp-NPPT-Beschichtungen bestimmt.

##### 4.1.1.2 Bestimmung der elektrischen Eigenschaften

Durch impedanzspektroskopische Messungen sollten die sp-NPPT-Beschichtungen auf ihre Eignung als Elektrodenmaterial grundlegend geprüft werden. Wie in Kapitel 3.1.6.2 (vgl. S. 49ff) bereits erläutert, stellen die zu charakterisierenden Proben aus einer nanoporösen Platinbeschichtung mit einem ungeordneten Porensystem und insgesamt drei Grenzschichten ein überaus komplexes System dar. Daher war eine Auswertung anhand der Nyquist-Auftragung (vgl. S. 208) sowie die Erstellung eines Ersatzschaltbildes nicht sinnvoll.

Infolgedessen wird der Betrag der Impedanz in Abhängigkeit der Frequenz betrachtet und die Spektren untereinander vergleichend diskutiert. Für den direkten Vergleich wurden alle Beträge der Impedanzen auf die Fläche normiert.

Die frequenzabhängigen Beträge der Impedanz der sp-NPPT-beschichteten Goldsubstrate im Vergleich zu unbeschichteten Goldoberflächen sind in Abbildung 4.13 dargestellt.

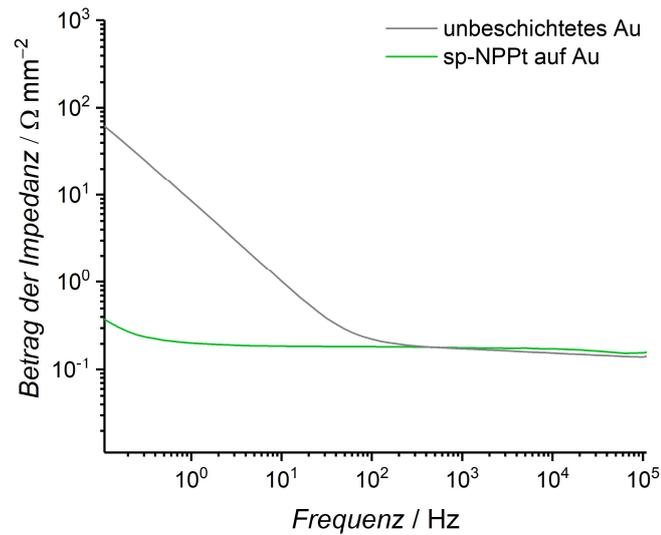


Abbildung 4.13: Impedanzspektroskopische Messung eines unbeschichteten Goldsubstrats (grau) und eines sp-NPPT-beschichteten Goldsubstrats (grün), das unter Verwendung der Standardsynthesebedingungen in Elektrolysezelle 1 hergestellt wurde.

Im hochfrequenten Bereich weisen beide Oberflächen die gleiche Impedanz von etwa  $0.13 \Omega \cdot \text{mm}^{-2}$  auf, was dem Elektrolytwiderstand  $R_E$  entspricht. Durch die sp-NPPT-Beschichtung wurde der Betrag der Impedanz im niederfrequenten Bereich ab einer Frequenz von ungefähr 200 Hz verringert. Ab dieser Frequenz steigt der Wechselstromwiderstand der blanken Goldoberfläche stark an, während die Impedanz der sp-NPPT-Beschichtung weiterhin einen Wert von  $0.13 \Omega \cdot \text{mm}^{-2}$  aufweist. Bei der kleinsten gemessenen Frequenz von 0.1 Hz wurde die Impedanz schlussendlich im Vergleich zu der blanken Goldoberfläche um etwa zwei Größenordnungen von  $66.4 \Omega \cdot \text{mm}^{-2}$  auf  $0.4 \Omega \cdot \text{mm}^{-2}$  herabgesetzt. Die Beschichtung von Platinsubstraten mit einer analogen sp-NPPT-Beschichtung zeigten vergleichbare Ergebnisse, dargestellt in Abbildung 4.14.

#### 4 Ergebnisse und Diskussion

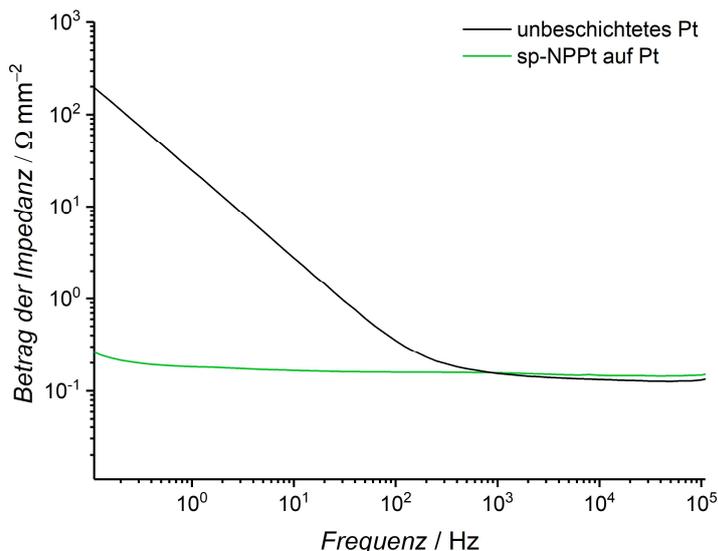


Abbildung 4.14: Impedanzspektroskopische Messung eines unbeschichteten Platinsubstrats (schwarz) und eines sp-NPPt-beschichteten Platinsubstrats (grün), das unter Verwendung der Standardsynthesebedingungen in Elektrolysezelle 1 hergestellt wurden.

Obwohl Gold und Platin ähnlich gute elektrische Eigenschaften besitzen, weisen die Wechselstromwiderstände der beiden Edelmetalle in der Form, in der sie hier verwendet werden, leichte Unterschiede auf. So steigt die Impedanz der blanken Platinoberfläche bereits ab einer Frequenz von 800 Hz deutlich an und beträgt bei 0.1 Hz  $213.5 \Omega \cdot \text{mm}^{-2}$ . Durch Beschichten mit sp-NPPt konnte die Impedanz bei 0.1 Hz wiederum auf  $0.3 \Omega \cdot \text{mm}^{-2}$  minimiert werden, was in etwa der Impedanz der sp-NPPt-Beschichtung auf Gold entspricht. Da die in Abbildung 4.13 und Abbildung 4.14 gezeigten Messungen in der gleichen Zelle und somit mit gleichem Aufbau durchgeführt wurden, weist der hier aufgenommene Elektrolytwiderstand  $R_E$  bei hohen Frequenzen den gleichen Wert von etwa  $0.13 \Omega \cdot \text{mm}^{-2}$  auf.

Im Verlauf dieser Arbeit wurde die Messzelle ersetzt (EZ 2, vgl. S. 43), wodurch sich der Messaufbau bezüglich der Elektrodenabstände änderte. Folglich weisen die in Abbildung 4.15 gezeigten Impedanzspektren einen anderen und mit ungefähr  $2.5 \Omega \cdot \text{mm}^{-2}$  deutlich höheren Elektrolytwiderstand  $R_E$  im Vergleich zu den in EZ 1 gemessenen Oberflächen auf. Auch ist der Wechselstromwiderstand der blanken Platinoberfläche bei 0.1 Hz mit  $630 \Omega \cdot \text{mm}^{-2}$  fast dreimal so hoch wie in EZ 1. Somit können die absoluten Impedanzen der Proben, welche in unterschiedlichen Messzellen vermessen wurden, nicht direkt miteinander verglichen werden. Sie werden nur mit Bezug auf die in der entsprechenden Messzelle untersuchte unbeschichtete Platinoberfläche diskutiert.

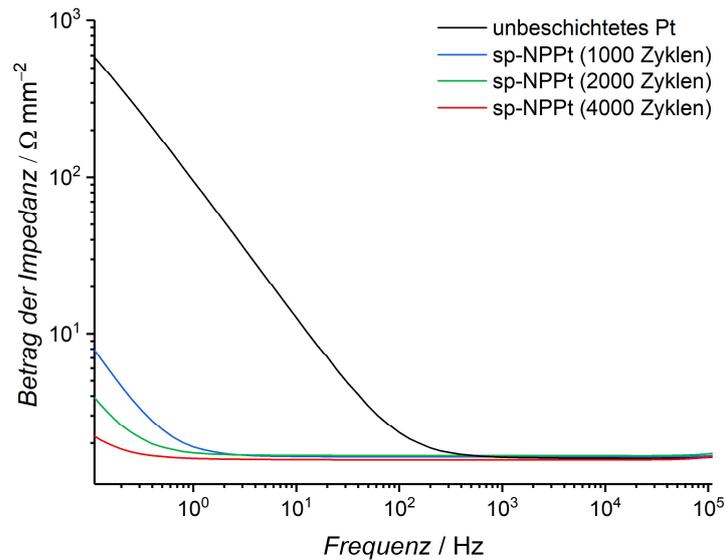


Abbildung 4.15: Impedanzspektroskopische Messungen eines unbeschichteten Platinsubstrats (schwarz) und sp-NPPt-beschichteten Platinsubstraten, die unter Verwendung der Standardsynthesebedingungen mit 1000 (blau), 2000 (grün) und 4000 (rot) Abscheidungszyklen in Elektrolysezelle 2 hergestellt wurden.

Der Vergleich der Impedanzen im niederfrequenten Bereich zeigt einen deutlichen Einfluss zwischen Impedanz und verwendeter Anzahl der Abscheidungszyklen. So weist die Beschichtung, welche mit 1000 Zyklen hergestellt wurde, bei 0.1 Hz eine Impedanz von  $8.6 \Omega \cdot \text{mm}^{-2}$  auf. Durch Verdopplung der Abscheidungszyklen konnte der Wechselstromwiderstand auf  $4.2 \Omega \cdot \text{mm}^{-2}$  halbiert werden. Eine weitere Verdopplung auf 4000 Zyklen führte wiederum zu einer Verringerung der Impedanz auf  $2.3 \Omega \cdot \text{mm}^{-2}$ . Im Vergleich zu der blanken Platinoberfläche führten alle sp-NPPt-Beschichtungen zu einer Verringerung der Impedanz um zwei Größenordnungen im niederfrequenten Bereich. Im Hinblick auf die Herstellung dickerer Platinbeschichtungen unter Verwendung höheren Zyklenzahlen (vgl. S. 79) und der damit größeren spezifischen Oberfläche (vgl. S. 81) kann die Verringerung der Impedanz im niederfrequenten Bereich mit der erhöhten spezifischen Oberfläche erklärt werden.<sup>230</sup> Jedoch ist eine Verbesserung der Impedanz durch sp-NPPt-Beschichtungen nur bei niedrigen Frequenzen zu erwarten. Der Elektrolytwiderstand  $R_E$ , welcher für die Impedanz bei höheren Frequenzen entscheidend ist, lässt sich nicht durch Oberflächenbeschaffenheiten der Elektrode, sondern ausschließlich durch den Gesamtaufbau des Systems, wie Elektrolyt und Elektrodenabstände, beeinflussen.

Durch cyclovoltammetrische Messungen sollen die integralen Ladungsmengen der unbeschichteten Platinoberflächen mit denen der sp-NPPt-Beschichtungen verglichen werden (Abbildung 4.16).

#### 4 Ergebnisse und Diskussion

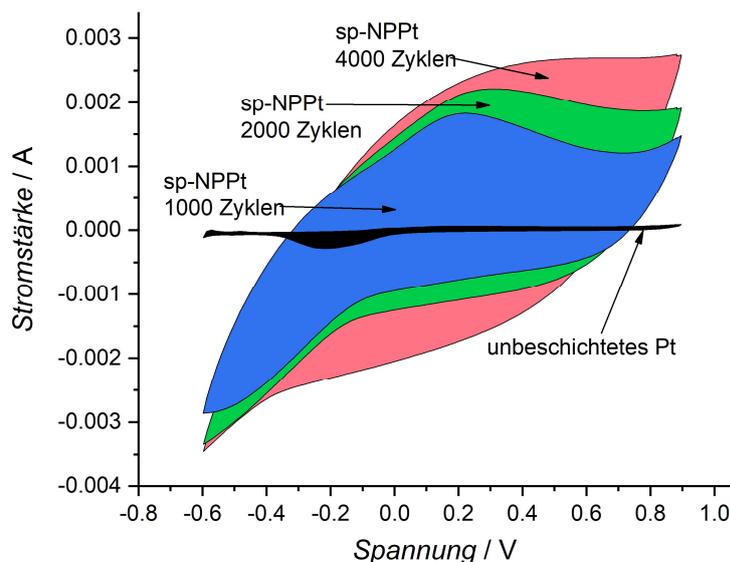


Abbildung 4.16: Cyclovoltammetrische Untersuchung von einem unbeschichteten Platinsubstrat (schwarz) und sp-NPPt-beschichteten Platinsubstraten, die unter Verwendung der Standardsynthesebedingungen mit 1000 (blau), 2000 (grün) und 4000 (rot) Abscheidungszyklen in Elektrolysezelle 2 hergestellt wurden.

Da in einem wässrigen System mit einer Silber/Silberchlorid-Referenzelektrode die Sauerstoffentwicklung bei 0.9 V und die Wasserstoffentwicklung bei  $-0.6$  V einsetzt, wurde die cyclovoltammetrische Messung im Spannungsbereich zwischen den Zersetzungspotentialen durchgeführt. Die in der Literatur<sup>101,217</sup> und im Rahmen dieser Arbeit verwendete Geschwindigkeit der Potentialänderung von  $0.1 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$  führte zu Cyclovoltogrammen, in denen die üblichen Oxidations- sowie Reduktionsreaktionen nicht klar erkennbar sind (vgl. S. 55). Trotzdem können anhand des Integrals der Cyclovoltogramme deutliche Unterschiede zwischen der unbeschichteten Platinoberfläche und den sp-NPPt-Beschichtungen festgestellt werden. Die blanke Platinoberfläche weist mit  $1.4\cdot 10^{-4}$  VA bereits eine deutlich kleinere Ladungsmenge als die sp-NPPt-Beschichtung auf, welche mit 1000 Zyklen elektrochemisch abgeschieden wurde ( $27.3\cdot 10^{-4}$  VA). Durch die Verdopplung der Zyklenzahl ergibt sich eine weitere Erhöhung der Ladungsmenge um 21% auf  $33.1\cdot 10^{-4}$  VA. Unter Anlegen von 4000 Abscheidungszyklen erfolgte eine weitere Erhöhung der integralen Ladungsmenge um 24% auf  $41.1\cdot 10^{-4}$  VA. Dieser Effekt kann wiederum mit Erhöhung der spezifischen Oberfläche erklärt werden, da durch eine für Reduktions- und Oxidationsreaktionen größere zugängliche Fläche eine höhere Ladungsmenge übertragen werden kann.

Die sp-NPPt-Beschichtung ermöglicht folglich den Transfer deutlich größerer Ladungsmengen über die Elektrodenschnittstelle zur Stimulation von Neuronen unter elektrochemisch sicheren Bedingungen. Somit wird eine Effizienzerhöhung der

Elektroden durch die Vergrößerung ihrer elektrochemisch aktiven Oberfläche erzeugt.<sup>101,170</sup>

### *Kurzzusammenfassung: Bestimmung der elektrischen Eigenschaften von sp-NPPt*

Impedanzspektroskopische Messungen zeigten durch sp-NPPt-Beschichtungen eine starke Verringerung der Impedanz im niederfrequenten Bereich im Vergleich zu blanken Gold- oder Platinoberflächen um zwei Größenordnungen. Durch den Vergleich von sp-NPPt-Beschichtungen mit 1000, 2000 und 4000 elektrochemischen Abscheidungszyklen, konnte ein Zusammenhang zwischen dem niederfrequenten Wechselwiderstand und der sp-NPPt-Schichtdicke festgestellt werden. Durch die Verdopplung der Abscheidungszyklen ergab sich bei einer Frequenz von 0.1 Hz jeweils in etwa eine Halbierung des Betrags der Impedanz.

Die durch cyclovoltammetrische Messungen bestimmte Ladungsmenge wurde außerdem durch sp-NPPt-Beschichtungen stark erhöht. Für blanke Platinoberflächen ergab sich eine Ladungsmenge von  $1.4 \cdot 10^{-4}$  VA, welche durch eine sp-NPPt-Beschichtung (1000 Abscheidungszyklen) auf  $27.3 \cdot 10^{-4}$  VA erhöht wurde. Die Verdopplung auf 2000 Abscheidungszyklen führte zu einer weiteren Erhöhung auf  $33.1 \cdot 10^{-4}$  VA, durch Anlegen von 4000 Abscheidungszyklen ergab sich eine Ladungsmenge  $41.1 \cdot 10^{-4}$  VA. Diese Erhöhung kann durch die vergrößerte spezifische Oberfläche der sp-NPPt-Beschichtung erklärt werden.

### **4.1.1.3 Cytokompatibilitätsuntersuchungen**

Für die Anwendung als biomedizinisches Beschichtungsmaterial für neuronale Elektroden spielt die Bestimmung der Cytokompatibilität der sp-NPPt-Beschichtungen eine entscheidende Rolle. Alle Zellkulturuntersuchungen wurden durch Jennifer Harre aus der Arbeitsgruppe von Dr. Athanasia Warnecke an der Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde (Leitung Prof. Dr. Thomas Lenarz) der Medizinischen Hochschule Hannover durchgeführt und gemeinsam ausgewertet. Begonnen wurden die Cytokompatibilitätsuntersuchungen zunächst mit murinen NIH3T3-Fibroblasten, welche das grün fluoreszierende Protein (*green fluorescent protein*, GFP) exprimieren. Anschließend wurde die Zellüberlebensrate der aus dem Innenohr stammenden Spiralganglienzellen auf sp-NPPt-Beschichtungen untersucht, um die Eignung des Beschichtungsmaterials speziell für das Cochlea-Implantat zu evaluieren. Da die Elektrodenkontakte des Cochlea-Implantats heutzutage aus dichtem Platin bestehen und diese als sehr gut biokompatibel gelten, wurden als Kontrolle unbeschichtete Platinsubstrate verwendet.

Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der Zellkulturuntersuchungen mit NIH3T3-Fibroblasten auf sp-NPPt sowie unbeschichtetem Platin sind in Abbildung 4.17 dargestellt.

#### 4 Ergebnisse und Diskussion

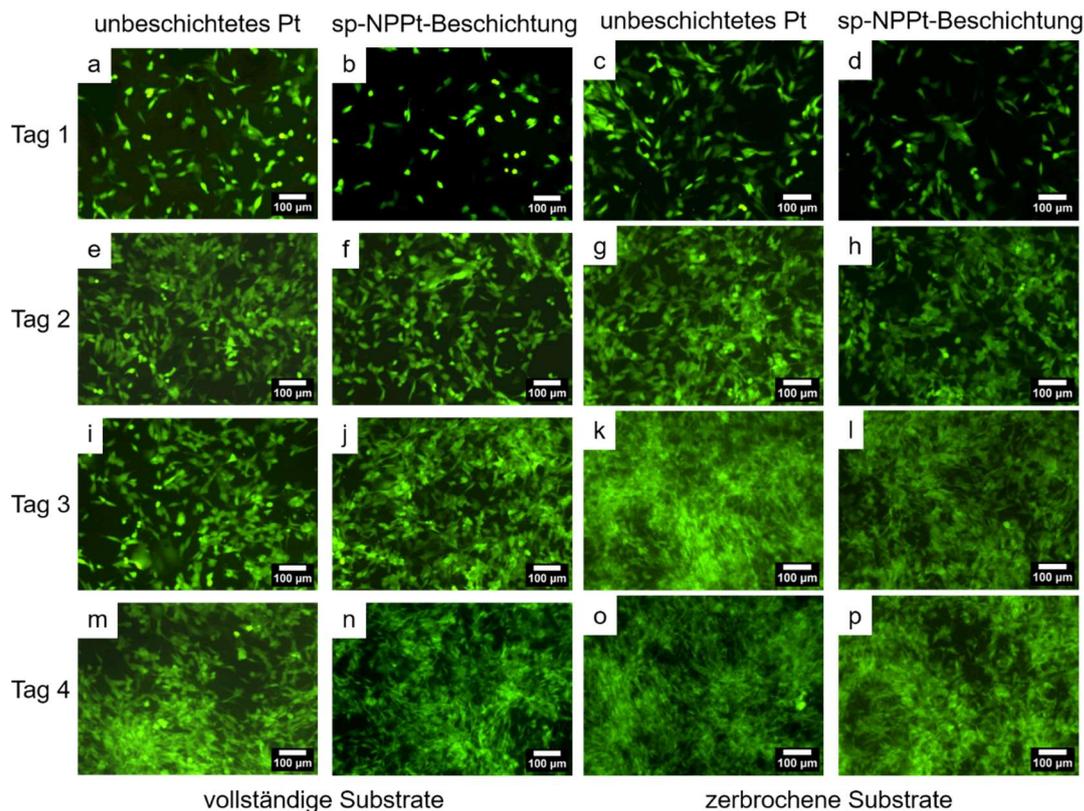


Abbildung 4.17: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Fibroblasten auf unbeschichtetem Platin (erste und dritte Spalte) und sp-NPpt (zweite und vierte Spalte) nach einem Tag (a-d), zwei Tagen (e-h), drei Tagen (i-l) und vier Tagen (m-p) nach der Fibroblasten-Einsaat. Die elektrochemische Abscheidung der sp-NPpt erfolgte in Elektrolysezelle 1. Um Einflüsse des zur Elektrodenpräparation verwendeten Silberleitlacks auszuschließen, wurden sowohl vollständige Substrate (erste und zweite Spalte), auf denen der Silberleitlack entfernt wurde, wie auch zerbrochene Substrate (dritte und vierte Spalte) untersucht.

Einen Tag nach Fibroblasten-Einsaat sind sowohl auf den unbeschichteten Platinsubstraten, als auch auf den sp-NPpt-Beschichtungen grün fluoreszierende Zellen erkennbar (Abbildung 4.17a-d). Auf allen Proben sind sowohl ausgebreitete als auch kugelförmige Zellen zu sehen. Bei diesen Zellkulturuntersuchungen wird zusätzlich zwischen vollständigen und zerbrochenen Substraten unterschieden. Bei den vollständigen Substraten wurde der Bereich, auf welchem der Kupferdraht mit Silberleitlack befestigt wurde, mit Aceton, Isopropanol und Wasser gereinigt und somit der Silberleitlack entfernt. Bei den zerbrochenen Substraten wurde dieser Teil durch Anritzen mit einem Diamantstift und anschließendem Zerschneiden entlang der Grenze zur sp-NPpt-Beschichtung entfernt. Zwischen den vollständigen und zerbrochenen Proben ist kein Unterschied auszumachen. Im Verlauf der

Fibroblastenuntersuchungen kann auf allen Oberflächen eine einheitliche Zellproliferation festgestellt werden. Am vierten Tag hat sich auf den unbeschichteten Platinoberflächen und auf den sp-NPPt-Beschichtungen ein durchgehender Rasen aus Fibroblasten ausgebildet. Alle Zellen weisen eine typische Zellmorphologie auf und es sind keine kugelförmigen Zellen erkennbar, was für eine sehr gute Fibroblasten-Kompatibilität spricht. Visuell können keine Unterschiede mehr zwischen den unterschiedlichen Proben ausgemacht werden. Aus diesem Grund wurden die Fibroblasten am vierten Tag der Zellkulturuntersuchung ausgezählt. Die genauen Zellzahlen sind in Abbildung 4.18 dargestellt.

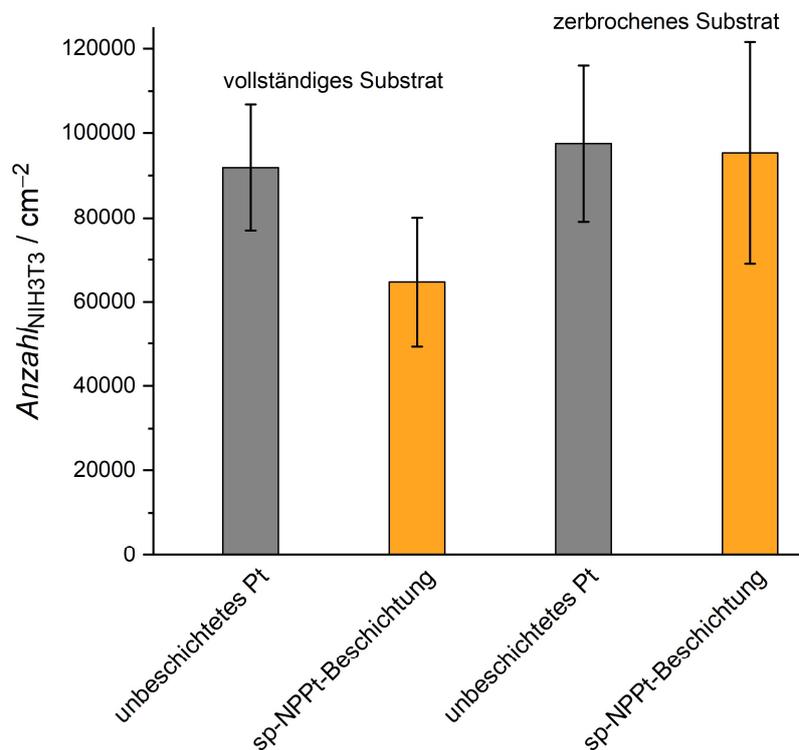


Abbildung 4.18: Absolute Zellzahlen der nach vier Tagen angewachsenen Fibroblasten auf den vollständigen bzw. den zerbrochenen Substraten des unbeschichteten Platins und der sp-NPPt-Beschichtung.

Anhand der absoluten Zellzahlen der nach vier Tagen angewachsenen Fibroblasten sind im Gegensatz zu den visuell beurteilten fluoreszenzmikroskopischen Bildern leichte Unterschiede erkennbar. Bei den vollständigen Substraten liegt die Zellzahl auf der sp-NPPt-Beschichtung unter Berücksichtigung der Standardabweichungen leicht unter der Zellzahl des unbeschichteten Platins. Bei den zerbrochenen Substraten hingegen weichen die Zellzahlen auf dem unbeschichteten Platin und der sp-NPPt-Beschichtung nicht voneinander ab. Da auch die Zellzahlen der Kontrollproben sowohl auf dem vollständigen als auch auf dem zerbrochenen Substrat die gleichen Werte aufweisen, kann die etwas

#### 4 Ergebnisse und Diskussion

schlechtere Fibroblasten-Proliferation auf der sp-NPPt-Beschichtung der vollständigen Proben möglicherweise auf Rückstände der Kontaktierung des Kupferdrahts zurückgeführt werden. Durch Änderung des Aufbaus der Elektrolysezelle kann die Kontaktierung des Substrats mit dem Kupferdraht umgangen werden, weshalb die weiterführenden Zellkulturuntersuchungen mit den sensitiveren Spiralganglienzellen direkt auf den in der Elektrolysezelle 2 hergestellten sp-NPPt-Beschichtungen durchgeführt wurden. Die Spiralganglienzellen wurden 48 Stunden nach Einsaat fixiert und angefärbt. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen sind in Abbildung 4.19 dargestellt.

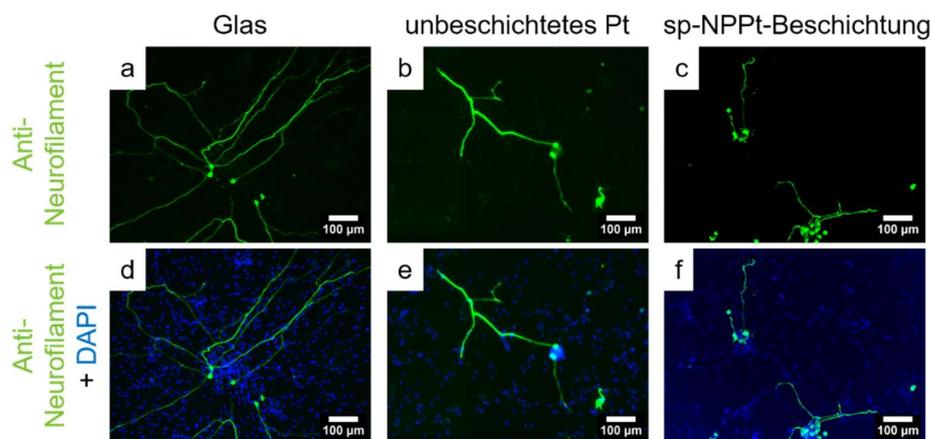


Abbildung 4.19: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der immunfluoreszenzgefärbten Spiralganglienzellkultur auf mit Ornithin / Laminin beschichteten Glas (a,d), unbeschichtetem Platin (b,e) und sp-NPPt (c,f) nach 48 Stunden nach der Spiralganglienzellen-Einsaat. In a-c sind Spiralganglienneurone mit eingefärbten Neurofilamenten (grün) erkennbar, in d-f sind zusätzlich die mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) fluoreszenzgefärbten Zellkerne (blau) zu sehen.

Durch Anfärben des Neurofilaments der Spiralganglienneurone (SGN) mit Anti-Neurofilament (ANF) kann die Zellmorphologie und das Neuritenwachstum aufgrund der grünen Fluoreszenz beurteilt werden (Abbildung 4.19a-c). Auf allen Proben sind SGN mit Neuriten erkennbar. Jedoch haben sich in dem aufgenommenen Bereich auf dem mit Ornithin / Laminin beschichteten Glas mehr Neuriten ausgebildet als auf den Platinoberflächen. Sowohl die Neuritenanzahl als auch die Neuritenlänge ist in den Aufnahmen deutlich größer. Der Vergleich zwischen den fluoreszenzmikroskopischen Bildern der unbeschichteten Platinoberfläche und der sp-NPPt-Beschichtung zeigt keine deutlichen Unterschiede. Die Zellkerne der Zellen können durch Anfärben mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) in Abbildung 4.19d-f visualisiert werden. Durch den Isolierungsprozess der Spiralganglienzellen (SGZ) sind in der verwendeten Zellsuspension zusätzlich zu den SGZ sogenannte Stützzellen vorhanden. Daher sind die in blau erkennbaren Zellkerne neben den SGN, auch den Gliazellen oder Fibroblasten zuzuordnen; diese können anhand der

DAPI-Färbung nicht unterschieden werden. Mit ANF sind allerdings nur SGN anfärbbar. Zur quantitativen Auswertung wurden die SGN ausgezählt, da die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen nur einen kleinen Bereich der Probenoberflächen zeigen. Die genauen Zellzahlen sind in Abbildung 4.20 dargestellt.

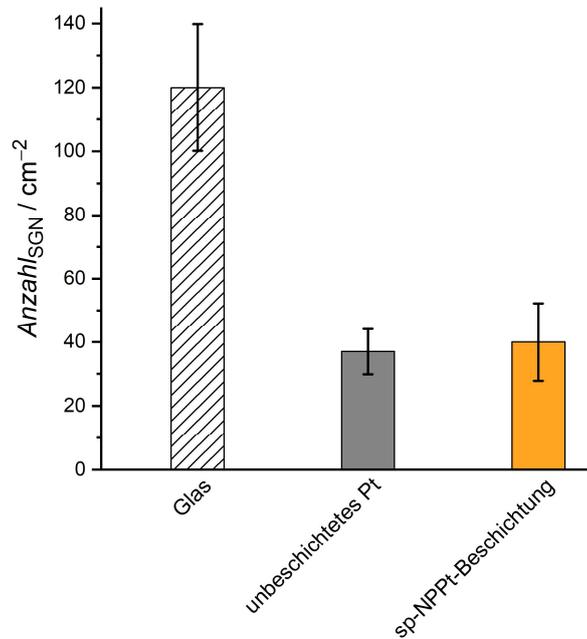


Abbildung 4.20: Absolute Zellzahlen der nach 48 Stunden angewachsenen Spiralganglienneuronen auf Glas (Ornithin / Laminin beschichtet, ideale Bedingungen), dem unbeschichteten Platinsubstrat und der sp-NPPT-Beschichtung.

Die absoluten Zellzahlen bestätigen den schon anhand der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen gewonnenen Eindruck, dass auf der mit Ornithin / Laminin beschichteten Glasoberfläche, welche ideale Überlebensbedingungen für Zellen aufweist, deutlich mehr SGN angewachsen sind. Auf den Platinoberflächen sind im Vergleich zu der Glaskontrolle nur ein Drittel der SGN vorhanden. Entscheidend ist jedoch der Vergleich der Zellüberlebensrate zwischen der aktuell in Implantaten verwendeten unbeschichteten Platinoberfläche und den sp-NPPT-Beschichtungen. Da sich diese nicht voneinander unterscheiden, kann die sp-NPPT-Beschichtung als gut cytokompatibel eingestuft werden.

Weitere sensitive Cytokompatibilitätsuntersuchungen auf den sp-NPPT-Beschichtungen wurden mit mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark (*bone marrow-derived mesenchymal stem cells*, BMDMSC) durchgeführt.

Die Lebend-Fluoreszenzfärbung der adhärennten BMDMSC durch Zugabe von Carboxyfluorescein Succinimidylester (CFSE) zur Beurteilung der Zellproliferation und Zellmorphologie war nicht erfolgreich. Nur drei Tage nach Zelleinsaat konnten

#### 4 Ergebnisse und Diskussion

auswertbare Bilder auf der unbeschichteten Platinoberfläche sowie der sp-NPPt-Beschichtung aufgenommen werden. Diese sind in Abbildung 4.21 dargestellt.

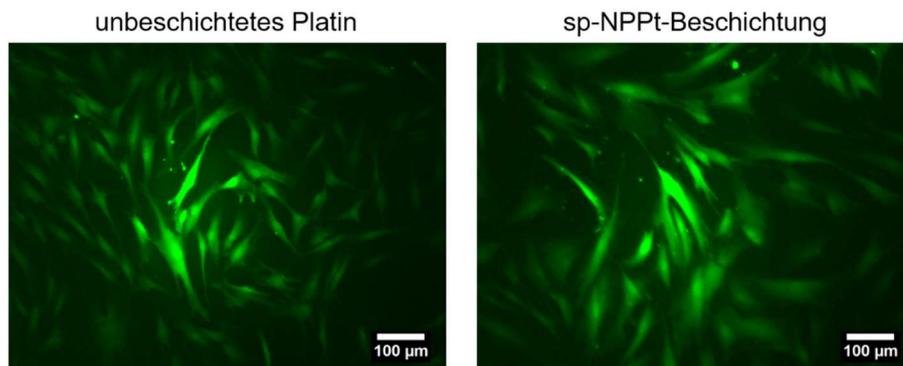


Abbildung 4.21: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der lebend angefärbten adhärennten BMDMSC durch CSFE auf unbeschichtetem Platin und der sp-NPPt-Beschichtung.

Sowohl auf unbeschichtetem Platin als auch auf den sp-NPPt-Beschichtungen ist ein dichter Zellrasen aus den grün fluoreszierenden BMDMSC erkennbar. Alle Zellen weisen eine typische Morphologie auf, es sind keine kugelförmigen Zellen mehr vorhanden. Infolgedessen kann von einem erfolgreichen BMDMSC-Wachstum auf den Oberflächen ausgegangen werden, bei dem kein Zellsterben zu beobachten ist. Anhand der fluoreszenzmikroskopischen Bilder können keine Unterschiede bezüglich der Zellmorphologie oder Zellproliferation auf unbeschichtetem Platin und der sp-NPPt-Beschichtung festgestellt werden, weshalb quantitative Analysen durch Auszählen der adhärennten Zellen durchgeführt wurden und im Folgenden erläutert werden.

Zu späteren Zeitpunkten konnte die Zelldichte der BMDMSC aufgrund der nicht erfolgreichen Lebend-Fluoreszenzfärbung visuell nicht bestimmt werden. Auch eine Aussage über die Zellmorphologie war somit nicht möglich.

Die prozentuale Proliferation der BMDMSC am 7., 14. und 21. Tag ist in Abbildung 4.22 zu sehen.

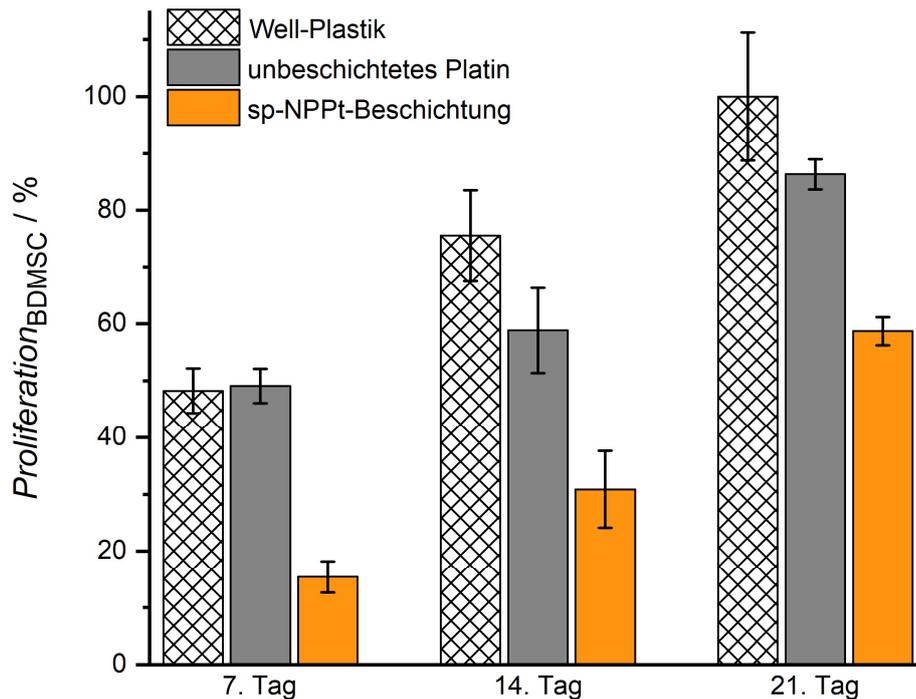


Abbildung 4.22: Zellproliferation der BMDMSC auf Well-Plastik, unbeschichteten Platinsubstraten und der sp-NPPT-Beschichtung an Tag 7, 14 und 21.

Für eine übersichtlichere Auswertung der Zellproliferation wurde die maximale Zellzahl der BMDMSC auf Well-Plastik am 21. Tag auf 100% festgelegt. An allen Tagen kann eine deutlich geringere Zellzahl auf der sp-NPPT-Beschichtung im Vergleich zum Well-Plastik und auch dem unbeschichteten Platin festgestellt werden. Am 7. Tag der Zellkulturuntersuchung weisen die BMDMSC auf Well-Plastik und auf der unbeschichteten Platinoberfläche die gleiche Zellanzahl mit etwa 50% auf. Auf der sp-NPPT-Beschichtung konnte hingegen nur etwa ein Drittel der Zellen nachgewiesen werden. Die BMDMSC-Proliferation vom 7. bis zum 14. Tag auf Well-Plastik beträgt etwa 27%, auf der unbeschichteten Platinoberfläche erhöhte sich die Zellzahl nur um 10%. Auf der sp-NPPT-Beschichtung hingegen vergrößerte sich die Zellzahl um 16%, was einer Verdopplung der absoluten Zellzahl auf der sp-NPPT-Beschichtung entspricht. Die BMDMSC-Proliferation vom 14. bis zum 21. Tag liegt auf Well-Plastik bei 25% und auf dem unbeschichteten Platin bei etwa 28%. Auch auf der sp-NPPT-Beschichtung erhöhte sich die Zellproliferation um 28%, wobei sich auch innerhalb der dritten Woche auf dieser Beschichtung die absolute Zellzahl verdoppelte. Diese Beobachtungen können mit einer anfänglich verminderten Zellanhaftung auf der nanoporösen Beschichtung erklärt werden. Möglicherweise werden aus dem Medium absorbierende, adhäsionsfördernde Komponenten zunächst aus dem Porensystem aufgenommen, bevor auch die äußere Oberfläche vollständig mit solchen Komponenten bedeckt ist. Nach einer erfolgreichen BMDMSC-Anhaftung zeigen die Zellen eine sehr gute Zellproliferation, welche im

Vergleich zum Well-Plastik und der unbeschichteten Platinoberfläche deutlich höhere absolute Zellzahlen aufweist. Infolgedessen deuten auch diese Zellkulturuntersuchungen auf eine gute Cytokompatibilität der sp-NPPt-Beschichtung hin.

Für weitere Beurteilungen der Cytokompatibilität der sp-NPPt-Beschichtung sollten *in vitro* Untersuchungen durchgeführt werden, bei welchen an die sp-NPPt-Beschichtung elektrische Impulse, analog zu denen im Cochlea-Implantat verwendeten, angelegt werden sollten.

##### *Kurzzusammenfassung: Cytokompatibilitätsuntersuchungen von sp-NPPt*

Die grundlegenden Cytokompatibilitätsuntersuchungen mit murinen NIH3T3-Fibroblasten wiesen sowohl auf unbeschichteten Platinoberflächen als auch auf sp-NPPt-Beschichtungen eine gute Zellproliferation und Zellmorphologie auf. Die absoluten Zellzahlen zeigen ein verbessertes Zellwachstum auf den Proben, welche nicht mit Silberleitlack und Kupferdraht in Kontakt gekommen sind. Die gute Fibroblasten-Anhaftung und -proliferation bewies eine gute Cytokompatibilität der sp-NPPt-Beschichtung.

Anschließende innenohrspezifischere Zellkulturuntersuchungen mit Spiralganglienzellen zeigten auf den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen auf allen Probenoberflächen ein gutes Neuritenwachstum. Der Vergleich zwischen den unbeschichteten Platinoberflächen, welche dem Benchmark der aktuellen Anwendung entsprechen, und den sp-NPPt-Beschichtungen zeigte keine Verschlechterung der SGN-Überlebensraten. Somit können die sp-NPPt-Beschichtungen auch für SGN als cytokompatibel eingestuft werden.

Abschließende Zellkulturuntersuchungen mit mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark zeigten eine anfänglich verminderte Anhaftung auf der sp-NPPt-Beschichtung im Vergleich zur unbeschichteten Platinoberfläche. Die anschließende Proliferation mit einer Verdopplung der Zellzahlen alle sieben Tage deutet auf ein gutes Zellwachstum im Vergleich zu den Kontrollproben hin.

Infolgedessen kann die sp-NPPt-Beschichtung als sehr gut cytokompatibel eingestuft werden und ist somit als Beschichtungsmaterial für Implantate geeignet.

##### **4.1.1.4 Chemische Modifizierung**

Um ein besseres Einlagerungs- und Freisetzungsverhalten von Wirkstoffen in die nanoporöse Platinbeschichtung zu erreichen, wurden durch chemische Modifizierung der sp-NPPt-Beschichtung mit unterschiedlichen Thiolen verschiedene Oberflächenladungen aufgebracht. Durch die so ermöglichten Wechselwirkungen zwischen Wirkstoff und modifizierter sp-NPPt-Beschichtung soll insbesondere das Freisetzungsverhalten beeinflusst werden. Hierfür wurden Thiole mit endständigen hydrophilen oder hydrophoben funktionellen Gruppen ausgewählt.

Die modifizierten Oberflächen wurden zunächst durch Bestimmung des Kontaktwinkels untersucht. Weiterführend wurden an ausgewählten modifizierten Oberflächen röntgenphotoelektronenspektroskopische Messungen (XPS) durchgeführt.

Die gemessenen Kontaktwinkel von unmodifizierten sowie mit 1-Propanthiol, Natrium-3-mercapto-1-propansulfonat, 11-Mercaptoundecansäure und Cysteamin modifizierten sp-NPPT-Beschichtungen sind in Abbildung 4.23 dargestellt.

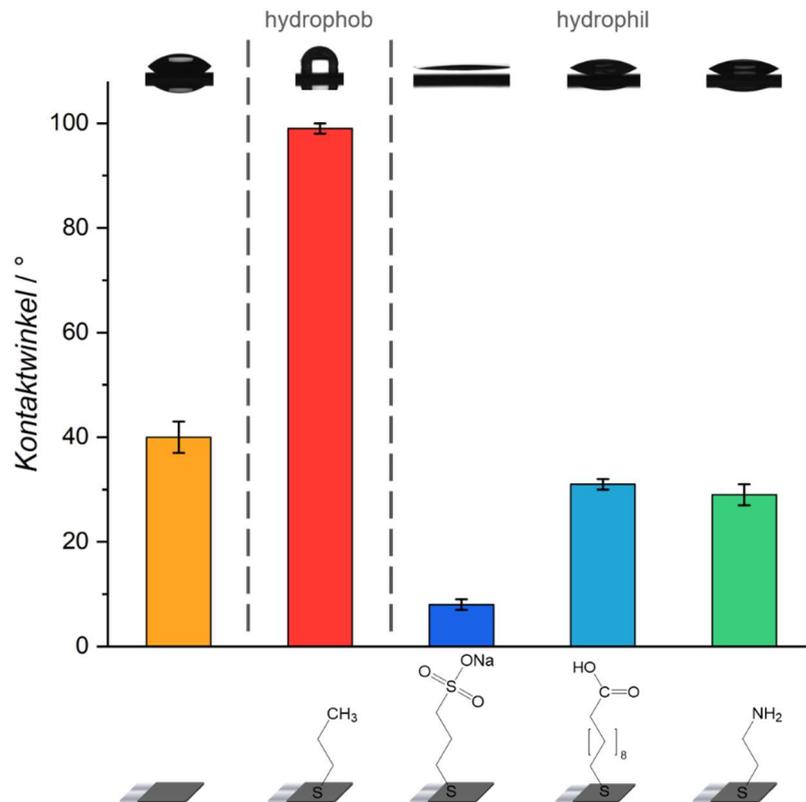


Abbildung 4.23: Kontaktwinkel von unmodifizierten (orange) sowie mit 1-Propanthiol (rot), Natrium-3-mercapto-1-propansulfonat (dunkelblau), 11-Mercaptoundecansäure (hellblau) und Cysteamin (grün) modifizierten sp-NPPT-Beschichtungen.

Die unmodifizierte sp-NPPT-Beschichtung weist einen Kontaktwinkel von  $40 \pm 3^\circ$  auf. Durch die Modifizierung mit unpolarem 1-Propanthiol wurde der Kontaktwinkel auf  $99 \pm 1^\circ$  stark erhöht, wodurch eine superhydrophobe Oberfläche erzeugt werden konnte. Die polaren Modifizierungen verringerten den Kontaktwinkel, es wurden hydrophile Oberflächen erhalten. So konnte nach dem Aufbringen von Natrium-3-mercapto-1-propansulfonat ein Kontaktwinkel von  $8 \pm 1^\circ$  gemessen werden. Die Modifizierung mit 11-Mercaptoundecansäure erzeugte einen Kontaktwinkel von  $31 \pm 1^\circ$ . Obwohl diese beiden Modifizierungen eine hydrophile Funktionalität aufweisen, unterscheidet sich der Kontaktwinkel um über  $20^\circ$ . Dies kann auf unterschiedliche pKs-Werte und unterschiedlich lange Alkylketten der eingesetzten

#### 4 Ergebnisse und Diskussion

Thiole zurückgeführt werden. Durch die deutlich längere hydrophobe Kohlenstoffkette der 11-Mercaptoundecansäure nimmt der Anteil der hydrophoben Wechselwirkungen im Vergleich zu denen mit Natrium-3-mercapto-1-propansulfonat stark zu, weshalb sich der Kontaktwinkel stark erhöhte. Das Aufbringen einer Amino-Funktionalität mit einer vergleichsweise kurzen Kohlenstoffkette durch Verwendung von Cysteamin führte zu einem Kontaktwinkel von  $29 \pm 2^\circ$ , welcher im vergleichbaren Größenbereich der Modifizierung mit 11-Mercaptoundecansäure liegt. Schlussfolgernd scheint die Amino-Funktionalität eine nicht so starke Hydrophilie, wie die Sulfonat-Gruppe, aufzuweisen. Da mit 1-Propanthiol eine unpolare, mit Natrium-3-mercapto-1-propansulfonat und 11-Mercaptoundecansäure jeweils eine saure, und mit Cysteamin eine basische Funktionalität erfolgreich aufgebracht werden konnte, ergeben sich unterschiedliche Möglichkeiten die Wechselwirkungen der sp-NPPt-Beschichtung mit dem Wirkstoff und folglich das Freisetzungsverhalten aus der nanoporösen Oberfläche zu beeinflussen.

Durch röntgenphotoelektronenspektroskopische (XPS) Messungen sollte die erfolgreiche Thiol-Modifizierung exemplarisch an einer 11-Mercaptoundecansäure-modifizierten sp-NPPt-Beschichtungen bestätigt werden. Hierfür wurden sowohl modifizierte als auch unmodifizierte sp-NPPt-Beschichtungen analysiert und die XPS-Messungen miteinander verglichen. Das XPS-Spektrum der unmodifizierten sp-NPPt-Beschichtung ist als Übersicht in Abbildung 4.24a dargestellt.

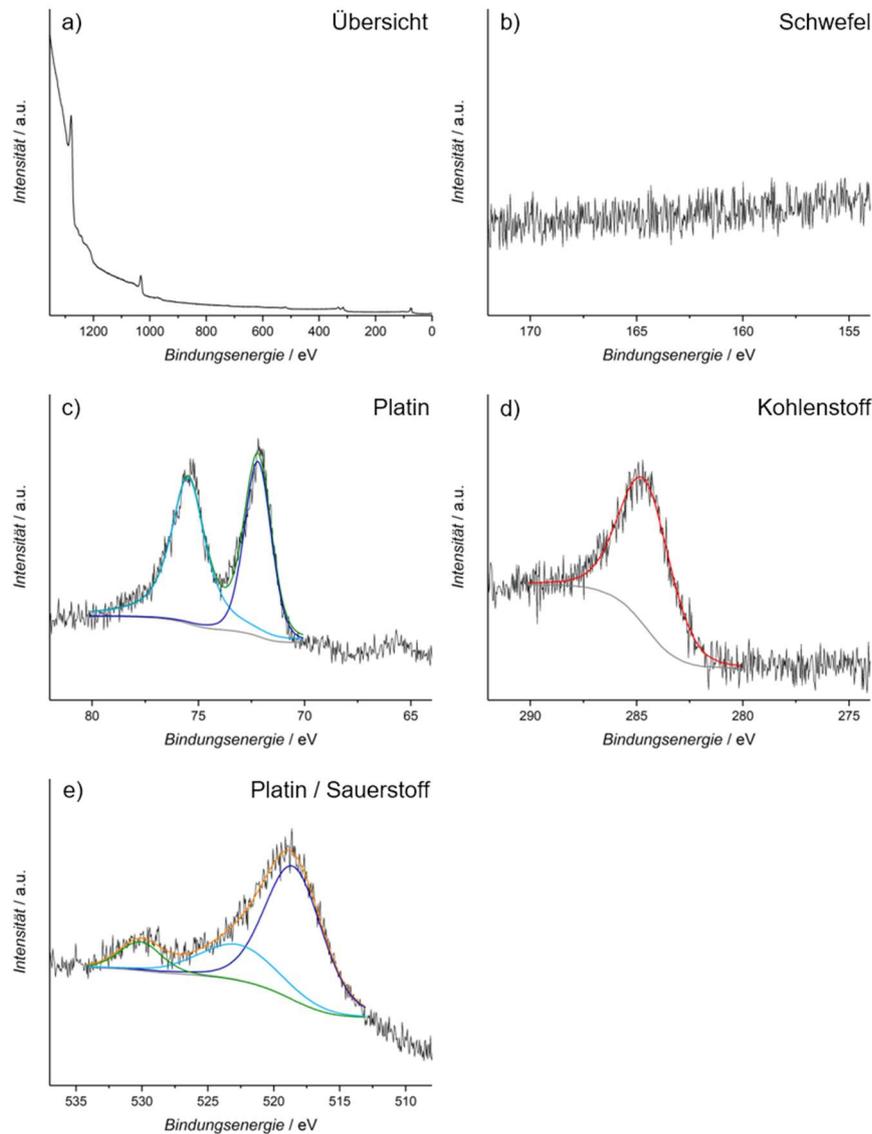


Abbildung 4.24: XPS-Spektrum einer unmodifizierten sp-NPPT-Beschichtung (a) sowie Vergrößerungen des Bindungsenergiebereichs von Schwefel (b), Platin (c), Kohlenstoff (d) und Platin / Sauerstoff (e).

Zunächst wird die Verschiebung des XPS-Spektrums anhand der Kohlenstoff C1s Emissionslinie (Abbildung 4.24d) durch Festlegen des Signals auf eine Bindungsenergie von  $285 \pm 1$  eV korrigiert. Eine Verzerrung des Spektrums kann anhand der beiden Pt4f-Emissionslinien mit der Spin-Bahn-Aufspaltung von 3.35 eV zwischen dem Pt4f<sub>5/2</sub> und dem Pt4f<sub>7/2</sub>-Niveau mit Bindungsenergien von  $75 \pm 1$  eV und  $72 \pm 1$  eV ausgeschlossen werden (Abbildung 4.24c).

In dem Bindungsenergiebereich von 513 eV – 534 eV wurden weitere Signale detektiert (Abbildung 4.24), welche durch einen entsprechenden Fit in drei Emissionslinien mit Bindungsenergien von  $519 \pm 1$  eV,  $523 \pm 1$  eV und  $530 \pm 1$  eV

#### 4 Ergebnisse und Diskussion

unterteilt werden können. Die Emissionslinie mit  $519 \pm 1$  eV kann dem  $\text{Pt}4p_{3/2}$  zugeordnet werden. Verschiedene Platin-Sauerstoffspezies weisen bei einer Bindungsenergie von  $531 \pm 1$  eV eine  $\text{O}1s$ -Emissionslinie auf, was aufgrund der Oberflächenoxidation zu erwarten ist. Der für die Analyse der chemischen Modifizierung entscheidende Bindungsenergiebereich liegt zwischen 155-170 eV, in welchem die von der Thiolgruppe erzeugte  $\text{S}2p$ -Emissionslinie mit einer Bindungsenergie von  $164 \pm 1$  eV erwartet wird. Bei der unmodifizierten sp-NPPT-Beschichtung wurde in diesem Bindungsenergiebereich keine Emissionslinie detektiert (Abbildung 4.24a). Im Vergleich hierzu konnte bei der mit 11-Mercaptoundecansäure modifizierte sp-NPPT-Beschichtung eine deutliche  $\text{S}2p$ -Emissionslinie bei  $164 \pm 1$  eV nachgewiesen werden (Abbildung 4.25b).

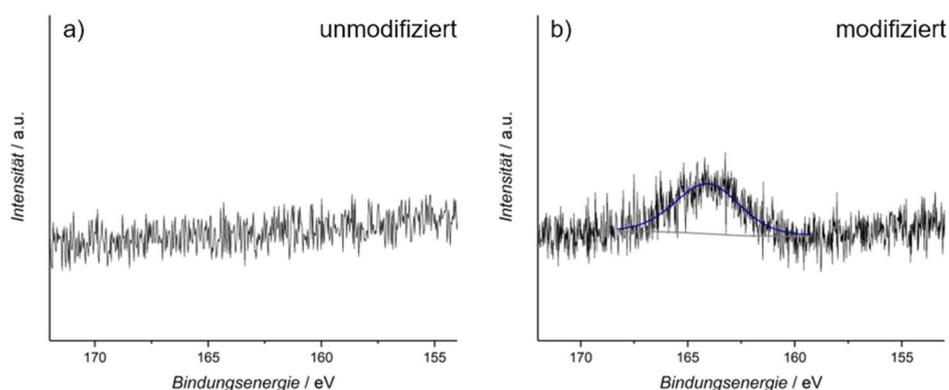


Abbildung 4.25: Vergleich des vergrößerten Bindungsenergiebereichs der  $\text{S}2p$ -Emissionslinie einer mit 11-Mercaptoundecansäure modifizierten (a) und einer unmodifizierten (b) sp-NPPT-Beschichtung.

Das gesamte XPS-Spektrum mit den entsprechend vergrößerten Bindungsenergiebereichen ist im Anhang (vgl. S. 211) zu finden.

Die Stabilität der chemischen Modifizierung unter Freisetzungsbedingungen wurde ebenfalls über XPS-Messungen untersucht. Dafür wurde eine mit 11-Mercaptoundecansäure modifizierte sp-NPPT-Beschichtung einen Tag unter Freisetzungsbedingungen (vgl. Kapitel 3.1.5, S. 47) gelagert und anschließend analysiert. Das aufgenommene XPS-Spektrum mit den entsprechend vergrößerten Bindungsenergiebereichen ist in Abbildung 4.26 dargestellt.

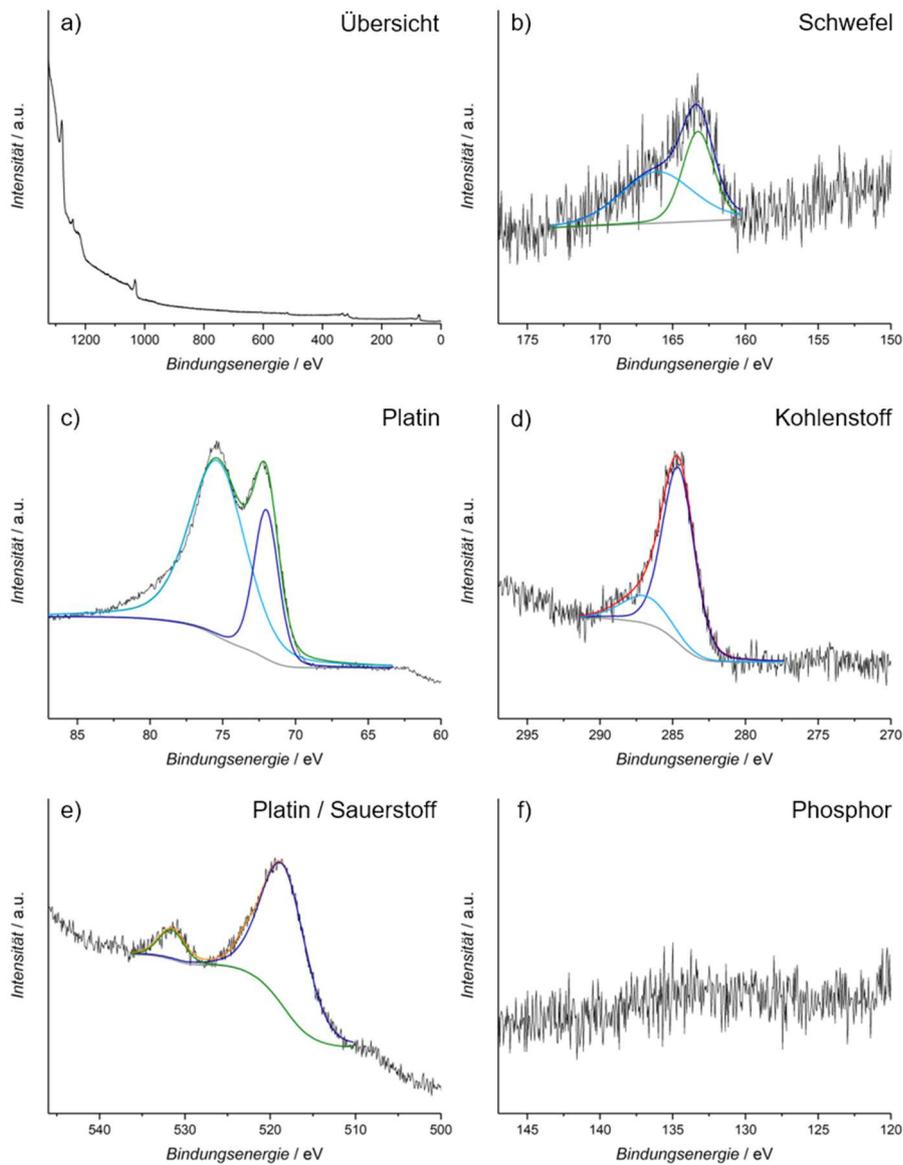


Abbildung 4.26: XPS-Spektrum einer 11-Mercaptoundecansäure-modifizierten sp-NPPT-Beschichtung nach eintägiger Lagerung unter Freisetzungsbedingungen (a) sowie Vergrößerungen des Bindungsenergiebereichs von Schwefel (b), Platin (c), Kohlenstoff (d), Platin / Sauerstoff (e) und Phosphor (f).

Nach eintägiger Lagerung unter Freisetzungsbedingungen ist auf der modifizierten sp-NPPT-Beschichtung nach wie vor ein Signal im Bereich der Schwefelemissionslinie detektierbar. Jedoch weist dieses Signal eine Schulter zu höherer Energie auf, weshalb sich bei Durchführen einer Regression zwei Emissionslinien ergeben (Abbildung 4.26b). Diese können der  $S2p$ -Emissionslinie des Thiols mit einer Bindungsenergie von  $164 \pm 1$  eV sowie der  $S2p$ -Emissionslinie eines oxidierten Schwefels bei  $166 \pm 1$  eV zugeordnet werden. Die Thiol-Gruppe wurde bereits innerhalb eines Tages unter Freisetzungsbedingungen zumindest teilweise

oxidiert. Die chemische Modifizierung auf der sp-NPPt-Beschichtung ist demnach nicht stabil. Die Pt4*f*-Emissionslinien mit der Spin-Bahn-Aufspaltung von 3.35 eV zwischen dem Pt4*f*<sub>5/2</sub> und dem Pt4*f*<sub>7/2</sub>-Niveau mit Bindungsenergien von  $75 \pm 1$  eV und  $72 \pm 1$  eV können auch bei dieser Probe detektiert werden (Abbildung 4.26c). Das Signal in dem Bindungsenergiebereich von 280–290 eV kann der Emissionslinie von Kohlenstoff zugeordnet werden und weist eine zusätzliche Schulter auf; der Kohlenstoff liegt nach einem Tag unter Freisetzungsbedingungen in zwei unterschiedlichen Bindungsverhältnissen vor. Da Carbonsäuren laut Literatur bei einer Bindungsenergie von  $288 \pm 1$  eV eine Emissionslinie aufweisen können, weist auch dieses detektierte Signal auf eine Zersetzung der Modifizierung hin. Um Rückstände des Phosphatpuffers auf der Probenoberfläche auszuschließen, in welchem die Probe für einen Tag gelagert wurde, ist in Abbildung 4.26f der Bindungsenergiebereich der Phosphor-Emissionslinien vergrößert dargestellt. Bei diesen Energien konnte kein Signal detektiert werden. Große Mengen einer Phosphatablagerung auf der Probenoberfläche können daher ausgeschlossen werden, Signale kleinerer Phosphatablagerungen könnten durch das Untergrundrauschen überdeckt werden. Bei der unmodifizierten sp-NPPt-Beschichtung, welche zur Kontrolle vermessen wurde, kann auch nach Lagerung unter Freisetzungsbedingungen keine S2*p*-Emissionslinie festgestellt werden (vgl. S. 212). Auch die zusätzliche C1*s*-Emissionslinie bei einer Bindungsenergie von  $288 \pm 1$  eV wurde auf der unmodifizierten sp-NPPt-Beschichtung nicht detektiert. Diese Beobachtung unterstützt die Vermutung, dass sowohl die S2*p*-Emissionslinie als auch die C1*s*-Emissionslinie durch die Modifizierung mit 11-Mercapto-undecansäure hervorgerufen wurden.

##### *Kurzzusammenfassung: Platinmodifizierung*

Durch Kontaktwinkelmessungen konnte die erfolgreiche chemische Modifizierung der sp-NPPt-Beschichtungen mit unterschiedlichen Thiolen nachgewiesen werden. Der Kontaktwinkel von  $40 \pm 3^\circ$  der unmodifizierten sp-NPPt-Beschichtung wurde durch die Modifizierung mit dem unpolarem 1-Propanthiol auf  $99 \pm 1^\circ$  stark erhöht und somit eine superhydrophobe Oberfläche erzeugt. Durch das Aufbringen von Natrium-3-mercapto-1-propansulfonat ergab sich ein Kontaktwinkel von  $8 \pm 1^\circ$ , die Modifizierung mit 11-Mercapto-undecansäure änderte den Kontaktwinkel auf  $31 \pm 1^\circ$ . Der große Unterschied zwischen den beiden Modifizierungen kann durch die deutlich längere Alkylkette der 11-Mercapto-undecansäure und die unterschiedlichen Säurestärken der funktionellen Gruppen erklärt werden. Die Modifizierung mit Cysteamin führte durch die geringere Alkylkettenlänge zu einem Kontaktwinkel von  $29 \pm 2^\circ$ .

Auch durch röntgenphotoelektronenspektroskopische Messungen konnte die Modifizierung mit 11-Mercapto-undecansäure anhand der S2*p*-Emissionslinie, welche

von der Thiolgruppe erzeugt wurde, nachgewiesen werden. Diese trat auch nach eintägiger Lagerung unter Freisetzungsbedingungen auf, allerdings findet zumindest teilweise eine Oxidation der Thiol-Gruppe statt. Daher muss davon ausgegangen werden, dass die Zersetzung der Modifizierung unter Freisetzungsbedingungen bereits nach einem Tag begonnen hat.

### 4.1.1.5 Rolipram-Freisetzung

Nach erfolgreicher Synthese stabiler sp-NPPt-Beschichtungen und chemischer Modifizierung mit unterschiedlich funktionalisierten Thiolen wurde Rolipram in die sp-NPPt-Beschichtung eingelagert und anschließend unter dynamischen Bedingungen bei 37 °C zur Simulation der Körperbedingungen freigesetzt. Zum einen wurde der Einfluss der unterschiedlichen chemischen Modifizierungen, zum anderen der Zusammenhang zwischen sp-NPPt-Schichtdicke und freigesetzter Rolipram-Menge bestimmt.

Zur generellen Evaluierung der Rolipram-Freisetzung wurde diese zunächst sowohl aus unmodifizierten als auch aus Cysteamin-, 1-Propanthiol-, Natrium-3-mercapto-1-propansulfonat-, 11-Mercaptoundecansäure- und 2-Phenylethanthiol-modifizierten sp-NPPt-Beschichtungen unter nicht sterilen Bedingungen über 17 Tage durchgeführt.

Die Freisetzung aus 2-Phenylethanthiol-modifizierten sp-NPPt-Beschichtungen ergab durch die Analyse der Freisetzungsüberstände am Photometer keine auswertbaren Ergebnisse. Die bei 280 nm gemessenen Extinktionen der Blindprobe ohne Rolipram-Freisetzung zeigten so hohe Werte, dass jegliche Interpretation als nicht sinnvoll erachtet wurde. Dieser Effekt kann mit der UV-Aktivität des Benzolrings des 2-Phenylethanthiol begründet werden, weshalb sich eine mögliche Absorption des freigesetzten Roliprams mit der Absorption des Benzolrings überlagerte und somit nicht detektierbar war. Auch könnten starke Wechselwirkungen zwischen den  $\pi$ -Systemen des Benzolrings und des Roliprams zu keiner erfolgreichen Freisetzung geführt haben. Aufgrund der beschriebenen aufgetretenen Problematik wurde die Modifizierung mit 2-Phenylethanthiol nicht weitergeführt.

Die kumulativen Rolipram-Freisetzungskurven aus unmodifizierten, als auch aus Cysteamin-, 1-Propanthiol-, Natrium-3-mercapto-1-propansulfonat- und 11-Mercaptoundecansäure-modifizierten sp-NPPt-Beschichtungen, welche in Elektrolysezelle 1 abgeschieden wurden, sind in Abbildung 4.27 dargestellt.

#### 4 Ergebnisse und Diskussion

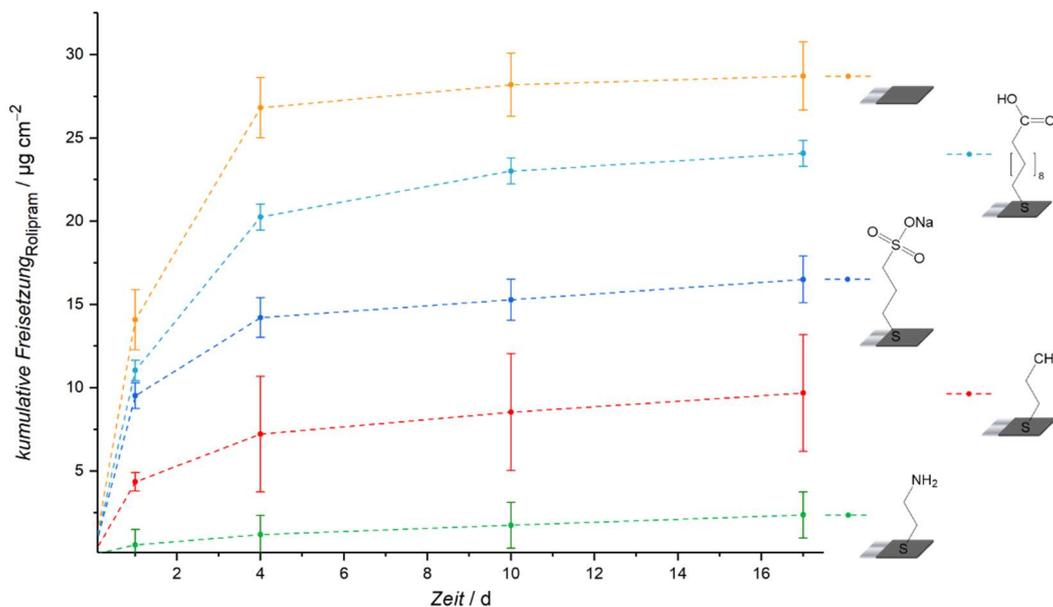


Abbildung 4.27: Kumulative Rolipram-Freisetzung aus unmodifizierten (orange) sowie mit Cysteamin (grün), 1-Propanthiol (rot), Natrium-3-mercaptopropansulfonat (dunkelblau) und 11-Mercaptoundecansäure (hellblau) modifizierten sp-NPpt-Beschichtungen unter nicht sterilen Bedingungen. Für die elektrochemische sp-NPpt-Abscheidung wurden die Standardsynthesebedingungen und EZ 1 verwendet.

Schon nach dem ersten Freisetzungstag sind zwischen den verschiedenen Oberflächenmodifizierungen große Unterschiede erkennbar. Aus der basischen Cysteamin-modifizierten sp-NPpt-Beschichtung (grün) wurde am ersten Tag  $0.6 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  und somit etwa 25% der insgesamt freigesetzten Rolipram-Menge abgegeben. Die gesamte Freisetzung weist über die 17 Tage einen fast linearen Verlauf auf. Durch eine hydrophobere Modifizierung mit 1-Propanthiol (rot) konnte mit  $4.3 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  eine deutlich höhere Rolipram-Konzentration am ersten Tag abgegeben werden, die Modifizierung mit Säuregruppen (blau) erzielte jedoch eine weitere Erhöhung der freigesetzten Rolipram-Mengen auf bis zu  $11 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ . Die größte Rolipram-Menge am ersten Freisetzungstag konnte bei unmodifizierten sp-NPpt-Beschichtungen (orange) mit  $14 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  bestimmt werden. Bei allen Proben wurden bereits bis zum ersten Tag über 45% der insgesamt freigesetzten Rolipram-Menge abgegeben. Bis zum 4. Tag kann, abgesehen von der Cysteamin-Modifizierung, bei allen Proben im Vergleich zu der durchschnittlichen Rolipramfreisetzung aus den jeweiligen Beschichtungen, von einer verstärkten Rolipram-Freisetzung gesprochen werden. Anschließend wurde ab dem 4. bis zum 17. Freisetzungstag eine gemäßigte Rolipramfreisetzung bestimmt. Die bis zum 17. Tag freigesetzten Rolipram-Mengen aus den unmodifizierten sowie Thiol-modifizierten sp-NPpt-Beschichtungen sind in Abbildung 4.28 dargestellt.

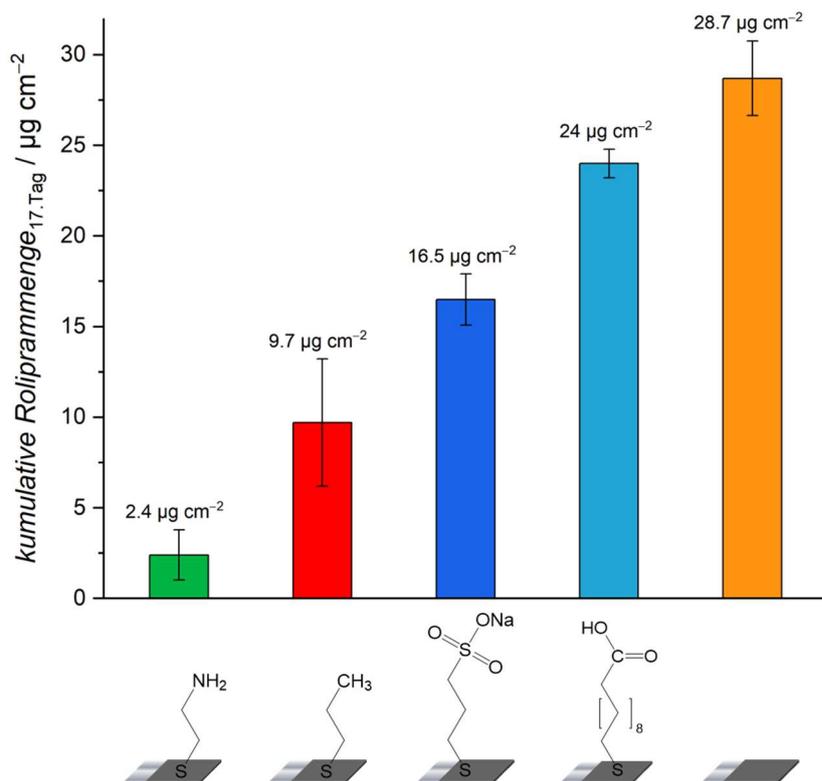


Abbildung 4.28: Kumulative Rolipram-Mengen am 17. Freisetzungstag von unmodifizierten (orange) sowie mit Cysteamin (grün), 1-Propanthiol (rot), Natrium-3-mercaptopropionsulfonat (dunkelblau) und 11-Mercaptoundecansäure (hellblau) modifizierten sp-NPPt-Beschichtungen unter nicht sterilen Bedingungen. Für die elektrochemische sp-NPPt-Abscheidung wurden die Standardsynthesebedingungen und EZ 1 verwendet.

Insgesamt konnte aus der mit Cysteamin-modifizierten sp-NPPt-Beschichtung eine nur geringe Rolipram-Menge von  $2.4 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  freigesetzt werden, durch die hydrophobe Modifizierung mit 1-Propanol ( $9.74 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) sowie die Modifizierungen mit sauren funktionellen Gruppen ( $24 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) wurde die freigesetzte Rolipram-Menge deutlich erhöht. Aus der unmodifizierten sp-NPPt-Beschichtung konnten bis zum 17. Freisetzungstag die größten Rolipram-Mengen ( $28.7 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) abgegeben werden.

Unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse wurden die Poren vermutlich durch die chemische Modifizierung blockiert, weshalb in die unmodifizierte sp-NPPt-Beschichtung am meisten Rolipram eingelagert werden konnte. Da jedoch die saure Modifizierung mit 11-Mercaptoundecansäure trotz der langen Kohlenstoffkette zu einer vergleichsweise hohen Rolipram-Freisetzung führte, spielen offensichtlich auch andere Wechselwirkungen eine entscheidende Rolle. So kann der polare Teil der funktionellen Gruppe des Thiols mit der sekundären Aminogruppe des Roliprams (Abbildung 4.29) elektrostatische Wechselwirkungen ausbilden.

#### 4 Ergebnisse und Diskussion

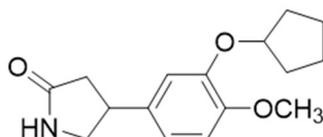


Abbildung 4.29: Strukturformel des neuroprotektiven Wirkstoffs Rolipram. (Rolipram)

Bei der Modifizierung mit 11-Mercaptooundecansäure kann folglich die Säuregruppe mit der basischen Aminogruppe wechselwirken, ebenso die lange hydrophobe Kohlenstoffkette und der hydrophobe Teil des Roliprams. Anhand dieser Begründung kann außerdem die etwas geringere freigesetzte Rolipram-Menge aus der Natrium-3-mercapto-1-propansulfonat-modifizierten sp-NPpt-Oberfläche erklärt werden. Auch hier könnten Wechselwirkungen zwischen der Säuregruppe und der basischen Aminogruppe auftreten, durch die kürzere Kohlenstoffkette jedoch sind die Wechselwirkungen zu dem hydrophoben Teil des Roliprams schwächer. Bei der Modifizierung mit 1-Propanthiol können ausschließlich Wechselwirkungen zwischen den hydrophoben Bereichen auftreten, da bei diesem Thiol keine polare Funktionalisierung vorliegt. Entsprechend wird bei dieser Modifizierung im Vergleich zu den bereits erläuterten Modifizierungen weniger Rolipram eingelagert und schlussendlich freigesetzt. Die Modifizierung mit Cysteamin, welches eine basische funktionelle Gruppe aufweist, führte zu der geringsten freigesetzten Rolipram-Menge. Vermutlich treten zwischen der basischen Aminogruppe des Thiols und des Roliprams abstoßende Wechselwirkungen auf, was die Rolipram-Einlagerung verminderte. Auch die kurze Kohlenstoffkette weist möglicherweise geringere Wechselwirkungen zu dem hydrophoben Bereich des Roliprams auf.

Für weiterführende Zellkulturuntersuchungen zur Bestimmung des Einflusses von Rolipram auf die Spiralganglienzellen des Innenohrs, wurden anschließend Rolipram-Freisetzung aus den sp-NPpt-Beschichtungen unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Für die Herstellung dieser sp-NPpt-Beschichtungen wurde die neu entwickelte Elektrolysezelle 2 (EZ 2) verwendet, weshalb sich die Beschichtungsgeometrie leicht änderte. Es wurde mit den drei Oberflächenmodifikationen weitergearbeitet, welche in der vorherigen Rolipram-Freisetzung die größten Roliprammengen freisetzen. Die kumulativen Freisetzungskurven unter sterilen Bedingungen sind in Abbildung 4.30 dargestellt.

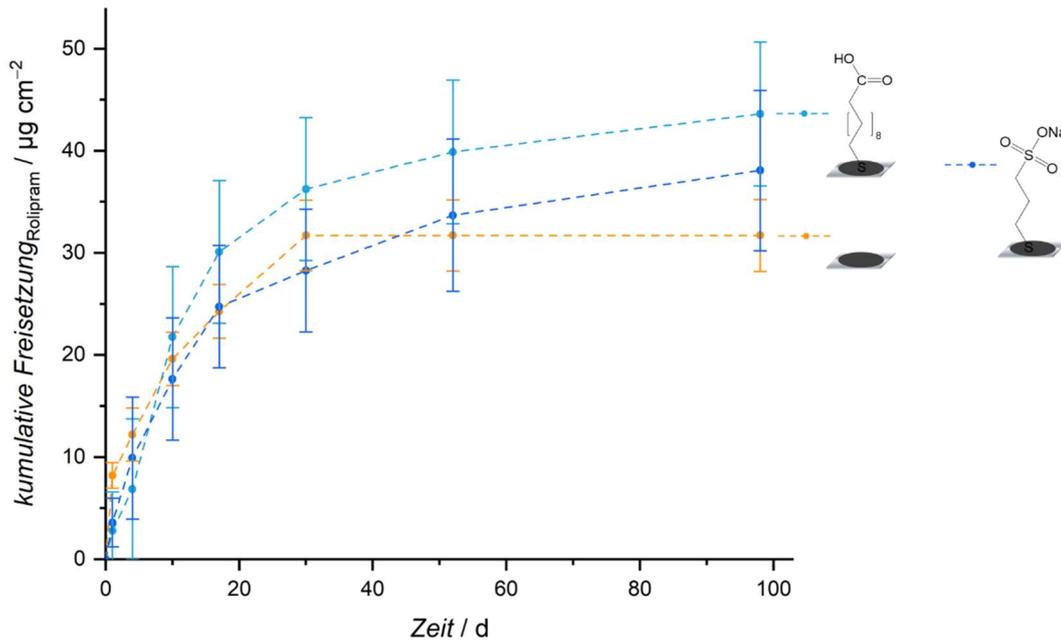


Abbildung 4.30: Kumulative Rolipram-Freisetzung aus unmodifizierten (orange) sowie mit Natrium-3-mercapto-1-propansulfonat (dunkelblau) und 11-Mercaptoundecansäure (hellblau) modifizierten sp-NPpt-Beschichtungen unter sterilen Bedingungen. Für die elektrochemische sp-NPpt-Abscheidung wurden die Standardsynthesebedingungen und EZ 2 verwendet.

Im Vergleich zu der bereits vorgestellten Rolipram-Freisetzung (vgl. Abbildung 4.27, S. 102) unterscheiden sich hier die freigesetzten Rolipram-Mengen kaum voneinander. Unter Berücksichtigung der Standardabweichungen weisen sowohl die unmodifizierte (orange), wie auch die mit Natrium-3-mercapto-1-propansulfonat (dunkelblau) und 11-Mercaptoundecansäure (hellblau) über den gesamten Freisetzezeitraum von 98 Tagen ähnliche Freisetzungsverläufe und -mengen auf. Auffällig ist, dass bei der unmodifizierten sp-NPpt-Beschichtung ab dem 30. Tag kein freigesetztes Rolipram nachgewiesen werden kann. Für die genauere Betrachtung der freigesetzten Rolipram-Mengen und für die Vergleichbarkeit zu der vorherigen Rolipram-Freisetzung (vgl. Abbildung 4.27, S. 102) sind die kumulativen Rolipram-Mengen vom 17. und 98. Tag in Abbildung 4.31 dargestellt.

#### 4 Ergebnisse und Diskussion

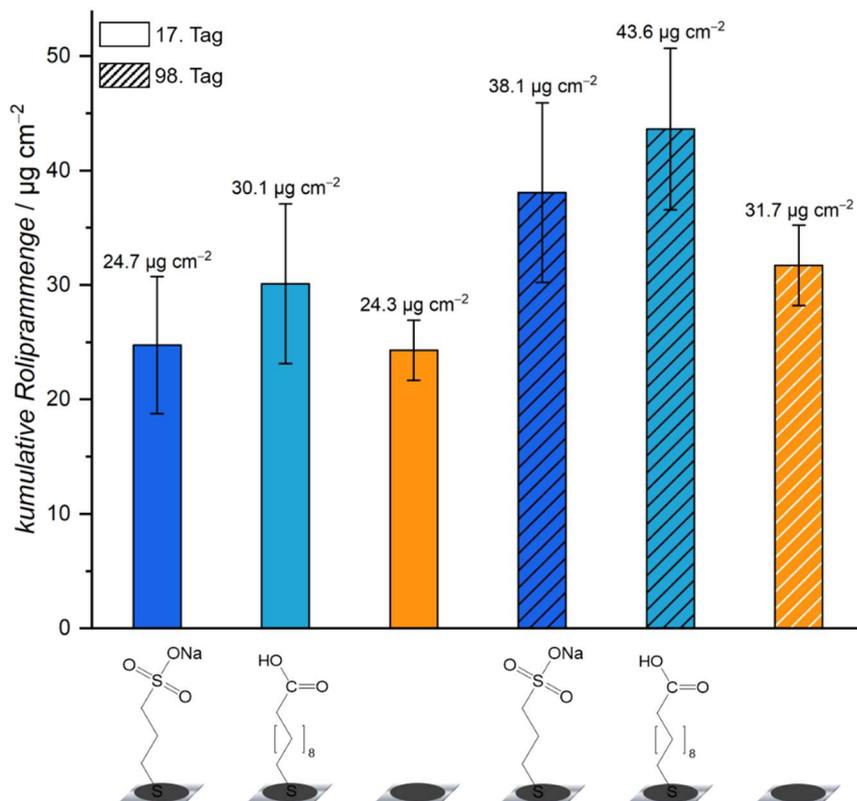


Abbildung 4.31: Kumulative Rolipram-Mengen nach 17 und 98 Tagen aus unmodifizierten (orange) sowie mit Natrium-3-mercapto-1-propansulfonat (dunkelblau) und 11-Mercaptoundecansäure (hellblau) modifizierten sp-NPpt-Beschichtungen unter sterilen Bedingungen. Für die elektrochemische sp-NPpt-Abscheidung wurden die Standardsynthesebedingungen und EZ 2 verwendet.

Nach 17 Freisetzungstagen wurden aus der mit Natrium-3-mercapto-1-propansulfonat modifizierten sp-NPpt-Beschichtung  $24.7 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  freigesetzt, was einer Erhöhung um 50% zu der vorherigen Rolipram-Freisetzung unter nicht sterilen Bedingungen entspricht. Unter Berücksichtigung der großen Standardabweichungen wurden aus der mit 11-Mercaptoundecansäure modifizierten sp-NPpt-Beschichtung mit  $30.1 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  gleiche Rolipram-Mengen freigesetzt. Dies entspricht im Vergleich zu der vorherigen Rolipram-Freisetzung einer Erhöhung um 25%. Im Gegensatz zu den modifizierten sp-NPpt-Beschichtungen verringerte sich die aus der unmodifizierten sp-NPpt-Beschichtung freigesetzte Rolipram-Menge im Vergleich zu der vorherigen Rolipram-Freisetzung mit  $24.3 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  um 15%. Durch diese veränderten Freisetzungsverläufe können nun keine Unterschiede mehr zwischen den modifizierten und der unmodifizierten sp-NPpt-Beschichtung ausgemacht werden.

Auch nach 98 Freisetzungstagen unterscheiden sich die freigesetzten Rolipram-Mengen aus den modifizierten und der unmodifizierten sp-NPpt-Beschichtung unter Berücksichtigung der Standardabweichung nicht voneinander. Da die sp-NPpt-

Modifizierung bereits nach einem Tag unter Freisetzungsbedingungen eine beginnende Oxidation der Thiolgruppe aufweist (vgl. Abbildung 4.26), ist eine von der Modifizierung abhängige Rolipram-Freisetzung nach mehreren Tagen nicht zu erwarten.

Außerdem kann festgestellt werden, dass der Großteil des Roliprams in den ersten 17 Tagen freigesetzt wurde. Bei der mit Natrium-3-mercapto-1-propansulfonat modifizierten sp-NPpt-Beschichtung wurden bereits 65% in den ersten 17 Tagen freigesetzt, aus der mit 11-Mercaptoundecansäure modifizierten sp-NPpt-Beschichtung sogar 70% sowie aus der unmodifizierten sp-NPpt-Beschichtung sogar 77%. Ab dem 30. Tag konnte aus der unmodifizierten sp-NPpt-Beschichtung kein Rolipram nachgewiesen werden.

Zur Bestimmung des Rolipram-Einflusses auf das SGN-Überleben wurden die Überstände von unmodifizierten und modifizierten sp-NPpt-Beschichtungen des ersten und vierten Freisetzungstags in einer Doppelbestimmung untersucht. Von jeder Probenart wurden zwei Proben untersucht, welche in Abbildung 4.32 in den jeweils gleichen Farben nebeneinander aufgeführt sind.

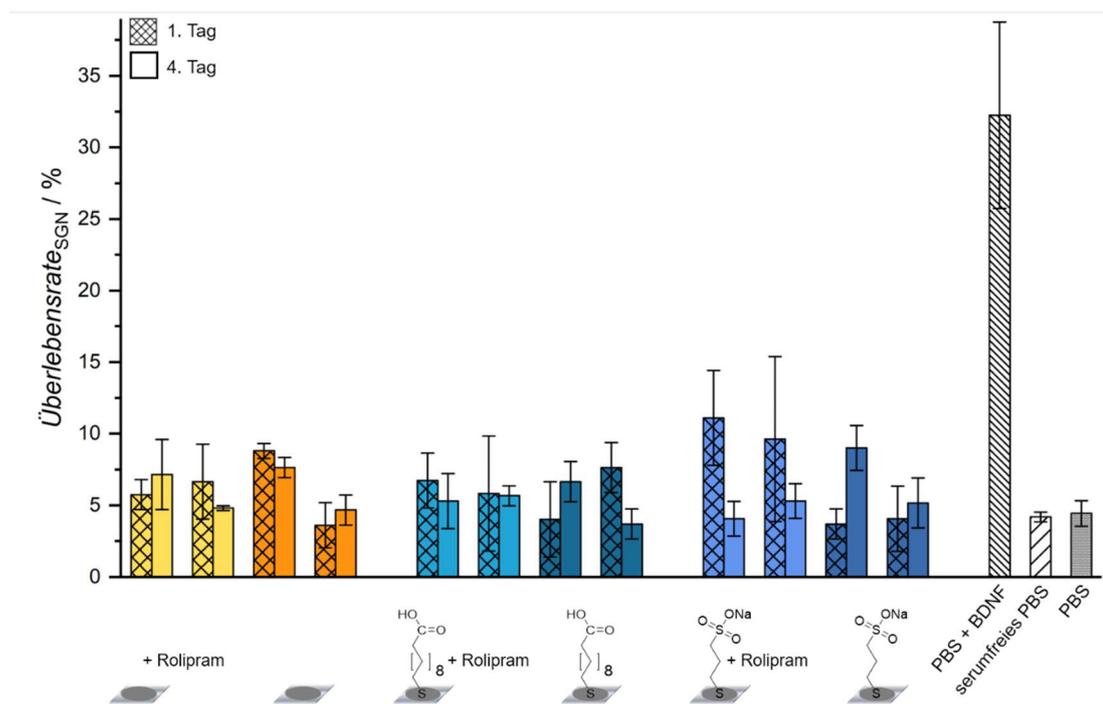


Abbildung 4.32: SGN-Überlebensrate in den Überständen der Rolipram-Freisetzung in PBS aus unmodifizierten (gelb/orange), 11-Mercaptoundecansäure (hellblau) und Natrium-3-mercapto-1-propansulfonat (dunkelblau) modifizierten sp-NPpt-Beschichtungen.

Anhand der in Abbildung 4.32 gezeigten SGN-Überlebensraten können unter Berücksichtigung der Standardabweichungen keine Unterschiede zwischen den unmodifizierten und den modifizierten sp-NPpt-Beschichtungen festgestellt werden.

#### 4 Ergebnisse und Diskussion

Auch konnte das Zellwachstum durch die Freisetzung des neuroprotektiven Wirkstoffes Rolipram nicht verbessert werden. Da außerdem zwischen dem serumfreien PBS und dem angereicherten PBS keine Unterschiede im SGN-Überleben bestehen und ausschließlich die mit dem Wachstumsfaktor BDNF angereicherten Überstände ein verbessertes Zellüberleben zeigten, sollte der generelle Einfluss des Roliprams auf die SGN überprüft werden. Hierfür wurden Rolipram-Lösungen mit Konzentrationen zwischen  $0.1-10 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$  in Zellkulturuntersuchungen evaluiert, welche im Gegensatz zu schon publizierten Versuchsreihen,<sup>11</sup> keinen Effekt auf das SGN-Überleben aufwiesen. Daher sollte zukünftig zunächst der positive Einfluss des Roliprams auf die SGN bestätigt werden, bevor Rückschlüsse auf die Rolipram-Freisetzung aus sp-NPPT-Beschichtungen gezogen werden.

Da durch eine Modifizierung der sp-NPPT-Beschichtung kein reproduzierbar einstellbares Wirkstofffreisetzungssystem hergestellt werden konnte, wurde der Einfluss der spezifischen Oberfläche bzw. der Schichtdicke der sp-NPPT-Beschichtung auf die freigesetzten Rolipram-Mengen untersucht. Daher wurden Rolipram-Freisetzungen aus sp-NPPT-Beschichtungen durchgeführt, welche mit 1000 bis 8000 Abscheidungszyklen hergestellt wurden. Die Freisetzungskurven sind in Abbildung 4.33 dargestellt.

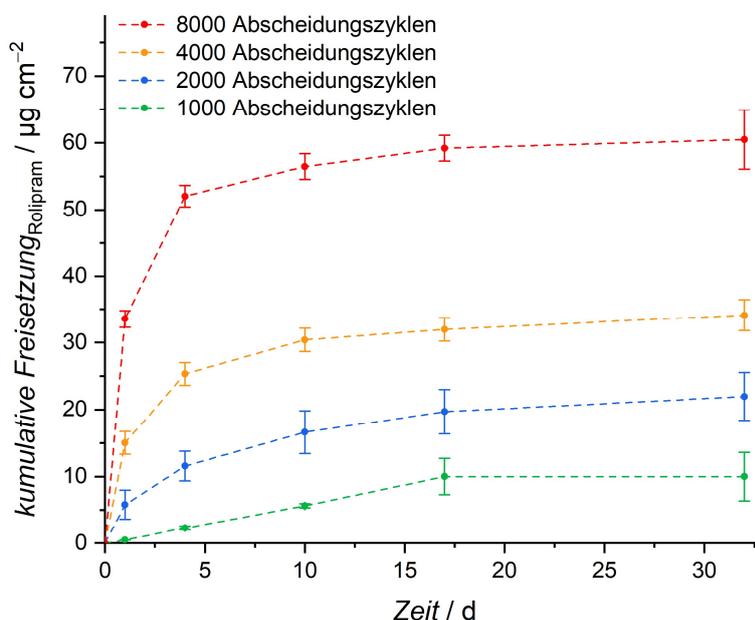


Abbildung 4.33: Kumulative Rolipram-Freisetzung aus unmodifizierten sp-NPPT-Beschichtungen, die unter Verwendung der Standardsynthesebedingungen mit 1000 (grün), 2000 (blau), 4000 (orange) und 8000 (rot) Abscheidungszyklen in Elektrolysezelle 2 hergestellt wurden. Die Freisetzung wurde unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

Bereits nach einem Freisetzungstag sind deutliche Unterschiede der freigesetzten Rolipram-Menge in Abhängigkeit der Schichtdicke erkennbar. So wurden aus der

dünnsten sp-NPpT-Beschichtung, welche mit 1000 Zyklen beschichtet wurde, etwa  $0.5 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  Rolipram freigesetzt. Durch die Verdopplung der Abscheidungszyklen erhöhte sich die freigesetzte Rolipram-Menge auf  $5.8 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ . Weitere Erhöhung der Abscheidungszyklen auf 4000 bzw. 8000 führten zu  $15.0 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  bzw.  $33.5 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  freigesetztem Rolipram. Während die Beschichtung mit 1000 Abscheidungszyklen bis zum 17. Freisetzungstag ein nahezu lineares Freisetzungprofil zeigt, weisen die restlichen Freisetzungprofile mit steigender Zyklenzahl bis zum 4. Tag eine stärkere Rolipram-Freisetzung auf. Ab dem 4. Tag weisen alle Freisetzungskurven eine nahezu gleiche Steigung auf, folglich werden aus allen Beschichtungen ähnliche Rolipram-Mengen freigesetzt. Für einen genaueren Vergleich sind die kumulativen Rolipram-Mengen bis zum 4. und 32. Tag in Abbildung 4.34 aufgeführt.

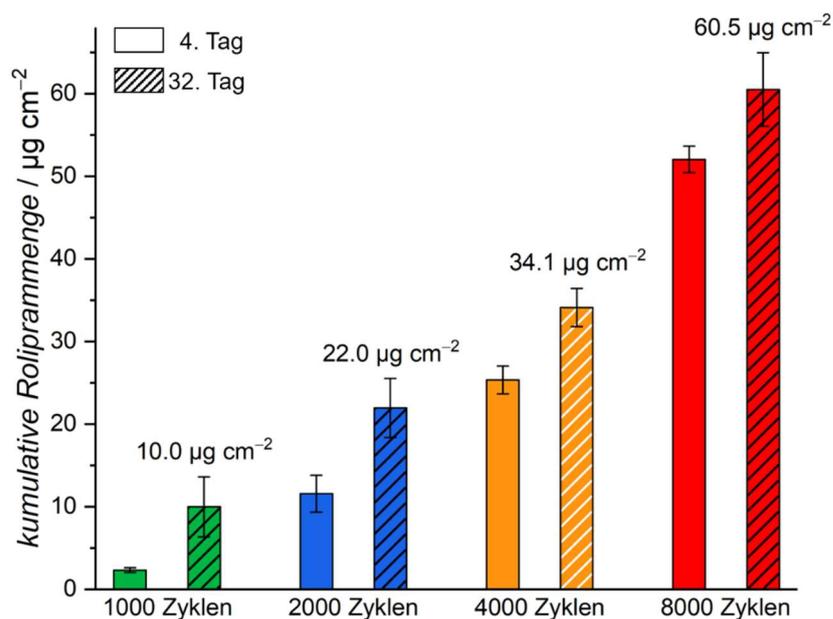


Abbildung 4.34: Freigesetzte Rolipram-Mengen bis zum 4. und 32. Tag aus sp-NPpT-Beschichtungen, die unter Verwendung der Standardsynthesebedingungen mit 1000 (grün), 2000 (blau), 4000 (orange) und 8000 (rot) Abscheidungszyklen in Elektrolysezelle 2 hergestellt wurden.

In Bezug auf die bis zum 32. Tag freigesetzten Rolipram-Mengen wurde aus der mit 1000 Zyklen beschichteten sp-NPpT-Beschichtung bis zum 4. Freisetzungstag 23% Rolipram abgegeben. Durch Erhöhung der Zyklenzahl steigt auch der prozentuale Rolipram-Anteil, der bis zum 4. Tag freigesetzt wurde. Dieser liegt bei einer Zyklenzahl von 2000 bei 50%, für 4000 Zyklen bereits bei 74% und für 8000 Zyklen schließlich bei 86%. Folglich unterscheiden sich die Freisetzungprofile der mit unterschiedlicher Zyklenzahl abgeschiedenen sp-NPpT-Beschichtungen hauptsächlich in den ersten vier Freisetzungstagen. Die abgegebenen Rolipram-Mengen bis zum 32. Tag weisen zwar keinen linearen Zusammenhang auf, allerdings kann mit Verachtfachung der Zyklenzahl die Rolipram-Menge versechsfacht werden.

Zur Bestimmung des Freisetzungsmechanismus wurden unbeschichtete Platinsubstrate analog zu den sp-NPPT-Beschichtungen mit den jeweiligen Thiolen modifiziert und mit Rolipram beladen. In den Freisetzungsergebnissen konnte zu keinem Zeitpunkt Rolipram nachgewiesen werden. Entsprechend scheint Rolipram in den Poren der sp-NPPT-Beschichtung und nicht nur an der makroskopischen Oberfläche angelagert zu werden. Trotzdem sollte beachtet werden, dass durch die elektrochemische Platinabscheidung die Morphologie der Platinoberfläche verändert wird. Möglicherweise findet an der deutlich raueren sp-NPPT-Beschichtung zusätzlich eine bevorzugte Rolipram-Anlagerung statt.

Um den positiven Einfluss des Roliprams auf Überleben der Spiralganglienzellen des Innenohrs bestimmen zu können, sollten die Überstände aus der unter sterilen Bedingungen durchgeführten Rolipram-Freisetzung in Zellkulturuntersuchungen evaluiert werden. Eine sterile Rolipram-Freisetzung in Panserin, dem Medium der SGN-Zellkulturuntersuchungen, konnte nicht erfolgreich durchgeführt werden. Trotz der Zugabe von Antibiotika wurden nach einigen Freisetzungstagen Kontaminationen, wie Bakterien aller Art, Pilze einschließlich Hefen, sowie Viren, in den Überständen beobachtet werden.<sup>231</sup> Daher konnte diese Versuchsreihe hinsichtlich des SGN-Überlebens keinen Mehrwert liefern, weshalb die Diskussion im Anhang zu finden ist (vgl. S. 212).

Da in PBS keine Nährstoffe vorhanden sind, kann die Kontaminierung durch Bakterien, Pilze sowie Viren während der Rolipram-Freisetzung in PBS deutlich leichter verhindert werden. Nachteilig ist jedoch die leichte Verdünnung des Zellmediums bei der Zellkulturuntersuchung, welche durch Zugabe des PBS-haltigen Überstands erzeugt wird. In Anlehnung an schon erfolgreich durchgeführte Zellkulturuntersuchungen mit PBS-haltigen Überständen<sup>64</sup> wurden entsprechend die Überstände aus der in PBS durchgeführten Rolipram-Freisetzung unter sterilen Bedingungen (vgl. Abbildung 4.30, S. 105) für Zellkulturuntersuchungen mit SGN verwendet.

##### *Kurzzusammenfassung: Rolipram-Freisetzung*

Zunächst wurde Rolipram unter nicht sterilen Bedingungen aus sp-NPPT-Beschichtungen, welche elektrochemisch in Elektrolysezelle 1 abgeschieden wurden, über 17 Tage unter dynamischen Bedingungen freigesetzt. Hierbei wurden fünf unterschiedlich modifizierte sowie unmodifizierte sp-NPPT-Beschichtungen untersucht. Es zeigte sich, dass aus der unmodifizierten Beschichtung die höchsten Rolipram-Mengen mit  $28.7 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  freigesetzt werden konnten. Die Modifizierungen mit 11-Mercaptoundecansäure und Natrium-3-mercapto-1-propan-sulfonat wiesen mit  $24 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  bzw.  $16.5 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  die größten freigesetzten Rolipram-Mengen aus modifizierten Oberflächen auf. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden mit diesen drei Oberflächenmodifikationen weitere Freisetzungsversuche

unter sterilen Bedingungen über eine Dauer von 98 Tagen in PBS und Panserin durchgeführt. Durch die in Panserin enthaltenen Nährstoffe konnten die Überstände während der Freisetzung nicht steril gehalten werden, weshalb Zellkulturuntersuchungen mit diesen nicht möglich waren. Die Freisetzung in PBS zeigte im Gegensatz zu der zuvor durchgeführten Rolipram-Freisetzung keine Abhängigkeit zwischen der freigesetzten Rolipram-Menge und der chemischen Modifizierung der sp-NPPt-Beschichtung. Nach 98 Tagen wurden aus allen sp-NPPt-Beschichtungen etwa  $38 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  Rolipram freigesetzt, wobei der Großteil des Roliprams (65-77%) bereits bis zum 17. Tag freigesetzt wurde. Die Zellkulturuntersuchungen mit Überständen aus der Rolipram-Freisetzung zeigten keinen Einfluss des Roliprams auf die SGN-Überlebensrate. Da auch die Kontrollproben keinen eindeutigen Effekt zeigten, sollte daher zukünftig der positive Einfluss des Roliprams auf die SGN erneut evaluiert werden.

Die Dicke der sp-NPPt-Beschichtungen zeigte einen deutlichen Einfluss auf die freigesetzte Rolipram-Menge. So konnte aus der mit 1000 Abscheidungszyklen hergestellten sp-NPPt-Beschichtungen nach 32 Tagen  $10.0 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  Rolipram freigesetzt werden. Durch Verdopplung der Abscheidungszyklen erhöhte sich die freigesetzte Rolipram-Menge auf  $22.0 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ . Die weitere Erhöhung der Zyklenzahl auf 4000 bzw. 8000 führte zu  $34.1 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  und  $60.5 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  freigesetztem Rolipram. Obwohl kein linearer Zusammenhang zwischen Zyklenzahl der elektrochemischen Abscheidung und freigesetzter Rolipram-Menge beobachtet werden konnte, wurde durch die erhöhte sp-NPPt-Schichtdicke eine deutlich größere Rolipram-Menge abgegeben.

Dementsprechend eignet sich zur Einstellung der freizusetzenden Rolipram-Menge am besten die Verwendung unterschiedlicher Schichtdicken der sp-NPPt-Beschichtung. Der zunächst festgestellte Einfluss der sp-NPPt-Modifizierung konnte nicht reproduziert werden.

##### 4.1.1.6 Stabilitätsuntersuchungen nach Lagerung unter Freisetzungsbedingungen

Für die Anwendung als biomedizinisches Implantatbeschichtungsmaterial spielt insbesondere die Stabilität der sp-NPPt-Beschichtungen unter Freisetzungsbedingungen eine große Rolle. Zur Simulation der Körperbedingungen wurden die Proben für 17 Tage unter dynamischen Bedingungen bei  $37^\circ\text{C}$  in Panserin gelagert. Es wurden sowohl unmodifizierte und modifizierte Oberflächen als auch mit Rolipram beladene und unbeladene sp-NPPt-Beschichtungen untersucht. Anhand von rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen sollte die Oberflächenmorphologie der Proben beurteilt werden, impedanzspektroskopische sowie cyclovoltammetrische Messungen dienten zur Kontrolle der elektrischen Eigenschaften.

#### 4 Ergebnisse und Diskussion

Außerdem wurden die Freisetzungsüberstände mittels Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (*inductively coupled plasma mass spectrometry*, ICP-MS) auf Platinbestandteile untersucht, um Auflösungen der sp-NPPT-Beschichtung zu evaluieren. Insbesondere für biomedizinische Anwendungen werden freigesetzte ionische Platinspezies im Hinblick auf mögliche cancerogene Eigenschaften als sehr kritisch eingestuft (vgl. Kapitel 2.2.1, S. 12ff).

Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen unmodifizierter mit Rolipram beladener sp-NPPT-Beschichtungen sind in Abbildung 4.35 dargestellt.

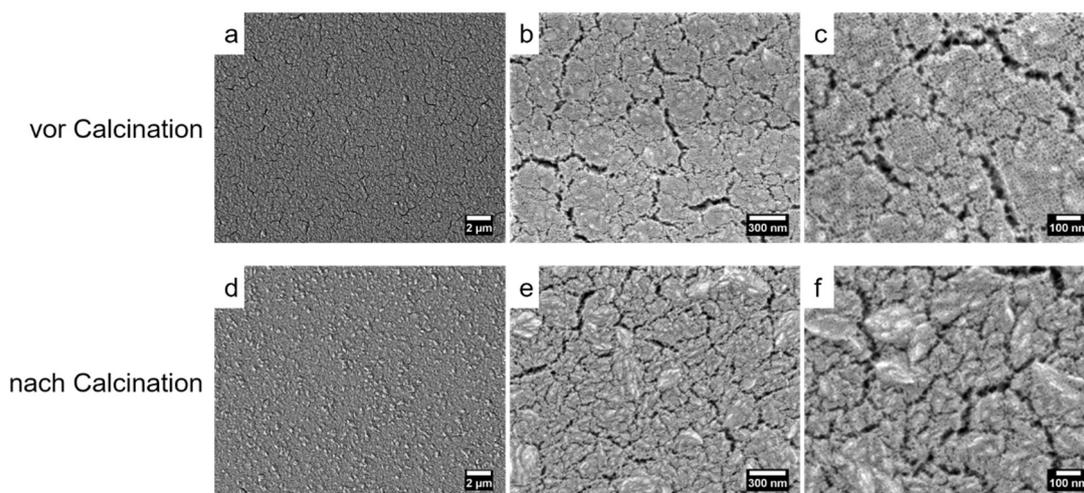


Abbildung 4.35: REM-Aufnahme einer unmodifizierten mit Rolipram-beladenen sp-NPPT-Beschichtung nach der Rolipram-Freisetzung (a-c) sowie nach der Freisetzung zur Reinigung calcinierten (d-g) Proben.

Um mögliche Oberflächenverunreinigungen zu entfernen, die durch die Lagerung im Freisetzungsmedium verursacht werden können, wurden die Proben bei 350 °C calciniert und anschließend vermessen. Die Oberflächenmorphologie der sp-NPPT-Beschichtung nach 17-tägiger Lagerung unter Freisetzungsbedingungen in Panserin blieb, wie in Abbildung 4.35a-c zu erkennen, unverändert. Es sind weiterhin Poren mit einem Durchmesser von etwa 10 nm und Risse mit einer Breite von 50 nm vorhanden. Es scheint, als hätten sich durch die Calcination etwa 300 nm große, nicht poröse Ablagerungen auf der sp-NPPT-Beschichtung gebildet (Abbildung 4.35d-f). Trotzdem sind weiterhin Poren mit unveränderten Porendurchmessern von 10 nm und Risse in der Beschichtung vorhanden. Dies entspricht der unmodifizierten Kontrollprobe (Abbildung 4.36), in der kein Rolipram eingelagert wurde.

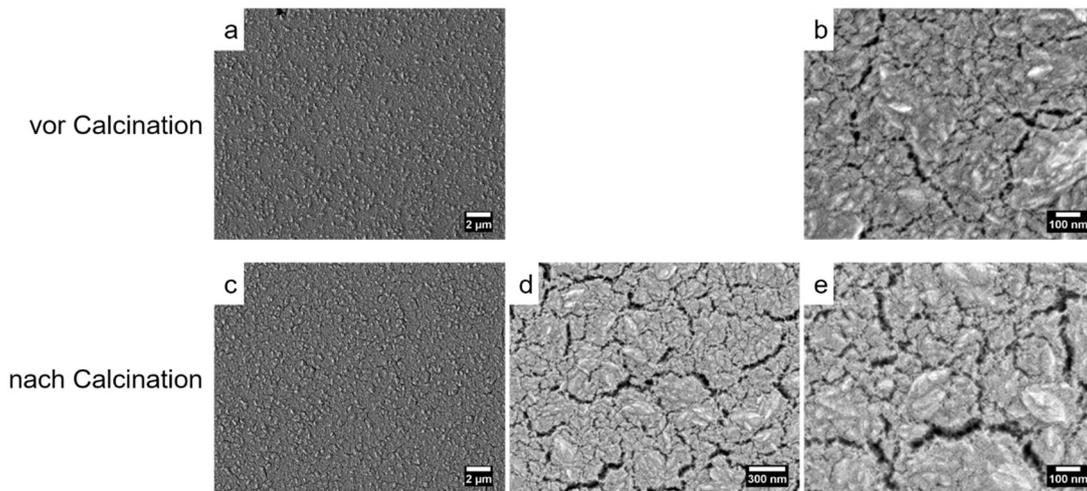


Abbildung 4.36: REM-Aufnahme einer unmodifizierten unbeladenen sp-NPPt-Beschichtung nach Lagerung unter Freisetzungsbedingungen (a,b) sowie nach der Freisetzung zur Reinigung calcinierter (c-e) Proben.

Die Poren- und Rissgrößen unterscheiden sich nicht zu der in Abbildung 4.35d-f dargestellten sp-NPPt-Beschichtung. Auch hat sich die Oberflächenmorphologie der Kontrollprobe durch die Calcination (Abbildung 4.36c-e) nicht verändert. Offensichtlich haben sich auf einigen Probenoberflächen Ablagerungen gebildet, welche durch die Lagerungen in Panserin während der Rolipram-Freisetzung verursacht wurden.

Die mit 11-Mercaptoundecansäure modifizierte sp-NPPt-Beschichtung zeigt die gleiche Oberflächenmorphologie wie die bereits analysierten sp-NPPt-Beschichtungen, dargestellt in Abbildung 4.37.

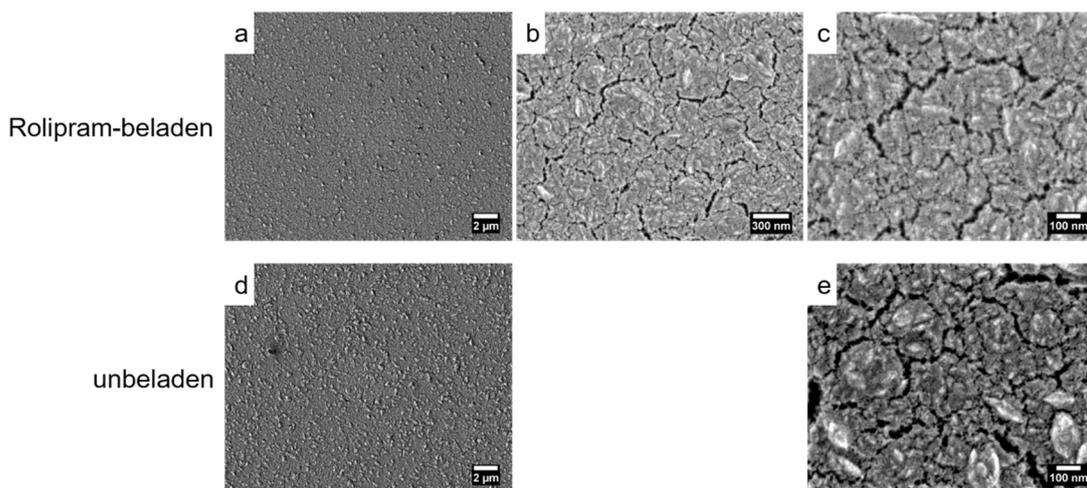


Abbildung 4.37: REM-Aufnahme von mit 11-Mercaptoundecansäure modifizierten Rolipram-beladenen (a-c) sowie unbeladenen (d,e) sp-NPPt-Beschichtungen nach Lagerung unter Freisetzungsbedingungen.

#### 4 Ergebnisse und Diskussion

Entsprechend können anhand der vorgestellten REM-Aufnahmen gravierende Änderungen der Oberflächenmorphologie von den sp-NPPt-Beschichtungen durch die Rolipram-Freisetzung ausgeschlossen werden. Unabhängig von Oberflächenmodifizierung und Rolipram-Beladung wurden bei einigen Proben nach der Freisetzung Ablagerungen auf der sp-NPPt-Beschichtung beobachtet, welche auch durch Calcination nicht entfernt werden konnten.

Zur weiteren Stabilitätsbeurteilung der sp-NPPt-Beschichtung unter Freisetzungsbedingungen wurden impedanzspektroskopische Messungen von den sp-NPPt-Beschichtungen, die auch unter dem REM untersucht wurden, durchgeführt. (Abbildung 4.38).

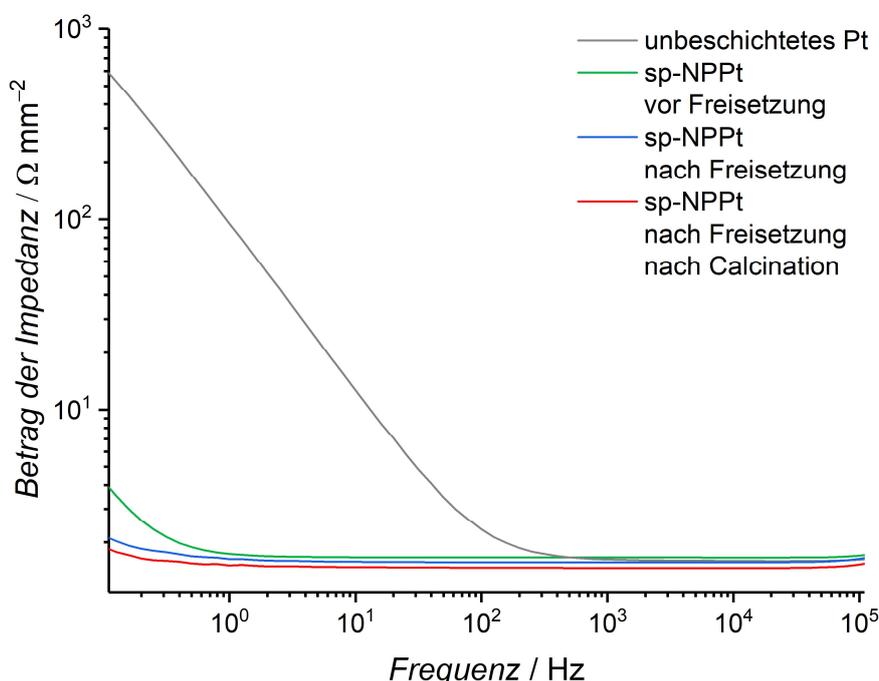


Abbildung 4.38: Impedanzspektroskopische Messungen eines unbeschichteten Platinsubstrats (grau), sowie von sp-NPPt-beschichteten Platinsubstraten vor der Rolipram-Freisetzung (blau), nach der Rolipram-Freisetzung (grün) sowie anschließender Calcination (rot).

Das unbeschichtete Platinsubstrat (schwarz) weist, wie auch schon in Kapitel 4.1.1.2 (S. 85) erläutert, bei einer Frequenz von  $0.1 \text{ Hz}$  mit  $630 \Omega \cdot \text{mm}^{-2}$  eine deutlich höhere Impedanz als die sp-NPPt-Beschichtungen auf. Vor der Rolipram-Freisetzung wurde bei  $0.1 \text{ Hz}$  für die sp-NPPt-Beschichtung eine Impedanz von  $4.2 \Omega \cdot \text{mm}^{-2}$  (grün) bestimmt. Bei den impedanzspektroskopischen Messungen konnten weder Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Modifikationen der Platinoberfläche noch zwischen unbeladenen und beladenen sp-NPPt-Beschichtungen festgestellt werden. Nach der 17-tägigen Rolipram-Freisetzung in Panserin bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  unter dynamischen Bedingungen wiesen alle sp-NPPt-Beschichtungen bei  $0.1 \text{ Hz}$  eine

Impedanz von etwa  $2 \Omega \cdot \text{mm}^{-2}$  auf (blau), wobei keine Veränderung durch die anschließende Calcination verursacht wurde (rot). Die Verschiebung der Impedanzen der calcinierten sp-NPPT-Beschichtung bei allen Frequenzen um einen konstanten Wert wird auf einen systematischen Fehler zurückgeführt und kann mit den Umgebungsparametern, wie Temperatur und Druck, erklärt werden. Die Verringerung der Impedanz der sp-NPPT-Beschichtungen nach der Freisetzung im niederfrequenten Bereich könnte mit einer besseren Zugänglichkeit des Porensystems und einer folglich erhöhten spezifischen Oberfläche erklärt werden. Dies könnte auf leichte Auflösungen der sp-NPPT-Beschichtung oder Herauslösen von Chemikalienrückständen aus dem Herstellungsprozess, beispielsweise Pluronic® F127, zurückzuführen sein.

Anhand cyclovoltammetrischer Messungen sollte ein Vergleich der integralen Ladungsmenge zwischen der sp-NPPT-Beschichtung vor sowie nach der Rolipram-Freisetzung gezogen werden. Außerdem wurde diese mit den Messungen an calcinierten Proben verglichen. Es wurden unmodifizierte und modifizierte, sowie unbeladene und Rolipram beladene Proben untersucht, die sich jedoch nicht unterschieden. Daher wird im Folgenden ausschließlich zwischen sp-NPPT-Beschichtungen vor und nach der Freisetzung sowie nach anschließender Calcination, differenziert. In Abbildung 4.39 sind die jeweiligen Cyclovoltammogramme dargestellt.

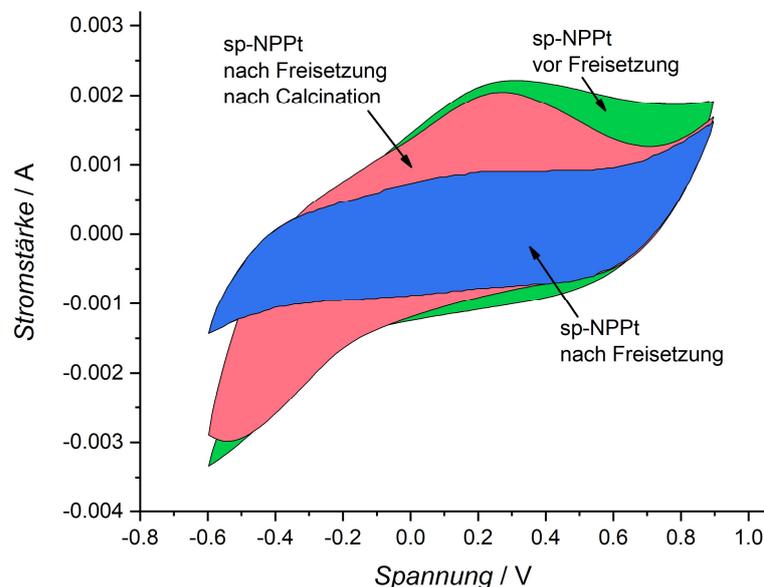


Abbildung 4.39: Cyclovoltammetrische Untersuchungen von sp-NPPT-beschichteten Platinsubstraten vor der Rolipram-Freisetzung (blau), nach der Rolipram-Freisetzung (grün) sowie anschließender Calcination (rot).

Vor der Rolipram-Freisetzung weist die sp-NPPT-Beschichtung eine integrale Ladungsdichte von  $33,1 \cdot 10^{-4} \text{ VA}$  auf (grün; vgl. Abbildung 4.16, S. 86), welche durch

die 17-tägige Rolipram-Freisetzung auf  $19.6 \cdot 10^{-4}$  VA verringert wurde (blau). Durch anschließende Calcination wurde die integrale Ladungsmenge mit einem Wert von  $31.9 \cdot 10^{-4}$  VA wieder stark erhöht (rot), wodurch der Ausgangswert der integralen Ladungsmenge fast erreicht wurde. Allerdings unterscheiden sich die Verläufe der Cyclovoltammogramme (rot, grün). So ist in dem Cyclovoltammogramm der calcinierten sp-NPPT-Beschichtung (rot) eine deutlichere Oxidationsreaktion erkennbar. Da sich die Impedanz durch die Rolipram-Freisetzung im niederfrequenten Bereich verringerte (vgl. Abbildung 4.38, S. 114) und dies mit einer Erhöhung der spezifischen Oberfläche erklärt wurde, scheinen die Redoxreaktionen an der sp-NPPT-Oberfläche durch die Freisetzungsbedingungen vermindert zu werden. Die auf den REM-Aufnahmen erkennbaren Ablagerungen (vgl. Abbildung 4.36, S. 113) wurden durch die Calcination nicht entfernt, weshalb die verminderten Oberflächenreaktionen vor der Calcination mit diesen nicht erklärt werden können. Infolgedessen scheinen Rückstände mit einer Zersetzungstemperatur kleiner als  $350 \text{ }^\circ\text{C}$  in der sp-NPPT-Beschichtung vorhanden zu sein, welche die Redoxreaktionen an der sp-NPPT-Oberfläche beeinflussen. Dies können zum einen Rolipram-Rückstände, welche noch nicht freigesetzt wurden, sein. Zum anderen sind auch Rückstände aus dem Freisetzungsmedium Panserin denkbar.

Zur Untersuchung möglicher Auflösungen der sp-NPPT-Beschichtung während der Wirkstofffreisetzung wurden die PBS-Überstände mittels Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (*inductively coupled plasma mass spectrometry*, ICP-MS) auf sämtliche Platinspezies überprüft. Zur generellen Evaluierung der Messdurchführung und -parameter wurden zunächst mit Rolipram beladene unmodifizierte, unbeladene unmodifizierte, sowie mit Rolipram beladene 11-Mercaptoundecansäure-modifizierte und unbeladene 11-Mercaptoundecansäure-modifizierte sp-NPPT-Beschichtungen auf ihre Stabilität geprüft. Die kumulativ aufgetragenen Platinkonzentrationen aus den Überständen von Tag 1, 4, 10 und 17 sind in Abbildung 4.40 dargestellt.

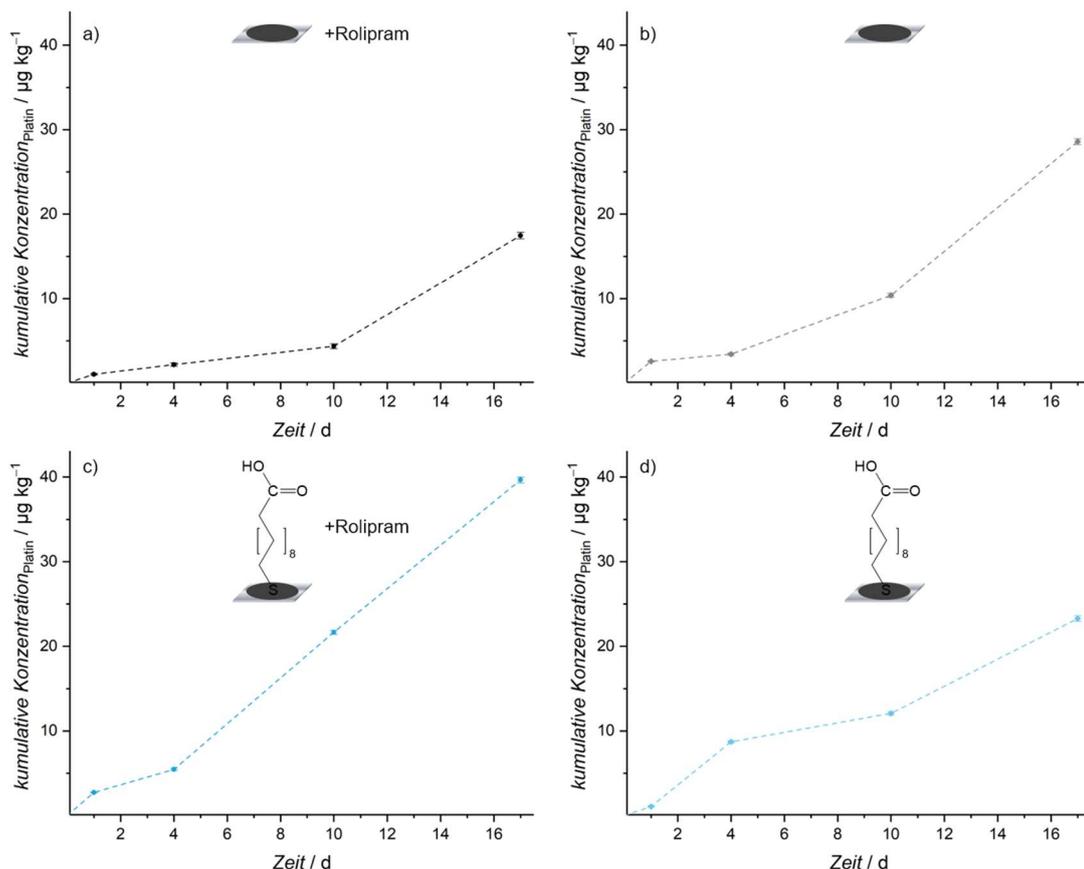


Abbildung 4.40: Kumulative Auftragung der durch ICP-MS-Messungen bestimmten Platinkonzentrationen der Freisetzungsrückstände von Tag 1, 4, 10 und 17. Es wurden mit Rolipram beladene unmodifizierte (a), unbeladene unmodifizierte (b), sowie Rolipram beladene 11-Mercaptoundecansäure-modifizierte (c) und unbeladene 11-Mercaptoundecansäure-modifizierte (d) sp-NPPt-Beschichtungen untersucht.

Es ist zu erkennen, dass die Kurven der unmodifizierten sp-NPPt-Beschichtungen zunächst eine geringere Steigung aufweisen, welche ab dem 10. Tag deutlich ansteigt. Nach 17 Tagen wurden aus der mit Rolipram beladenen unmodifizierten sp-NPPt-Beschichtung (a)  $17.5 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  Platin freigesetzt, bei der unbeladenen sp-NPPt-Beschichtung (b) sogar  $28.6 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ . Bei den mit Rolipram beladenen modifizierten sp-NPPt-Beschichtungen (c) ergibt sich ein ähnliches Ergebnis, hier steigt die Platinkonzentration schon ab dem 4. Tag deutlich an und weist nach 17 Tagen einen Wert von  $39.7 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  auf. Die unbeladene modifizierte sp-NPPt-Beschichtung (d) zeigt schon während der ersten Freisetzungstage eine hohe Platinfreisetzung, welche jedoch im weiteren Verlauf nicht weiter ansteigt. So wurde hier nach 17 Tagen  $23.3 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  Platin in den Überständen nachgewiesen.

Bei den unmodifizierten sp-NPPt-Beschichtungen wurde eine geringere Platinmenge als bei den mit Rolipram beladenen Proben freigesetzt. Bei den modifizierten sp-NPPt-Beschichtungen hingegen weist die Rolipram beladene

#### 4 Ergebnisse und Diskussion

Beschichtung eine deutlich höhere Platinfreisetzung auf. Folglich wurde die freigesetzte Platinmenge nicht von der Rolipram-Freisetzung beeinflusst. Auch bei dem Vergleich zwischen unmodifizierten und modifizierten sp-NPPT-Beschichtungen kann kein Zusammenhang zu der freigesetzten Platinmenge festgestellt werden.

Zukünftig sollten zur genaueren Einschätzung der Stabilität der sp-NPPT-Beschichtung zusätzlich blanke Platinsubstrate mit der jeweils analogen Behandlung als Blindkontrollen zu der sp-NPPT-Beschichtung vermessen werden. Da auch aus dichten Platinoberflächen, welche bereits im Menschen eingesetzt werden, Platinspezies freigesetzt werden, sollten die Platinkonzentrationen miteinander verglichen und anhand dieser die Zelltoxizität eingeschätzt werden. Außerdem sollten sowohl die Einlagerungs- als auch Freisetzungsbedingungen in Reinstwasser simuliert und unterschiedlich behandelte nanoporöse Platinbeschichtungen im Vergleich zu unbeschichteten Platinsubstraten untersucht werden. Zellkulturuntersuchungen mit NIH3T3-Fibroblasten und SH-SY5Y Krebszellen zeigten, dass geringe Platinkonzentration unter  $1000 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  kein Zellsterben hervorriefen.<sup>91</sup> Daher sollten aufgrund der potentiellen Anwendung im Innenohr Zellkulturuntersuchungen der Überstände mit den aus dem Innenohr stammenden Spiralganglienzellen durchgeführt werden.

Durch *in vivo* Analysen der elektrochemischen Impedanzspektroskopie und Cyclovoltammetrie unter Freisetzungsbedingungen könnten weitere anwendungsbezogene Aussagen über die Beschichtungsstabilität getätigt werden.<sup>232</sup>

##### *Kurzzusammenfassung: Stabilitätsuntersuchungen nach Lagerung unter Freisetzungsbedingungen*

Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen zeigten nach 17-tägiger Lagerung unter Freisetzungsbedingung keine Veränderungen des Porensystems. Außerdem sind auf einigen Oberflächen Ablagerungen erkennbar, welche auf Rückstände aus dem Freisetzungsmedium zurückgeführt werden.

Impedanzspektroskopische Messungen zeigten eine Verringerung des Wechselstromwiderstands im niederfrequenten Bereich um etwa  $2 \Omega\cdot\text{mm}^{-2}$ , welcher sich auch durch anschließende Calcination nicht veränderte. Eine mögliche Erklärung ist eine bessere Zugänglichkeit des Porensystems durch Herauslösen von Rückständen, wie Pluronic® F127, aus der sp-NPPT-Beschichtung.

In aufgenommenen Cyclovoltagrammen konnte ein deutlicher Unterschied zwischen den sp-NPPT-Beschichtungen vor und nach der Freisetzung festgestellt werden. Die integrale Ladungsmenge wurde durch Lagerung unter Freisetzungsbedingungen von  $33.1\cdot 10^{-4}$  VA um 40% auf  $19.6\cdot 10^{-4}$  VA verringert. Hier konnte eine anschließende Calcination eine Annäherung des Cyclovoltammogramms der sp-NPPT-Beschichtung nach der Freisetzung an den

Ausgangszustand hervorrufen, wodurch die integrale Ladungsmenge wiederum auf  $31,9 \cdot 10^{-4}$  VA erhöht wurde.

Die Untersuchung der Freisetzungsüberstände mittels ICP-MS auf Platinspezies zeigte, dass unabhängig von Modifizierung und Rolipram-Freisetzung bis zum 17. Freisetzungstag Platinkonzentrationen bis  $39,7 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$  nachgewiesen werden konnten. Da diese Platinkonzentrationen anhand bereits durchgeführter Zellkulturuntersuchungen mit NIH3T3-Fibroblasten und SH-SY5Y Krebszellen keine Toxizität zeigten, sollte der Einfluss der Platinmengen auf die aus dem Innenohr stammenden Spiralganglienzellen untersucht werden (vgl. Kapitel 2.2.1, S. 12ff).

### 4.1.1.7 Transfer auf Elektrodenkontakte des Cochlea-Implantats

Aufgrund der in den vorherigen Abschnitten durch REM-Aufnahmen, elektrische Charakterisierungen, Cytokompatibilitätsuntersuchungen sowie Rolipram-Freisetzungen gezeigten erfolgsversprechenden Eigenschaften der sp-NPPt-Beschichtung sollten weiterführend Elektrodenkontakte eines Cochlea-Implantats beschichtet und charakterisiert werden.

### Entwicklung einer alternativen Templatentfernung

Hierfür musste zunächst eine alternative Templatentfernung zur Calcination bei  $350 \text{ }^\circ\text{C}$  entwickelt werden, da sich die Polytetrafluorethylen (PTFE)-Ummantelung des an dem Elektrodenkontakt angeschweißte Platindrahts ab etwa  $300 \text{ }^\circ\text{C}$  zersetzt.<sup>198</sup>

Zum Nachweis der Rückstände des Pluronic® F127 in der sp-NPPt-Beschichtung mussten zunächst geeignete Analysemethoden gefunden werden. Dafür wurden cyclovoltammetrische Messungen, Krypton-Physisorptionsmessungen und Zellkulturuntersuchungen durchgeführt. Geeignete Verfahren zur Pluronic® F127-Entfernung könnten zum einen die Extraktion und zum anderen eine Calcination bei unter  $300 \text{ }^\circ\text{C}$  sein.

Zur Bestimmung einer geeigneten Calcinationstemperatur unter  $300 \text{ }^\circ\text{C}$  wurde der genaue Zersetzungstemperaturbereich von Pluronic® F127 durch thermogravimetrische Messungen bestimmt (vgl. Abbildung 7.8, S. 214). Da sich Pluronic® F127 ab etwa  $250 \text{ }^\circ\text{C}$  zersetzt, wurde  $270 \text{ }^\circ\text{C}$  als eine mögliche geeignete Calcinationstemperatur festgelegt. Anhand cyclovoltammetrischer Messungen sollten Rückschlüsse auf mögliche Restmengen von Pluronic® F127 in der sp-NPPt-Beschichtung durch Detektion von Reduktions- und Oxidationsprozessen an der Probenoberfläche geschlossen werden. Zur Bestimmung möglicher Pluronic® F127-Rückstände wurden Cyclovoltammogramme einer nicht calcinierten sowie bei  $120 \text{ }^\circ\text{C}$ , bei  $270 \text{ }^\circ\text{C}$  und  $350 \text{ }^\circ\text{C}$  calcinierten sp-NPPt-Beschichtungen aufgenommen, welche in Abbildung 4.41 dargestellt sind.

#### 4 Ergebnisse und Diskussion

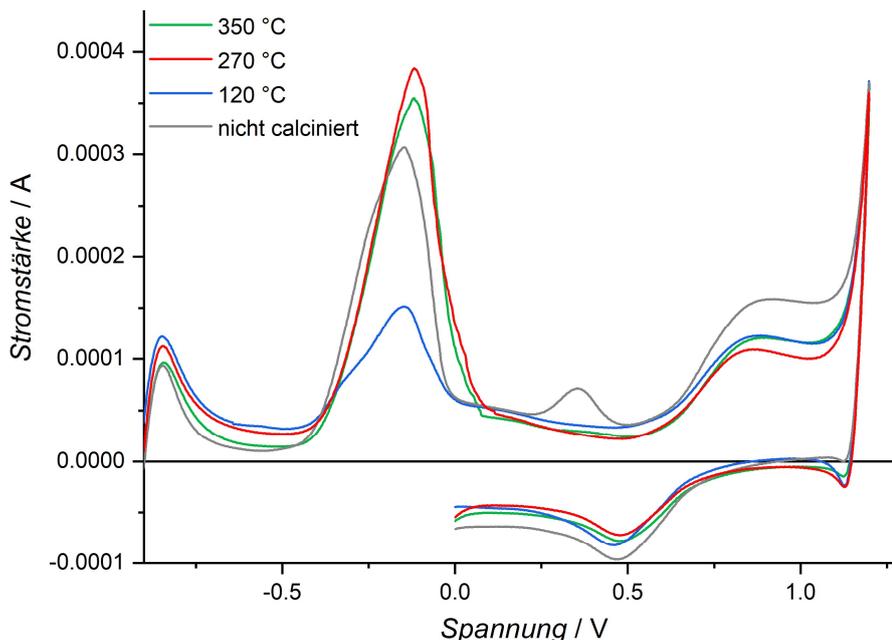


Abbildung 4.41: Cyclovoltammetrische Messungen an nicht calcinierten (grau), sowie bei 120 °C (blau), 270 °C (rot) und 350 °C (grün) calcinierten sp-NPpt-Beschichtungen zum Nachweis möglicher Pluronic® F127-Rückstände in der sp-NPpt-Beschichtung.

Um die an der Probenoberfläche ablaufenden Oxidations- und Reduktionsreaktionen genauer analysieren zu können, wurde die Geschwindigkeit der Potentialänderung im Vergleich zu den cyclovoltammetrischen Messungen in Abschnitt 4.1.1.2 von  $0.1 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$  auf  $0.001 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$  herabgesetzt. Infolgedessen sind die einzelnen Signale deutlich besser ausgebildet, wodurch der Potentialbereich zwischen  $-1.0 \text{ V}$  bis  $0 \text{ V}$  der Oxidation der atomaren Wasserstoff-Belegung auf der Platinoberfläche zugeordnet werden kann. Im weiteren Verlauf des Spannungshinlauf ist die Bildung der Sauerstoffdeckschicht erkennbar, bis die Sauerstoffentwicklung bei etwa  $1.1 \text{ V}$  einsetzt. Auch die Reduktion der Sauerstoffbelegung beim Potentialrücklauf bei  $0.5 \text{ V}$  ist deutlich erkennbar. Durch den Vergleich der Oberflächenreaktionen an der nicht calcinierten sowie bei unterschiedlichen Temperaturen calcinierten sp-NPpt-Beschichtung, sollte auf mögliche Rückstände von Pluronic® F127 geschlossen werden. Die nicht calcinierte sp-NPpt-Beschichtung weist bei einem Potential von  $0.35 \text{ V}$  im Gegensatz zu den calcinierten Proben ein deutliches Signal auf. Möglicherweise könnte dieses Signal durch eine Oxidationsreaktion von den Rückständen in der nicht calcinierten Probe hervorgerufen werden. Da diese Reaktion jedoch an der Oberfläche der bei  $120 \text{ °C}$  calcinierten sp-NPpt-Beschichtung nicht mehr stattfindet und Pluronic® F127 erst ab etwa  $250 \text{ °C}$  zersetzt wird (vgl. Abbildung 7.8, S. 214), sollte diese Oxidationsreaktion nicht dem Pluronic® F127 zugeordnet werden. Vermutlich werden durch die Calcination noch weitere Rückstände, beispielsweise aus der Elektrolytlösung,

entfernt, welche das Oxidationssignal bei 0.35 V verursachen. Zwar weist die bei 120 °C calcinierte sp-NPpt-Oberfläche bei -0.15 V ein deutlich kleineres Signal auf, da aber an der nicht calcinierte sp-NPpt-Beschichtung eine ähnlich hohe Oxidationsreaktion wie an den bei höheren Temperaturen calcinierten Beschichtungen stattfindet, sollte auch dieses Signal nicht den Rückständen von Pluronic® F127 zugeordnet werden. Demzufolge ist die Cyclovoltammetrie als Nachweismethode für Rückstände von Pluronic® F127 nicht geeignet.

Es wurden darüber hinaus Krypton-Physisorptionsmessungen von bei 120 °C, 270 °C und 350 °C calcinierten sp-NPpt-Beschichtungen durchgeführt und die spezifische Oberfläche mittels der Brunauer-Emmet-Teller-Methode (BET) bestimmt. Die aufgenommenen Isothermen sowie der Vergleich der spezifischen Oberflächen sind in Abbildung 4.42 dargestellt.

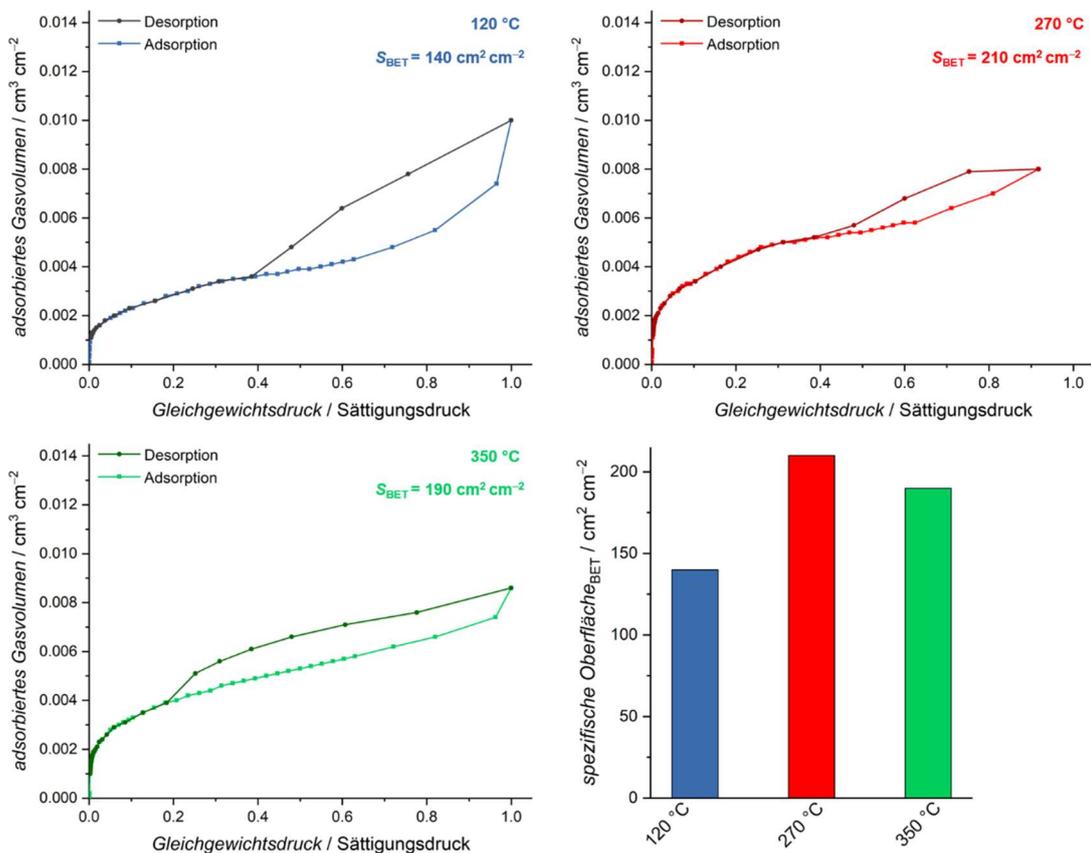


Abbildung 4.42: Isothermen der Krypton-Physisorptionsmessungen von bei 120 °C (blau), 270 °C (rot) und 350 °C (grün) calcinierten sp-NPpt-Beschichtungen sowie der direkte Vergleich der jeweiligen spezifischen Oberflächen.

Die Isothermen verlaufen abhängig von der Calcinationstemperatur unterschiedlich. So weist die Isotherme unter Verwendung einer Calcinationstemperatur von 120 °C eine größere Hysterese auf, welche sich im Druckbereich von 1.0 bis 0.4 ausbildet (blau). Durch die Erhöhung der Calcinationstemperatur auf

270 °C konnte eine kleinere Hysterese detektiert werden, welche mit einem deutlich flacheren Verlauf im Druckbereich von 1.0 bis 0.4 auftrat. Die weitere Temperaturerhöhung auf 350 °C führte zu einer flachen Hysterese mit einem deutlich größeren Druckbereich von 1.0 bis 0.2. Da die vermessenen Probenmengen aufgrund des großen Herstellungsaufwands mit ihrer sehr geringen makroskopischen Oberfläche an der unteren Nachweisgrenze für Krypton-Physisorptionsmessungen liegen, sollten anhand des Isothermenverlaufs keine konkreten Aussagen über Porenformen und Porengrößen getroffen werden. Trotzdem können durch den Vergleich der spezifischen Oberflächen Rückschlüsse auf mögliche Pluronic® F127-Rückstände gezogen werden. Die bei 120 °C calcinierte sp-NPpt-Beschichtung weist mit  $140 \text{ cm}^2 \cdot \text{cm}^{-2}$  eine kleinere spezifische Oberfläche auf als die Proben, die bei 270 °C oder 350 °C calciniert wurden. Durch die Calcination bei 270 °C konnte eine spezifische Oberfläche von  $210 \text{ cm}^2 \cdot \text{cm}^{-2}$ , durch Calcinieren bei 350 °C eine spezifische Oberfläche von  $190 \text{ cm}^2 \cdot \text{cm}^{-2}$  erzeugt werden. Unter Berücksichtigung der Messfehler ist die spezifische Oberfläche beider Proben gleichzusetzen, was auf eine vollständige Entfernung von Pluronic® F127 aus den Poren schließen lässt. Für eine genaue Aussage über die Pluronic® F127-Entfernung und folglich über die Cytokompatibilität der sp-NPpt-Beschichtung müssen abschließend Zellkulturuntersuchungen mit den sensitiven aus dem Innenohr stammenden Spiralganglienzellen (SGZ) durchgeführt werden.

Da die Extraktion von Pluronic® F127 aus Silica-Partikeln im Arbeitskreis Behrens bereits erfolgreich durchgeführt wird, sollte dieses Verfahren durch Anpassen der Parameter zur Entfernung des Pluronic® F127 aus sp-NPpt-Beschichtung verwendet werden.<sup>233</sup> Aufgrund der vorrangegangenen Untersuchungen über die Pluronic® F127-Entfernung aus Silica-Partikeln wurden die unter Verwendung des Extraktionsverfahrens hergestellten sp-NPpt-Beschichtungen direkt in Zellkulturexperimenten mit den sensitiven aus dem Innenohr stammenden Spiralganglienzellen (SGZ) untersucht. Hierfür wurden als Kontrollproben sowohl die Anzahl der Spiralganglienneuronen (SGN) auf Well-Plastik als auch auf den unbeschichteten Platinsubstraten bestimmt. Im Vergleich wurde eine nicht calcinierte sp-NPpt-Beschichtung untersucht. Da die bei 350 °C calcinierten sp-NPpt-Beschichtungen bereits in Zellkulturuntersuchungen mit SGN als cytokompatibel eingestuft wurden (vgl. Abbildung 4.20, S. 91), dienten auch diese Beschichtungen als Vergleichsproben. Es wurden zwei unterschiedlich lange Extraktionszeiten untersucht. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen sind in Abbildung 4.43 zu sehen, bei welchen das Neurofilament der SGN in grün und die Zellkerne sowohl der SGZ, als auch der Stützzellen, in blau erkennbar sind.

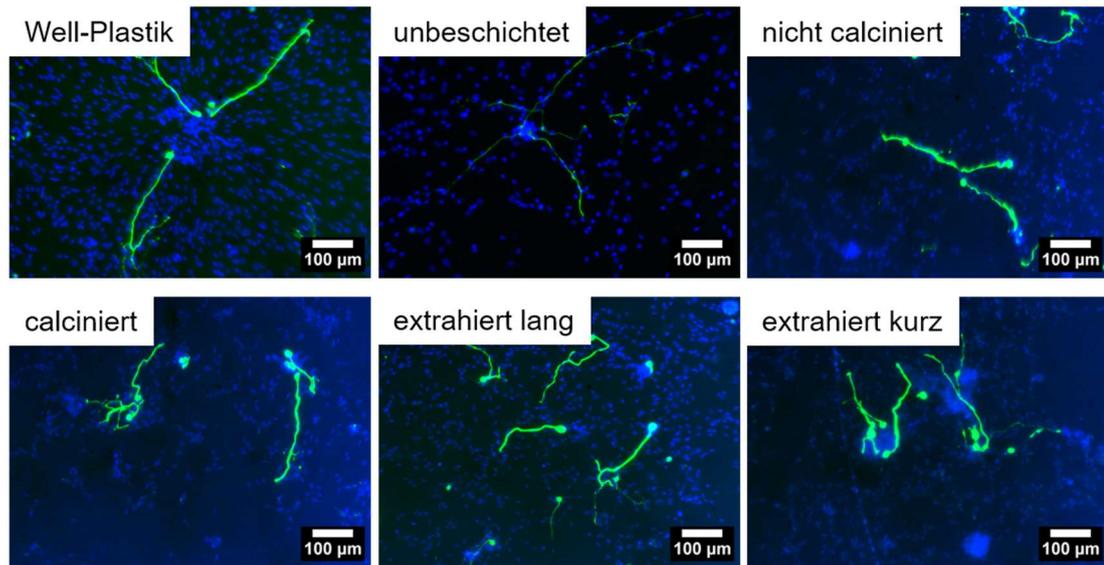


Abbildung 4.43: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von SGZ auf Ornithin/Laminin beschichtetem Well-Plastik, unbeschichtetem Platin und der sp-NPPT-Beschichtung, bei welcher Pluronic F127® nicht entfernt wurde (nicht calciniert), sowie durch Calcination, durch lange Extraktion und durch kurze Extraktion entfernt wurde. Die Spiralganglienneurone mit eingefärbten Neurofilamenten sind in grün erkennbar, die Zellkerne wurden mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) eingefärbt und sind in blau zu sehen.

Auf allen Oberflächen konnte ein Neuritenwachstum beobachtet werden. Visuell konnten keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Oberflächen festgestellt werden. Die absolute SGN-Anzahl nach zweitägiger Kultivierungszeit auf den unterschiedlichen Probenoberflächen ist in Abbildung 4.44 dargestellt.

#### 4 Ergebnisse und Diskussion

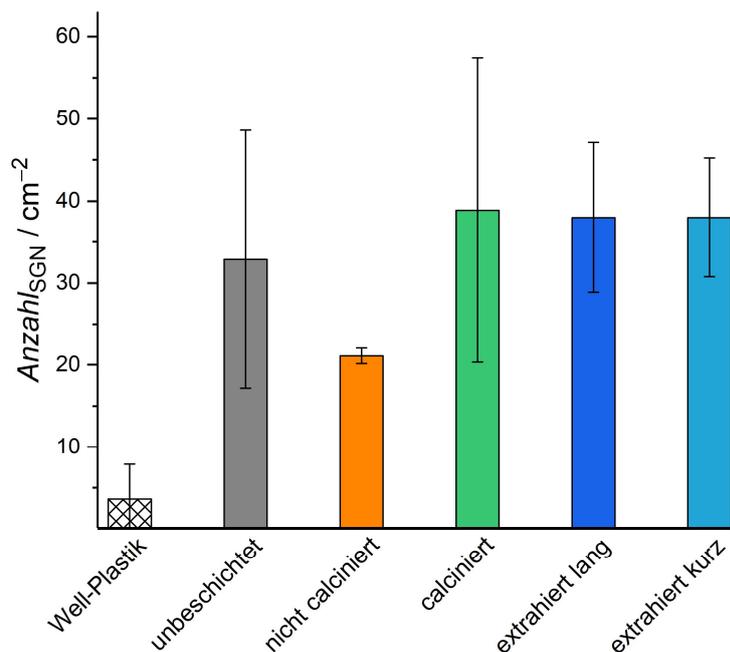


Abbildung 4.44: Absolute Zellzahlen der nach 48 Stunden angewachsenen Spiralganglienzellen auf Well-Plastik, dem unbeschichteten Platinsubstrat (grau) und der nicht calcinierten sp-NPPT-Beschichtung (orange), sowie sp-NPPT-Beschichtungen aus denen Pluronic F127® durch Calcination (grün), durch lange Extraktion (dunkelblau) und durch kurze Extraktion (hellblau) entfernt wurde.

Die nach 48 Stunden ausgezählte SGN-Anzahl auf Well-Plastik ist sehr gering, insbesondere im Hinblick auf die Ergebnisse anderer Zellkulturuntersuchungen mit SGN (vgl. Abbildung 4.83, S. 159). Aus den schon auf S. 91 erläuterten Gründen wird daher die geringe SGN-Anzahl auf der Kontrollprobe nicht weiter diskutiert und für die Auswertung nicht berücksichtigt. Der Vergleich zwischen den als sehr gut biokompatibel eingestuften unbeschichteten Platinsubstraten und den calcinierten, oder extrahierten sp-NPPT-Beschichtungen zeigt keine entscheidenden Unterschiede in der SGN-Überlebensrate. Ausschließlich auf der nicht calcinierten sp-NPPT-Beschichtung wurde eine deutlich geringere SGN-Anzahl nachgewiesen, was auf das in der Beschichtung eingeschlossene Pluronic® F127 zurückgeführt werden kann. Da sich das Zellwachstum auf den mit kurzer Extraktionszeit behandelten sp-NPPT-Beschichtungen von der calcinierten Probe nicht unterscheidet, wurde Pluronic® F127 offensichtlich bereits nach der kurzen Extraktionszeit aus den Poren der sp-NPPT-Beschichtung entfernt. Entsprechend eignet sich die Extraktion mit kürzerer Einlagerungszeit als alternative Templatentfernung und wird im Folgenden zur Entfernung von Pluronic® F127 bei Beschichtung der Elektrodenkontakte verwendet.

### *Kurzzusammenfassung: Entwicklung einer alternativen Templatentfernung*

Zur Beschichtung von Elektrodenkontakten des Cochlea-Implantats mit sp-NPPt musste aufgrund der PTFE-Ummantelung der Elektrodenkontaktierung eine alternative Templatentfernung bei niedrigeren Temperaturen entwickelt werden.

Es wurde zum einen eine Calcination unterhalb der PTFE-Zersetzungstemperatur bei 270 °C untersucht. Anhand cyclovoltammetrischer Messungen konnten keine Informationen über Rückstände von Pluronic® F127 in der sp-NPPt-Beschichtung erhalten werden. Durch Krypton-Physisorptionsmessungen kann eine erfolgreiche Pluronic® F127-Entfernung bei 270 °C angenommen werden

Zum anderen konnte die erfolgreiche Pluronic® F127-Entfernung durch ein Extraktionsverfahren mittels Zellkulturuntersuchungen nachgewiesen werden. Da der Beschichtungsprozess bei möglichst geringen Temperaturen durchgeführt werden sollte, um die PTFE-Ummantelung der Platindrähte nicht zu beschädigen, und die Extraktion ein erfolgreiches Ergebnis lieferte, wurden die per Calcination behandelten Proben nicht weiter untersucht.

Infolgedessen wird die Extraktion im Folgenden zur Pluronic® F127-Entfernung angewendet.

### **Oberflächen- und Schichtdickencharakterisierung**

Nachdem eine für Implantatbeschichtungen anwendbare sp-NPPt-Beschichtung erfolgreich hergestellt und charakterisiert wurde, sollten anschließend Cochlea-Elektrodenkontakte mit dieser beschichtet werden. Fotografische Aufnahmen eines solchen Elektrodenkontakts sind in Abbildung 4.45 zu sehen.

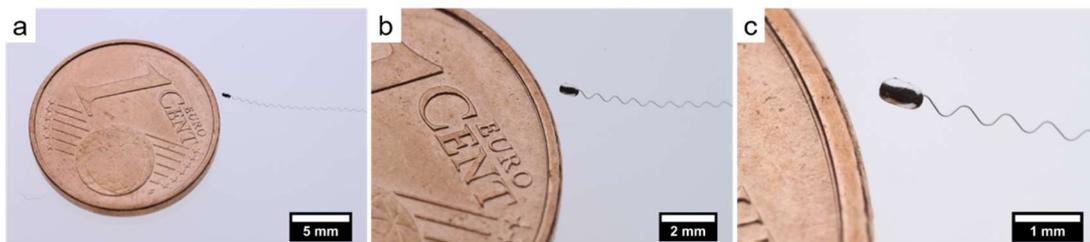


Abbildung 4.45: Fotografische Aufnahme eines Platinkontakts mit kontaktiertem Platindraht des Cochlea-Implantats in verschiedenen Vergrößerungen.

Der Elektrodenkontakt weist eine Breite von 450  $\mu\text{m}$  und eine Länge von 700  $\mu\text{m}$  auf und ist über einen sehr flexiblen, wellenförmigen, Teflon-ummantelten Platin-Iridiumdraht mit dem Implantat verbunden. Auf den rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen in Abbildung 4.46a und b ist der angeschweißte Draht an der Unterseite des Elektrodenkontakts erkennbar.

#### 4 Ergebnisse und Diskussion

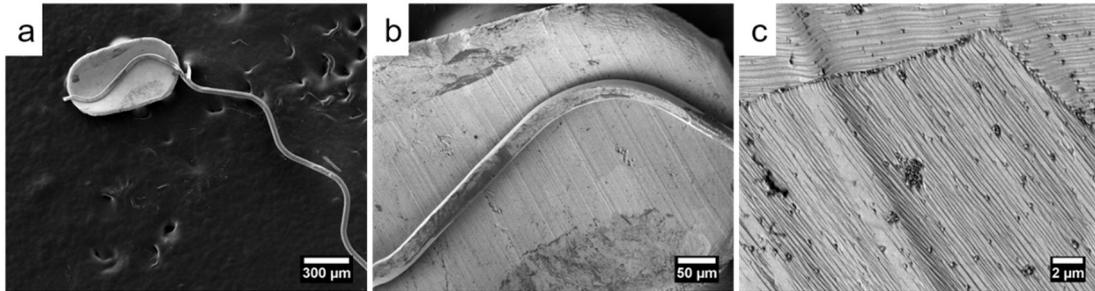


Abbildung 4.46: REM-Aufnahmen eines unbeschichteten Cochlea-Elektrodenkontakts.

Durch weitere Vergrößerung ist in Abbildung 4.46c die typische Struktur von blanken Edelmetalloberflächen erkennbar. Diese weist durch den bei der Herstellung von Edelmetallfolien verwendeten Walzprozess parallele Furchen auf.

Für die Beschichtung der Cochlea-Elektrodenkontakte ergeben sich zwei unterschiedliche Herstellungsrouten. Zum einen können die schon gefertigten Elektrodenkontakte elektrochemisch mit sp-NPPT beschichtet werden, zum anderen können die Kontakte aus einer schon beschichteten Platinfolie hergestellt werden. Werden die schon angefertigten Elektrodenkontakte elektrochemisch beschichtet, so müssen gegebenenfalls die Parameter der Standardsynthese der sp-NPPT-Beschichtung angepasst sowie Pluronic® F127 über Extraktion entfernt werden. In Abbildung 4.47 sind die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen eines durch Anlegen von 2000 Abscheidungszyklen mit sp-NPPT beschichteten Elektrodenkontakts zu sehen.

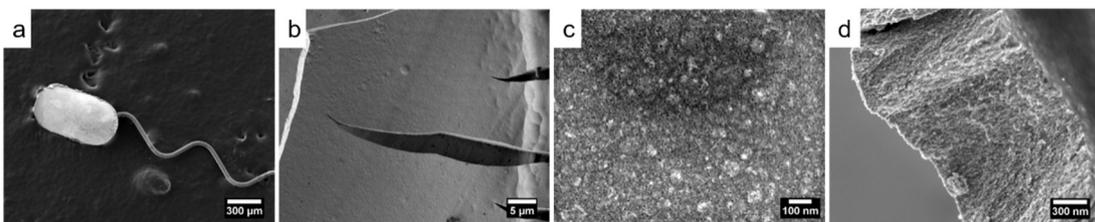


Abbildung 4.47: REM-Aufnahmen einer sp-NPPT-Beschichtung auf einem Cochlea-Elektrodenkontakt unter Verwendung der Standardsynthesebedingungen mit 2000 Abscheidungszyklen.

In der Übersichtsaufnahme sind ausschließlich an den äußeren Kanten des Elektrodenkontakts wenige Bruchstücke einer Beschichtung erkennbar, ein Großteil des Kontakts weist keine Beschichtung auf. Durch nähere Betrachtung der Beschichtung in Abbildung 4.47b scheint sich diese von dem Elektrodenkontakt abzuheben, was eine schlechte Anhaftung vermuten lässt. Bei weiteren Vergrößerungen werden Poren mit einer Größe von unter 10 nm erkennbar. Anhand der Bruchkante kann die Schichtdicke der sp-NPPT ermittelt werden, diese liegt bei etwa 1300 nm. Da diese Beschichtung im Vergleich zu den sp-NPPT-Beschichtungen auf den Platinsubstraten mehr als doppelt so dick ist (vgl. S. 80) sollte durch Verringerung der Anzahl der Abscheidungszyklen eine dünnere sp-NPPT-

Beschichtung erzeugt werden. Unter Verwendung von 600 Abscheidungszyklen konnte eine deutlich stabilere sp-NPPt-Beschichtung erzeugt werden, was auf den rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen in Abbildung 4.48 erkennbar ist.

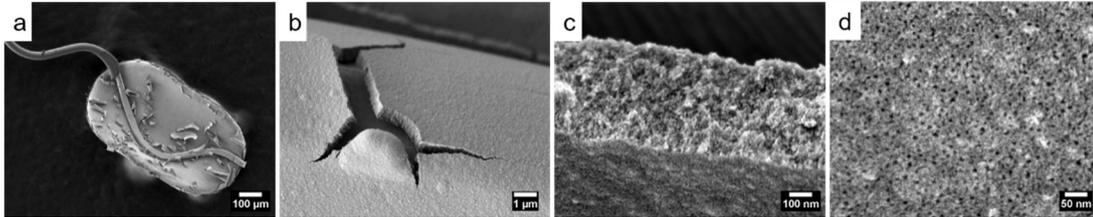


Abbildung 4.48: REM-Aufnahmen einer sp-NPPt-Beschichtung auf einem Cochlea-Elektrodenkontakt unter Verwendung von 600 Abscheidungszyklen.

Anhand der Übersichtsaufnahme kann der Ablösungsprozess der sp-NPPt-Beschichtung gut nachvollzogen werden. Sowohl an den Kanten als auch an dem kontaktierten Draht löst sich die sp-NPPt-Beschichtung durch Aufrollen von dem Elektrodenkontakt ab. Außerdem sind, wie in Abbildung 4.48b zu sehen, vereinzelt Risse in der sp-NPPt-Beschichtung vorhanden. Anhand dieser Kanten kann zum einen eine vollständige Porosität durch die gesamte sp-NPPt-Beschichtung festgestellt werden und zum anderen die Schichtdicke mit 450 nm bestimmt werden. Durch die hohe Vergrößerung in Abbildung 4.48d sind wiederum Poren mit Durchmessern kleiner 10 nm erkennbar.

Da durch die Verringerung der Zyklenzahl auf 600 Abscheidungszyklen eine deutlich stabilere sp-NPPt-Beschichtung auf dem Elektrodenkontakt aufgebracht werden konnte, wurde die Zyklenzahl nochmals auf 200 Abscheidungszyklen verkleinert. Die so erzeugte sp-NPPt-Beschichtung ist in Abbildung 4.49 dargestellt.

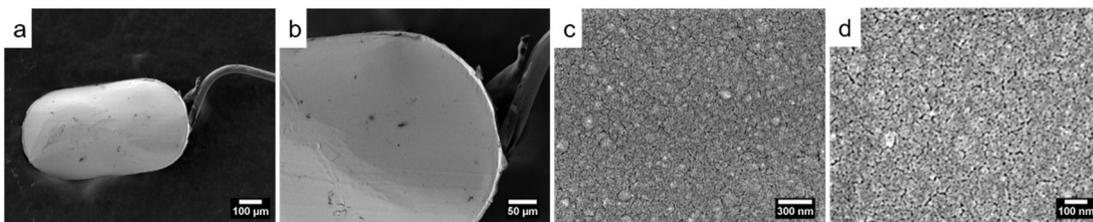


Abbildung 4.49: REM-Aufnahmen einer sp-NPPt-Beschichtung auf einem Cochlea-Elektrodenkontakt unter Verwendung von 200 Abscheidungszyklen.

Es konnte eine Beschichtung ohne Ablösungen oder Risse erzeugt werden, selbst an den Kanten des Elektrodenkontakts sind keine unbeschichteten Bereiche erkennbar. Höhere Vergrößerungen zeigen eine homogene Beschichtung, welche Poren mit Durchmessern kleiner 10 nm aufweisen.

Durch **Beschichten einer Platinfolie** unter Standardsynthesebedingungen, welche in Abbildung 4.50 zu sehen ist (2000 Abscheidungszyklen, Calcination),

#### 4 Ergebnisse und Diskussion

konnten Elektrodenkontakte aus dieser durch den Implantathersteller gefertigt werden.

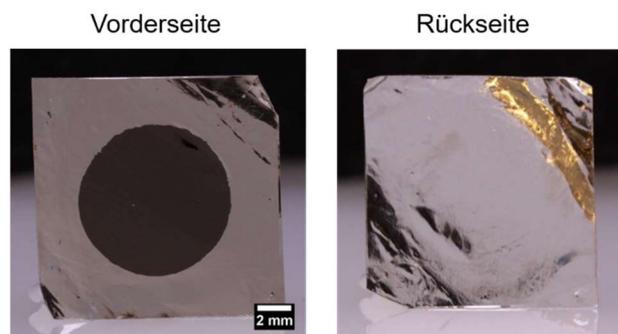


Abbildung 4.50: Fotografische Aufnahmen der mit sp-NPpt beschichteten Platinfolie des Implantatherstellers, aus welcher die Elektrodenkontakte angefertigt wurden.

Dafür wurden aus dem in schwarz erkennbaren sp-NPpt beschichteten Bereich der Platinfolie die Kontakte ausgestanzt, anschließend geborgen und der Platin-Iridiumdraht angeschweißt. Um die Stabilität der sp-NPpt-Beschichtung während der Herstellungsprozedur zu analysieren, wurden rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen nach den einzelnen Fertigungsschritten aufgenommen. Hierfür wurden alle Kontakte aus derselben beschichteten Platinfolie angefertigt. Dabei wird zwischen dem Ausstanzen von der sp-NPpt beschichteten Seite und von der Rückseite der beschichteten Platinfolie unterschieden. In Abbildung 4.51 ist ein Elektrodenkontakt nach Ausstanzen von der beschichteten Seite der Platinfolie gezeigt.

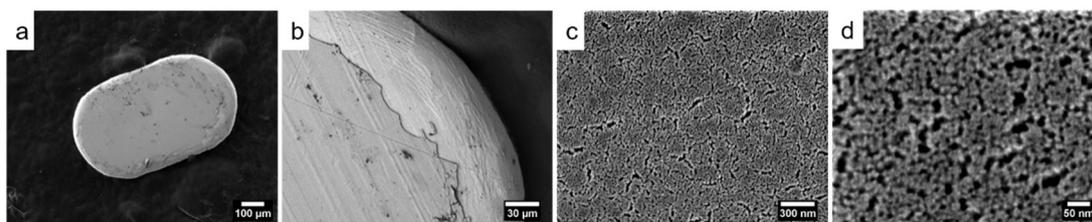


Abbildung 4.51: REM-Aufnahmen einer sp-NPpt-Beschichtung auf einem Cochlea-Elektrodenkontakt, welcher aus einer sp-NPpt-beschichteten Platinfolie (2000 Abscheidungszyklen) gestanzt wurde.

Auf dem gesamten Elektrodenkontakt ist eine Beschichtung erkennbar, die an den Kanten des Kontakts abgeplatzt ist. Dies kann auf den Ausstanzprozess zurückgeführt werden. Durch höhere Vergrößerungen in Abbildung 4.51c und d ist eine homogene, poröse Beschichtung mit etwas größeren Porendurchmessern von um die 10 nm zu sehen. Außerdem sind in dieser sp-NPpt-Beschichtung, im Vergleich zur sp-NPpt durch direkte elektrochemische Platinabscheidung auf den

Elektrodenkontakten (vgl. Abbildung 4.49), deutlich mehr Poren miteinander verknüpft.

Nach dem Biegen des ausgestanzten Elektrodenkontakts ist keine durchgehende sp-NPpt-Beschichtung auf der Oberfläche vorhanden (Abbildung 4.52).

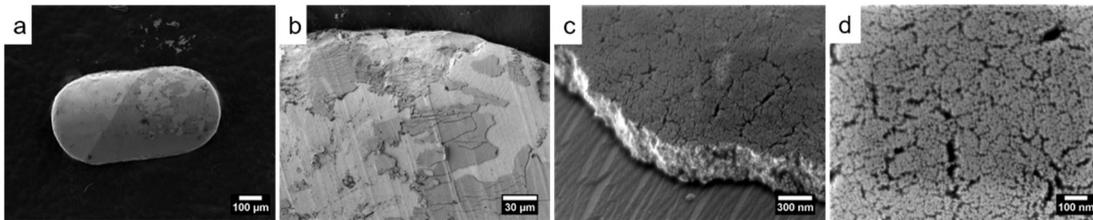


Abbildung 4.52: REM-Aufnahmen einer sp-NPpt-Beschichtung auf einem Cochlea-Elektrodenkontakt, welcher aus einer sp-NPpt-beschichteten Platinfolie (2000 Abscheidungszyklen) gestanzt und anschließend gebogen wurde.

In vielen Bereichen des Elektrodenkontakts ist die Beschichtung brüchig oder abgeplatzt. In Abbildung 4.52a ist auf der linken Seite des Elektrodenkontakts eine komplett unbeschichtete Oberfläche mit einer scharfen Kante zur sp-NPpt-Beschichtung erkennbar. Diese scharfe Kante lässt das Abplatzen der Beschichtung durch die sehr schwierige Handhabung der Elektrodenkontakte vermuten. Durch die kleine Größe der Kontakte waren diese mit einer Pinzette sehr schwer zu greifen, was das Aufkleben auf den REM-Trägern erschwerte. Anhand der höheren Vergrößerung konnte die Schichtdicke auf mindestens 300 nm abgeschätzt und die Porosität der Beschichtung mit Porendurchmessern von um die 10 nm festgestellt werden. Da die Ansicht auf die Bruchkante der sp-NPpt-Beschichtung nicht waagrecht ist, kann die Schichtdicke aufgrund möglicher Verzerrungen nur abgeschätzt werden.

Im Vergleich zu dem ausgestanzten und gebogenen Elektrodenkontakt ist auf der Oberfläche des Kontakts, bei welchem zusätzlich ein Platin-Iridiumdraht angeschweißt wurde, ein deutlich größerer Anteil der Oberfläche beschichtet.

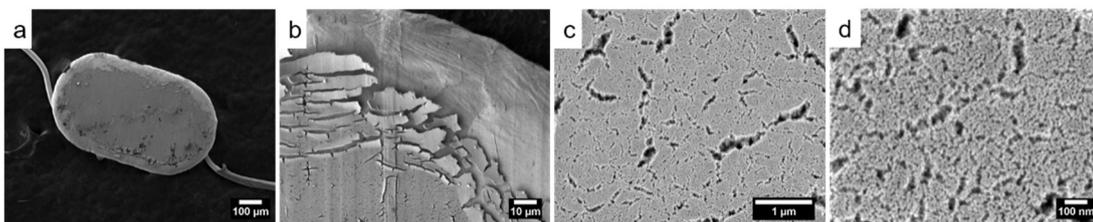


Abbildung 4.53: REM-Aufnahmen einer sp-NPpt-Beschichtung auf einem Cochlea-Elektrodenkontakt, der aus einer sp-NPpt-beschichteten Platinfolie (2000 Abscheidungszyklen) gestanzt, gebogen und an einen Platindraht geschweißt wurde.

Wie schon bei dem nur ausgestanzten Elektrodenkontakt (vgl. Abbildung 4.51) wurde die sp-NPpt-Beschichtung ausschließlich am Rand des Kontakts durch den

#### 4 Ergebnisse und Diskussion

Herstellungsprozess entfernt. Im äußeren Bereich der sp-NPPt-Beschichtung sind Risse und einzelne Beschichtungsstücke erkennbar, welche sich teilweise von der Elektrodenoberfläche ablösen (Abbildung 4.53b). Die Beschichtung mittig auf dem Elektrodenkontakt weist eine homogene poröse Oberfläche mit Porendurchmessern um 10 nm auf.

Die sp-NPPt-Beschichtung auf dem Elektrodenkontakt, welcher nicht gebogen wurde, sondern bei welchem direkt nach dem Ausstanzen der Platin-Iridiumdraht angeschweißt wurde, ist in Abbildung 4.54 gezeigt.

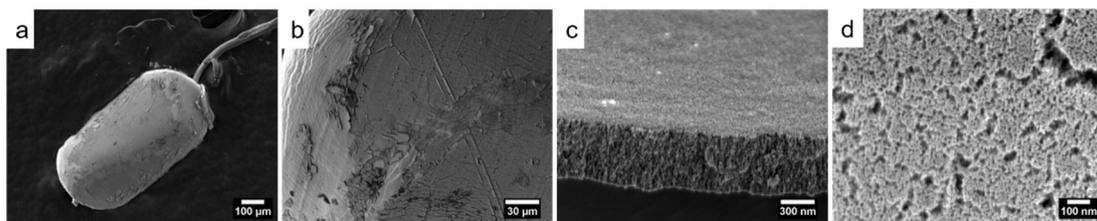


Abbildung 4.54: REM-Aufnahmen einer sp-NPPt-Beschichtung auf einem Cochlea-Elektrodenkontakt, welcher aus einer sp-NPPt-beschichteten Platinfolie (2000 Abscheidungszyklen) gestanzt und anschließend an einen Platindraht geschweißt wurde.

Diese sp-NPPt-Beschichtung zeigt eine vergleichbare Oberflächenbeschaffenheit, wie die der Beschichtung auf dem zusätzlich gebogenen Elektrodenkontakt, welche in Abbildung 4.53 zu sehen ist. In der Mitte des Kontakts ist eine intakte Beschichtung erkennbar, an den Kanten hingegen hat sich die sp-NPPt-Beschichtung abgelöst. In den Randbereichen der Beschichtung sind Risse und Bruchstücke erkennbar. Da die Bruchkante der sp-NPPt-Beschichtung bei dieser Probe waagrecht betrachtet werden kann, kann die Schichtdicke auf etwa 500 nm bestimmt werden. Die Beschichtung selbst ist homogen und weist Poren mit Durchmessern um 10 nm auf.

Da anhand der diskutierten Elektrodenkontakte die Vermutung aufgestellt werden kann, dass die Ablösung der sp-NPPt-Beschichtung an den Kanten des Elektrodenkontakts durch den Ausstanzprozess verursacht wurde, sollten außerdem Elektrodenkontakte durch Ausstanzen von der Rückseite der beschichteten Platinfolie angefertigt werden. Die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen eines so ausgestanzten Kontakts sind in Abbildung 4.55 dargestellt.

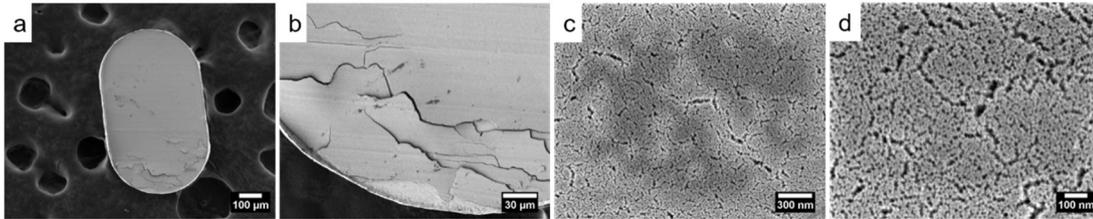


Abbildung 4.55: REM-Aufnahmen einer sp-NPpt-Beschichtung auf einem Cochlea-Elektrodenkontakt, welcher aus einer sp-NPpt-beschichteten Platinfolie (2000 Abscheidungszyklen) gestanzt wurde.

Schon auf der Übersichtsaufnahme in Abbildung 4.55a ist eine deutlich bessere sp-NPpt-Beschichtung erkennbar. An den Kanten des Elektrodenkontakts sind keine Ablösungen, sondern lediglich einige Risse der Beschichtung im unteren Bereich erkennbar. Ansonsten konnte ein Elektrodenkontakt mit einer homogenen porösen Beschichtung mit Porendurchmessern von 10 nm hergestellt werden.

Nach dem Biegen hat sich jedoch ein Großteil der sp-NPpt-Beschichtung von dem Elektrodenkontakt gelöst, zu sehen in Abbildung 4.56.

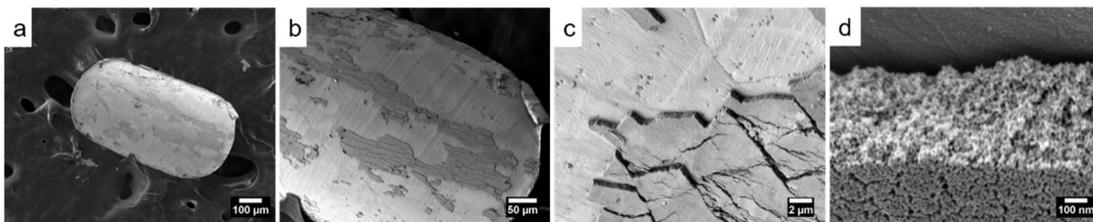


Abbildung 4.56: REM-Aufnahmen einer sp-NPpt-Beschichtung auf einem Cochlea-Elektrodenkontakt, welcher aus einer sp-NPpt-beschichteten Platinfolie (2000 Abscheidungszyklen) gestanzt und anschließend gebogen wurde.

Es sind nur noch wenige beschichtete Bereiche auf dem Elektrodenkontakt erkennbar, welche viele Risse aufweisen. Die Beschichtung ist wie auf den anderen Elektrodenkontakten porös mit Durchmessern von 10 nm und einer Schichtdicke von 500 nm. Auf dem Elektrodenkontakt nach Ausstanzen, Biegen und Anschweißen des Platin-Iridiumkontakts hingegen ist eine durchgehende sp-NPpt-Beschichtung über die gesamte Elektrodenoberfläche erkennbar (Abbildung 4.57a).

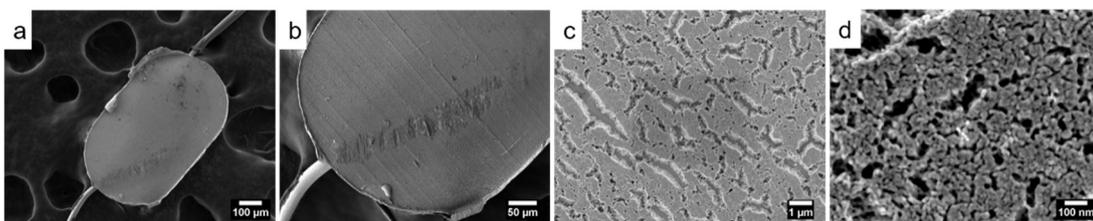


Abbildung 4.57: REM-Aufnahmen einer sp-NPpt-Beschichtung auf einem Cochlea-Elektrodenkontakt, welcher aus einer sp-NPpt-beschichteten Platinfolie (2000 Abscheidungszyklen) gestanzt, gebogen und an einen Platindraht geschweißt wurde.

#### 4 Ergebnisse und Diskussion

Entsprechend kann die Ablösung der sp-NPPT-Beschichtung nicht pauschal auf den Biegeprozess zurückgeführt werden. Vermutlich ist eher die Handhabung für die Haftung der Beschichtung entscheidend. Im Vergleich zu den Kontakten, bei welchen von der Vorderseite der beschichteten Platinfolie ausgestanzt wurde (vgl. Abbildung 4.53), konnte durch Ausstanzen von der Rückseite das Abplatzen der sp-NPPT-Beschichtung an den Kanten des Elektrodenkontakts verhindert werden. Die Beschichtung weist, abgesehen von den typischen Poren mit Durchmessern von 10 nm, zusätzlich deutlich größere Poren mit Durchmessern um die 20 nm auf. Außerdem scheinen sich vermehrt Löcher mit einem Durchmesser von über 150 nm gebildet zu haben. Zusätzlich scheint die sp-NPPT-Beschichtung durch den Schweißprozess getempert worden zu sein, da die Beschichtung deutlich verwachsener wirkt. Da alle Elektrodenkontakte aus der gleichen mit sp-NPPT beschichteten Platinfolie gefertigt wurden, müssen dieser Effekte auf den Schweißprozess zurückgeführt werden. Diese Vermutung wird durch die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen in Abbildung 4.58 bestätigt.

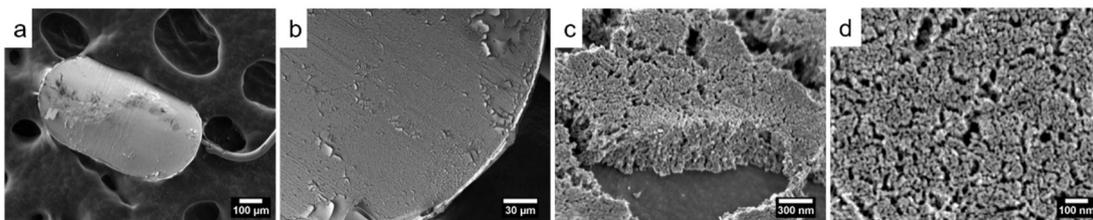


Abbildung 4.58: REM-Aufnahmen einer sp-NPPT-Beschichtung auf einem Cochlea-Elektrodenkontakt, welcher aus einer sp-NPPT-beschichteten Platinfolie (2000 Abscheidungszyklen) gestanzt und anschließend an einen Platindraht geschweißt wurde.

Der Elektrodenkontakt, welcher ausgestanzt und direkt mit einem Platin-Iridiumdraht verschweißt wurde, weist ähnlich große Poren und Verwachsungen auf. Die sp-NPPT-Beschichtung auf diesem nicht gebogenen Kontakt ist auf der gesamten Elektrodenoberfläche erkennbar, auch die Kanten zeigen eine vollständige Beschichtung. In einigen Bereichen haben sich Teile der Beschichtung mit einer Länge von über 1600 nm abgelöst. Allerdings treten diese Ablösungen nur vereinzelt auf, was auf eine stabilere Beschichtung durch den möglichen Tempervorgang zurückzuführen wäre. Anhand dieser Beschichtungskante kann die Schichtdicke auf etwa 300 nm bestimmt werden.

#### *Kurzzusammenfassung: Oberflächen- und Schichtdickencharakterisierung von sp-NPPT auf Elektrodenkontakten*

Anhand rasterelektronenmikroskopischer Aufnahmen konnten die Oberflächen der sp-NPPT-Beschichtungen auf Elektrodenkontakten, welche durch zwei unterschiedliche Herstellungsrouten gefertigt wurden, analysiert werden.

Durch elektrochemische Abscheidung auf den bereits gefertigten Elektrodenkontakten konnte nach Anpassung der Standardsynthesebedingungen durch Verringerung der Abscheidungszyklen und Templatentfernung durch Extraktion eine homogene sp-NPpt-Beschichtung erzeugt werden. Diese zeigte keine Ablösungseffekte und ist folglich als stabil einzuordnen. Auch die Teflonummantelung des Platin-Iridiumdrahts zeigt keine Beschädigungen, die durch das Extraktionsverfahren hätten erzeugt werden können. Die erzeugte sp-NPpt-Schichtdicke unter Verwendung von 200 Abscheidungszyklen (vgl. S. 127) konnte nicht bestimmt werden, da keine Bruchkanten vorlagen. Die Schichtdicke wird vermutlich deutlich unter 400 nm liegen, da durch Anlegen von 600 Zyklen eine Schicht mit einer Dicke von 450 nm abgeschieden wurde.

Bei der Anfertigung von Elektrodenkontakten aus einer sp-NPpt beschichteten Platinfolie löste sich bei einigen Elektrodenoberflächen die sp-NPpt-Beschichtung fast vollständig ab. Da diese Ablösungen willkürlich auftraten und keinem Prozessschritt (Ausstanzen, Biegen, Schweißen) zugeordnet werden konnten, sind diese der schwierigen Handhabung der Elektrodenkontakte zuzuordnen. Durch die sehr kleine Elektrodengröße konnten diese nur schwierig mit der Pinzette gegriffen werden, weshalb dabei vermutlich auf einigen Elektrodenkontakten die Beschichtung zerstört wurde. Aufgrund der erfolgsversprechenden sp-NPpt-Beschichtung auf dem Elektrodenkontakt nach dem Ausstanz-, Biegen- und Schweißprozess (Abbildung 4.57) kann durch Optimierung der Handhabung vermutlich auch durch diesen Fertigungsprozess ein mit sp-NPpt beschichteter Elektrodenkontakt hergestellt werden. Hierbei zeigte sich, dass das Ausstanzen bevorzugt von der Rückseite durchgeführt werden sollte. Außerdem wurde die sp-NPpt-Beschichtung durch den Schweißprozess vermutlich getempert, was zu einer erhöhten Stabilität führen könnte. Dies müsste zukünftig weiter untersucht werden.

Durch die Beschichtung des schon gefertigten Elektrodenkontakts konnte eine homogenere sp-NPpt-Beschichtung erzeugt werden, welche jedoch vermutlich eine deutlich dünnere Schichtdicke im Vergleich zu dem aus der beschichteten Platinfolie gefertigten Elektrodenkontakt aufweist. Zur Beurteilung der bevorzugten Herstellungsmethode sollten weitere Untersuchungen, wie Stabilitätsuntersuchungen unter Stimulationsbedingungen, elektrische Charakterisierungen und Freisetzungsversuche mit Wirkstoffen durchgeführt werden.

#### **Bestimmung der elektrischen Eigenschaften**

Durch impedanzspektroskopische Messungen sollte der erfolgreiche Transfer der sp-NPpt-Beschichtungen auf die Elektrodenkontakte des Cochlea-Implantats anhand der verbesserten elektrischen Eigenschaften (vgl. Abschnitt 4.1.1.2, S. 82) bestätigt werden. Hierfür wurden unbeschichtete sowie sp-NPpt-beschichtete

Platinkontakte im Frequenzbereich von  $10^{-1}$  Hz bis  $10^5$  Hz untersucht (Abbildung 4.59).

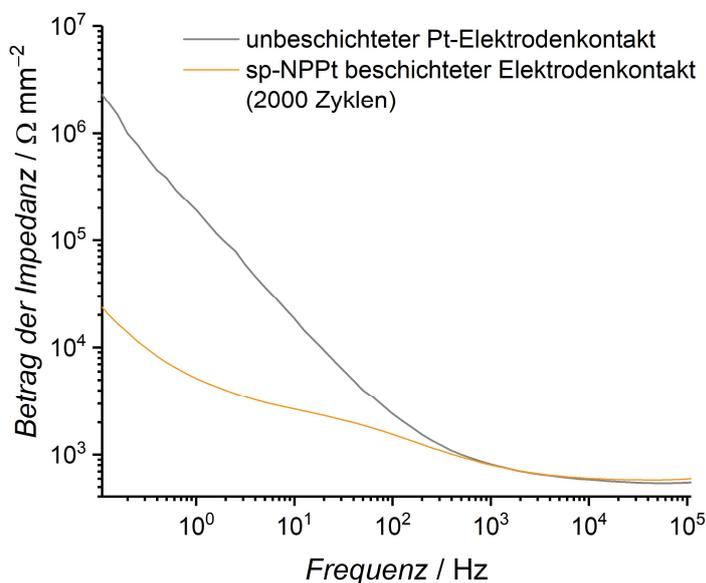


Abbildung 4.59: Impedanzspektroskopische Messung eines unbeschichteten (schwarz) und eines sp-NPPt-beschichteten (grün) Platinkontakts einer Cochlea-Elektrode.

Zunächst wurde ein mit 2000 Zyklen elektrochemisch beschichteter Platinkontakt vermessen, von einem analog beschichteten Platinkontakt wurden bereits raster-elektronenmikroskopische Aufnahmen in Abbildung 4.47 (vgl. S. 126) gezeigt. Im hochfrequenten Bereich weisen sowohl der unbeschichtete als auch der sp-NPPt-beschichtete Elektrodenkontakt eine Impedanz von etwa  $230 \Omega \cdot \text{mm}^{-2}$  auf. Bei beiden Kontakten erhöht sich die Impedanz bereits ab  $10^4$  Hz, jedoch mit deutlich unterschiedlichen Verläufen. So steigt die Impedanz der unbeschichteten Platinoberfläche ab etwa  $10^3$  Hz auf einen Wert von  $2.6 \cdot 10^6 \Omega \cdot \text{mm}^{-2}$  bei einer Frequenz von 0.1 Hz. Für den sp-NPPt-beschichteten Elektrodenkontakt scheint sich bei 20 Hz ein Plateau mit  $2.25 \cdot 10^3 \Omega \cdot \text{mm}^{-2}$  abzuzeichnen, bevor die Impedanz auf  $25.9 \cdot 10^3 \Omega \cdot \text{mm}^{-2}$  bei 0.1 Hz weiter ansteigt. Somit wurde die Impedanz im niederfrequenten Bereich durch die sp-NPPt-Beschichtung im Vergleich zu dem unbeschichteten Platinkontakt um zwei Größenordnungen verringert, was mit den Ergebnissen der sp-NPPt-Beschichtung auf Platinsubstraten übereinstimmt (vgl. Abbildung 4.15, S. 85). Da die Anzahl der zur Verfügung gestellten Elektrodenkontakten begrenzt war, wurde zunächst nur der mit 2000 Abscheidungszyklen beschichtete Elektrodenkontakt vermessen, obwohl bei diesem anhand der REM-Aufnahmen eine Ablösung der sp-NPPt-Beschichtung festgestellt wurde. Außerdem wurden die Messungen in der in Abbildung 4.60 gezeigten Zelle durchgeführt, bei der die Elektrodenkontakte lediglich in den Elektrolyten gehängt und nicht definiert fixiert werden können.

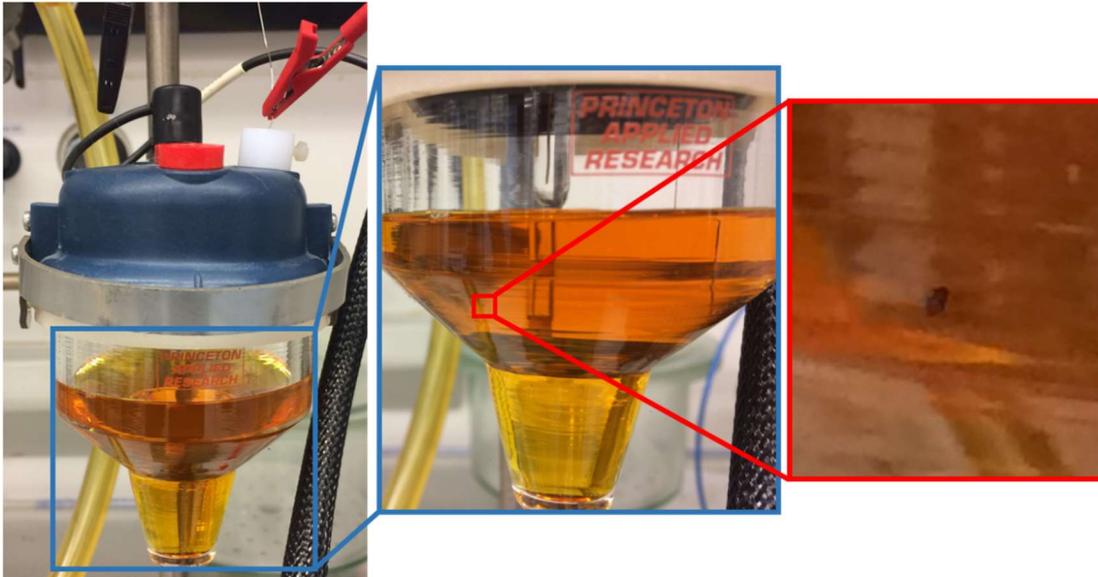


Abbildung 4.60: Fotografische Aufnahme der Zelle für elektrochemische Abscheidung sowie impedanzspektroskopische und cyclovoltammetrische Messungen der Elektrodenkontakte einer Cochlea-Elektrode. In der Vergrößerung (rot) ist der Elektrodenkontakt erkennbar.

Dadurch konnten zum einen die Abstände zwischen dem Elektrodenkontakt und der Gegen- bzw. Referenzelektrode nicht konstant eingestellt werden, zum anderen konnten Bewegungen des Elektrodenkontakts während der Messung nicht vollständig verhindert werden. Somit könnte sich durch Veränderung des Elektrodenabstands während der Messung auch der Elektrolytwiderstand und somit der Systemwiderstand ändern, was das Plateau im Kurvenverlauf der Impedanzmessung begründen könnte. Infolgedessen sollten anhand des Kurvenverlaufs der Impedanz (vgl. Abbildung 4.59) keine Interpretationen über elektrische Charaktereigenschaften der sp-NPpt-Beschichtung auf den Elektrodenkontakten angestellt werden.

Durch cyclovoltammetrische Messungen sollten in Anlehnung an die in Abschnitt 4.1.1.2 vorgestellten Ergebnisse der sp-NPpt-Beschichtungen auf Platinsubstraten (vgl. Abbildung 4.16, S. 86) Oberflächenreaktionen und die integralen Ladungsdichten der unbeschichteten sowie der sp-NPpt-beschichteten Elektrodenkontakte bestimmt werden. Auch bei diesen Messungen wurde der Potentialbereich von  $-0.6\text{ V}$  bis  $0.9\text{ V}$  gewählt, um die Zersetzungsspannungen von Wasserstoff und Sauerstoff nicht zu überschreiten. Die Potentialänderung wurde mit einer Geschwindigkeit von  $0.1\text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$  durchgeführt. Die in Abbildung 4.61 dargestellten Cyclovoltammogramme des unbeschichteten und des sp-NPpt-beschichteten Platinkontakts zeigen deutliche Unterschiede bezüglich des Kurvenverlaufs und der eingeschlossenen Fläche.

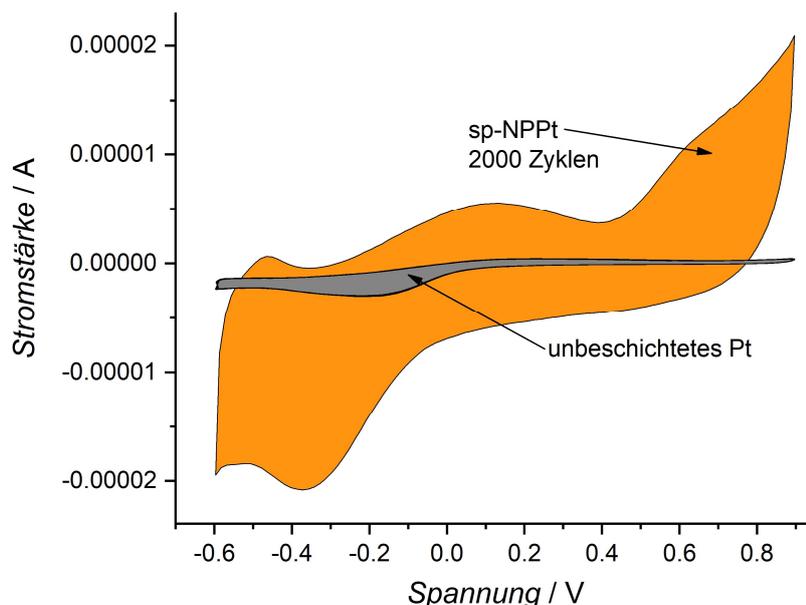


Abbildung 4.61: Cyclovoltammetrische Untersuchung eines unbeschichteten (grau) und eines sp-NPPt-beschichteten (orange) Platinkontakts einer Cochlea-Elektrode.

So können die im Cyclovoltammogramm des sp-NPPt-beschichteten Elektrodenkontakts erkennbaren Signale den in Abschnitt 3.1.6.2 (vgl. Abbildung 3.8, S. 55) erläuterten Oxidations- und Reduktionsprozessen an der Platinoberfläche zugeordnet werden. Im Bereich von etwa  $-0.4\text{ V}$  bis  $0.4\text{ V}$  findet die Aufladung der elektrolytischen Doppelschicht, die Anbindung der Hydroxyl-Gruppen und die Ausbildung der Sauerstoffdeckschicht an der Platinoberfläche statt. Der Anstieg der Stromstärke ab  $0.4\text{ V}$  deutet auf die Entwicklung von elementarem Sauerstoff hin. Die Reduktion der Sauerstoffbelegung findet im Potentialrücklauf bis etwa  $-0.5\text{ V}$  statt, woran die Aufladung der elektrolytischen Doppelschicht und die Bildung der Wasserstoffdeckschicht anschließt. Da sich bei  $-0.6\text{ V}$  ein negativer Anstieg der Stromstärke andeutet, scheint sich erst ab diesem Potential elementarer Wasserstoff zu bilden. Durch den Spannungshinlauf findet zwischen  $-0.6\text{ V}$  bis  $-0.4\text{ V}$  wiederum die Oxidation der Wasserstoffbelegung statt. Die resultierenden Stromstärken an den Elektrodenkontakten sind im Vergleich zu denen der Substratoberflächen (vgl. Abbildung 4.16, S. 86) zwei Größenordnungen kleiner, was mit der deutlich kleineren Probenoberfläche der Elektrodenkontakte erklärt werden kann. Auch unterscheiden sich die integralen Ladungsdichten mit  $1.18 \cdot 10^{-5}\text{ VA}$  des unbeschichteten und  $1.99 \cdot 10^{-5}\text{ VA}$  des sp-NPPt-beschichteten Elektrodenkontakts nicht so stark. Trotzdem konnte die integrale Ladungsdichte um 69% erhöht werden.

Zukünftig sollten die mit 200 Abscheidungszyklen beschichteten Elektrodenkontakte durch impedanzspektroskopische und cyclovoltammetrische Messungen bezüglich ihrer elektrischen Eigenschaften untersucht werden, da diese in den REM-Aufnahmen die stabilsten und homogensten sp-NPPt-Beschichtungen aufwiesen.

### *Kurzzusammenfassung: Bestimmung der elektrischen Eigenschaften von sp-NPPt auf Elektrodenkontakten*

Durch eine sp-NPPt-Beschichtung konnte die Impedanz im Vergleich zu unbeschichteten Platinkontakten im niederfrequenten Bereich um zwei Größenordnungen verringert werden. Allerdings zeigte der Kurvenlauf keinen linearen Verlauf, was vermutlich mit dem nicht optimalen Messaufbau zusammenhängt. Der Platinkontakt wurde lediglich in die Elektrolytlösung gehängt, weshalb Bewegungen des Kontakts während der Messungen nicht ausgeschlossen werden können. Durch die Veränderung der Elektrodenabstände kann sich somit der Elektrolytwiderstand und folglich der Widerstand des gesamten Systems während der Messung ändern. Dies sollte durch eine neu konstruierte Messzelle zukünftig verhindert werden.

Cyclovoltammetrische Messungen der sp-NPPt-beschichteten Elektrodenkontakte zeigten eine Vergrößerung der integralen Ladungsmenge um 69%. Auch konnten anhand des Kurvenverlaufs Oxidations- und Reduktionsprozesse an der sp-NPPt-Oberfläche nachvollzogen werden.

Da die mit 200 Abscheidungszyklen elektrochemisch beschichteten Elektrodenkontakte in den rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen die stabilsten und homogensten sp-NPPt-Beschichtungen aufwiesen, sollten diese zukünftig auf ihre elektrischen Eigenschaften untersucht werden.

### **Cytokompatibilitätsuntersuchungen**

Die erfolgreich mit sp-NPPt beschichteten Elektrodenkontakte wurden anschließend in Zellkulturuntersuchungen bezüglich ihrer Cytokompatibilität untersucht. Alle Zellkulturuntersuchungen wurden durch Jennifer Harre aus der Arbeitsgruppe von Dr. Athanasia Warnecke an der Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde (Leitung Prof. Dr. Thomas Lenarz) der Medizinischen Hochschule Hannover durchgeführt und gemeinsam ausgewertet. Da sp-NPPt beschichtete Platinwafer bereits eine gute Cytokompatibilität mit Fibroblasten und den aus dem Innenohr stammenden Spiralganglienneuronen (SGN) aufwiesen (vgl. Abschnitt 4.1.1.3, S. 87ff und S. 124), wurde sofort das Zellüberleben der sensitiven SGN auf den sp-NPPt beschichteten Elektrodenkontakten charakterisiert.

Zunächst wurden lichtmikroskopische Aufnahmen der Elektrodenkontakte vor Fixierung der SGN aufgenommen (Abbildung 4.62).

#### 4 Ergebnisse und Diskussion

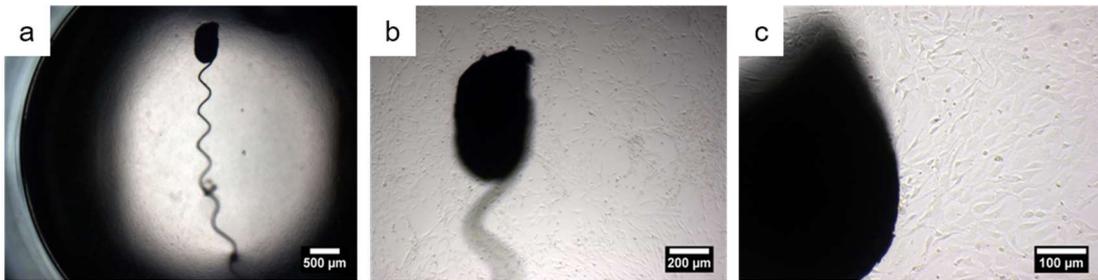


Abbildung 4.62: Lichtmikroskopische Aufnahmen eines mit sp-NPpt beschichteten Elektrodenkontakts vor Fixierung der SGN.

Bei allen Proben sind sowohl in der mit Ornithin/Laminin beschichteten Well-Platte als auch an der Elektrodenoberfläche Zellen erkennbar. Da überall in dem Well eine gleichmäßige Zellbesiedelung vorliegt und sich die Zelldichte direkt an der Elektrodenoberfläche nicht von der in dem Well unterscheidet, kann von einer guten Cytokompatibilität und keiner Toxizität der sp-NPpt-Beschichtung ausgegangen werden. Zur genaueren Quantifizierung wurden die SGN im gesamten Well ausgezählt und die in Abbildung 4.63 dargestellte prozentuale Überlebensrate bestimmt.

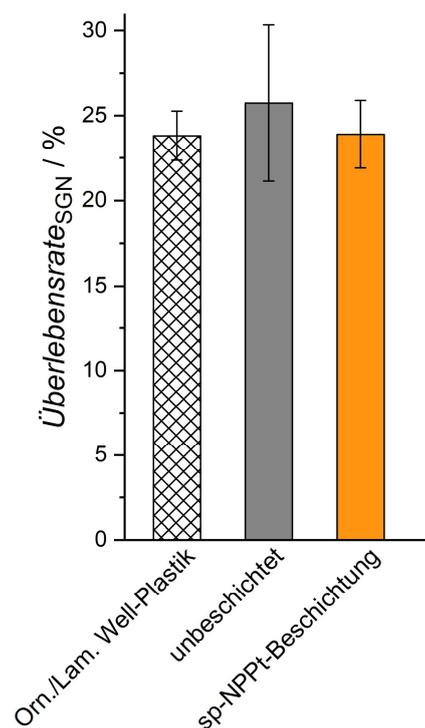


Abbildung 4.63: SGN-Überlebensrate nach viertägiger Kultivierung auf Ornithin/Laminin beschichteten Well-Plastik, unbeschichteten sowie sp-NPpt beschichteten Elektrodenkontakten.

Wie aufgrund der lichtmikroskopischen Aufnahmen in Abbildung 4.62 vermutet, sind zwischen der SGN-Überlebensrate auf dem Ornithin/Laminin beschichteten

Well-Plastik, in den Wells mit dem unbeschichteten sowie dem sp-NPPT beschichteten Elektrodenkontakt keine Unterschiede auszumachen. Da die Überlebensrate der SGN auf Well-Plastik als Positivkontrolle zu betrachten ist und der unbeschichtete Elektrodenkontakt bereits im Menschen eingesetzt wird, kann anhand der vergleichbaren Überlebensraten auf diesen drei Probenoberflächen von einer guten Cytokompatibilität der sp-NPPT-Beschichtung ausgegangen werden. Zur genaueren Betrachtung der SGN-Anhaftung auf den Elektrodenoberflächen wurden die Zellkerne mit 4',6-Diamin-2-phenylindol (DAPI) sowie das SGN-Neurofilament mit Anti-Neurofilament (ANF) angefärbt und sowohl unter dem Licht- (Abbildung 4.64) als auch Fluoreszenzmikroskop (Abbildung 4.65) betrachtet.

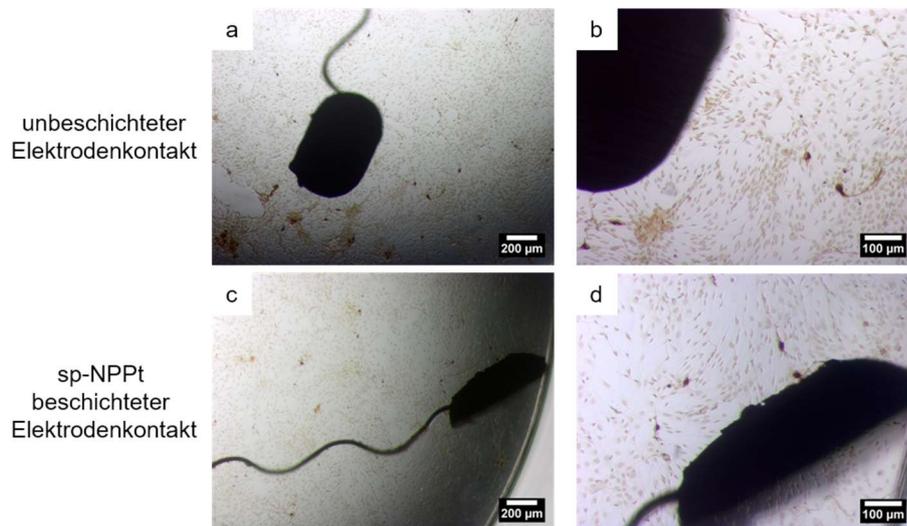


Abbildung 4.64: Lichtmikroskopische Aufnahmen von unbeschichteten und sp-NPPT beschichteten Elektrodenkontakten nach Anfärben des SGN-Neurofilament mit ANF.

Nach der Zellanfärbung weisen die Zellen unter dem Lichtmikroskop keine sichtbare Veränderung bezüglich der Zelldichte oder Zellmorphologie auf. Auf der gesamten Well-Platte, insbesondere an der Oberfläche der Elektrodenkontakte, sind weiterhin Zellen erkennbar. Jedoch kann anhand der lichtmikroskopischen Aufnahmen keine Aussage über die Zelldichte beziehungsweise Zellmorphologie der SGN direkt auf den Elektrodenkontakten gemacht werden, weshalb die Betrachtung unter dem Fluoreszenzmikroskop (Abbildung 4.65) weitere Erkenntnisse liefern sollte.

#### 4 Ergebnisse und Diskussion

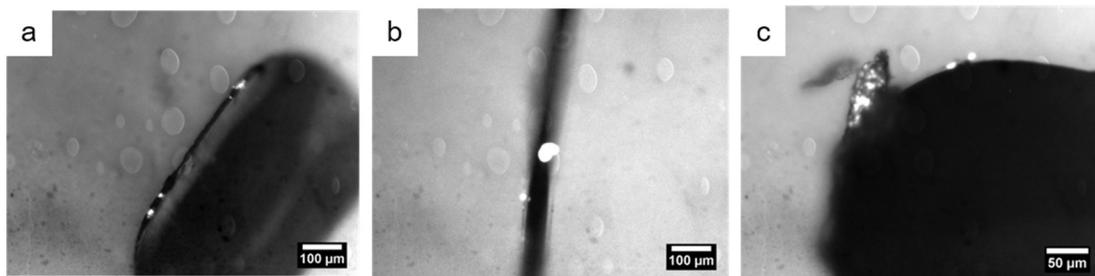


Abbildung 4.65: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von sp-NPPT beschichteten Elektrodenkontakten nach Anfärben der Zellkerne mit DAPI und dem SGN-Neurofilament mit ANF.

Jedoch konnten, wie auf allen fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen in Abbildung 4.65 zu sehen, keine fluoreszierenden Zellen auf den Elektrodenkontakten gefunden werden. Folgendermaßen sind sowohl auf den unbeschichteten als auch den sp-NPPT beschichteten Elektrodenkontakten keine Zellen vorhanden, was mit der Durchführung und dem Aufbau der Zellkulturuntersuchung erklärt werden kann. Aufgrund ihrer geringen Größe schwammen die Elektrodenkontakte häufig auf der Panserin-Oberfläche und konnten nur erschwert mit dem Medium bedeckt werden. Dies könnte das Anwachsen der Zellen auf der Elektrodenoberfläche verhindert haben. Durch den Transport der Well-Platte können Bewegungen der Elektrodenkontakte ausgelöst worden sein, was wiederum eine dauerhafte Zellanhaftung auf der Elektrodenoberfläche erschwerte. Außerdem wurden die Elektrodenkontakte zur Untersuchung unter dem Fluoreszenzmikroskop aus dem Medium entfernt, wobei sich die Zellen von der Elektrodenoberfläche gelöst haben können. Ein direktes Aufsetzen der Zellen zu Beginn der Zellkulturuntersuchungen auf die Elektrodenoberfläche war aufgrund der geringen Elektrodengröße nicht möglich.

Trotz alledem zeigen die mikroskopischen Aufnahmen sowie die Zellzahlen in den gesamten Wells mit den unbeschichteten und sp-NPPT beschichteten Elektroden keine Unterschiede. Da die unbeschichteten Elektrodenkontakte bereits im Menschen eingesetzt werden und als sehr gut biokompatibel gelten, können die sp-NPPT beschichteten Elektrodenkontakte als nicht toxisch eingestuft werden.

Da die beschriebenen Untersuchungen als Vorversuche gewertet werden, sollten die Elektrodenkontakte bei zukünftigen Zellkulturuntersuchungen durch Einbetten in beispielsweise biokompatiblen Hartklebewachs (Deiberit 502®, SILADENT) oder ein Hydrogel wie Agarose befestigt werden. Dies würde Bewegungen der Elektrodenkontakte sowie das Schwimmen auf der Medium-Oberfläche verhindern, wodurch das Aufwachsen der Zellen auf der Elektrodenoberfläche verbessert werden könnte.

### *Kurzzusammenfassung: Bestimmung der Cytokompatibilität von sp-NPPT auf Elektrodenkontakten*

Sowohl auf den licht- als auch fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen konnten keine Unterschiede zwischen den Wells mit unbeschichteten und den sp-NPPT beschichteten Elektrodenkontakten festgestellt werden. Die lichtmikroskopischen Aufnahmen zeigten eine gute Zellbesiedelung, welche sich bis zur Elektrodenkontaktoberfläche homogen über das gesamte Well erstreckte.

Auf den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen konnten keine Zellen auf den Elektrodenkontakten festgestellt werden. Da jedoch auch auf den unbeschichteten Elektrodenkontakten keine Zellen vorhanden waren, wird das verhinderte Zellanzwachsen mit der schwierigen Handhabung der Elektrodenkontakte während der Zellkulturuntersuchungen begründet.

Auch die absoluten Zellzahlen zeigten keine Unterschiede zwischen der SGN-Überlebensrate auf den unbeschichteten und sp-NPPT beschichteten Elektrodenkontakten.

Infolgedessen kann die sp-NPPT-Beschichtung auf den Elektrodenkontakten als nicht toxisch eingestuft werden. Allerdings müssen weitere Zellkulturuntersuchungen mit befestigten Elektrodenkontakten durchgeführt werden, um die sp-NPPT beschichteten Elektrodenkontakte als gut cytokompatibel und somit als geeignete neuronale Elektrode einstufen zu können.

### **4.1.2 Nanoporöse Platinbeschichtung mit großen Porendurchmessern**

Zur Herstellung nanoporöser Platinbeschichtungen mit mittleren Porendurchmessern von 50 nm (*large pore nanoporous platinum*, lp-NPPT) wurde mit Polystyrolatex-Kugeln (PLBs) ein kolloidales Templat eingesetzt. Grundlegende Syntheseparameter des Beschichtungsprozesses, welcher sich in das Aufbringen der PLBs auf die Substratoberfläche, die anschließende elektrochemische Abscheidung von Platin in die interpartikulären Zwischenräume und in die abschließende PLBs-Entfernung gliedert, wurden im Rahmen der Forschungspraktika von Dawid P. Warwas und Dennis Müller evaluiert (vgl. Abbildung 2.16, S. 35). Dabei wurden die ersten lp-NPPT-Modifikationen auf Gold durchgeführt, im Laufe dieser Arbeit wurde die Übertragbarkeit der schon gewonnenen Erkenntnisse für Platinsubstrate bestimmt und weitere Untersuchungen mit den beschichteten Platinsubstraten durchgeführt.

#### **4.1.2.1 Oberflächen- und Schichtdickencharakterisierung**

Zunächst wurden Goldsubstrate mit einer 0.5 Gew.-% PLBs-Suspension mit einem PLBs-Durchmesser von 50 nm unter Variation des PLBs-Suspensionsvolumens beschichtet.

In Abbildung 4.66 sind fotografische Aufnahmen einer exemplarischen PLBs-Beschichtung unter Verwendung von 100  $\mu$ L PLBs-Suspension gezeigt.

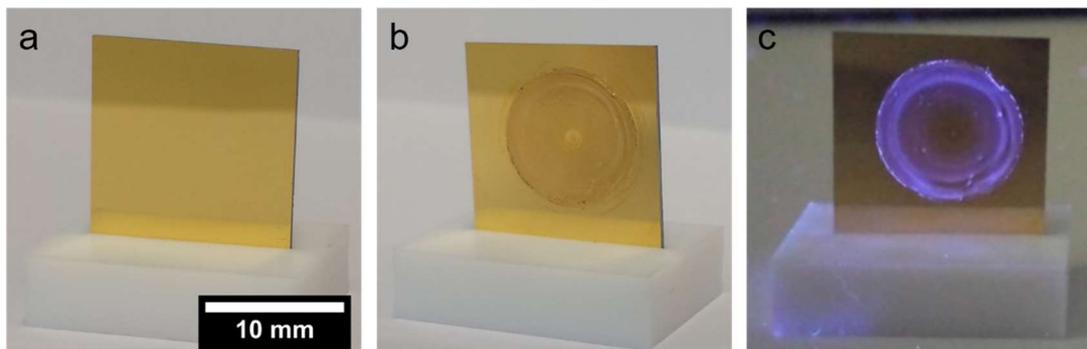


Abbildung 4.66: Fotografische Aufnahme eines unbeschichteten Goldsubstrats (a), eines mit PLBs beschichteten Goldsubstrats (b) und dasselbe mit PLBs beschichtete Goldsubstrat unter UV-Licht (c).

Schon mit dem Auge ist in Abbildung 4.66b eine farblose der Trocknungszellenöffnung entsprechende runde Beschichtung erkennbar. Bei Bestrahlung mit ultraviolettem Licht (UV-Licht) werden die blau fluoreszierenden PLBs deutlich sichtbarer, die vermehrt am äußeren Rand des Kreises abgelagert wurden (Abbildung 4.66c). Im mittleren Bereich des Kreises konnten hingegen keine fluoreszierenden Partikel aufgebracht werden. Dieser Effekt kann auf mögliche Kapillarkräfte während der Trocknung aufgrund der Oberflächenspannung des Wassers zurückgeführt werden.

Um die Stabilität der PLBs-Beschichtung gegen wässrige Lösungen für die anschließende elektrochemische Platinabscheidung in die interpartikulären Zwischenräume zu überprüfen, wurden PLBs-beschichtete Goldsubstrate für eine Woche bei Raumtemperatur, sowie für 1 h bei 80 °C in Reinstwasser gelagert. Es konnten keine Ablösungen oder Beschädigungen der PLBs-Beschichtung festgestellt werden, weshalb von einer guten Anhaftung der PLBs-Beschichtung auf der Goldoberfläche ausgegangen wird. Daher wurden in den folgenden Beschichtungen die anschließenden elektrochemischen Platinabscheidungen ohne weitere Stabilitätsuntersuchungen durchgeführt.

Die in Abbildung 4.67 gezeigten Platinbeschichtungen wurden unter Verwendung von 100  $\mu\text{L}$  PLBs-Suspension mit Abscheidungspotentialen von -0.2 V (Abbildung 4.67a-d) bzw. +0.1 V (Abbildung 4.67e-h) und Zyklenzahlen von 4000 (Abbildung 4.67a, b, e, f) bzw. 8000 (Abbildung 4.67c, d, g, h) hergestellt. Von jeder Probe ist jeweils eine fotografische Aufnahme unter weißem (Abbildung 4.67a, c, e, g) bzw. UV-Licht (Abbildung 4.67b, d, f, h) dargestellt.

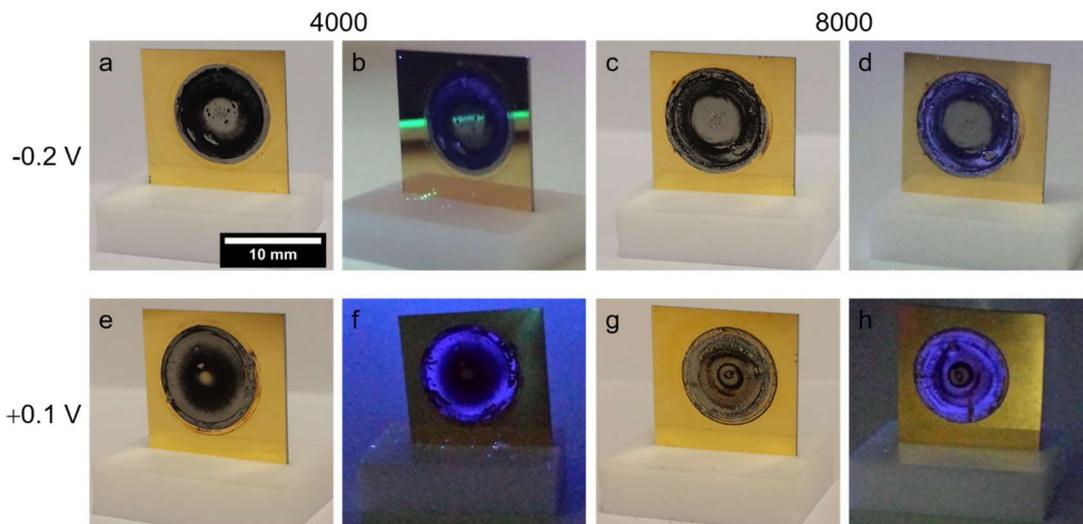


Abbildung 4.67: Fotografische Aufnahmen unter weißem (a, c, e, g) und UV-Licht (b, d, f, h) von vier verschiedenen Ip-NPPT-Beschichtungen auf Gold, bei welchen Abscheidungspotentiale von  $-0.2\text{ V}$  (a-d) bzw.  $+0.1\text{ V}$  (e-h) und Zyklenzahlen von 4000 (a, b, e, f) bzw. 8000 (c, d, g, h) verwendet wurden.

Die in Abbildung 4.67a und b gezeigte Platinbeschichtung wurde mit einem Abscheidungspotential von  $-0.2\text{ V}$  mit 4000 Zyklen hergestellt, bei welcher etwa 75% der beschichteten Oberfläche eine schwarze Färbung aufweisen. Am Kreisrand sowie in dem mittleren Bereich der Beschichtung ist eine Graufärbung erkennbar. Die durch Bestrahlung mit UV-Licht in blau sichtbaren PLBs sind ausschließlich im Bereich der schwarzen Beschichtung zu sehen. Wie auch schon nach der PLBs-Beschichtung in Abbildung 4.66 erkennbar war, wurden im mittleren Bereich vermutlich keine PLBs abgeschieden, weshalb hier dichtes Platin elektrochemisch aufgebracht wurde. In den Bereichen der PLBs-Beschichtung wurde vermutlich poröses Platin abgeschieden, wodurch wiederum die Schwarzfärbung erklärt werden kann. Die Verdopplung der Zyklenzahl auf 8000 (Abbildung 4.67c, d) führte zu einer vergleichbaren Beschichtung, bei der ebenfalls eine schwarze Färbung im äußeren und eine graue Färbung im inneren Beschichtungsbereich zu sehen ist. Zusätzlich wirkt die schwarze Beschichtung durch graue, raue Bereiche deutlich inhomogener. Durch die deutlich längere elektrochemische Abscheidung könnte Platin hier nicht nur in die interpartikulären Zwischenräume der PLBs, sondern auch auf der PLBs-Beschichtung abgeschieden worden sein.

Durch die Änderung von einem negativen auf ein positives Abscheidungspotential mit einem Wert von  $+0.1\text{ V}$  (Abbildung 4.67e, f) zeigte sich keine Verbesserung der Homogenität. Zwar wurde der mittlere graue Beschichtungsbereich verkleinert, jedoch führte die Potentialänderung auch zu einem deutlich breiteren grauen Randbereich. Unter UV-Licht sind die blau fluoreszierenden PLBs in genau diesem grauen Bereich erkennbar. Im äußeren Beschichtungsbereich weist die PLBs-Schicht offensichtlich eine größere Schichtdicke auf. Möglicherweise

#### 4 Ergebnisse und Diskussion

konnte die Platinsalzlösung aufgrund der erhöhten Schichtdicke nicht in die gesamte PLBs-Beschichtung eindringen, wodurch die Reduktion der Platin-Ionen an dem Platinsubstrat vermindert wurde. Durch die Verwendung von 8000 Zyklen (Abbildung 4.67g, h) wurde eine stark inhomogene Beschichtung erzeugt, bei welcher große Bereiche eine graue Färbung mit einer hohen Rauigkeit aufweisen. Auch sind unbeschichtete Bereiche erkennbar, in denen das Goldsubstrat sichtbar ist. Die Abscheidung einer schwarzen Beschichtung konnte durch das positive Potential und die erhöhte Zyklenzahl kaum erreicht werden.

Auf die in Abbildung 4.67a, b, e und f beruhenden Beobachtungen, dass bei einem Abscheidungspotential von  $-0.2\text{ V}$  in dem Bereich der PLBs und unter Verwendung von  $+0.1\text{ V}$  im inneren Bereich eine schwarze Beschichtung abgeschieden wurde, sollten anschließend diese beiden Potentiale kombiniert werden. Es wurden zur PLBs-Beschichtung wiederum  $100\text{ }\mu\text{L}$  PLBs-Suspension verwendet, die elektrochemische Platinabscheidung erfolgte für beide Potentiale mit jeweils 4000 Zyklen. Durch die Potentialkombination wurde die in Abbildung 4.68 dargestellte Platinbeschichtung abgeschieden, welche wie auch die Beschichtungen in Abbildung 4.67 eine schwarze Beschichtung im äußeren Bereich und eine graue Beschichtung im inneren Bereich der beschichteten Fläche zeigt.

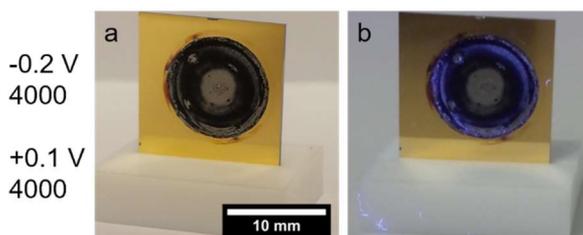


Abbildung 4.68: Fotografische Aufnahmen unter weißem (a) und UV-Licht (b) eines mit lp-NPPt beschichteten Goldsubstrats. In der elektrochemischen Abscheidung wurde zunächst für 4000 Zyklen ein Potential von  $-0.2\text{ V}$ , anschließend für 4000 Zyklen ein Potential von  $+0.1\text{ V}$  angelegt.

Unter UV-Licht sind blau fluoreszierende PLBs in den grauen Bereichen am Rand der Beschichtung erkennbar. Demzufolge konnte auch durch die Kombination der elektrochemischen Abscheidungen mit beiden Potentialen keine Verbesserung der Homogenität der porösen Platinbeschichtung verbessert werden.

Auf diesen Beobachtungen basierend wurden im Folgenden die zur Beschichtung eingesetzten PLBs-Suspensionsvolumina auf  $300\text{ }\mu\text{L}$  erhöht und Platin mit entsprechenden Abscheidungspotentialen von  $-0.2\text{ V}$  bzw.  $+0.1\text{ V}$  und 4000 bzw. 8000 Zyklen elektrochemisch abgeschieden. Die fotografischen Aufnahmen in Abbildung 4.69 zeigen die resultierenden Beschichtungen vor und nach der PLBs-Entfernung unter weißem und UV-Licht.

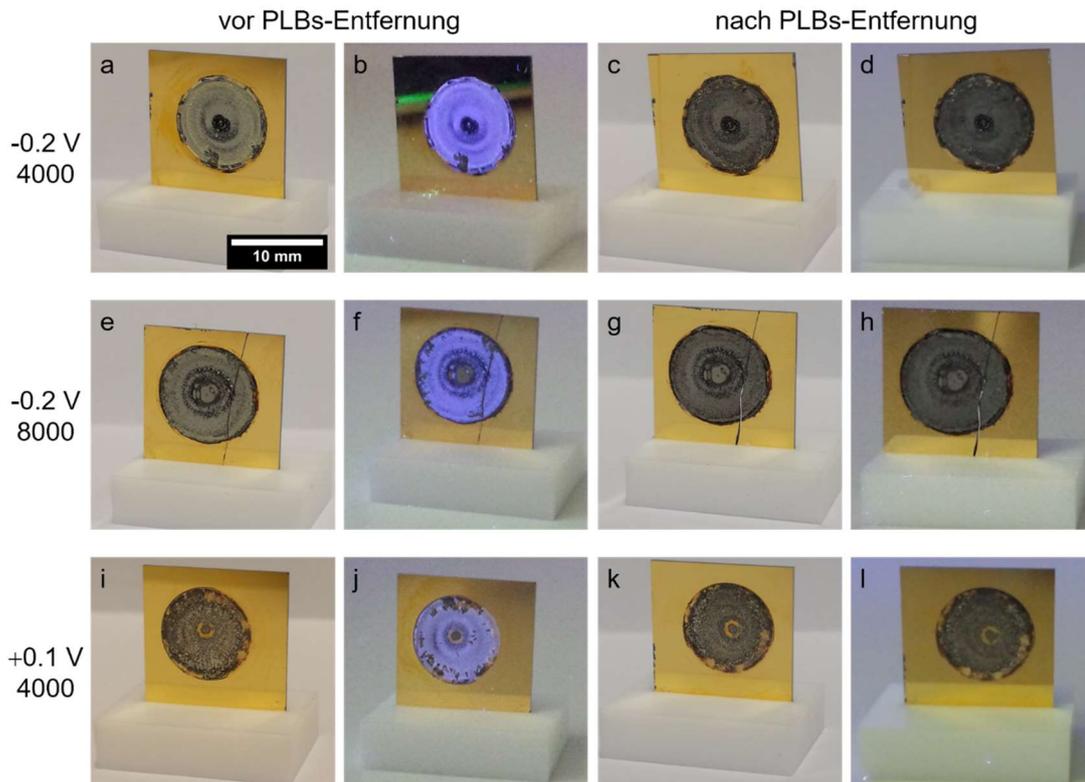


Abbildung 4.69: Fotografische Aufnahmen unter weißem (a, c, e, g, i, l) und UV-Licht (b, d, f, h, j, l) von drei verschiedenen Ip-NPpT-Beschichtungen auf Gold vor und nach der PLBs-Entfernung, bei welchen Abscheidungspotentiale von -0.2 V (a-h) bzw. +0.1 V (i-l) und Zyklenzahlen von 4000 (a-d, i-l) bzw. 8000 (e-h) verwendet wurden.

Durch das größere PLBs-Volumen von 300  $\mu\text{L}$ , einem Abscheidungspotential von -0.2 V und 4000 Zyklen (Abbildung 4.69a-d) konnte im Vergleich zu den mit 100  $\mu\text{L}$  beschichteten PLBs-Proben die gesamte Substratoberfläche, welche mit dem Elektrolyten in Kontakt stand, mit Platin beschichtet werden. Unter dem UV-Licht sind auch die blau fluoreszierenden PLBs im gesamten Beschichtungsbereich erkennbar (Abbildung 4.69b). Allerdings zeigt die Aufnahme nach Entfernung der PLBs eine graue Beschichtung, was auf eine dichte Platinabscheidung hindeutet (Abbildung 4.69c). Wie auch schon anhand der Abbildung 4.67f vermutet wurde, könnte durch eine zu große PLBs-Schichtdicke die Platinabscheidung in die interpartikulären Zwischenräume erschwert werden, wodurch bei einer dicken PLBs-Beschichtung vorzugsweise dichtes Platin auf den PLBs entsteht. Da unter dem UV-Licht nach der PLBs-Entfernung keine blau fluoreszierende Beschichtung zu erkennen ist, wurden die PLBs erfolgreich aus der elektrochemisch abgeschiedenen Platinbeschichtung gelöst.

Durch Erhöhung der Zyklenzahl sowie Veränderung des Abscheidungspotentials konnte weder die Homogenität verbessert noch eine schwarze Beschichtung abgeschieden werden. Da bereits die Beschichtung unter Verwendung eines

#### 4 Ergebnisse und Diskussion

Abscheidungspotentials von +0.1 V und 4000 Zyklen eine stark raue Beschichtung erzeugte, wurde auf eine Erhöhung der Zyklenzahl bei diesem Arbeitspotential verzichtet.

Durch rasterelektronenmikroskopische (REM) Aufnahmen soll die Platinbeschichtung auf deren Porosität und Homogenität im Folgenden genauer charakterisiert werden. Analog zu den fotografischen Aufnahmen (Abbildung 4.67, S. 143) sind in Abbildung 4.70 die REM-Aufnahmen der mit 4000 Zyklen abgeschiedenen Platinbeschichtungen dargestellt.

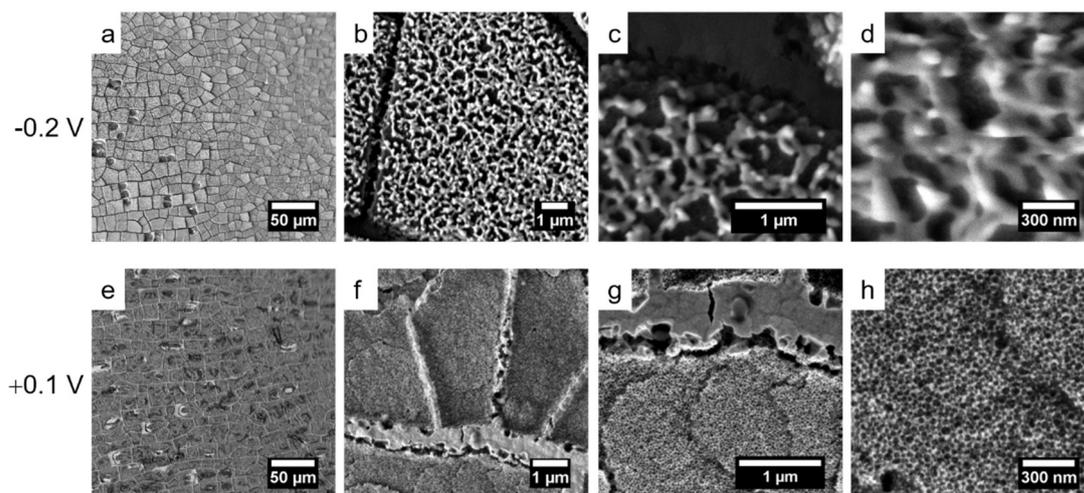


Abbildung 4.70: REM-Aufnahmen zwei verschiedener Ip-NPpPt-Beschichtungen auf Gold. Durch Anlegen eines Abscheidungspotentials von -0.2 V wurde die in a-d gezeigte Beschichtung hergestellt, bei einem Potential von +0.1 V wurde die in e-h gezeigte Beschichtung abgeschieden. Zur PLBs-Beschichtung wurden 100 µL PLBs-Suspension verwendet.

In den Übersichtsaufnahmen (Abbildung 4.70a und e) weisen beide Beschichtungen starke Inhomogenitäten auf. Es sind viele einzelne, in sich homogene Bereiche erkennbar, die durch Risse voneinander getrennt sind. Bei näherer Betrachtung ist auf der Oberfläche, welche mit einem Potential von -0.2 V abgeschieden wurde, ein großporiges Netzwerk mit Durchmessern von 300 nm erkennbar. In den Rissen mit einer Breite von 500 nm hat keine Platinabscheidung stattgefunden. Die Aufnahmen bei höheren Vergrößerungen sind sehr unscharf, was auf Aufladeeffekte zurückzuführen ist. Dies könnte durch PLBs-Reste in der Beschichtung verursacht werden. Durch die Potentialänderung auf +0.1 V wurde in den einzelnen Arealen ein kleinporiges Netzwerk mit mittleren Porendurchmessern von etwa 30 nm abgeschieden. Das poröse Netzwerk ist aus einzelnen Schichten aufgebaut, da einzelne Abgrenzungen erkennbar sind. In den Rissen mit einer Breite von 800 nm wurde unter diesen Synthesebedingungen dichtes Platin abgeschieden.

Beim Vergleich der rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen der Probe, bei denen das dreifache PLBs-Suspensionsvolumen zur Templatbeschichtung verwendet

wurde, sind in der Übersichtsaufnahme in Abbildung 4.71a ähnliche Inhomogenitäten erkennbar.

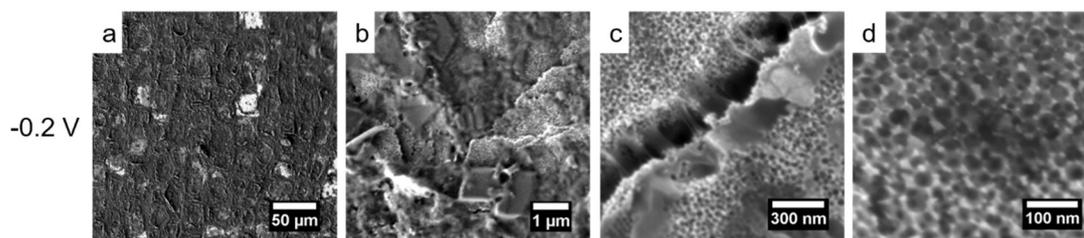


Abbildung 4.71: REM-Aufnahmen einer Ip-NPpPt-Beschichtung auf Gold unter Verwendung von 300 µL PLBs-Suspension für die Templatbeschichtung. Platin wurde elektrochemisch mit einem Potential von -0.2 V mit 4000 Zyklen abgeschieden.

Auf der Platinbeschichtung sind wiederum einzelne Areale sichtbar, welche durch Risse voneinander abgetrennt sind. Bei höherer Vergrößerung sind auf der Beschichtung einzelne Partikel erkennbar, die keine Porosität aufweisen und keine einheitliche Morphologie zeigen. Außerdem sind Bereiche eines porösen Netzwerks mit mittleren Porendurchmessern von etwa 30 nm zu sehen. Auch bei dieser Probe sind die schon unter Verwendung von 100 µL PLBs-Suspension beobachteten Risse erkennbar, in denen kein Platin abgeschieden wurde.

Durch Verwendung von 100 µL PLBs-Suspension und anschließendem Kombinieren der elektrochemischen Abscheidung mit Potentialen von -0.2 V und +0.1 V mit jeweils 4000 Zyklen bildete sich die Platinbeschichtung, deren fotografische Aufnahmen bereits in Abbildung 4.68 vorgestellt wurden. Die REM-Aufnahmen vor vollständiger PLBs-Entfernung in Abbildung 4.72a-d zeigen eine inhomogene Beschichtung, welche bereits deutlich erkennbare Risse aufweist.

#### 4 Ergebnisse und Diskussion

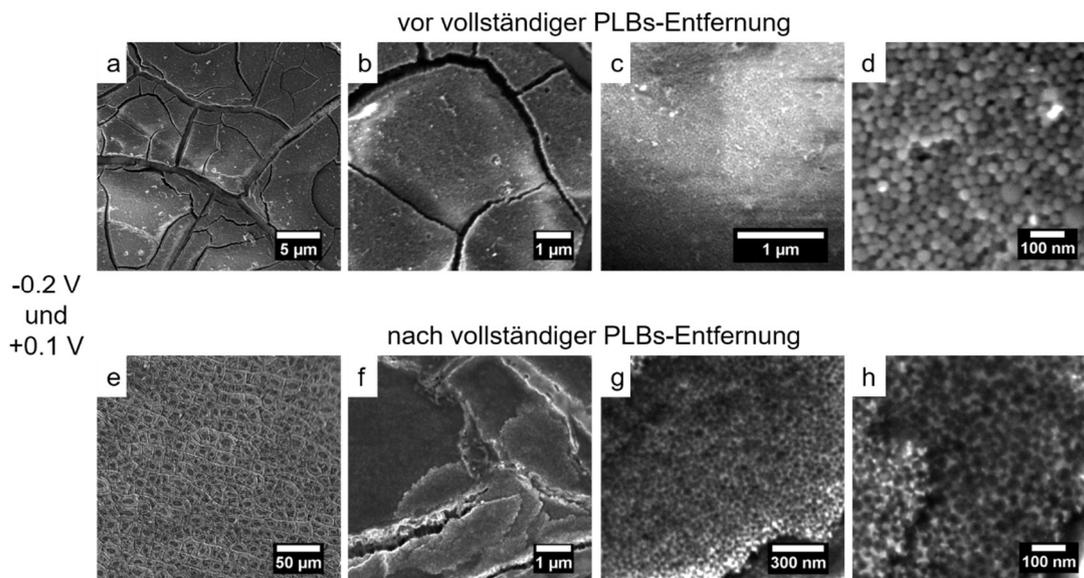


Abbildung 4.72: REM-Aufnahmen einer Ip-NPPt-Beschichtung auf Gold, bei der jeweils für 4000 Zyklen ein Abscheidungspotential von -0.2 V und anschließend von +0.1 V angelegt wurde. In a-e sind Aufnahmen der Probe vor PLBs-Entfernung, in e-h Aufnahmen derselben Probe nach Entfernung der PLBs dargestellt.

Bei näherer Betrachtung sind auf der Oberfläche der beschichteten Bereiche dicht gepackte PLBs mit einem mittleren Durchmesser von 40 nm erkennbar. Durch Lagerung in Toluol konnten, wie in Abbildung 4.72e-h erkennbar, die PLBs vollständig entfernt werden. Es sind weiterhin einzelne Areale, welche durch Risse voneinander getrennt sind, auf der Probenoberfläche vorhanden. Durch Entfernen der PLBs konnte eine poröse Beschichtung mit Porendurchmessern entsprechend dem PLBs-Durchmesser von 40 nm erzeugt werden. Die zweifach hintereinander durchgeführte elektrochemische Platinabscheidung führte zu einer zweiten porösen Platinschicht entlang der mit dichtem Platin gefüllten Risse. Dies kann mit den unterschiedlichen Keimbildungsenergien erklärt werden, da diese im Vergleich zu freien Flächen entlang der Kanten niedriger ist und somit dort der Keim zur Elektrokristallisation bevorzugt entsteht.<sup>234,235</sup> Da die Rissbildung, unabhängig von den während der elektrochemischen Platinabscheidung verwendeten Parametern, auf allen Proben auftrat, ist diese auf Trocknungseffekte bei der PLBs-Beschichtung zurückzuführen. Durch die Beschichtung mit einer ethanolischen PLBs-Suspension und der dadurch schnelleren Trocknung konnten sowohl die inhomogene Platinbeschichtung des Substrats als auch die Rissbildung der PLBs-Beschichtung nicht verbessert werden. Da die Homogenität der PLBs-Beschichtung durch das organische Lösungsmittel sogar deutlich verschlechtert wurde (vgl. Abbildung 7.9, S. 215), erfolgten keine weiteren Experimente mit ethanolischen PLBs-Suspensionen.

Basierend auf den Ergebnissen der mit Ip-NPPt beschichteten Goldsubstrate wurde auch bei der Beschichtung von Platinsubstraten das PLBs-Suspensionsvolumen variiert, wobei die elektrochemische Platinabscheidung mit einem Arbeitspotential von 2 V und einer Zyklenzahl von 4000 konstant gehalten wurde. Da die Verwendung von 300  $\mu\text{L}$  auf den Goldsubstraten zu stark inhomogenen Beschichtungen mit nur geringen nanoporösen Platinbereichen führte (vgl. Abbildung 4.69, S. 145), wurden im Folgenden das schon auf Gold verwendete Volumen von 100  $\mu\text{L}$  eingesetzt. Durch die Volumenerhöhung auf 150  $\mu\text{L}$  sollte der Einfluss durch eine längere Trocknungszeit auf eine möglicherweise höher geordnete PLBs-Beschichtung untersucht werden. Auch die Auswirkung einer Konzentrationsänderung der PLBs-Suspension sollte beurteilt werden. Die PLBs-Konzentration von 0.5 Gew.-%, die auf den Goldsubstraten verwendet wurde, wurde daher auf 0.25 Gew.-%, 0.125 Gew.-% sowie 0.0625 Gew.-% reduziert. In Abbildung 4.73 sind fotografische Aufnahmen von Platinbeschichtungen unter Verwendung der PLBs mit einem Durchmesser von 50 nm unter Variation des PLBs-Suspensionsvolumen und der PLBs-Konzentration dargestellt.

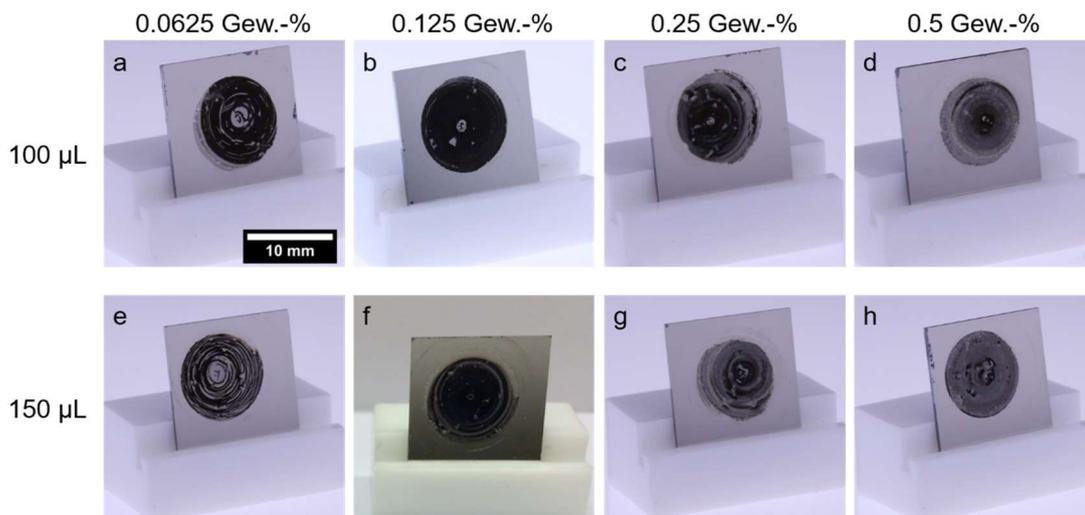


Abbildung 4.73: Fotografische Aufnahmen von Ip-NPPt-Beschichtungen auf Platinsubstraten unter Verwendung von PLBs mit einem Durchmesser von 50 nm, bei welchen 100  $\mu\text{L}$  (a-d) bzw. 150  $\mu\text{L}$  (e-h) der PLBs-Suspension verwendet wurden. Die PLBs-Konzentration wurde zwischen 0.0625 Gew.-% (a,e), 0.125 Gew.-% (b,f), 0.25 Gew.-% (c,g) und 0.5 Gew.-% (d,h) variiert.

Schon mit dem Auge sind Homogenitätsunterschiede der verschiedenen Platinbeschichtungen erkennbar. Durch die Beschichtung mit 100  $\mu\text{L}$  PLBs-Suspension (Abbildung 4.73a-d) zeigt sich bei einer PLBs-Konzentration von 0.0625 Gew.-% (Abbildung 4.73a) eine nicht vollständige Platinbeschichtung des Substrats. Die schwarze Färbung der Beschichtung deutet auf eine Porosität hin. Die unbeschichteten Bereiche der Probe, in denen das Platinsubstrat erkennbar ist,

#### 4 Ergebnisse und Diskussion

sprechen für eine zu geringe eingesetzte PLBs-Konzentration. Durch Erhöhung der PLBs-Konzentration auf 0.125 Gew.-% (Abbildung 4.73b) konnte die Homogenität der schwarzen Platinbeschichtung stark erhöht werden. Ausschließlich ein kleiner Bereich in der Mitte der Probenoberfläche zeigt keine Beschichtung. Durch weitere PLBs-Konzentrationserhöhungen auf 0.25 Gew.-% und 0.5 Gew.-% sind wiederum stärkere Inhomogenitäten und Bereiche einer grauen Beschichtung erkennbar (Abbildung 4.73c, d), was die Abscheidung einer dichten Platinbeschichtung vermuten lässt. Durch die Erhöhung des PLBs-Suspensionsvolumens auf 150  $\mu\text{L}$  (Abbildung 4.73e-h) konnten ähnliche Platinbeschichtungen erzeugt werden. Bei einer PLBs-Konzentration von 0.0625 Gew.-% (Abbildung 4.73e) wurde das Substrat, wie auch schon bei der Verwendung von 100  $\mu\text{L}$  PLBs-Suspension, unvollständig mit Platin beschichtet. Auch hier sind Bereiche von unbeschichteten Platinsubstrat erkennbar, was auf eine zu geringe Menge an PLBs schließen lässt. Die Beschichtung selbst weist eine schwarze Färbung auf, was wiederum auf eine Porosität hindeutet. Die PLBs-Konzentrationserhöhung auf 0.125 Gew.-% führt zu einer deutlich homogeneren schwarzen Beschichtung, bei welcher keine unbeschichteten Bereiche erkennbar sind (Abbildung 4.73f). Eine weitere PLBs-Konzentrationserhöhung auf 0.25 Gew.-% und 0.5 Gew.-% erzeugte eine großflächige graue Beschichtung und nur vereinzelte Bereiche einer schwarzen Beschichtung (Abbildung 4.73g-h). Durch die Erhöhung des PLBs-Suspensionsvolumens von 100  $\mu\text{L}$  auf 150  $\mu\text{L}$  konnten keine makroskopisch homogeneren Platinbeschichtungen erzeugt werden.

Die makroskopisch homogenste Platinbeschichtung konnte unter Verwendung von 100  $\mu\text{L}$  einer 0.125 Gew.-%igen PLBs-Suspension abgeschieden werden. Zur genaueren Beurteilung der Homogenität und Porosität dieser Beschichtung wurden rasterelektronische (REM) Aufnahmen angefertigt, die in Abbildung 4.74 dargestellt sind.

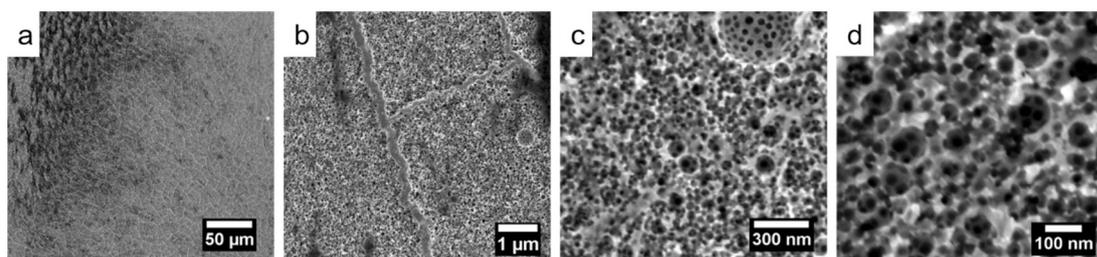


Abbildung 4.74: REM-Aufnahmen einer Ip-NPPT-Beschichtung auf Platin unter Verwendung von 100  $\mu\text{L}$  einer 0.125 Gew.-%igen PLBs-Suspension für die Templatbeschichtung.

Auf der Übersichtsaufnahme in Abbildung 4.74a sind, wie auch bei den Platinbeschichtungen auf Gold (vgl. Abbildung 4.70), einzelne Areale zu sehen. Durch weitere Vergrößerung sind in Abbildung 4.74b homogene poröse Beschichtungen erkennbar, die durch etwa 200 nm breite, aus dichtem Platin

bestehende, Bereiche voneinander abgegrenzt sind. Die Porendurchmesser des ungeordneten Porensystems liegen im Bereich von 35–90 nm (Abbildung 4.74c und d). Der mittlere Porendurchmesser von ungefähr 50 nm entspricht dem eingesetzten PLBs-Durchmesser. Die Querschnittsaufnahmen in Abbildung 4.75 ermöglichen die Schichtdickenbestimmung der elektrochemisch abgeschiedenen Platinbeschichtung.

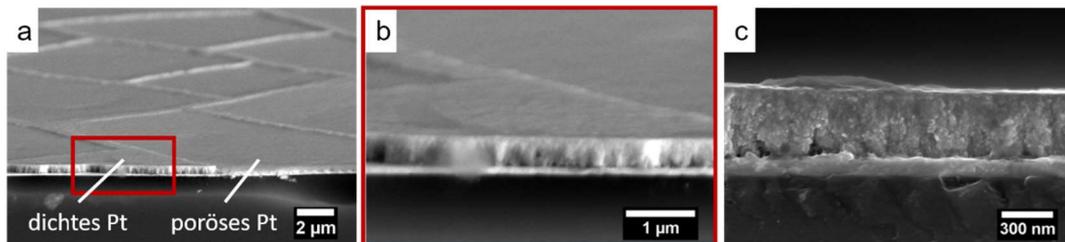


Abbildung 4.75: REM-Aufnahme einer lp-NPPT-Beschichtung auf Platin im Querschnitt unter 100  $\mu\text{L}$  einer 0.125 Gew.-%igen PLBs-Suspension für die Templatbeschichtung.

Auf der Übersichtsaufnahme in Abbildung 4.75a sind die einzelnen Areale sowie die Grenzen aus dichtem Platin erkennbar. Durch weitere Vergrößerung in Abbildung 4.75b kann der Querschnitt der Platingrenze genauer beurteilt werden. Wie schon vermutet besteht die Platingrenze aus dichtem Platin und weist eine Schichtdicke von etwa 400 nm auf (Abbildung 4.75c). Aufgrund einer nur begrenzten Anzahl an rasterelektronischen Aufnahmen konnte keine weitere Querschnittsaufnahme von der porösen Platinbeschichtung innerhalb der Areale angefertigt werden. Jedoch lassen die Querschnittsaufnahmen die Vermutung zu, dass diese im Vergleich zum dichten Platin eine deutlich geringere Schichtdicke aufweisen.

Basierend auf den vielversprechenden Ergebnissen der lp-NPPT-Beschichtungen wurde im Rahmen der Doktorarbeit von Tim-Joshua Strauß die Integration von nanoporösen Silica-Nanopartikeln (NPSNP) in die nanoporöse Platinbeschichtung untersucht.<sup>236</sup> Hierbei soll das bereits untersuchte Wirkstofffreisetzungssystem der NPSNP zur Wirkstofffreisetzung genutzt werden.<sup>64</sup> Durch die Integration der NPSNP in die Poren des lp-NPPT können die Elektrodenkontakte des Cochlea-Implantats mit diesem Wirkstofffreisetzungssystem ausgestattet werden. Die Herstellung des sogenannten NPSNP@NPPT-Systems ist schematisch in Abbildung 4.76 dargestellt.

#### 4 Ergebnisse und Diskussion

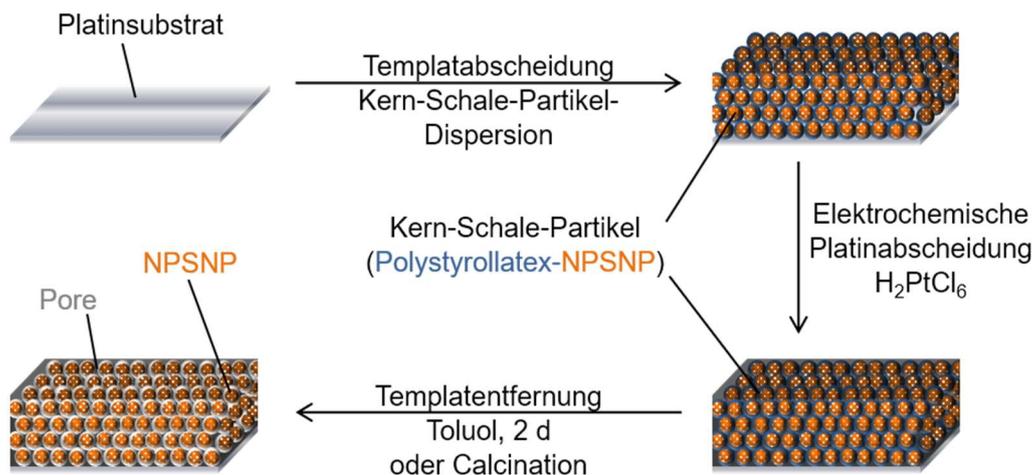


Abbildung 4.76: Schematische Darstellung der Präparation eines Komposit-Materials aus nanoporösen Silica-Nanopartikeln in nanoporösem Platin auf einem Platinsubstrat.

Zunächst werden Nanopartikel mit einem nanoporösem Silica-Kern und einer Polystyrolatex-Schale, sogenannte Kern-Schale-Partikel, synthetisiert. Diese werden analog zu den Polystyrolatex-Kugeln auf der Platinsubstrat-Oberfläche aufgebracht. Die Platinabscheidung in die Templat-Zwischenräume erfolgt elektrochemisch. Durch die anschließende Auflösung der Polystyrolatex-Schale bleiben ausschließlich die NPSNP in den Nanoporen der Platinbeschichtung zurück. Anhand der in Abbildung 4.77 gezeigten rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen des Probenquerschnitts kann die erfolgreiche Herstellung des NPSNP@NPt-Systems mit einer Beschichtungsdicke von 360 nm und einem NPSNP-Durchmesser von 75 nm nachgewiesen werden.

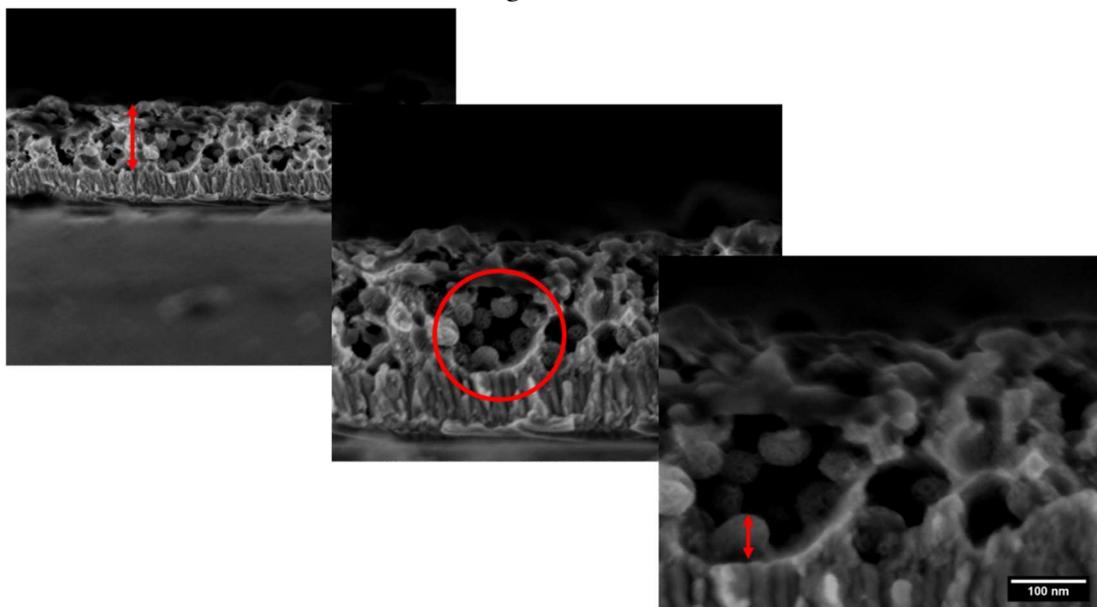


Abbildung 4.77: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme des Komposit-Materials aus nanoporösen Silica-Nanopartikeln in nanoporösem Platin.<sup>237</sup>

*Kurzzusammenfassung: Oberflächen- und Schichtdickencharakterisierung von lp-NPPT*

In diesem Abschnitt wurden poröse Platinbeschichtungen mit mittleren Porendurchmessern von ungefähr 50 nm auf Gold- und Platinsubstraten vorgestellt. Es zeigten sich sowohl auf den Gold- als auch auf Platinsubstraten starke makroskopische Inhomogenitäten der schwarzen Platinbeschichtungen, welche durch Einsatz von 100  $\mu\text{L}$  PLBs-Suspension mit einer Konzentration von 0.125 Gew.-% deutlich verringert werden konnten. Durch rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen waren einzelne, in sich homogene poröse Areale, die durch dichtes Platin voneinander abgegrenzt waren, erkennbar. Das ungeordnete Porensystem wies bei allen Proben einen Porendurchmesser entsprechend der PLBs-Größe von etwa 50 nm auf. Durch REM-Aufnahmen des Querschnitts einer porösen Platinbeschichtung auf Platin konnte die Schichtdicke der dichten Platingrenzen mit 400 nm bestimmt werden. Die Schichtdicke der porösen Platinbeschichtung konnte anhand der Aufnahmen nicht näher untersucht werden, allerdings lässt sich aufgrund der Übersichtsaufnahme vermuten, dass diese deutlich unter 400 nm liegt. Durch die Integration von nanoporösen Silica-Nanopartikeln in die lp-NPPT-Beschichtung, kann ein implantatassoziiertes Wirkstoffsystem in der in dieser Arbeit entwickelten lp-NPPT-Beschichtung etabliert werden.<sup>236</sup>

### 4.1.2.2 Bestimmung der elektrischen Eigenschaften

Für die Anwendung als neuronales Elektrodenmaterial spielen die elektrischen Eigenschaften der porösen Platinbeschichtung eine entscheidende Rolle. Daher wurden impedanzspektroskopische Messungen von den lp-NPPT auf Platinsubstraten angefertigt und diese mit den Impedanzen der unbeschichteten Platinsubstrate verglichen (Abbildung 4.78).

## 4 Ergebnisse und Diskussion

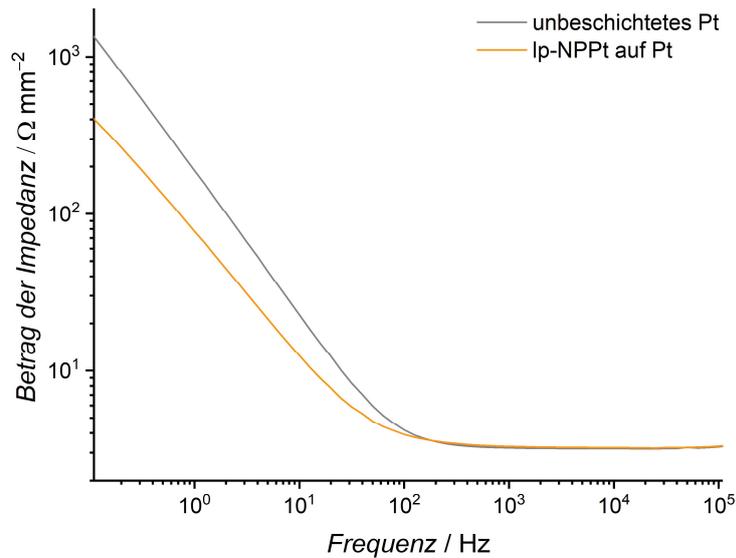


Abbildung 4.78: Impedanzspektroskopische Messungen einer Ip-NPPt (orange) im Vergleich zu einer unbeschichteten Platinoberfläche (grau).

Sowohl die unbeschichteten als auch die Ip-NPPt-beschichteten Elektrodenkontakte weisen im hochfrequenten Bereich eine Impedanz von  $4 \Omega \cdot \text{mm}^{-2}$  auf. Ab einer Frequenz von 320 Hz steigen bei beiden Oberflächen die Impedanzen jeweils an, wobei die Impedanzkurve des unbeschichteten Elektrodenkontakts eine höhere Steigung besitzt. Infolgedessen hat der unbeschichtete Elektrodenkontakt bei 0.1 Hz mit  $1.4 \cdot 10^3 \Omega \cdot \text{mm}^{-2}$  eine höhere Impedanz als der Ip-NPPt-beschichtete Elektrodenkontakt mit  $0.43 \cdot 10^3 \Omega \cdot \text{mm}^{-2}$ . Da der Systemwiderstand bei hohen Frequenzen von dem Elektrolytwiderstand bestimmt wird und der Anteil des zu bestimmenden Probenwiderstands im niederfrequenten Bereich zunimmt, kann die um ein Drittel verringerte Impedanz bei 0.1 Hz auf die erhöhte spezifische Oberfläche durch die Ip-NPPt-Beschichtung zurückgeführt werden.

### *Kurzzusammenfassung: Bestimmung der elektrischen Eigenschaften von Ip-NPPt*

Durch die Ip-NPPt-Beschichtung konnte die Impedanz im niederfrequenten Bereich um etwa ein Drittel herabgesenkt werden. Dies kann mit der erhöhten spezifischen Oberfläche erklärt werden.

### 4.1.2.3 Cytokompatibilitätsuntersuchungen

Auf der Ip-NPPt-Oberfläche wurden als potenzielles biomedizinisches Material für neuronale Elektroden grundlegende Cytokompatibilitätsuntersuchungen mit murinen NIH3T3-Fibroblasten, die das grün fluoreszierende Protein (*green fluorescent protein*, GFP) exprimieren, durchgeführt. Im Hinblick auf die Anwendung als Beschichtungsmaterial der Cochleae-Elektrodenkontakte wurde anschließend das Verhalten der aus dem Innenohr stammenden Spiralganglienzellen auf der Ip-

NPpt-Oberfläche untersucht. Als Kontrollen wurden sowohl Well-Plastik als auch Glasoberflächen untersucht. Da dichtes Platin bereits erfolgreich als neuronales Elektrodenmaterial im Menschen eingesetzt wird, dienten unbeschichtete Platinoberflächen als Vergleichsmaterial zu den lp-NPpt-Beschichtungen. Alle Zellkulturuntersuchungen wurden durch Jennifer Harre aus der Arbeitsgruppe von Dr. Athanasia Warnecke an der Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde (Leitung Prof. Dr. Thomas Lenarz) der Medizinischen Hochschule Hannover durchgeführt und gemeinsam ausgewertet.

Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der Zellkulturuntersuchungen mit NIH3T3-Fibroblasten auf lp-NPpt sowie unbeschichtetem Platin, Glas und Well-Plastik als Kontrolle sind in Abbildung 4.79 dargestellt.

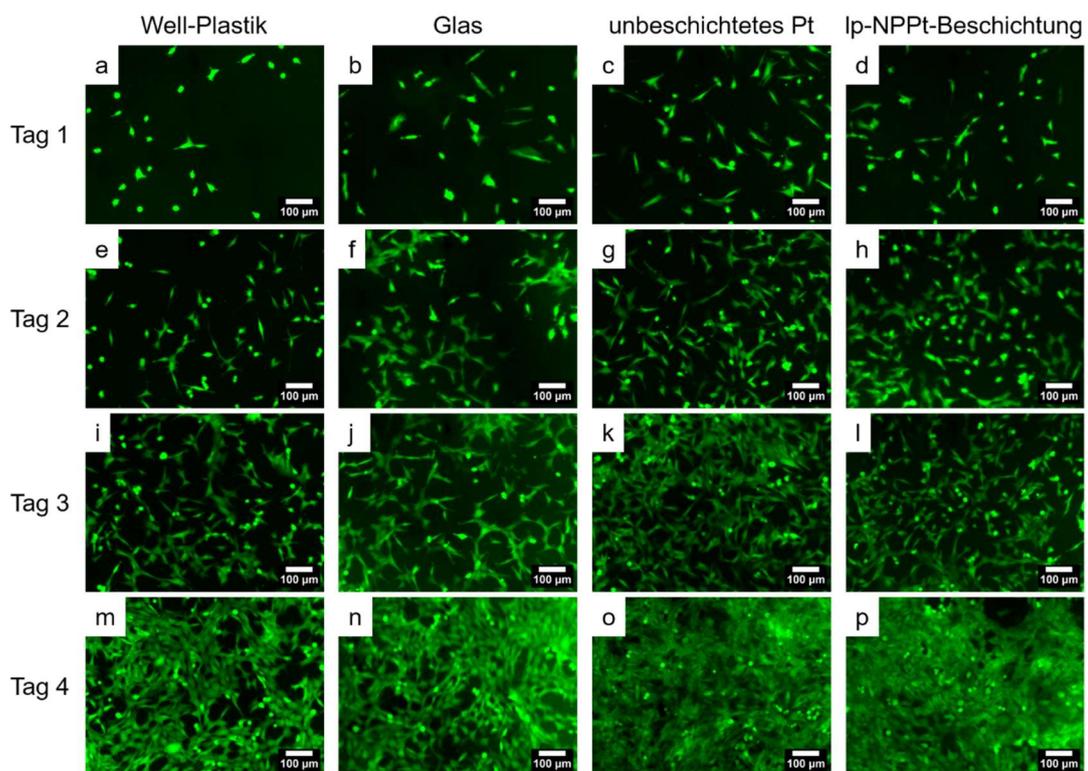


Abbildung 4.79: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Fibroblasten auf Well-Plastik (a,e,i,m), Glas (b,f,j,n), unbeschichtetem Platin (c,g,k,o) und lp-NPpt (d,h,l,p) nach 1 Tag (a-d), 2 Tagen (e-h), 3 Tagen (i-l) und 4 Tagen (m-p) der Fibroblasten-Einsaat.

Einen Tag nach der Fibroblasten-Einsaat sind auf allen Proben grün fluoreszierende Zellen erkennbar. Auf Well-Plastik (Abbildung 4.79a) weisen die Fibroblasten eine hauptsächlich runde Zellform auf, ausgebreitete Zellen sind nur vereinzelt zu beobachten. Eine ähnliche Anzahl an Zellen, jedoch eine stärkere Zellausbreitung, ist auf der Glasoberfläche (Abbildung 4.79b) zu sehen. Auf dem unbeschichteten Platin, wie auch auf dem lp-NPpt sind deutlich mehr Zellen erkennbar, wobei eine

#### 4 Ergebnisse und Diskussion

verbesserte Zellausbreitung auf unbeschichtetem Platin zu beobachten ist. Da nach einem Tag im Vergleich zum Well-Plastik und Glas eine verbesserte Zellproliferation und -morphologie sowohl auf dem unbeschichteten als auch porösem Platin auftritt, scheint eine gute Fibroblasten-Kompatibilität der Platinoberflächen vorzuliegen. Anhand der täglichen mikroskopischen Aufnahmen ist auf allen Oberflächen ein gutes Zellwachstum erkennbar. Nach vier Tagen bildete sich auf allen Probenoberflächen ein dichter Zellrasen aus Fibroblasten aus, der hauptsächlich aus ausgebreiteten Zellen und nur vereinzelt aus kugelförmigen Zellen besteht. Auch die absoluten Zellzahlen des vierten Tages (Abbildung 4.80) bestätigen die schon auf den fluoreszenzmikroskopischen Bildern beobachtete gute Zellproliferation.

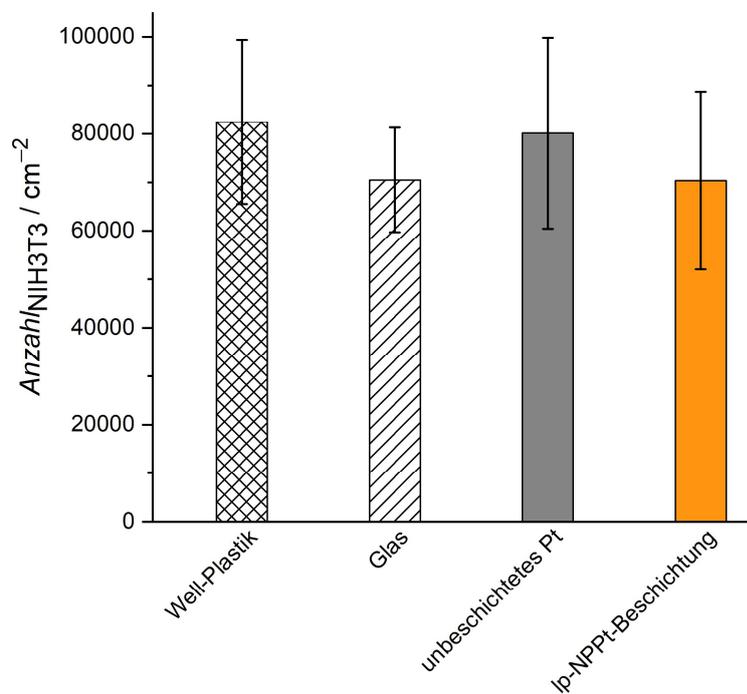


Abbildung 4.80: Absolute Zellzahlen der nach vier Tagen angewachsenen Fibroblasten auf Well-Plastik, Glas, unbeschichtetem Platin und Ip-NPpt-Beschichtung.

Unter Berücksichtigung der Standardabweichungen unterscheiden sich die absoluten Zellzahlen auf den verschiedenen Probenoberflächen nicht. Da Well-Plastik als auch unbeschichtetes Platin als sehr gut biokompatibel gilt, kann durch die nur leicht verminderte Zellproliferation auf dem Ip-NPpt trotzdem von einer guten Cytokompatibilität ausgegangen werden.

Aufgrund des guten Ergebnisses der grundlegenden Cytokompatibilitätsuntersuchung mit NIH3T3-Fibroblasten wurden anschließend spezifischere Zellkulturuntersuchungen mit Spiralganglienzellen (SGZ) aus dem Innenohr

durchgeführt. Die aufgenommenen fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen sind in Abbildung 4.81 dargestellt.

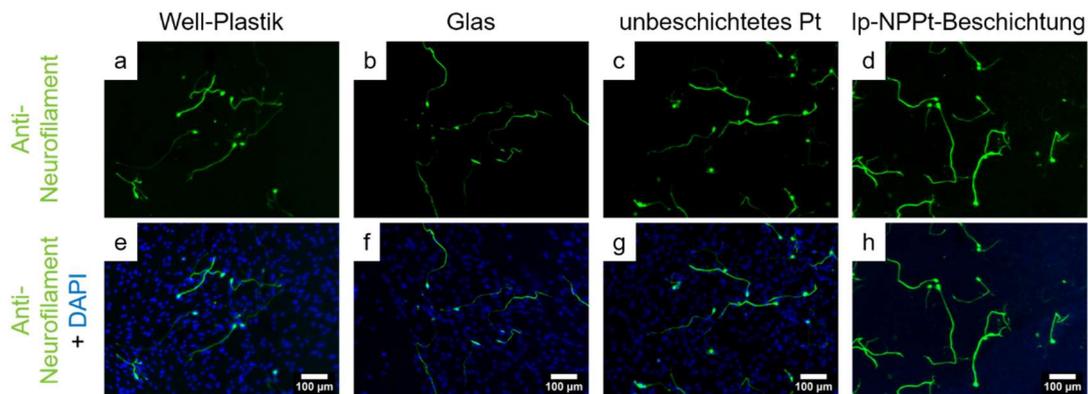


Abbildung 4.81: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der immunfluoreszenzgefärbten Spiralganglienzellkultur auf mit Ornithin / Laminin beschichtetem Well-Plastik (a,e), mit Ornithin / Laminin beschichtetem Glas (b,f), unbeschichtetem Platin (c,g) und Ip-NPPT (d,h) 48 Stunden nach der Spiralganglienzellen-Einsaat. In a-d sind Spiralganglienneurone mit angefärbten Neurofilamenten (grün) erkennbar, in e-h sind zusätzlich die mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) fluoreszenzgefärbten Zellkerne (blau) zu sehen.

Zur Identifizierung der Spiralganglienneurone (SGN) in der Mischkultur wurde das Neurofilament der SGN mit Anti-Neurofilament (ANF) eingefärbt, wodurch diese durch grüne Fluoreszenz erkennbar sind (Abbildung 4.81a-d). Auf allen Probenoberflächen haben sich ausgehend vom Zellsoma Neuriten ausgebildet. In der Zellmorphologie und den Neuritenlängen sind zwischen den Kontrolloberflächen und der Ip-NPPT-Beschichtung keine Unterschiede auszumachen. Auf den fluoreszenzmikroskopischen Bildern scheinen auf der Ip-NPPT-Beschichtung im Vergleich zu dem mit Ornithin / Laminin beschichtetem Well-Plastik und der mit Ornithin / Laminin beschichteten Glasoberfläche mehr SGN angewachsen zu sein. Da die Aufnahmen jedoch nur einen kleinen Bereich der Probenoberfläche darstellen, sind diese nicht repräsentativ, weshalb im Folgenden für eine quantitative Auswertung die SGN ausgezählt wurden (vgl. Abbildung 4.83, S. 159).

Die Zellkerne von allen Zelltypen können durch die Färbung mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) sichtbar gemacht werden, diese sind in Abbildung 4.81e-h in blau zu sehen. Durch den Isolierungsprozess der SGZ sind in der verwendeten Zellsuspension zusätzlich zu den SGZ sogenannte Stützzellen vorhanden. Daher sind die in blau erkennbaren Zellkerne den SGZ, aber auch den Gliazellen oder Fibroblasten zuzuordnen und können nicht unterschieden werden. Auf dem Well-Plastik, wie auch auf der Glasoberfläche und dem unbeschichteten Platin sind auf der gesamten Oberfläche runde Zellkerne zu sehen. Ausschließlich auf der Ip-NPPT-Beschichtung sind keine Zellkerne eindeutig sichtbar. Zur besseren Beurteilung

#### 4 Ergebnisse und Diskussion

wurden fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von dem Randbereich der Ip-NPPT-Beschichtung aufgenommen und mit den mittig aufgenommenen Aufnahmen der Ip-NPPT-Beschichtung verglichen (Abbildung 4.82)

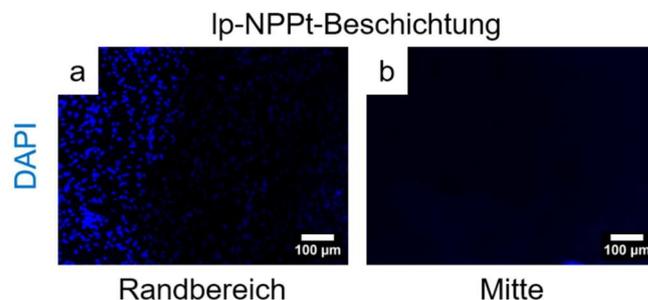


Abbildung 4.82: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen des Randbereichs sowie der Mitte einer Ip-NPPT-Beschichtung mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) fluoreszenzgefärbten Zellkernen (blau).

Auf dem unbeschichteten Bereich der Probe sind die in blau fluoreszierenden Zellkerne deutlich zu erkennen. Auch im Randbereich der Ip-NPPT-Beschichtung sind Zellkerne zu sehen, die jedoch im Vergleich zu denen im unbeschichteten Bereich deutlich schwächer fluoreszieren. Je weiter der Randbereich entfernt ist, desto schwächer wird die erkennbare Fluoreszenz. In der Mitte der Ip-NPPT-Beschichtung können schließlich keine Zellkerne mehr ausgemacht werden. Diese Beobachtungen lassen die Anwesenheit der Zellkerne vermuten, die aufgrund von Absorption des Lichts oder Adsorption der DAPI-Moleküle an der porösen Platinoberfläche keine sichtbare Fluoreszenz aufweisen und somit nicht erkennbar sind. Zur quantitativen Auswertung wurden die für 48 h kultivierten und immunocytochemisch angefärbten SGN am Fluoreszenzmikroskop ausgezählt (Abbildung 4.83).

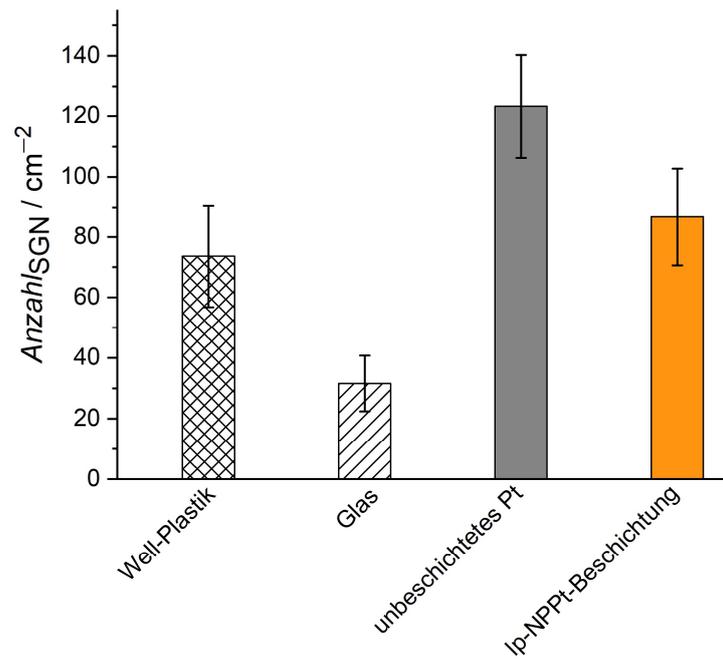


Abbildung 4.83: Absolute Zellzahlen der nach 48 Stunden angewachsenen Spiralganglienneurone auf dem mit Ornithin / Laminin beschichteten Well-Plastik, mit Ornithin / Laminin beschichteten Glas, unbeschichtetem Platin und Ip-NPpt-Beschichtung.

Auf dem mit Ornithin / Laminin beschichteten Well-Plastik konnten mit  $74 \pm 17 N_{\text{SGN}} \cdot \text{cm}^{-2}$  etwa doppelt so viele Zellen als auf der mit Ornithin / Laminin beschichteten Glasoberfläche mit  $32 \pm 9 N_{\text{SGN}} \cdot \text{cm}^{-2}$  nachgewiesen werden. Da auf der Glasoberfläche üblicherweise ein positives Zellwachstum zu erwarten ist, scheint die Sterilisation oder die Beschichtung mit Ornithin / Laminin nicht erfolgreich gewesen zu sein. Daher werden zur Auswertung der SGN-Zellkulturuntersuchung die Ergebnisse auf Glas nicht berücksichtigt und im Folgenden das beschichtete Well-Plastik als Positivkontrolle mit den Platinproben verglichen. Im Vergleich zu dem Well-Plastik sind sowohl auf dem unbeschichteten Platinsubstrat mit  $123 \pm 17 N_{\text{SGN}} \cdot \text{cm}^{-2}$  als auch auf der Ip-NPpt-Beschichtung mit  $87 \pm 16 N_{\text{SGN}} \cdot \text{cm}^{-2}$  mehr SGN angewachsen, was eine gute Cytokompatibilität beider Platinoberflächen bestätigt. Die höheren Zellzahlen auf unbeschichtetem Platin können nicht eindeutig erklärt werden. Eine mögliche Erklärung wäre das zunächst langsamere Anwachsen der SGN auf der Ip-NPpt-Oberfläche im Vergleich zur unbeschichteten Platinoberfläche. Dies konnte bereits bei den Zellkulturuntersuchungen von mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark auf sp-NPpt-Beschichtungen beobachtet werden (vgl. Abbildung 4.22, S. 93).

### *Kurzzusammenfassung: Cytokompatibilitätsuntersuchungen von lp-NPPT*

Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der grundlegenden Cytokompatibilitätsuntersuchungen mit murinen NIH3T3-Fibroblasten zeigten auf der lp-NPPT-Beschichtung eine erfolgreiche Zellproliferation über den gesamten Zeitraum der Zellkulturuntersuchungen. Auch die typische Zellmorphologie und die im Vergleich hierzu sehr geringen kugelförmigen Zellen bewiesen eine gute Cytokompatibilität der lp-NPPT-Beschichtung. Anschließende spezifischere Zellkulturuntersuchungen mit den aus dem Innenohr isolierten Spiralganglienzellen lieferten mit einer erhöhten Zellüberlebensrate im Vergleich zur Positivkontrolle vielversprechende Ergebnisse. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der Probenoberflächen zeigten ein sehr gutes Neuritenwachstum auf der lp-NPPT-Beschichtung.

### **4.1.3 Direkter Vergleich der nanoporösen Platinbeschichtungen mit unterschiedlichen Porengrößen**

Abschließend sollen die beiden in 4.1.1 und 4.1.2 vorgestellten nanoporösen Platinbeschichtungen miteinander verglichen werden. Obwohl beide NPPT-Beschichtungen aufgrund ihrer unterschiedlichen Porendurchmesser verschiedene Anwendungsbereiche bezüglich der Wirkstoffeinlagerung haben könnten, sollen sowohl die Oberflächenbeschaffenheit und Schichtdicken, als auch die elektrischen Eigenschaften und die Cytokompatibilität gegenübergestellt werden.

#### **4.1.3.1 Oberflächen- und Schichtdickencharakterisierung**

Zur Beurteilung der Oberflächenbeschaffenheit und der Schichtdicken sind in Abbildung 4.84 rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen einer sp-NPPT-Beschichtung (a-c; vgl. S. 80), und einer lp-NPPT-Beschichtung (d-f; vgl. S. 150) dargestellt.

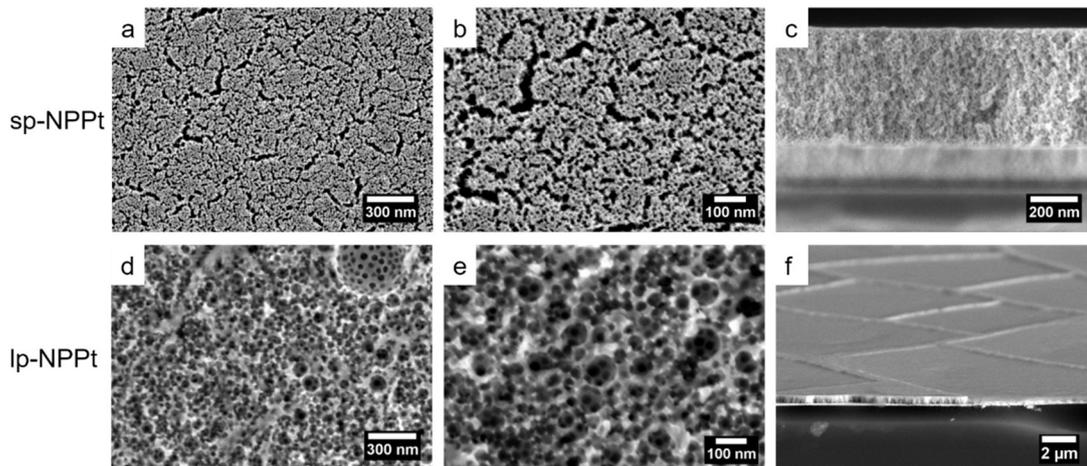


Abbildung 4.84: REM-Aufnahmen einer sp-NPpT-Beschichtung (a-c) und einer lp-NPpT-Beschichtung (d-f).

Beide Beschichtungen weisen in der Übersichtsaufnahme (a, d) eine poröse Oberfläche auf, welche sich in den Porendurchmessern stark unterscheiden. So kann anhand einer höheren Vergrößerung (b, e) für die mit Pluronic® F127 hergestellte sp-NPpT-Beschichtung ein mittlerer Porendurchmesser von 10 nm festgestellt werden. Durch die Verwendung von Polystyrolatex-Kugeln (PLBs) wurde eine poröse Beschichtung mit mittleren Durchmessern entsprechend den PLBs-Durchmessern von 50 nm erzeugt. Die sp-NPpT-Beschichtung weist Risse bzw. untereinander verbundene Poren auf, bei der lp-NPpT-Beschichtung hingegen treten dichte Platinbereiche auf. Die Schichtdicke der sp-NPpT ist mit 500 nm dicker als die der lp-NPpT-Beschichtung, diese liegt unter 400 nm (vgl. S. 151).

#### 4.1.3.2 Bestimmung der elektrischen Eigenschaften

Die elektrischen Eigenschaften wurden anhand impedanzspektroskopischer Messungen beurteilt. Die Messungen der sp-NPpT- und lp-NPpT-Beschichtungen wurden in unterschiedlichen Zellen durchgeführt, weshalb sich durch die verschiedenen Elektrodenabstände der Elektrolytwiderstand  $R_E$  änderte. Für eine bessere Vergleichbarkeit wurden die Werte der Impedanzen daher auf den jeweiligen Elektrolytwiderstand sowie die makroskopische Oberflächengröße normiert und in Abbildung 4.85 gegenübergestellt.

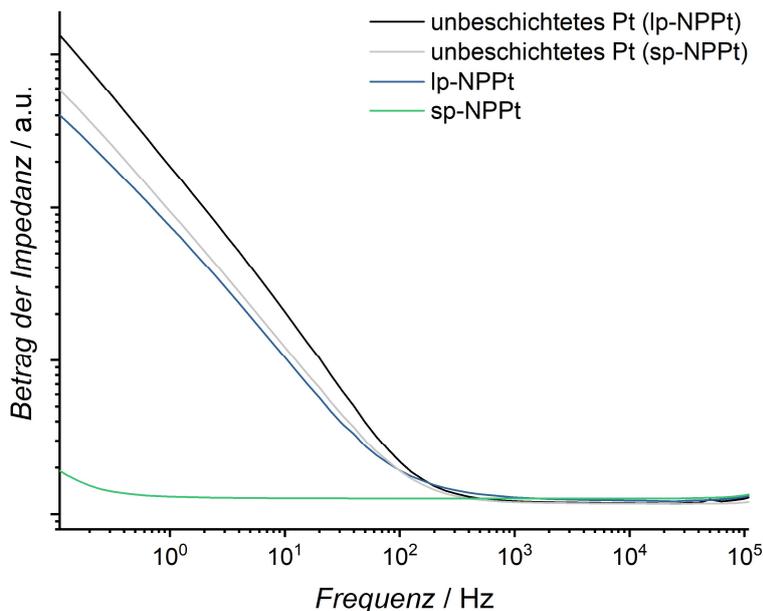


Abbildung 4.85: Impedanzspektroskopischen Messungen von sp-NPPt- (grün) und lp-NPPt- (blau) Beschichtungen auf Platinsubstraten. Für die Vergleichbarkeit der Systemwiderstände wurden die Kurven auf den Elektrolytwiderstand normiert.

Die unbeschichteten Platinsubstrate sind identisch, weisen aber aufgrund des veränderten Messaufbaus unterschiedliche Impedanzen auf. Die in schwarz und grau dargestellten normierten Impedanzen entsprechen Vergleichsmessungen unbeschichteter Substrate in der Messzelle für lp-NPPt respektive sp-NPPt-Beschichtungen.

Durch die Normierung weisen alle Oberflächen im hochfrequenten Bereich die gleiche Impedanz auf, ab etwa 300 Hz steigen die Wechselstromwiderstände der unbeschichteten Platinoberflächen sowie der lp-NPPt-Beschichtung stark an. Die unbeschichteten Platinsubstrate wurden auf die makroskopische Fläche und den Elektrolytwiderstand normiert, weshalb sie die gleiche Impedanz aufweisen müssten. Trotzdem ist die Impedanz für die lp-NPPt-Messung (schwarz) bei 0.1 Hz fast dreifach so hoch. Folglich sollte bei dem Vergleich der Impedanzen von den sp-NPPt- und lp-NPPt-Beschichtungen ein recht hoher Fehler berücksichtigt werden. Dennoch weist die sp-NPPt-Beschichtung eine um über zwei Größenordnungen kleinere Impedanz bei 0.1 Hz auf, was vermutlich auf die deutlich höhere spezifische Oberfläche der sp-NPPt-Beschichtung zurückzuführen ist.

#### 4.1.3.3 Cytokompatibilitätsuntersuchungen

Durch Zellkulturuntersuchungen mit den aus dem Innenohr stammenden Spiralganglienzellen wurde die Cytokompatibilität der sp-NPPt- und lp-NPPt-Beschichtungen beurteilt. Alle Zellkulturuntersuchungen wurden durch Jennifer Harre aus der Arbeitsgruppe von Dr. Athanasia Warnecke an der Klinik für Hals-

Nasen-Ohrenheilkunde (Leitung Prof. Dr. Thomas Lenarz) der Medizinischen Hochschule Hannover durchgeführt und gemeinsam ausgewertet. Auf beiden porösen Platinbeschichtungen kann ein erfolgreiches Neuritenwachstum (grün) beobachtet werden (Abbildung 4.86).

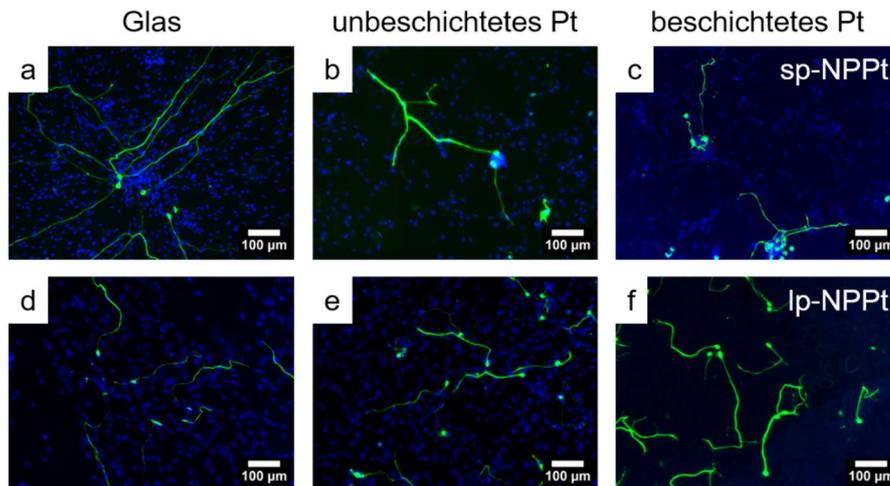


Abbildung 4.86: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der immunfluoreszenzgefärbten Spiralganglienzellkultur auf mit Ornithin / Laminin beschichtetem Glas (a,d), unbeschichtetem Platin (b,e), sp-NPPt (c) und lp-NPPt (f) nach 48 Stunden der Spiralganglienzellen-Einsaat.

Ein direkter Vergleich der absoluten Überlebensraten der Spiralganglienneurone (SGN) aus dem Innenohr zwischen unabhängigen Zellkulturuntersuchungen ist nicht sinnvoll, da die SGN-Zellüberlebensrate stark von der Qualität der aus Ratten isolierten Zellen abhängt. Dies ist besonders anhand der stark unterschiedlichen Zellüberlebensraten auf mit Ornithin/Laminin beschichteten Glasoberflächen deutlich (vgl. Abbildung 4.20, S. 91 und Abbildung 4.83, S. 159). Für einen Vergleich wurden die Überlebensraten jeweils auf die Blindprobe (unbeschichtetes Platinsubstrat) normiert und in Abbildung 4.87 gegenübergestellt.

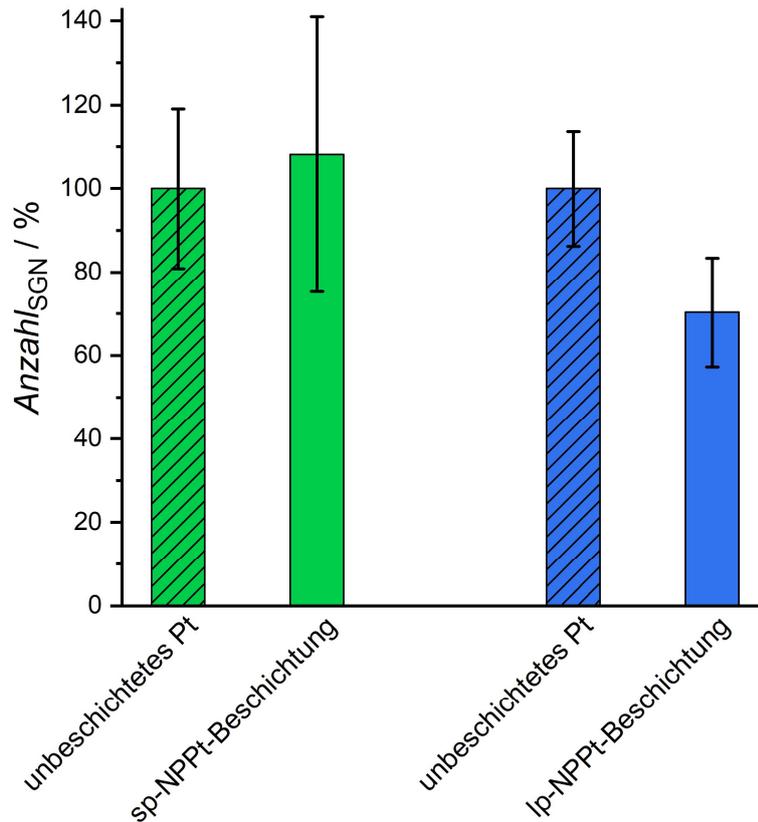


Abbildung 4.87: Normierte SGN-Zellzahlen der nach 48 Stunden angewachsenen Spiralganglienzellen auf unbeschichteten Platinsubstraten (schraffiert) sowie der sp-NPpt- (grün) und lp-NPpt- (blau) Beschichtung.

Unter Berücksichtigung der Standardabweichungen weisen die SGN auf den sp-NPpt-Beschichtungen ein vergleichbares Zellüberleben wie auf den unbeschichteten Platinsubstraten auf. Das Zellüberleben auf den lp-NPpt-Beschichtungen ist im Vergleich zu der unbeschichteten Platinoberfläche geringer.

*Kurzzusammenfassung: Direkter Vergleich der nanoporösen Platinbeschichtungen mit unterschiedlichen Porengrößen*

Durch die Verwendung von zwei unterschiedlichen Templaten konnten nanoporöse Platinbeschichtungen mit Porendurchmessern von 10 nm sowie etwa 50 nm hergestellt werden. Beide NPpt-Beschichtungen weisen eine Verringerung der Impedanz im niederfrequenten Bereich auf. Die Beschichtung mit sp-NPpt führte im Vergleich zu lp-NPpt zu einem deutlich größeren positiven Einfluss der Impedanz, da diese bei  $10^{-1}$  Hz um zwei Größenordnungen mehr verringert werden konnte. Zellkulturuntersuchungen zeigten auf beiden Beschichtungen eine mit unbeschichteten Platinsubstraten vergleichbare gute SGN-Überlebensrate, auf den sp-NPpt-Beschichtungen war diese etwas höher.

Aufgrund der deutlich besseren elektrochemischen Eigenschaften und des erhöhten SGN-Zellüberlebens sollte sp-NPpt zur Beschichtung der Elektrodenkontakte für die Integration eines implantatassoziierten Wirkstofffreisetzungssystem verwendet werden.

### 4.2 L1CAM-modifizierte Goldoberflächen

In diesem Abschnitt wird die Immobilisierung von L1CAM auf Goldoberflächen vorgestellt und diskutiert.

Zur L1CAM-Modifizierung wurden goldbeschichtete Siliciumwafer verwendet. Das Protein L1CAM wurde mittels Cysteamin auf der Goldoberfläche angebunden, da Cysteamin mit seiner Thiol-Gruppe Wechselwirkungen mit der Goldoberfläche eingeht. Außerdem können zwischen der Aminogruppe des Cysteamins und der Carbonsäure-Gruppe des L1CAMs Wasserstoffbrückenbindungen und elektrostatische Wechselwirkungen, sowie zwischen den Kohlenstoffketten des Cysteamins und L1CAMs hydrophobe Wechselwirkungen ausgebildet werden (vgl. Abschnitt 3.2.2, S. 62).

Zur Beurteilung der L1CAM-Verteilung sowie der prozentualen Flächenbedeckung auf der Goldoberfläche wird angebundenes L1CAM nach Fluoreszenzmarkierung mit Cy3<sup>®</sup> unter einem Fluoreszenzmikroskop visualisiert. Durch ein antikörperbasiertes Nachweisverfahren (*enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA) werden anschließend die immobilisierten, immunologisch aktiven L1CAM-Mengen direkt auf der Goldoberfläche bestimmt. Als weiteres Nachweisverfahren zur Bestimmung der immobilisierten, immunologisch aktiven L1CAM-Menge wird eine Kombination aus Cyclovoltammetrie und ELISA vorgestellt, bei der das L1CAM zunächst elektrochemisch von der Oberfläche abgelöst und anschließend in den Überständen nachgewiesen wird. Abschließend werden zur Beurteilung des elektrochemischen Ablöseverhaltens Kontaktwinkelmessungen und kolorimetrische Analysen ausgewertet.

#### 4.2.1 Flächenbedeckung und Verteilung

Zur Beurteilung des Immobilisierungsverhaltens auf Goldoberflächen wurde fluoreszenzmarkiertes L1CAM mit Einlagerungskonzentrationen von  $0.05 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $0.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  und  $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  auf Cysteamin-modifizierte Goldoberflächen aufgebracht und am Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen wurden mit der Software ImageJ analysiert, indem die Fluoreszenzpunkte gezählt, die durchschnittliche Größe der Fluoreszenzpunkte bestimmt und die prozentuale Flächenbedeckung berechnet wurde. Dafür wurde, wie in Abbildung 4.88 gezeigt, zunächst der Hintergrund unter

Berücksichtigung der Leuchtpunktgröße abgezogen, der Kontrast der Leuchtpunkte erhöht und ein Threshold ausgewählt.

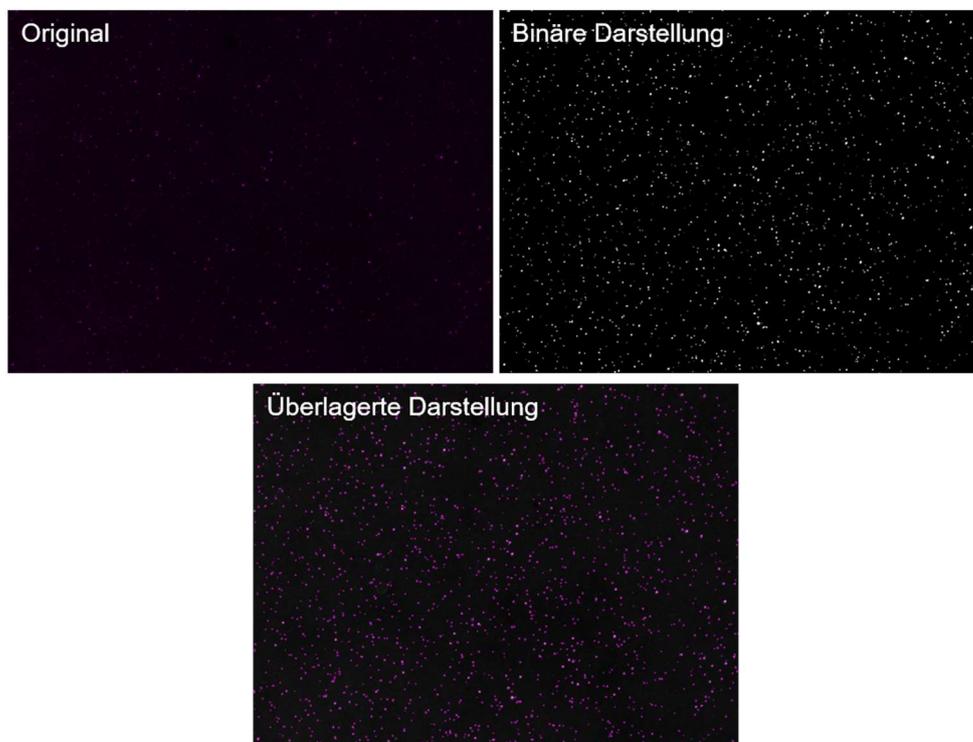


Abbildung 4.88: Ablauf der Bildbearbeitung durch ImageJ zur Auswertung der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen von auf dem Goldsubstrat aufgetragenen Cy3 gelabelten L1CAM. Das Originalbild zeigt die Aufnahme des Fluoreszenzmikroskops, in der binären Darstellung wurden die fluoreszierenden Leuchtpunkte des Originalbildes in weiße Punkte transferiert. In der überlagerten Darstellung wurde das Originalbild und die binäre Darstellung vereint.

Außerdem wurde bei ImageJ der Befehl „Watershed“ angewendet, um große zusammengelagerte Leuchtpunkte, die fälschlicherweise als ein Leuchtpunkt gezählt werden, der Größe der anderen Leuchtpunkte anzupassen und zu trennen. Da sich für jedes Bild der Hintergrund und Kontrast unterschieden, wurde zur Auswertung für jedes Bild ein passender Threshold visuell ausgewählt (vgl. S 216). Im Hinblick auf die übliche Auswertungsmethode bei fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen, beispielsweise bei Zellkulturuntersuchen, bei denen unter Anwendung definierter Abläufe jeder Leuchtpunkt manuell ausgezählt wird, stellte sich diese Methode als sinnvoll heraus.

Bereits auf den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen, dargestellt in Abbildung 4.89, können Unterschiede bezüglich der Anzahl der Leuchtpunkte zwischen den eingesetzten L1CAM-Einlagerungskonzentrationen von  $0.05 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $0.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $10\text{-}50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  und  $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  festgestellt werden.

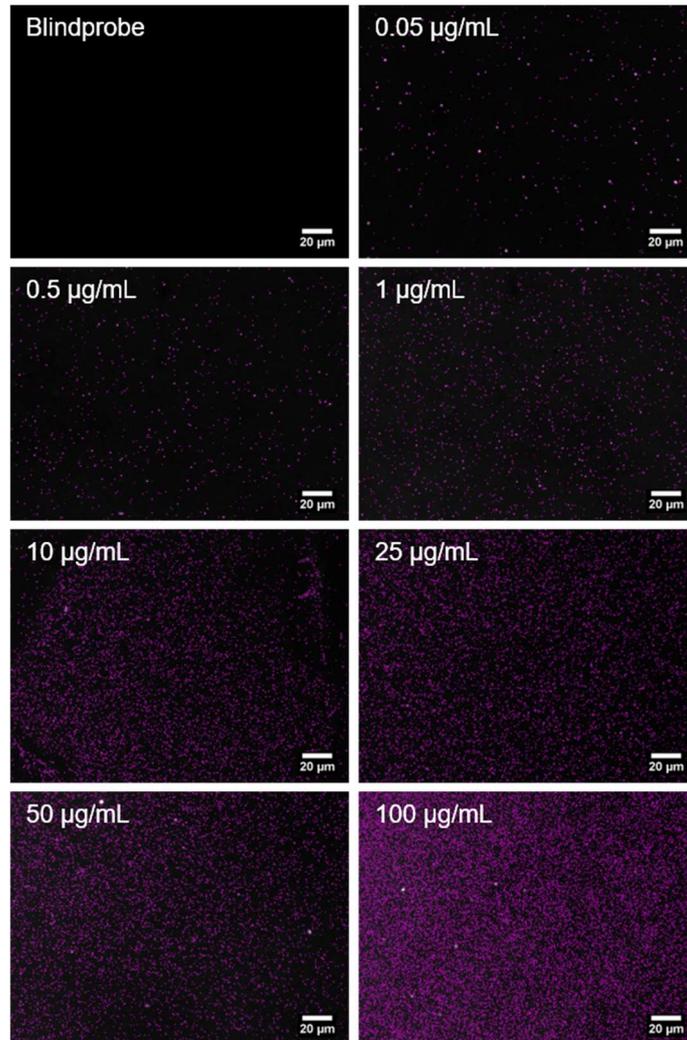


Abbildung 4.89: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von auf dem Goldsubstrat aufgetragenen fluoreszenzmarkierten L1CAM mit unterschiedlich eingesetzten L1CAM-Einlagerungskonzentrationen mit Kennzeichnung der ausgewerteten Leuchtpunkte durch ImageJ.

Wie zu erwarten steigt die Anzahl der sichtbaren Leuchtpunkte mit größer werdender Konzentration an. Die Aufnahmen von Proben, die mit den L1CAM-Konzentrationen  $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  und  $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  hergestellt wurden, können visuell nicht unterschieden werden.

Zur genaueren Auswertung wurden die Anzahl und die durchschnittliche Größe der Leuchtpunkte sowie die prozentuale Flächenbedeckung der Goldoberfläche durch die Leuchtpunkte betrachtet. Die Anzahl der Leuchtpunkte, welche in Abbildung 4.90 aufgeführt sind, steigt zunächst im Bereich von  $0.05 - 10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  mit höher werdender L1CAM-Einlagerungskonzentration von  $0.1\cdot 10^5 \text{ mm}^{-2}$  bis  $1.2\cdot 10^5 \text{ mm}^{-2}$  an.

#### 4 Ergebnisse und Diskussion

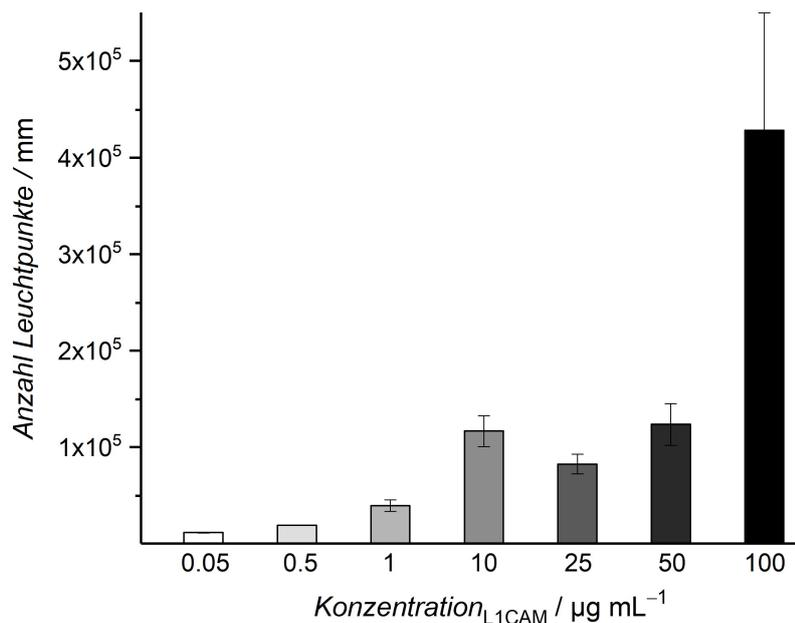


Abbildung 4.90: Anzahl der Leuchtpunkte der mit fluoreszenzmarkierten L1CAM-beschichteten Goldoberflächen in Abhängigkeit der L1CAM-Einlagerungskonzentration.

Unter Berücksichtigung der Standardabweichung kann die Leuchtpunktzahl im Bereich von 10 – 50 µg·mL<sup>-1</sup> mit einem Wert von etwa 10<sup>5</sup> mm<sup>-2</sup> als konstant angesehen werden. Bei Erhöhung der L1CAM-Einlagerungskonzentration auf 100 µg·mL<sup>-1</sup> steigt die Leuchtpunktzahl auf etwa 4.3·10<sup>5</sup> mm<sup>-2</sup> an, jedoch weist dieser Wert eine deutlich höhere Standardabweichung auf als die Leuchtpunktzahl bei anderen Konzentrationen.

Bei Betrachtung der in Abbildung 4.91 dargestellten durchschnittlichen Leuchtpunktgröße konnte unter Berücksichtigung der teilweise sehr großen Standardabweichung keine Abhängigkeit von der Konzentration festgestellt werden (Abbildung 4.91).

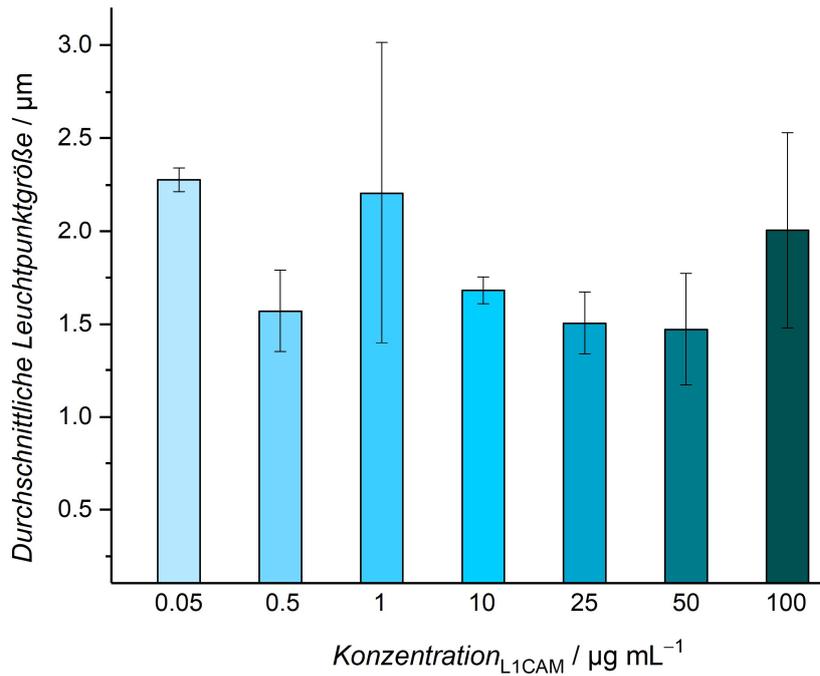


Abbildung 4.91: Durchschnittliche Leuchtpunktgröße auf den fluoreszenzmarkierten L1CAM beschichteten Goldoberflächen in Abhängigkeit von der L1CAM-Einlagerungskonzentration.

Alle Leuchtpunkte wiesen unabhängig von der verwendeten L1CAM-Einlagerungskonzentration eine Größe zwischen 1.5 – 2.3 µm auf.

Aus Anzahl und Größe der Leuchtpunkte lässt sich die prozentual bedeckte Oberfläche bestimmen, die im Hinblick auf die Anwendung als Implantatbeschichtungsmaterial eine entscheidende Rolle spielen kann (Abbildung 4.92).

#### 4 Ergebnisse und Diskussion

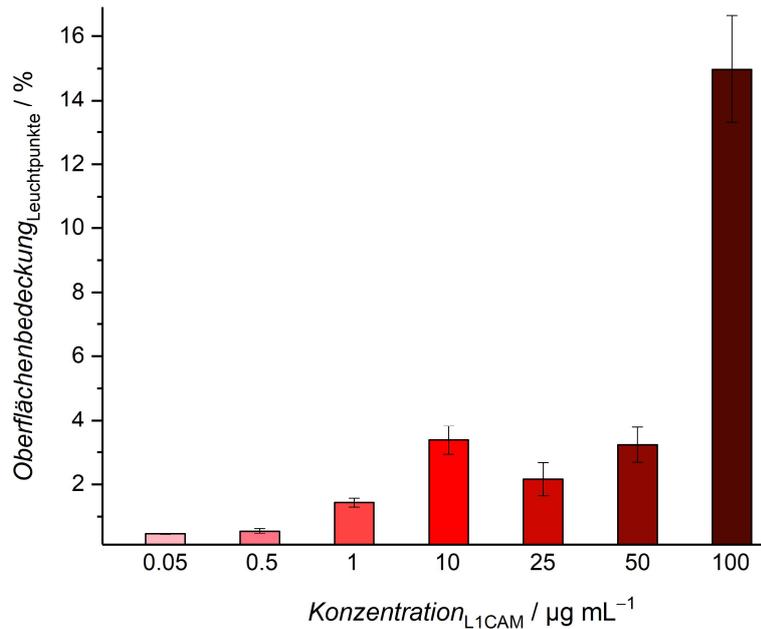


Abbildung 4.92: Prozentuale Bedeckung der Oberfläche mit fluoreszenzmarkiertem L1CAM auf Goldoberflächen in Abhängigkeit der L1CAM-Einlagerungskonzentration.

Da sich die Leuchtpunktgrößen in Abhängigkeit der L1CAM-Einlagerungskonzentration kaum unterscheiden, ähnelt der Verlauf der prozentualen Flächenbedeckung dem der Leuchtpunktzahl (vgl. Abbildung 4.90). Zunächst steigt die bedeckte Oberfläche im Konzentrationsbereich von  $0.05 - 10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  von 0.4% auf 3.4% an. Dabei unterscheiden sich die Werte der Konzentrationen von  $0.05 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  und  $0.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  mit einer Differenz unter 1% kaum. Auch kann im Konzentrationsbereich von  $10 - 50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  unter Berücksichtigung der Standardabweichung kein signifikanter Unterschied festgestellt werden, die Oberflächenbedeckung in diesem Konzentrationsbereich liegt bei etwa 3%. Durch eine Konzentrationserhöhung der L1CAM-Einlagerungslösung auf  $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  wurde mit 15% auch eine deutlich höhere Oberflächenbedeckung erreicht.

##### *Kurzzusammenfassung: Verteilung und Flächenbedeckung von L1CAM*

Zur Evaluierung des Immobilisierungsverhaltens wurde mit Cy3<sup>®</sup> fluoreszenzmarkiertes L1CAM in unterschiedlichen Konzentrationen auf Cysteamin-modifizierten Goldoberflächen aufgebracht. Die am Fluoreszenzmikroskop bestimmte Leuchtpunktzahl stieg im Konzentrationsbereich von  $0.05 - 10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  von  $0.1 \cdot 10^5 \text{ mm}^{-2}$  auf  $1.2 \cdot 10^5 \text{ mm}^{-2}$  an. Im Konzentrationsbereich zwischen  $10 - 50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  hingegen konnte unter Berücksichtigung der Standardabweichung kein Anstieg der Leuchtpunktzahl festgestellt werden. Erst durch eine Konzentrationserhöhung auf  $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  erhöhte sich die Leuchtpunktzahl auf über

$4 \cdot 10^5 \text{ mm}^{-2}$  (vgl. S. 168). Die durchschnittliche Leuchtpunktgröße zeigte keine Konzentrationsabhängigkeit (vgl. S. 169f). Entsprechend wies die aus Leuchtpunktzahl und -größe bestimmte prozentuale L1CAM-Oberflächenbedeckung den gleichen Verlauf, wie die Leuchtpunktzahl auf (vgl. S. 170).

### 4.2.2 Bestimmung der immunologisch aktiven L1CAM Menge

Neben Untersuchungen der L1CAM-Flächenbedeckung durch fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen sollte das immobilisierte, immunologisch aktive L1CAM quantitativ bestimmt werden. Hierfür wurde ein antikörperbasiertes Nachweisverfahren (*enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA) sowohl direkt auf der Goldoberfläche als auch indirekt an den Überständen der an den beschichteten Goldoberflächen durchgeführten Cyclovoltammetrie angewendet.

#### 4.2.2.1 ELISA auf modifizierten Goldoberflächen

Mit Hilfe des antikörperbasierten Nachweisverfahrens *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) wurde das immobilisierte, immunologisch aktive L1CAM direkt auf der Goldoberfläche nachgewiesen. Wie in Abschnitt 3.2.4.2 beschrieben (vgl. S. 66) binden spezifische Antikörper an das immunologisch aktive L1CAM und lösen einen enzymatisch erzeugten Farbumschlag im Überstand aus, der anschließend mittels eines Photometers vermessen werden kann.

Bei der Bestimmung des immobilisierten immunologisch aktiven L1CAMs wurden als Kontrollen sowohl unbeschichtete als auch mit Cysteamin-beschichtete Goldsubstrate vermessen. Dabei sollte durch die Evaluierung von den Cysteamin beschichteten Goldsubstraten ausgeschlossen werden, dass die erhöhte Extinktion durch das Verbindermolekül zwischen Goldoberfläche und L1CAM hervorgerufen wird. Es wurden zwei L1CAM-Einlagerungskonzentrationen ( $100 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,  $2000 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) verwendet, wobei zum Vergleich bei einigen Proben zur Vorbeugung einer unspezifischen Anbindung des Antikörpers ein Blockierungsschritt vor Zugabe des Detektionsreagenz B durchgeführt wurde. Der Blockierungsschritt erfolgte analog zu der beim kommerziellen ELISA durchgeführten Blockierung der Mikrotiterplatte nach der Auftragung des primären Antikörpers. Hierfür wurden  $300 \text{ } \mu\text{L}$  einer 2%igen BSA-Waschlösung für eine Stunde auf die Probe gegeben. Die geringen L1CAM-Einlagerungskonzentrationen waren nötig, um im Messbereich des ELISAs zu liegen. Die in Abbildung 4.93 dargestellten Extinktionen zeigen einen deutlichen Unterschied zwischen den unbeschichteten Goldsubstraten als Kontrolle, den Cysteamin-beschichteten Goldsubstraten als Blindwert und den mit L1CAM beschichteten Goldsubstraten.

#### 4 Ergebnisse und Diskussion

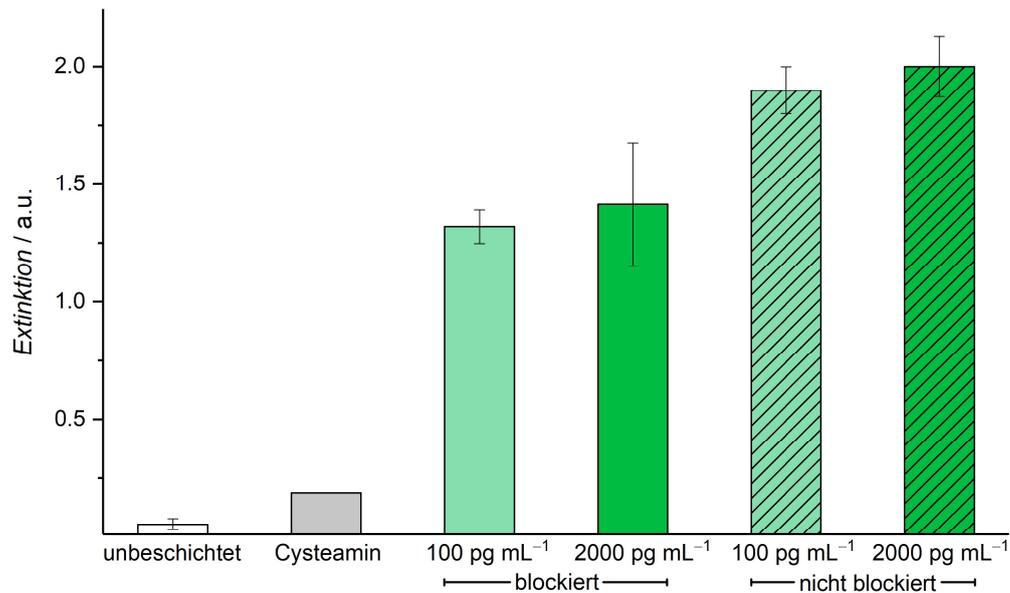


Abbildung 4.93: Extinktionen der Überstände aus dem ELISA von Proben, die mit unterschiedlichen L1CAM-Einlagerungskonzentrationen hergestellt wurden.

Daher konnte unter Abzug der Blindwerte der Cysteamin-beschichteten Goldsubstrate und mithilfe einer Kalibrierung anhand der gemessenen Extinktion die L1CAM-Konzentration auf der Goldoberfläche bestimmt werden. Wie in Abbildung 4.94 zu sehen, wurde durch den zusätzlich durchgeführten Blockierungsschritt eine um 35% verringerte Konzentration bestimmt.

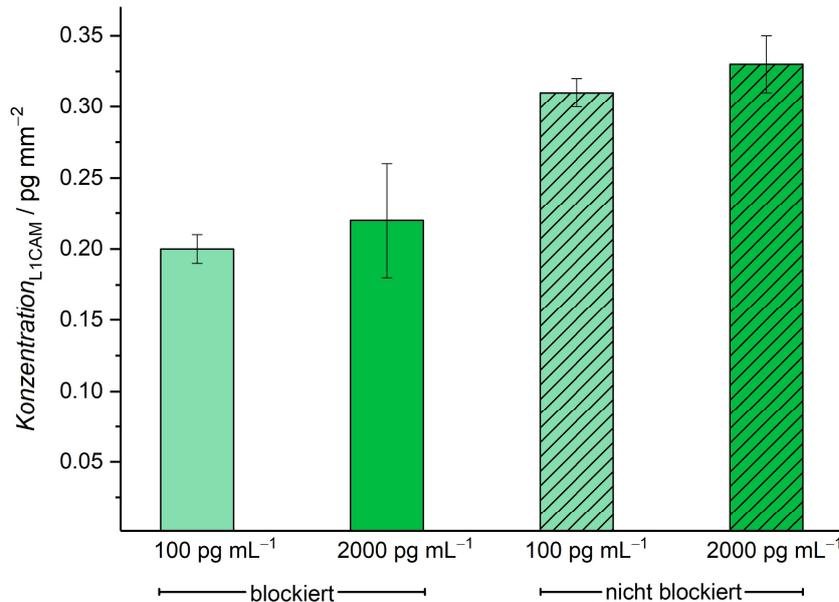


Abbildung 4.94: Darstellung der aus den Extinktionen des ELISAs berechneten L1CAM-Konzentrationen auf Goldoberflächen von geblockten sowie nicht geblockten Proben, die mit L1CAM-Einlagerungskonzentrationen von 100 pg·mL<sup>-1</sup> bzw. 2000 pg·mL<sup>-1</sup> hergestellt wurden.

Unter Verwendung einer Einlagerungskonzentration von 100 pg·mL<sup>-1</sup> weisen die blockierten Proben eine Verringerung der berechneten L1CAM-Konzentration von 0.31 pg·mL<sup>-1</sup> auf 0.2 pg·mL<sup>-1</sup> auf. Wurden die Proben in einer Einlagerungslösung mit einer Konzentration von 2000 pg·mL<sup>-1</sup> mit L1CAM immobilisiert, sank die berechnete L1CAM-Konzentration durch den Blockierungsschritt von 0.33 pg·mm<sup>-2</sup> auf 0.22 pg·mm<sup>-2</sup>. Während die nachgewiesenen L1CAM-Konzentrationen auf den blockierten Proben aufgrund von Ablösungen oder Austauschreaktionen des L1CAMs unterschätzt werden können, führen unspezifische Anbindungen des Antikörpers auf der nicht blockierten Goldoberfläche zu vermeintlich erhöhten L1CAM-Konzentrationen.

Die unterschiedlichen L1CAM-Einlagerungskonzentrationen zeigen unter Berücksichtigung der Fehlerintervalle keinen Einfluss auf die L1CAM-Menge. Im Vergleich zur L1CAM-Einlagerungskonzentration wurden nur geringe L1CAM-Mengen auf der Goldoberfläche nachgewiesen. Jedoch sollte berücksichtigt werden, dass durch den ELISA ausschließlich immunologisch aktives L1CAM bestimmt wurde und sich die Einlagerungskonzentration auf die L1CAM-Gesamtmenge bezieht. Wieviel L1CAM von dieser Gesamtmenge immunologisch aktiv ist bzw. ob jedes immobilisierte Protein seine immunologische Wirkung entfalten kann, muss zukünftig geklärt werden. Durch die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen in Abschnitt 4.2.1 (vgl. S. 167), auf welchen eine erfolgreiche konzentrationsabhängige L1CAM-Immobilisierung nachgewiesen werden konnte, wird die Vermutung der

eingeschränkten immunologischen Aktivität unterstützt. Dennoch konnte bereits durch sehr geringe L1CAM-Einlagerungskonzentrationen immunologisch aktives L1CAM auf der Goldoberfläche erfolgreich immobilisiert werden.

##### 4.2.2.2 Cyclovoltammetrie mit anschließendem ELISA

Als ein weiteres L1CAM-Nachweisverfahren wurde ein indirekter ELISA durchgeführt. Hierfür wurde die Thiolgruppe des Cysteamin, welches als Verbindermolekül zwischen der Goldoberfläche und dem L1CAM diente, cyclovoltammetrisch durch Reduktion oder Oxidation von der Goldoberfläche entfernt. Die Oxidation der Thiolgruppe führte zu einer Disulfidbildung, durch die Reduktion der Thiolgruppe bildet sich eine negativ geladene Sulfidgruppe unter Abspaltung von Wasserstoff aus. Diese wird aufgrund des an der Goldoberfläche angelegten Elektronenüberschuss nicht mehr an dem Goldsubstrat angelagert.

Dadurch wurde das an das Cysteamin angelagerte L1CAM mit entfernt und konnte im Überstand nachgewiesen werden. In Abbildung 4.95 ist exemplarisch ein Cyclovoltammogramm der oxidativen Entfernung im Potentialbereich von 0 V bis 1.2 V aufgeführt.

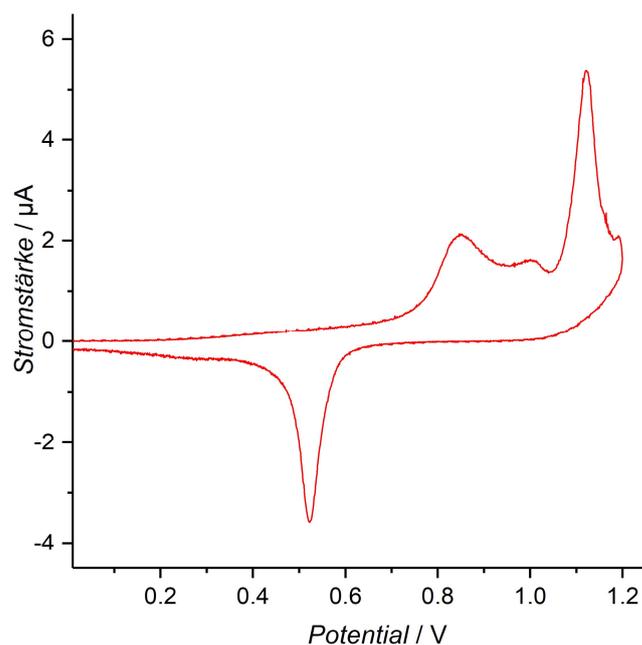


Abbildung 4.95: Exemplarisches Cyclovoltammogramm der oxidativen Entfernung des immobilisierten L1CAM von einer Cysteamin-beschichteten Goldoberfläche. Es wurde eine L1CAM-Einlagerungskonzentration von  $2000 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$  verwendet.

Im Vergleich zu den Cysteamin-beschichteten Goldsubstraten zeigen die mit L1CAM immobilisierten Proben in den aufgenommenen Cyclovoltammogrammen keine zusätzlichen Elektrodenprozesse, weshalb nicht von einer Veränderung des

Proteins durch die elektrochemischen Einflüsse ausgegangen wird.<sup>227</sup> Daher konnte anschließend durch Vermessen des Überstands im ELISA die in Abbildung 4.96 dargestellte immunologisch aktive L1CAM-Konzentration bestimmt werden.

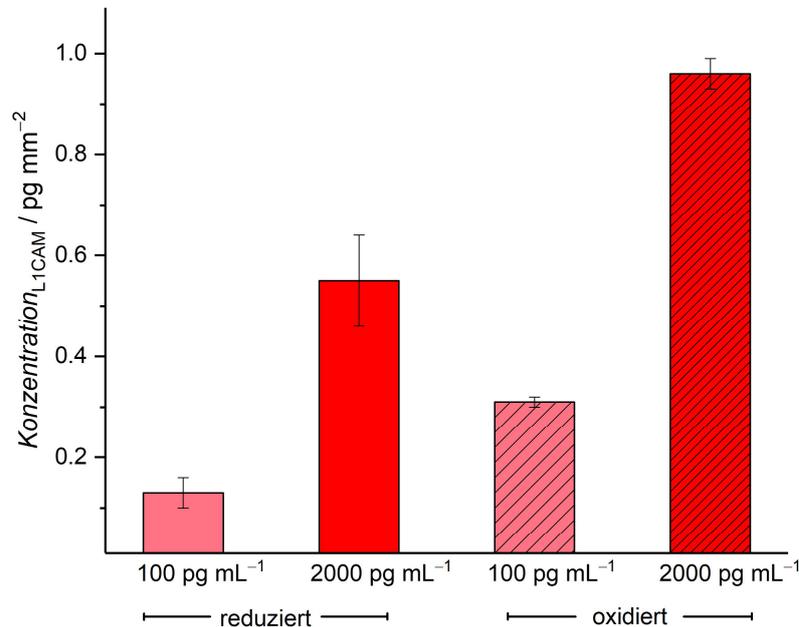


Abbildung 4.96: L1CAM-Konzentrationen der Überstände aus der cyclovoltammetrischen Ablösung des L1CAMs von der Goldoberfläche durch reduktive bzw. oxidative Prozesse. Zur L1CAM-Immobilisierung wurden Lösungen mit Konzentrationen von 100 pg·mL<sup>-1</sup> und 2000 pg·mL<sup>-1</sup> verwendet.

Der Vergleich zwischen reduktiv und oxidativ entferntem L1CAM zeigt einen deutlichen Unterschied in den nachgewiesenen L1CAM-Konzentrationen. Unter Verwendung einer L1CAM-Einlagerungskonzentration von 100 pg·mL<sup>-1</sup> wurden bei der reduktiven Entfernung 42%, bei 2000 pg·mL<sup>-1</sup> sogar 57% weniger L1CAM als bei der oxidativen Entfernung bestimmt. Entsprechend wurden durch die reduktive Entfernung vermutlich keine vollständige Ablösung der Cysteamin-Beschichtung erreicht. Zur näheren Untersuchung dieser These wurden zwei reduktive Entfernungszyklen von Cysteamin-beschichteten Goldsubstraten hintereinander durchgeführt. Zwischen den beiden Zyklen wurde die Elektrolysezelle gereinigt und der Elektrolyt ausgetauscht. Der Vergleich beider Zyklen in Abbildung 4.97 zeigt deutliche Unterschiede in den Maxima der Stromspitzen.

#### 4 Ergebnisse und Diskussion

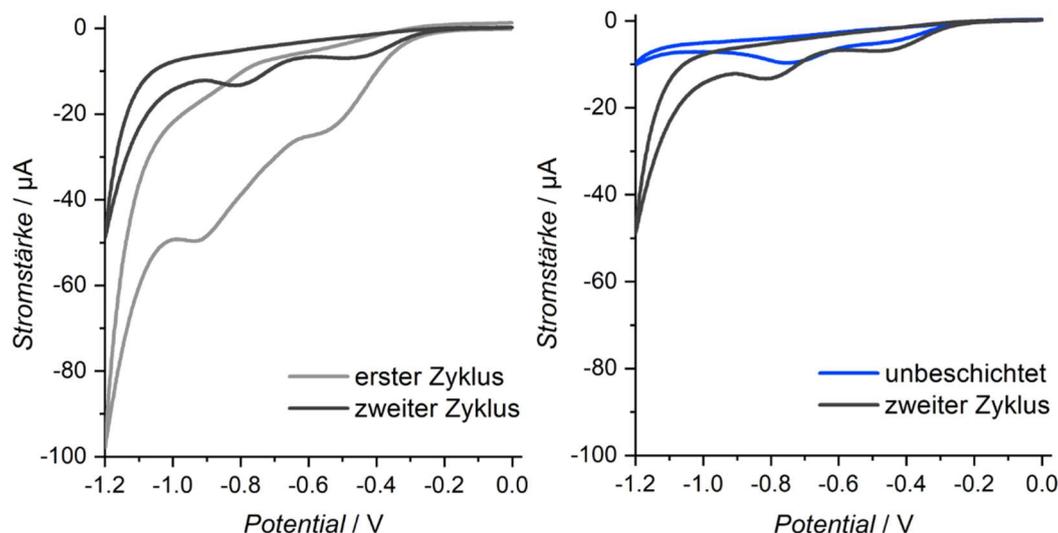


Abbildung 4.97: Vergleich zwischen zwei hintereinander durchgeführten Cyclovoltammetrie-Messungen der reduktiven Cysteamin-Entfernung von Goldoberflächen (links) und Vergleich eines unbeschichteten Goldsubstrats mit dem zweiten Zyklus der Cysteamin-Reduktion (rechts).

Die geringeren Oberflächenreaktionen der Cysteamin-Beschichtung im zweiten Zyklus sprechen für eine erfolgreiche Reduktion der Thiol-Gruppe während des ersten Zyklus. Trotzdem zeigt der Cyclovoltammogrammvergleich in Abbildung 4.97 einer unbeschichteten Goldoberfläche mit dem zweiten Zyklus leichte Unterschiede in den Oberflächenreaktionen, weshalb von einer nicht vollständigen Reduktion der Thiol-Gruppe ausgegangen werden muss. Da auch die Fehlerintervalle bei der oxidativen Entfernung deutlich kleiner sind, spricht dies für eine genauere Bestimmungsmethode.

Der Vergleich der durchgeführten Analysemethoden unter Verwendung des ELISAs in Abbildung 4.98 zeigt, dass im Gegensatz zu dem direkt auf der Goldoberfläche durchgeführten ELISA (vgl. Abschnitt 4.2.2.1, S. 171) durch elektrochemische Ablösung sowohl größere L1CAM-Mengen nachgewiesen werden konnten, als auch, dass Abhängigkeiten in der nachgewiesenen L1CAM-Konzentration von der Einlagerungskonzentration beobachtet werden können.

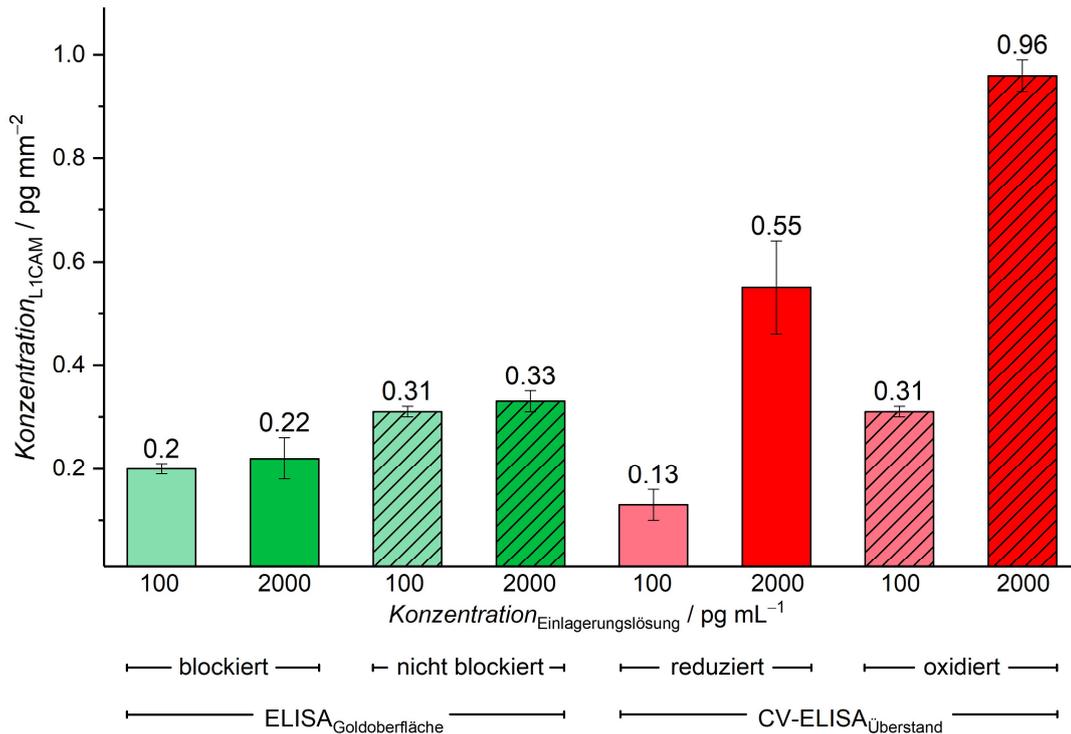


Abbildung 4.98: Vergleich der L1CAM-Konzentrationen an der Oberfläche, die durch den direkt auf der Goldoberfläche durchgeführten ELISA ermittelt wurden, mit den Werten, die der ELISA der Überstände aus der elektrochemischen Ablösung lieferte.

Durch Erhöhung der L1CAM-Einlagerungskonzentration von  $100 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$  auf  $2000 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$  kann bei der oxidativen Entfernung die 3-fache L1CAM-Menge detektiert werden. Trotzdem können, wie auch bei dem direkt auf der Probenoberfläche durchgeführten ELISA in Abschnitt 4.2.2.1, nicht annähernd die in der Einlagerungslösung eingesetzten L1CAM-Konzentrationen erreicht werden. Durch die 20-fache Konzentrationserhöhung kann lediglich eine 3-fache L1CAM-Konzentration nachgewiesen werden. Wie bereits in Abschnitt 4.2.2.1 erläutert ist ein direkter Vergleich zwischen Einlagerungskonzentration und detektierter L1CAM-Menge nicht sinnvoll, da bei dem ELISA ausschließlich die immunologisch aktive L1CAM-Konzentration bestimmt wird. Die Einlagerungskonzentration hingegen bezieht sich auf die L1CAM-Gesamtmenge, also auch auf nicht immunologisch aktives L1CAM. Welcher Anteil der L1CAM-Gesamtmenge immunologisch aktiv ist und ob die immunologische Aktivität des L1CAM durch die Immobilisierung teilweise blockiert oder sogar zerstört wird, sollte zukünftig untersucht werden. Im Hinblick auf die in Abschnitt 4.2.1 (vgl. S. 167) gezeigten fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen des immobilisierten fluoreszenzmarkierten L1CAM, durch die eine erfolgreiche konzentrationsabhängige L1CAM-Immobilisierung nachgewiesen werden konnte, wird die Vermutung einer verminderten immunologischen L1CAM-Aktivität gefestigt. Trotz alledem konnte bereits mit geringen

L1CAM-Einlagerungskonzentrationen immunologisch aktives L1CAM erfolgreich auf Goldoberflächen immobilisiert und mittels ELISA nach elektrochemischer Oxidation bzw. Reduktion der Thiolgruppe des Verbindungsmoleküls nachgewiesen werden. Bei oxidativer Entfernung konnte außerdem die 3-fache immobilisierte immunologisch aktive L1CAM-Menge bei 20-facher Erhöhung der Einlagerungskonzentration nachgewiesen werden.

#### Kontaktwinkelmessungen

Zur weiteren Charakterisierung der elektrochemischen Entfernung des Verbindermoleküls Cysteamin wurden Kontaktwinkelmessungen von der unbeschichteten Goldoberfläche und von einem parallel zur Thiol-Modifizierung in Ethanol gelagerten Goldsubstrat als Blindproben durchgeführt. Außerdem wurden Messungen an einer Cysteamin-modifizierten Goldoberfläche, sowohl vor als auch nach der oxidativen Cyclovoltammetrie, ausgewertet. Anhand der gemessenen Kontaktwinkel, dargestellt in Abbildung 4.99, sind deutliche Unterschiede zwischen den Blindproben und den mit Cysteamin-beschichteten Goldsubstraten erkennbar.

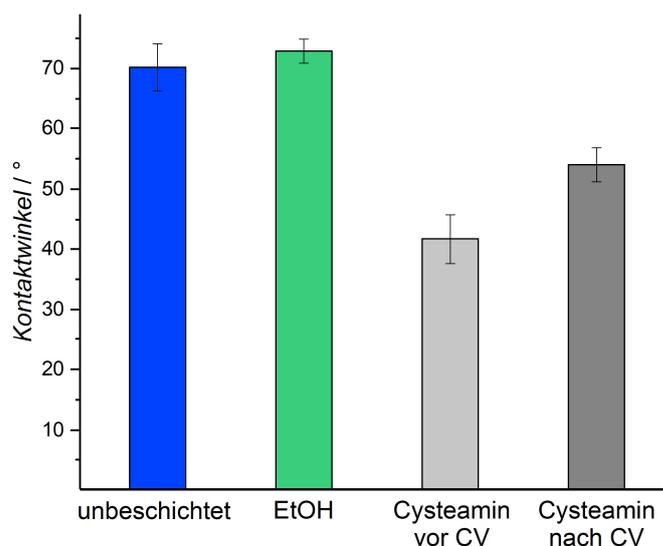


Abbildung 4.99: Kontaktwinkelmessungen einer unbeschichteten Goldoberfläche, eines in Ethanol gelagerten Goldsubstrats und eines Cysteamin-beschichteten Goldsubstrats vor und nach oxidativer Cyclovoltammetrie.

Die unbeschichtete Goldoberfläche weist einen Kontaktwinkel von 70°, das in Ethanol gelagerte Goldsubstrat einen Kontaktwinkel von 73°, auf. Unter Berücksichtigung der Messfehler sowie der Standardabweichungen sind bei den beiden Blindproben demnach keine Unterschiede in der Benetzbarkeit erkennbar. Durch die Modifizierung mit Cysteamin verringert sich der Kontaktwinkel auf 42°, die Hydrophilie ist durch die Aminogruppen erhöht. Nach einem Zyklus der Cyclovoltammetrie erhöht sich der Kontaktwinkel wiederum auf 54°, was auf eine

Ablösung des Cysteamins und folglich eine Konzentrationsabnahme der Aminogruppen auf der Goldoberfläche spricht. Da jedoch bei weitem nicht der Kontaktwinkel einer unbeschichteten Goldoberfläche mit  $70^\circ$  erreicht wurde, spricht auch diese Messung für eine nicht vollständige elektrochemische Cysteamin-Entfernung von der Goldoberfläche.

Die fotografischen Aufnahmen der Kontaktwinkelmessungen sind im Anhang in Abbildung 7.10 (vgl. S. 217) aufgeführt.

### Kolorimetrische Analyse von Aminogruppen

Zur weiteren Untersuchung, ob die Oxidation bzw. Reduktion von Cysteamin auf Goldoberflächen durch Cyclovoltammetrie nur eingeschränkt stattfindet, wurden abschließend kolorimetrische Analysen der Aminogruppen des Cysteamins durchgeführt. Die Methode nach Cook et al.<sup>229</sup> ermöglicht durch die in Abschnitt 3.2.4.2 beschriebene Reaktion eine quantitative Bestimmung von primären Aminogruppen (vgl. S 69). Als Blindproben wurden auch hier unbeschichtete Goldsubstrate sowie unter Modifizierungsbedingungen in Ethanol gelagerte Proben verwendet. Im Gegensatz zu den in Abbildung 4.100 dargestellten Ergebnissen der Cysteamin-beschichteten Goldsubstrate, konnten auf den Blindproben keine Aminogruppen nachgewiesen werden.

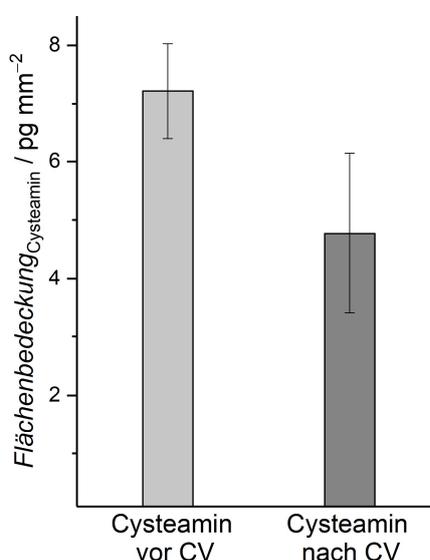


Abbildung 4.100: Durch kolorimetrische Analyse der Aminogruppen bestimmte Flächenbedeckung von Cysteamin auf Goldoberflächen vor und nach einem Zyklus der oxidativen Cyclovoltammetrie.

Die kolorimetrische Analyse einer mit Cysteamin-beschichteten Goldoberfläche vor der Cyclovoltammetrie zeigt eine Flächenbedeckung von  $7.2 \pm 0.8 \text{ pg}\cdot\text{mm}^{-2}$ . Durch Oxidation der Thiole während eines Zyklus der Cyclovoltammetrie wurde die nachgewiesene Flächenbedeckung des Cysteamins um 33% auf  $4.8 \pm 1.4 \text{ pg}\cdot\text{mm}^{-2}$

verringert. Dieses Ergebnis unterstützt die Erkenntnisse aus den Kontaktwinkelmessungen (vgl. S 178), bei welchen bereits eine nicht vollständige Cysteamin-Entfernung durch Durchführen der Cyclovoltammetrie vermutet wurde.

Basierend auf den Kontaktwinkelmessungen und der kolorimetrischen Analyse der Aminogruppen muss abschließend davon ausgegangen werden, dass der in diesem Abschnitt erläuterte ELISA nicht die tatsächlichen L1CAM-Konzentrationen, sondern zu geringe Proteinmengen nachweist. Für eine genauere Bestimmung der immobilisierten L1CAM-Menge müssten weitere Versuchsreihen zur Bestimmung des Oxidationsverhalten des Cysteamins durchgeführt werden.

#### *Kurzzusammenfassung: Bestimmung der immunologisch aktiven L1CAM-Menge auf Goldoberflächen*

Immunologisch aktives L1CAM konnte qualitativ unter Verwendung eines antikörperbasierten Nachweisverfahren (ELISA) nachgewiesen werden. Dies war sowohl direkt auf der Goldoberfläche möglich als auch indirekt durch cyclovoltammetrische Ablösung des L1CAMs und anschließende Analyse der Überstände.

Durch den direkten ELISA konnte die L1CAM-Konzentration auf der Goldoberfläche mit  $0.2 \text{ pg}\cdot\text{mm}^{-2}$  bestimmt werden. Die immobilisierte immunologisch aktive L1CAM-Menge ließ sich durch Erhöhung der L1CAM-Einlagerungskonzentration von  $100 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$  auf  $2000 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$  nicht verändern. Außerdem wurde festgestellt, dass die Durchführung eines Blockierungsschritts zu einer geringeren nachweisbaren immunologisch aktiven L1CAM-Menge führte (vgl. 173). Die unspezifische Anbindung des Antikörpers auf nicht blockierten Goldoberflächen könnte die Messung verfälschen und die tatsächliche L1CAM-Konzentration zu hoch bewerten. Durch Austauschreaktionen oder Ablösungen während des Blockierungsschritts könnten L1CAM-Moleküle durch Reaktion mit dem Blockierungsganz ersetzt worden sein, wodurch eine zu geringe L1CAM-Konzentration bestimmt wurde. Dennoch konnte auch mit sehr geringen Einlagerungskonzentrationen immunologisch aktives L1CAM auf der Goldoberfläche immobilisiert werden.

Auch durch cyclovoltammetrische Ablösung des L1CAMs und die anschließende Analyse der Überstände konnte immunologisch aktives L1CAM nachgewiesen werden. Durch Variation der Einlagerungskonzentration wurden unterschiedliche L1CAM-Mengen zwischen  $0.13 \text{ pg}\cdot\text{mm}^{-2}$  bis  $0.95 \text{ pg}\cdot\text{mm}^{-2}$  auf der Goldoberfläche immobilisiert. Außerdem zeigte sich, dass L1CAM durch eine reduktive Entfernung nicht vollständig von der Goldoberfläche abgelöst werden konnte. Mittels oxidativer Entfernung hingegen konnte fast die doppelte L1CAM-Menge in den Überständen ermittelt werden (vgl. S. 175ff).

Zur Evaluierung der elektrochemischen L1CAM-Ablösung wurde mittels Kontaktwinkelmessungen und kolorimetrischen Analysen die Bedeckung der

Goldoberfläche mit dem Verbindermolekül Cysteamin untersucht. Die Kontaktwinkelmessungen zeigten, dass Cysteamin durch einen cyclovoltammetrischen Durchlauf teilweise, jedoch nicht vollständig, entfernt werden konnte. Auch der kolorimetrische Aminonachweis zeigte, dass nach der oxidativen Entfernung weiterhin Aminogruppen auf der Goldoberfläche vorhanden sind.

Dementsprechend wird davon ausgegangen, dass sowohl durch den direkten als auch den indirekten ELISA nicht die tatsächliche L1CAM-Konzentration, sondern eine zu geringe Proteinmenge nachgewiesen wurde.

## 5 Zusammenfassung und Ausblick

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden sowohl grundlegende Untersuchungen der Oberflächenbeschaffenheit und der elektrischen Eigenschaften von nanoporösen Platinbeschichtungen durchgeführt als auch tiefgehende Kenntnisse über die Integration von implantatassoziierten Wirkstofffreisetzungssystemen und Biokompatibilitäten gewonnen. Hierfür wurden Platinbeschichtungen mit Porendurchmessern von 10 nm (*small pore nanoporous platinum*, sp-NPpT) und 50 nm (*large pore nanoporous platinum*, lp-NPpT) mithilfe Templat-basierter Synthesen elektrochemisch abgeschieden und untersucht. Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden Ansätze zur biochemischen Modifizierung unter Verwendung von L1CAM als neuronales Zelladhäsionsmolekül zur Verbesserung der Elektroden-Nerven-Interaktionen untersucht. Das Aufbringen des L1CAM über ein Verbindermolekül sowie die Entwicklung direkter und indirekter Nachweisverfahren der immunologisch aktiven L1CAM-Menge dienen als Grundlage zur Herstellung und Quantifizierung immobilisierter Adhäsionsmoleküle auf Edelmetalloberflächen.

Die Herstellung der sp-NPpT-Beschichtungen erfolgte durch Lösen des Templats Pluronic® F127 in der Platin(IV)-Elektrolyselösung, anschließende simultane elektrochemische Abscheidung von Platin sowie dem Templat und abschließend Templatentfernung. Durch Weiterentwicklung des Designs der Elektrolysezelle konnten reproduzierbare homogene sp-NPpT-Beschichtungen mit Porendurchmessern von 10 nm erzeugt werden. Die sp-NPpT-Schichtdicke konnte durch Variation der Zyklenzahl während der elektrochemischen Abscheidung zwischen 300 – 500 nm eingestellt werden (vgl. S. 78ff). Physisorptionsmessungen zeigten die nicht lineare Erhöhung der spezifischen Oberfläche einer 300 nm dicken Platinbeschichtung von  $30 \text{ cm}^2 \cdot \text{cm}^{-2}$  auf  $190 \text{ cm}^2 \cdot \text{cm}^{-2}$  der 500 nm dicken Beschichtung (vgl. S. 81). Eine deutliche Verringerung der Impedanz im niederfrequenten Bereich durch die sp-NPpT-Beschichtungen kann in der Anwendung im Cochlea-Implantat zu einer erhöhten Selektivität der Nervenregung führen. Durch die Beschichtung des dichten Platins mit einer 300 nm dicken sp-NPpT wurde die Impedanz bei 0.1 Hz um zwei Größenordnungen verringert. Durch das Aufbringen einer 500 nm dicken sp-NPpT-Beschichtung wurde die Impedanz nochmals halbiert (vgl. S. 85). Cyclovoltam-

metrische Messungen zeigten eine starke Vergrößerung der integralen Ladungsdichte durch Beschichtungen mit sp-NPPt, was auf die erhöhte spezifische Oberfläche der sp-NPPt zurückgeführt werden konnte. So wiesen blanke Platinoberflächen eine integrale Ladungsdichte von  $1.4 \cdot 10^{-4}$  VA auf, eine 300 nm dicke sp-NPPt-Beschichtung führte bereits zu einer Vergrößerung auf  $27.3 \cdot 10^{-4}$  VA. Durch weitere Erhöhungen der Schichtdicken konnten integrale Ladungsdichten von bis zu  $41.1 \cdot 10^{-4}$  VA erreicht werden (vgl. S. 86). Durch die unterschiedlichen Aspekte aus Elektrotechnik, Elektrochemie, den Materialwissenschaften und der Physik müssen zukünftig gemeinsam genormte Verfahren zur Charakterisierung des elektrischen Verhaltens einer Elektrode entwickelt und vereinheitlichte Darstellungen der Daten etabliert werden.<sup>238</sup> Angesichts der Anwendung als biomedizinisches Implantatmaterial wurden die sp-NPPt-Beschichtungen in Zellkulturuntersuchungen hinsichtlich ihrer Cytokompatibilität analysiert. Grundlegende Experimente mit murinen NIH3T3-Fibroblasten zeigten eine gute Zellproliferation und -morphologie auf der sp-NPPt-Beschichtung (vgl. S. 88f). Anschließende spezifischere Zellkulturuntersuchungen mit den aus dem Innenohr stammenden, empfindlicheren Spiralganglienzellen wiesen aufgrund der guten Zellüberlebensrate und des ausgeprägten Neuritenwachstums eine gute Cytokompatibilität nach (vgl. S. 90f). Anhand abschließender Zellkulturversuche mit mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark konnte eine zunächst verminderte Zellanhaftung auf der porösen Oberfläche beobachtet werden. Die jedoch sehr gute Zellproliferation über die dreiwöchige Versuchsdauer führte zu einer vervierfachen Zellzahl (vgl. S. 92f). Folglich wiesen die Zellkulturuntersuchungen mit NIH3T3-Fibroblasten, Spiralganglienzellen und mesenchymalen Stammzellen eine vielversprechende Cytokompatibilität der sp-NPPt-Beschichtung für die Anwendung im Cochlea-Implantat nach.

Die Generierung eines einstellbaren Wirkstofffreisetzungssystem in der sp-NPPt-Beschichtung sollte durch die chemische Modifizierung mit unterschiedlich funktionalisierten Thiolen erfolgen. Die funktionellen Gruppen des Thiols könnten die Wechselwirkungen der Implantatoberfläche mit dem Wirkstoff verändern und somit die Freisetzungszeit beeinflussen. Durch Kontaktwinkelmessungen konnte die Modifizierung mit sowohl hydrophoben als auch hydrophilen Thiolen erfolgreich nachgewiesen werden. Auch röntgenphotoelektronenspektroskopische Messungen an den Oberflächen bestätigten die erfolgreiche chemische Modifizierung der sp-NPPt-Beschichtung.

Die Poren der sp-NPPt-Beschichtung sollten als Wirkstoffreservoir dienen, aus welchen kontrolliert bioaktive Agenzien freigesetzt werden können. Hierfür wurde Rolipram als geeigneter neuroprotektiver Wirkstoff ausgewählt. Dieser wurde in unmodifizierte wie auch modifizierte sp-NPPt-Beschichtungen eingelagert und

schließlich unter sterilen dynamischen Bedingungen freigesetzt. Aus der unmodifizierten sp-NPPT-Beschichtung fand die gesamte Rolipramfreisetzung bereits in den ersten 30 Tagen statt, aus der Thiol-modifizierten sp-NPPT-Beschichtung konnte noch nach 98 Tagen eine Freisetzung gemessen werden (vgl. S. 105). Zukünftig sollten daher Freisetzungsuntersuchungen über einen längeren Zeitraum als 98 Tage durchgeführt werden, um möglicherweise weitere Rolipramfreisetzungen aus den Thiol-modifizierten Beschichtungen in Langzeit-Freisetzungsexperimenten festzustellen.

Rolipram-Freisetzungen aus sp-NPPT-Beschichtungen unterschiedlicher Schichtdicken zeigten im Vergleich zu modifizierten sp-NPPT-Beschichtungen deutlichere Unterschiede. So wurden aus einer 300 nm dicken sp-NPPT-Beschichtung nach 32 Tagen  $10.0 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  Rolipram freigesetzt, bei einer Beschichtungsdicke von 500 nm wurde eine ungefähre Verdopplung auf  $22.0 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  festgestellt (vgl. S. 108). Entsprechend eignet sich zum Einstellen der freizusetzenden Rolipram-Mengen die Variation der Schichtdicken und nicht, wie zunächst vermutet, die Oberflächenmodifizierung mit unterschiedlich funktionalisierten Thiolen.

Zellkulturuntersuchungen mit den Freisetzungsüberständen zeigten für sp-NPPT und Kontrollproben keinen Einfluss auf die Überlebensrate der Spiralganglienneurone. Da möglicherweise systematische Fehler in der Durchführung der Zellkulturuntersuchungen zu diesen Ergebnissen führten, sollte der Rolipram-Einfluss auf das Zellüberleben erneut evaluiert und die Zellkulturversuche wiederholt werden (vgl. S. 107).

Die Stabilität der sp-NPPT-Beschichtung wurde durch eine 17-tägige Lagerung unter Freisetzungsbedingung untersucht. Anhand rasterelektronenmikroskopischer Aufnahmen konnten keine Oberflächenveränderung, wie Auflösungseffekte des Porensystems, festgestellt werden. Allerdings waren Ablagerungen, vermutlich Rückstände aus dem Freisetzungsmedium, auf der sp-NPPT-Oberfläche erkennbar (vgl. S. 112ff). Sowohl impedanzspektroskopische als auch cyclovoltammetrische Messungen zeigten durch die Freisetzung verschlechterte elektrochemische Eigenschaften. Auch eine anschließende Calcination konnte die ursprünglichen elektrochemischen Eigenschaften nicht wiederherstellen (vgl. S. 114ff). Außerdem wurden die Freisetzungsüberstände mittels Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma auf sämtliche Platinspezies überprüft. Es wurden unabhängig von chemischer Modifizierung oder Rolipram-Beladung bis zum 17. Freisetzungstag Platinkonzentrationen von bis zu  $39.7 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  nachgewiesen (vgl. S. 117f). Da geringe Platinkonzentrationen unter  $1000 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  in Zellkulturuntersuchungen mit NIH3T3-Fibroblasten und SH-SY5Y Krebszellen keine negative Auswirkung auf das Zellüberleben aufwiesen, wurden die freigesetzten Platinkonzentrationen als nicht kritisch eingestuft.<sup>91</sup> Eine Bestätigung der Cytokompatibilität kann zukünftig

beispielweise anhand von Zellkulturuntersuchungen mit den Freisetzungsüberständen durchgeführt werden.

Aufgrund der vielversprechenden Oberflächeneigenschaften der sp-NPPt-Beschichtung und in Vorbereitung für die Erprobung in Tierversuchen sollte diese auf den Elektrodenkontakten von realen Cochlea-Implantaten aufgebracht werden. Hinsichtlich der PTFE-Ummantelung der Elektrodenkontaktierung musste hierfür eine alternative Templatentfernung bei niedrigeren Temperaturen entwickelt werden. Pluronic® F127 konnte durch Extraktion erfolgreich aus der elektrochemisch abgeschiedenen Platinbeschichtung entfernt werden, was durch Zellkulturuntersuchungen mit Spiralganglienzellen nachgewiesen wurde (vgl. S. 124).

Solche sp-NPPt beschichteten Elektrodenkontakte wurden mit zwei unterschiedlichen Herstellungsrouten gefertigt. Zum einen wurde eine Platinfolie nach der Standardmethode mit sp-NPPt beschichtet, woraus anschließend der Elektrodenkontakt durch einen Implantathersteller gefertigt wurde. Zum anderen wurde der schon gefertigte Elektrodenkontakt mit der alternativ entwickelten Syntheseroute beschichtet. Durch beide Herstellungsrouten konnten die Elektrodenkontakte mit einer sp-NPPt-Beschichtung ausgestattet werden. Die aus der beschichteten Platinfolie gefertigten Elektrodenkontakte wiesen gegenüber dichtem Platin verbesserte elektrische Eigenschaften auf. Die Impedanz im niederfrequenten Bereich konnte um zwei Größenordnungen verringert werden (vgl. S. 134). Cyclovoltammetrische Messungen zeigten eine Vergrößerung der integralen Ladungsdichte (vgl. S. 136). Zellkulturuntersuchungen mit Spiralganglienzellen ergaben anhand der absoluten Zellzahlen eine gute Cytokompatibilität der sp-NPPt-Beschichtung im Vergleich zu den unbeschichteten Elektrodenkontakten (vgl. S. 138). Bei einigen Proben traten Ablösungen der sp-NPPt-Beschichtung auf, welche keinem der Prozessschritte (Ausstanzen, Biegen, Schweißen) zugeordnet werden konnten (vgl. S. 128ff). Die Beschichtung der bereits gefertigten Elektrodenkontakte ergab durch Minimierung der Abscheidungszyklen eine homogene gut haftende sp-NPPt-Oberfläche (vgl. S. 127f), weshalb diese Herstellungsrouten als besser geeignet eingestuft wurde. Daher sollten mit diesen sp-NPPt beschichteten Elektrodenkontakten weiterführende Charakterisierungen, wie Zellkulturuntersuchungen sowie Stabilitätsuntersuchungen unter Stimulationsbedingungen durchgeführt werden. Diese Elektrodenkontakte sollten anschließend für die Herstellung von Implantaten für Tierversuche eingesetzt werden.

Nanoporöse Platinbeschichtungen mit Porendurchmessern größer 50 nm (lp-NPPt) konnten durch Einsetzen von Polystyrolatex-Kugeln als Templat hergestellt werden. Der resultierende Porendurchmesser in der lp-NPPt korreliert mit dem eingesetzten Templatdurchmesser und war folglich leicht einstellbar. Durch die elektrochemische Platinabscheidung auf dem Templat-beschichteten Substrat

wurden Areale mit einem ungeordneten Porensystem erzeugt, welche durch dichtes Platin voneinander abgegrenzt waren und eine Schichtdicke unter 400 nm aufwiesen (vgl. S. 150f).

Auch durch die lp-NPPT-Beschichtung konnte die Impedanz im niederfrequenten Bereich gesenkt werden, was mit der vergrößerten spezifischen Oberfläche erklärt werden kann (vgl. S. 154). Im Vergleich zur sp-NPPT-Beschichtung wurde eine geringere Impedanzminimierung erzeugt, da die lp-NPPT-Beschichtung durch die größeren Porendurchmesser eine geringere spezifische Oberfläche aufweist.

Durch Zellkulturuntersuchungen mit Spiralganglienzellen konnte anhand der hohen Zellüberlebensrate und des erfolgreichen Neuritenwachstums eine gute Cytoompatibilität nachgewiesen werden (vgl. S. 157).

Die Kombination des neuroprotektiven Wirkstoffs Rolipram mit dem Wachstumsfaktor BDNF bewirkt in Zellkulturuntersuchungen eine deutlich erhöhte Überlebensrate von Spiralganglienzellen<sup>11</sup>, weshalb die lp-NPPT-Beschichtungen zukünftig mit BDNF beladen werden sollten. Da in vorherigen Studien der Einfluss einer Oberflächenmodifizierung auf das BDNF-Freisetzungsverhalten gezeigt werden konnte<sup>64</sup>, sollte der Effekt einer Thiolmodifizierung der nanoporösen Platinoberfläche auf die BDNF-Freigabe untersucht werden.

Aufgrund der inerten Platinoberfläche, die sich nur bedingt chemisch modifizieren lässt, wurde ein Komposit-System aus modifizierbaren nanoporösen Silica-Nanopartikeln (NPSNP) und nanoporösem Platin entworfen. Hierbei sollten die NPSNP in die lp-NPPT-Beschichtung integriert werden, da mit dem gut modifizierbaren porösen Silica bereits erfolgreich einstellbare Langzeit-Wirkstofffreisetzungssysteme etabliert werden konnten.<sup>239,240,241,242</sup> Auch Zellkulturuntersuchungen von NPSNP mit den aus dem Innenrohr stammenden Spiralganglienzellen zeigten aufgrund eines erfolgreich etablierten Langzeit-Wirkstofffreisetzungssystems ein verbessertes Zellüberleben.<sup>64</sup> Infolgedessen sollten die als Templat verwendeten Polystyrolatex-Kugeln durch NPSNP ersetzt werden (vgl. S. 152). Für eine gute Ablagerung der Templat-Partikel auf der Substratoberfläche, einer anschließenden erfolgreichen Platinabscheidung in die Partikelzwischenräume und zur Verhinderung der Beschädigung der NPSNP sollten die NPSNP mit Polystyrolatex ummantelt werden. In Abbildung 5.1 ist die schematische Herstellung des Komposit-Materials gezeigt.

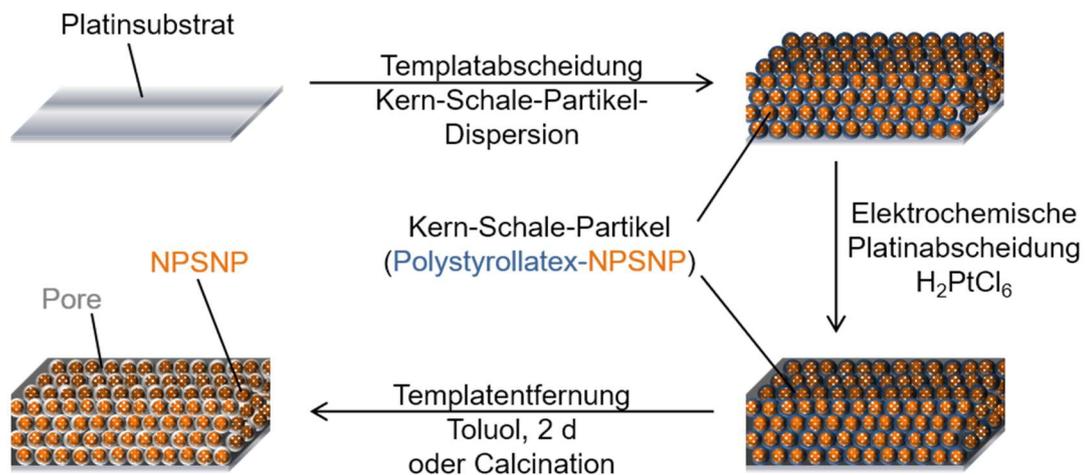


Abbildung 5.1: Schematische Darstellung der Präparation eines Komposit-Materials aus nanoporösen Silica-Nanopartikeln in nanoporösem Platin auf einem Platinsubstrat. Zunächst werden die Kern-Schale-Partikel auf dem Platinsubstrat aufgebracht, anschließend das Platin in die Templatzwischenräume abgeschieden. Nach Entfernung der Polystyrolatex-Beschichtung durch Extraktion mit Toluol oder Calcination entsteht das Komposit-Material.

Im Vergleich zu der in Abbildung 2.16 (vgl. S. 35) dargestellten Synthese der Ip-NPpPt-Beschichtung sollten anstelle der Polystyrolatex-Kugeln Kern-Schale-Partikel mit einem NPSNP-Kern und einem Polystyrolatex-Mantel eingesetzt werden. Die Umsetzung dieses Konzepts erfolgte im Rahmen der Doktorarbeit von Tim-Joshua Strauß<sup>236</sup> in denen bereits erste Beschichtungen erfolgreich hergestellt werden konnten (Abbildung 5.2).

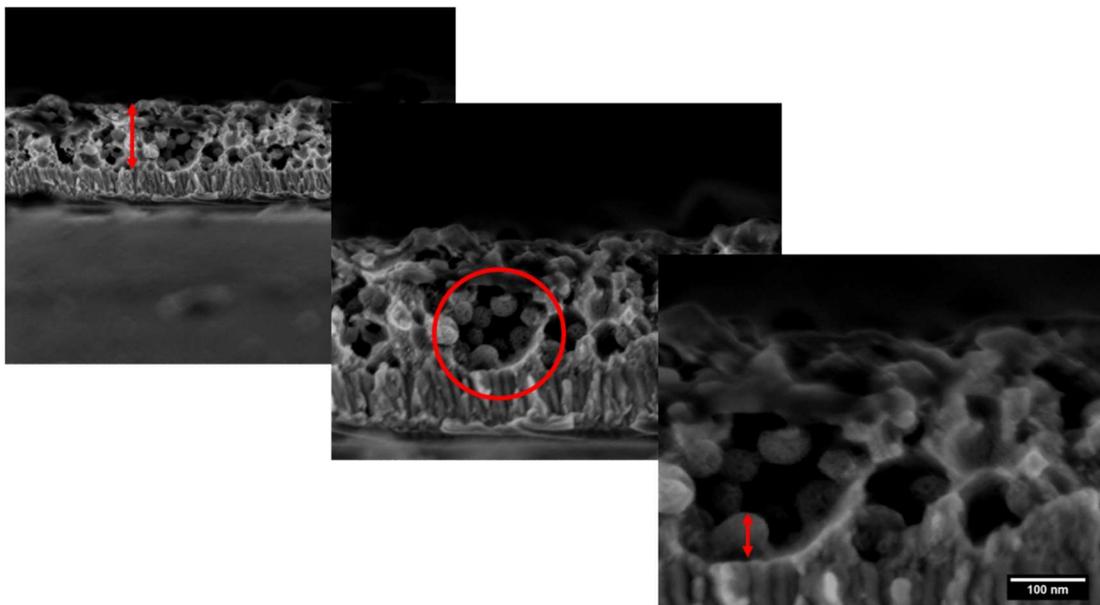


Abbildung 5.2: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme des Komposit-Materials aus nanoporösen Silica-Nanopartikeln in nanoporösem Platin.<sup>237</sup>

## 5 Zusammenfassung und Ausblick

Die Schichtdicke beträgt etwa 360 nm und die in den Poren der Platinbeschichtung erkennbaren NPSNP weisen einen Durchmesser von 75 nm auf. Angesichts dieses erfolgsversprechenden Materials wurde eine Erfindungsmeldung eingereicht und ein Patent angemeldet, was mittlerweile veröffentlicht ist.<sup>237</sup>

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die Anlagerung des Adhäsionsmoleküls L1CAM auf Goldoberflächen untersucht. Das Aufbringen von mit Cy3® fluoreszenzmarkiertem L1CAM zeigte ein konzentrationsabhängiges Immobilisierungsverhalten. Im Konzentrationsbereich der Einlagerungslösung von 0.05 – 10  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  stieg die Leuchtpunktzahl von  $0.1\cdot 10^5 \text{ mm}^{-2}$  auf  $1.2\cdot 10^5 \text{ mm}^{-2}$  an, wohingegen zwischen 10 – 50  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  keine Veränderung der Leuchtpunktzahl zu beobachten war. Eine weitere Konzentrationserhöhung auf 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  führte wiederum zu einer Verdopplung der Leuchtpunktzahl auf  $4\cdot 10^5 \text{ mm}^{-2}$  (vgl. S. 168). Die prozentuale Flächenbedeckung wies die gleiche Konzentrationsabhängigkeit auf (vgl. S. 170), da die Leuchtpunktgröße keine Konzentrationsabhängigkeit zeigte (vgl. S. 169).

Die immunologisch aktive L1CAM-Menge wurde durch Verwendung eines anti-körperbasierten Nachweisverfahren (ELISA) sowohl direkt auf der Goldoberfläche als auch indirekt nach Ablösen des L1CAMs bestimmt. Die direkte L1CAM-Bestimmung ergab eine von der Einlagerungskonzentration unabhängige Anlagerung von  $0.2 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Dies kann auf den Blockierungsschritt zurückgeführt werden, bei welchem möglicherweise Austauschreaktionen oder L1CAM-Ablösungen zu einer zu niedrig liegenden nachgewiesenen L1CAM-Konzentration führten (vgl. S. 173). Durch die oxidative L1CAM-Entfernung konnte im Vergleich zu den anderen Entfernungsmethoden mit bis zu  $0.9 \text{ pg}\cdot\text{mm}^{-2}$  die größte immunologisch aktive L1CAM-Menge nachgewiesen werden (vgl. S. 175). Da L1CAM offensichtlich durch keine Methode vollständig entfernt werden konnte, wurde die Veränderung des Kontaktwinkels und die Anwesenheit des Verbindermoleküls Cysteamin mit einem kolorimetrischen Aminonachweis untersucht. Durch beide Analysemethoden wurde die unvollständige L1CAM-Entfernung bestätigt (vgl. S. 178ff). Dementsprechend wird davon ausgegangen, dass sowohl durch den direkten als auch den indirekten ELISA zu geringe L1CAM-Konzentrationen nachgewiesen wurden.

Für eine genauere Analyse sollte zunächst der Anbindungsmechanismus des L1CAM genauer verstanden werden. Dies könnte durch die Untersuchung einer umfangreichen konzentrationsabhängigen Versuchsreihe umgesetzt werden. Außerdem müssen die elektrochemischen Ablösungsprozesse durch Variation der Geschwindigkeit der Potentialänderung sowie der Zyklenzahl optimiert werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein neuartiges und praktikables Konzept zur Etablierung eines implantatassoziierten Wirkstofffreisetzungssystem auf neuronalen Elektroden entwickelt. Basierend auf den durchgeführten Versuchen mit realen Cochlea-Elektrodenkontakten, kann das entwickelte System im nächsten Schritt bereits in Tierexperimenten in die Anwendung in Cochlea-Implantate überführt werden. Hiermit und mit darauf basierenden Weiterentwicklungen<sup>237</sup> sollten sich effiziente kontrollierbare Cochlea-implantatassoziierte Wirkstofffreisetzungssysteme realisieren lassen. Grundlegende Untersuchungen zur Immobilisierung mit L1CAM auf Goldsubstraten bilden die Basis zur Herstellung und Charakterisierung von biochemischen Modifizierungen auf Edelmetalloberflächen, welche in naher Zukunft an Relevanz gewinnen können.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Beethoven L van. *Heiligenstädter Testament*. Heiligenstadt; 1802.
2. Wilson BA, Dorman MF. Cochlear implants: a remarkable past and a brilliant future. *Hear Res*. 2013;242(0):3-21. doi:10.1016/j.heares.2008.06.005.Cochlear
3. Ray M, Dening T, Crosbie B. Dementia and hearing loss: A narrative review. *Maturitas*. 2019;128(June):64-69. doi:10.1016/j.maturitas.2019.08.001
4. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/deafness-and-hearing-loss>, Zugriff am 15.04.2021.
5. Roemer A, Köhl U, Majdani O, et al. Biohybrid cochlear implants in human neurosensory restoration. *Stem Cell Res Ther*. 2016:1-14. doi:10.1186/s13287-016-0408-y
6. Lenarz T. *Cochlea-Implantat*. Hannover: Springer Berlin Heidelberg; 1998.
7. Chung T, Wang JQ, Wang J, Cao B, Li Y, Pang SW. Electrode modifications to lower electrode impedance and improve neural signal recording sensitivity. *J Neural Eng*. 2015;12(5). doi:10.1088/1741-2560/12/5/056018
8. Shinohara T, Bredberg G, Ulfendahl M, et al. Neurotrophic factor intervention restores auditory function in deafened animals. *Proc Natl Acad Sci*. 2002;99(3):1657-1660. doi:10.1073/pnas.032677999
9. Lee K, Silva EA, Mooney DJ. Growth factor delivery-based tissue engineering: general approaches and a review of recent developments. *J R Soc Interface*. 2011;8(55):153-170. doi:10.1098/rsif.2010.0223
10. Li H, Edin F, Hayashi H, et al. Guided growth of auditory neurons: Bioactive particles towards gapless neural – electrode interface. *Biomaterials*. 2017;122:1-9. doi:10.1016/j.biomaterials.2016.12.020
11. Kranz K, Warnecke A, Lenarz T, Durisin M, Kranz VSK, Scheper V. Phosphodiesterase type 4 inhibitor rolipram improves survival of spiral ganglion neurons in vitro. *PLoS One*. 2014;9(3). doi:10.1371/journal.pone.0092157
12. El Kechai N, Agnely F, Mamelle E, Nguyen Y, Ferrary E, Bochot A. Recent advances in local drug delivery to the inner ear. *Int J Pharm*. 2015;494(1):83-101. doi:10.1016/j.ijpharm.2015.08.015
13. Wintermantel E, Bruinink A, Petitmermet M, Blum J, Ha S. *Medizintechnik: Life Science Engineering*. Springer.; 2009. doi:10.1007/978-3-540-93936-8
14. Kloke A, von Stetten F, Zengerle R, Kerzenmacher S. Strategies for the Fabrication of Porous Platinum Electrodes. *Adv Mater*. 2011;23(43):4976-5008. doi:10.1002/adma.201102182
15. Kolarcik CL, Bourbeau D, Azemi E, et al. In vivo effects of L1 coating on inflammation and neuronal health at the electrode-tissue interface in rat spinal cord and dorsal root ganglion. *Acta Biomater*. 2012;8(10):3561-3575. doi:10.1016/j.actbio.2012.06.034

16. Rutten WLC. Selective electrical interfaces with the nervous system. *Annu Rev Biomed Eng.* 2002;4:407-452. doi:10.1146/annurev.bioeng.4.020702.153427
17. Hodgkin AL, Huxley AF. Action potentials recorded from inside a nerve fibre. *Nature.* 1939;144:710-711. doi:10.1038/183055a0
18. Cogan SF. Neural stimulation and recording electrodes. *Annu Rev Biomed Eng.* 2008;10:275-309. doi:10.1146/annurev.bioeng.10.061807.160518
19. Liu A, Vöröslakos M, Kronberg G, et al. Immediate neurophysiological effects of transcranial electrical stimulation. *Nat Commun.* 2018;9:1-12. doi:10.1038/s41467-018-07233-7
20. Terzuolo, C. A., & Bullock TH. Measurement of imposed voltage gradient adequate to modulate neuronal firing. *Proc Natl Acad Sci US A.* 1956;42(9):687-694. doi:10.1073/pnas.42.9.687
21. Stieghorst J, Bondarenkova A, Burbliès N, Behrens P, Doll T. 3D silicone rubber interfaces for individually tailored implants. *Biomed Microdevices.* 2015;17(3):1-10. doi:10.1007/s10544-015-9960-y
22. Kringelbach ML, Jenkinson N, Owen SLF, Aziz TZ. Translational principles of deep brain stimulation. *Nat Rev Neurosci.* 2007;8(8):623-635. doi:10.1038/nrn2196
23. Khabarova EA, Denisova NP, Dmitriev AB, Slavin K V., Metman LV. Deep brain stimulation of the subthalamic nucleus in patients with parkinson disease with prior Pallidotomy or Thalamotomy. *Brain Sci.* 2018;8(4):1-8. doi:10.3390/brainsci8040066
24. Eusebio A, Thevathasan W, Doyle Gaynor L, et al. Deep brain stimulation can suppress pathological synchronisation in parkinsonian patients. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2011;82(5):569-573. doi:10.1136/jnnp.2010.217489
25. Perlmutter JS, Mink JW. Deep brain stimulation. *Annu Rev Neurosci.* 2006;29:229-257. doi:10.1146/annurev.neuro.29.051605.112824
26. Nemeroff CB, Mayberg HS, Krahl SE, et al. VNS therapy in treatment-resistant depression: Clinical evidence and putative neurobiological mechanisms. *Neuropsychopharmacology.* 2006;31(7):1345-1355. doi:10.1038/sj.npp.1301082
27. Dugan P, Devinsky O. Epilepsy: Guidelines on vagus nerve stimulation for epilepsy. *Nat Rev Neurol.* 2013;9(11):611-612. doi:10.1038/nrneurol.2013.211
28. Liu HY, Yang Z, Meng FG, et al. Preoperative Heart Rate Variability as Predictors of Vagus Nerve Stimulation Outcome in Patients with Drug-resistant Epilepsy. *Sci Rep.* 2018;8(1):1-11. doi:10.1038/s41598-018-21669-3
29. Schwartz MS, Otto SR, Shannon R V., Hitselberger WE, Brackmann DE. Auditory Brainstem Implants. *Am Soc Exp Neurother.* 2008;5:128-136. doi:10.1016/j.nurt.2007.10.068
30. Liu S, Zhao Y, Hao W, Zhang XD, Ming D. Micro- and nanotechnology for neural electrode-tissue interfaces. *Biosens Bioelectron.* 2020;170:112645. doi:10.1016/j.bios.2020.112645
31. Fattahi P, Yang G, Kim G, Abidian MR. A review of organic and inorganic biomaterials for neural interfaces. *Adv Mater.* 2014;26(12):1846-1885. doi:10.1002/adma.201304496
32. Stensaas SS, Stensaas LJ. Histopathological evaluation of materials implanted in the cerebral cortex. *Acta Neuropathol.* 1978;41(2):145-155. doi:10.1007/BF00689766
33. Ordonez J, Schuettler M, Boehler C, Boretius T, Stieglitz T. Thin films and

- microelectrode arrays for neuroprosthetics. *MRS Bull.* 2012;37(06):590-598. doi:10.1557/mrs.2012.117
34. Yang W, Gong Y, Li W. A Review: Electrode and Packaging Materials for Neurophysiology Recording Implants. *Front Bioeng Biotechnol.* 2021;8:1-31. doi:10.3389/fbioe.2020.622923
  35. Merrill DR. Materials considerations of implantable neuroengineering devices for clinical use. *Curr Opin Solid State Mater Sci.* 2014;18(6):329-336. doi:10.1016/j.cossms.2014.07.002
  36. Kotov NA, Winter JO, Clements IP, et al. Nanomaterials for Neural Interfaces. *Adv Mater.* 2009;21(40):3970-4004. doi:10.1002/adma.200801984
  37. [https://www.thieme.de/statics/dokumente/thieme/final/de/dokumente/tw\\_pflegepaedagogik/abb-62-17-aufbau-des-ohrs.jpg](https://www.thieme.de/statics/dokumente/thieme/final/de/dokumente/tw_pflegepaedagogik/abb-62-17-aufbau-des-ohrs.jpg), Zugriff am 15.04.2021.
  38. Robles L, Ruggero MA. Mechanics of the Mammalian Cochlea. *Physiol Rev.* 2001;81(3):130-1341305-1341352. doi:10.1152/physrev.2001.81.3.1305
  39. <https://healthlifemedia.com/healthy/the-anatomy-of-the-human-ear-the-inner-ear/anatomy-of-ear-in-the-inner-ear-thousands-of-microscopic-hair-cells-are-bent-by-the-wavelike-action-of-fluid-inside-the-cochlea/>, Zugriff am 15.04.2021.
  40. Shibata SB, Budenz CL, Bowling S a., Pfingst BE, Raphael Y. Nerve maintenance and regeneration in the damaged cochlea. *Hear Res.* 2011;281(1-2):56-64. doi:10.1016/j.heares.2011.04.019
  41. Lenarz T. Klinik für Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde. *MHH Forschungsbericht 2011.* 2011:392-406.
  42. Wilson BS. Cochlear implants: Current designs and future possibilities. *J Rehabil Res Dev.* 2009;45(5):695-730. doi:10.1682/jrrd.2007.10.0173
  43. Lenarz T, Boenninghaus H-G. *Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde.* 14. Auflag. Berlin; 2012. doi:10.1007/978-3-642-21131-7
  44. Cochlear Austria GmbH. *Ihr Weg in Eine Klangvolle Welt - Schritt Für Schritt Zum Cochlea-Implantat.*; 2017.
  45. Shepherd RK, Hardie NA. Deafness-induced changes in the auditory pathway: Implications for cochlear implants. *Audiol Neuro-Otology.* 2001;6(6):305-318. doi:10.1159/000046843
  46. Friesen LM, Shannon R V., Baskent D, Wang X. Speech recognition in noise as a function of the number of spectral channels: Comparison of acoustic hearing and cochlear implants. *J Acoust Soc Am.* 2002;110(2):1150-1163. doi:10.1121/1.1381538
  47. Fu QJ, Nogaki G. Noise susceptibility of cochlear implant users: The role of spectral resolution and smearing. *JARO - J Assoc Res Otolaryngol.* 2005;6(1):19-27. doi:10.1007/s10162-004-5024-3
  48. Mattotti M, Micholt L, Braeken D, Kovacic D. Characterization of spiral ganglion neurons cultured on silicon micro-pillar substrates for new auditory neuro-electronic interfaces. *J Neural Eng.* 2015;12:1-12. doi:10.1088/1741-2560/12/2/026001
  49. Liu W, Boström M, Kinnefors A, Linthicum F, Rask-Andersen H. Expression of myelin basic protein in the human auditory nerve-An immunohistochemical and comparative study. *Auris Nasus Larynx.* 2012;39(1):18-24. doi:10.1016/j.anl.2011.04.007
  50. Spoendlin H, Schrott A. Quantitative Evaluation of the Human Cochlear Nerve

- Quantitative Evaluation of the Human Cochlear Nerve. *Acta Otolaryngol.* 1989;108:61-70. doi:10.3109/00016488909138358
51. Rask-Andersen H, Liu W, Erixon E, Kinnefors A, Pfaller K, Schrott-Fischer A. Human Cochlea: Anatomical Characteristics and Their Relevance for Cochlear Implantation. *Anat Rec.* 2012;295:1791-1811. doi:10.1002/ar.22599
  52. Fuller CD, Iii JJG, Maat B, Ba D. Comparison of Two Music Training Approaches on Music and Speech Perception in Cochlear Implant Users. *Trends Hear.* 2018;22:1-22. doi:10.1177/2331216518765379
  53. Blauert J. *The Technology of Binaural Listening.* (Blauert J, ed.). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2013. doi:10.1007/978-3-642-37762-4
  54. Peter M, Paasche G, Szczepek A, et al. Influence of electrical stimulation on survival and growth of spiral ganglion neurons in vitro. *Forsch heute – Zukunft morgen.* 2018;97. doi:10.1055/s-0038-1641053
  55. Li M, Zhou Q, Duan YY. Nanostructured porous platinum electrodes for the development of low-cost fully implantable cortical electrical stimulator. *Sensors Actuators, B Chem.* 2015;221:179-186. doi:10.1016/j.snb.2015.06.053
  56. Cohen LT, Saunders E, Knight MR, Cowan RSC. Psychophysical measures in patients fitted with Contour™ and straight Nucleus electrode arrays. *Hear Res.* 2006;212(1-2):160-175. doi:10.1016/j.heares.2005.11.005
  57. Ranck JB. Which elements are excited in electrical stimulation of mammalian central nervous system: A review. *Brain.* 1975;98:417-440. doi:10.1016/0006-8993(75)90364-9
  58. Vieira M, Christensen BL, Wheeler BC, Feng AS, Kollmar R. Survival and stimulation of neurite outgrowth in a serum-free culture of spiral ganglion neurons from adult mice. *Hear Res.* 2007;230(1-2):17-23. doi:10.1016/j.heares.2007.03.005
  59. Abrashkin KA, Swiderski DL, Humayun N, Raphael Y, Rejali D, Lee VA. Cochlear implants and ex vivo BDNF gene therapy protect spiral ganglion neurons. *Hear Res.* 2007;228(1-2):180-187. doi:10.1016/j.heares.2007.02.010
  60. Pettingill LN, Richardson RT, Wise AK, O'Leary SJ, Shepherd RK. Neurotrophic factors and neural prostheses: Potential clinical applications based upon findings in the auditory system. *IEEE Trans Biomed Eng.* 2007;54(6):1138-1148. doi:10.1109/TBME.2007.895375
  61. Roehm PC, Hansen MR. Strategies to preserve or regenerate spiral ganglion neurons. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg.* 2005;13(5):294-300. doi:10.1097/01.moo.0000180919.68812.b9
  62. Grill WM, Norman SE, Bellamkonda R V. Implanted Neural Interfaces: Biochallenges and Engineered Solutions. *Annu Rev Biomed Eng.* 2009;11(1):1-24. doi:10.1146/annurev-bioeng-061008-124927
  63. Schwieger J, Warnecke A, Lenarz T, Esser KH, Scheper V, Forsythe J. Neuronal survival, morphology and outgrowth of spiral ganglion neurons using a defined growth factor combination. *PLoS One.* 2015;10(8):1-17. doi:10.1371/journal.pone.0133680
  64. Schmidt N, Schulze J, Warwas DP, et al. Long-term delivery of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) from nanoporous silica nanoparticles improves the survival of spiral ganglion neurons in vitro. *PLoS One.* 2018;13(3):1-23. doi:10.1371/journal.pone.0194778
  65. Green RA, Matteucci PB, Dodds CWD, et al. Laser patterning of platinum

- electrodes for safe neurostimulation. *J Neural Eng.* 2014;11(5). doi:10.1088/1741-2560/11/5/056017
66. Rose TL, Robblee LS. Electrical Stimulation with Pt Electrodes. VIII. Electrochemically Safe Charge Injection Limits with 0.2 MS Pulses. *IEEE Trans Biomed Eng.* 1990;37(11):1118-1120. doi:10.1109/10.61038
  67. Stöver T, Lenarz T. Biomaterials in cochlear implants. *GMS Curr Top Otorhinolaryngol Head Neck Surg.* 2009;8(Ci):1-22. doi:10.1055/s-0028-1119552
  68. Musa S, Rand DR, Bartic C, Eberle W, Nuttin B, Borghs G. Coulometric detection of irreversible electrochemical reactions occurring at Pt microelectrodes used for neural stimulation. *Anal Chem.* 2011;83(11):4012-4022. doi:10.1021/ac103037u
  69. Shannon R V. A Model of Safe Levels for Electrical Stimulation. *IEEE Trans Biomed Eng.* 1992;39(4):424-426. doi:10.1109/10.126616
  70. Schlie-Wolter S, Deiwick A, Fadeeva E, Paasche G, Lenarz T, Chichkov BN. Topography and coating of platinum improve the electrochemical properties and neuronal guidance. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2013;5(3):1070-1077. doi:10.1021/am3028487
  71. Gencoglu A, Minerick A. Chemical and morphological changes on platinum microelectrode surfaces in AC and DC fields with biological buffer solutions. *Lab Chip.* 2009;9(13):1866-1873. doi:10.1039/b820126a
  72. Barrese JC, Aceros J, Donoghue JP. Scanning electron microscopy of chronically implanted intracortical microelectrode arrays in non-human primates. *J Neural Eng.* 2016;13(2):26003-26029. doi:10.1088/1741-2560/13/2/026003
  73. Durisin M, Krause C, Arnoldner C, et al. Electron microscopy changes of cochlear implant electrodes with permanently high impedances. *Cochlear Implants Int.* 2011;12(4):228-233. doi:10.1179/1754762810y.0000000007
  74. Brummer SB, McHardy J, Turner MJ. Electrical Stimulation with Pt Electrodes: Trace Analysis for Dissolved Platinum and Other Dissolved Electrochemical Products. *Brain Behav Evol.* 1977;14:10-22. doi:10.1159/000124611
  75. McHardy J, Robblee LS, Martson JM, Brummer SB. Electrical stimulation with Pt electrodes. IV. Factors influencing Pt dissolution in inorganic saline. *Biomaterials.* 1980;1:50-56. doi:10.1016/0142-9612(80)90034-4
  76. Sawosz E, Chwalibog A, Szeliga J, et al. Visualization of gold and platinum nanoparticles interacting with *Salmonella Enteritidis* and *Listeria monocytogenes*. *Int J Nanomedicine.* 2010;5(1):631-637. doi:10.2147/IJN.S12361
  77. Artelt S, Creutzenberg O, Kock H, et al. Bioavailability of fine dispersed platinum as emitted from automotive catalytic converters: A model study. *Sci Total Environ.* 1999;228(2-3):219-242. doi:10.1016/S0048-9697(99)00049-2
  78. Hashimoto M, Yamaguchi S, Sasaki JI, et al. Inhibition of matrix metalloproteinases and toxicity of gold and platinum nanoparticles in L929 fibroblast cells. *Eur J Oral Sci.* 2016;124(1):68-74. doi:10.1111/eos.12235
  79. Hashimoto M, Kawai K, Kawakami H, Imazato S. Matrix metalloproteinase inhibition and biocompatibility of gold and platinum nanoparticles. *J Biomed Mater Res - Part A.* 2016;104(1):209-217. doi:10.1002/jbm.a.35557
  80. Horie M, Kato H, Endoh S, et al. Evaluation of cellular influences of platinum nanoparticles by stable medium dispersion. *Metallomics.* 2011;3(11):1244-1252. doi:10.1039/c1mt00060h

81. Asharani P V., Xinyi N, Hande MP, Valiyaveetil S. DNA damage and p53-mediated growth arrest in human cells treated with platinum nanoparticles. *Nanomedicine*. 2010;5(1):51-64. doi:10.2217/nnm.09.85
82. Gehrke H, Pelka J, Hartinger CG, et al. Platinum nanoparticles and their cellular uptake and DNA platination at non-cytotoxic concentrations. *Arch Toxicol*. 2011;85(7):799-812. doi:10.1007/s00204-010-0636-3
83. Crone M, Blank H, Marko D, et al. Cellular Uptake of Platinum Nanoparticles in Human Colon Carcinoma Cells and Their Impact on Cellular Redox Systems and DNA Integrity. *Chem Res Toxicol*. 2009;22(4):649-659. doi:10.1021/tx800354g
84. Dasari S, Bernard Tchounwou P. Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol*. 2014;740:364-378. doi:10.1016/j.ejphar.2014.07.025
85. Schacht J, Talaska AE, Rybak LP. Cisplatin and Aminoglycoside Antibiotics: Hearing Loss and Its Prevention. *Anat Rec*. 2012;295(11):1837-1850. doi:10.1002/ar.22578
86. Robblee LS, Agnew WF, Bullara LA. Electrical stimulation with Pt electrodes . VII . Dissolution of Pt electrodes during electrical stimulation of the cat cerebral cortex. *J Neurosci Methods*. 1983;9:301-308. doi:10.1016/0165-0270(83)90062-6
87. Spiers K, Cardamone T, Furness JB, Clark JCM, Patrick JF, Clark GM. An X-ray fluorescence microscopic analysis of the tissue surrounding the multi-channel cochlear implant electrode array. *Cochlear Implants Int*. 2016;17(3):129-131. doi:10.1080/14670100.2016.1157943
88. Clark GM, Clark J, Cardamone T, et al. Biomedical studies on temporal bones of the first multi-channel cochlear implant patient at the University of Melbourne. *Cochlear Implants Int*. 2014;15(S2):1-15. doi:10.1179/1754762814Y.0000000087
89. O'Malley JT, Burgess BJ, Galler D, Nadol JB. Foreign body response to silicone in cochlear implant electrodes in the human. *Otol Neurotol*. 2017;38(7):970-977. doi:10.1097/MAO.0000000000001454
90. Nadol JB, O'Malley JT, Burgess BJ, Galler D. Cellular immunologic responses to cochlear implantation in the human. *Hear Res*. 2014;318:11-17. doi:10.1016/j.heares.2014.09.007
91. Wissel K, Brandes G, Pütz N, et al. Effects of the in vitro corroded platinum electrode contacts in human cochlear implants on cell culture models. *PLoS One*. 2018;1-20. doi:10.1371/journal.pone.0196649 May
92. Hibbert DB, Weitzner K, Tabor B, Carter P. Mass changes and dissolution of platinum during electrical stimulation in artificial perilymph solution. *Biomaterials*. 2000;21(21):2177-2182. doi:10.1016/S0142-9612(00)00146-0
93. Robblee LS, McHardy J, Marston JM, Brummer SB. Electrical stimulation with Pt electrodes. V. The effect of protein on Pt dissolution. *Biomaterials*. 1980;1(3):135-139. doi:10.1016/0142-9612(80)90035-6
94. Shepherd RK, Murray MT, Houghton ME, Clark GM. Scanning electron microscopy of chronically stimulated platinum intracochlear electrodes. *Biomaterials*. 1985;6:237-242. doi:10.1016/0142-9612(85)90019-5
95. Brummer SB, Turner MJ. Electrochemical considerations for safe electrical stimulation of the nervous system with platinum electrodes. *IEEE Trans*

- Biomed Eng.* 1977;59-63. doi:10.1109/TBME.1977.326218
96. Huang CQ, Carter PM, Shepherd RK. Stimulus induced pH changes in cochlear implants: An in vitro and in vivo study. *Ann Biomed Eng.* 2001;29(9):791-802. doi:10.1114/1.1397793
  97. Merrill DR, Bikson M, Jefferys JGR. Electrical stimulation of excitable tissue: Design of efficacious and safe protocols. *J Neurosci Methods.* 2005;141(2):171-198. doi:10.1016/j.jneumeth.2004.10.020
  98. de Boer RW, van Oosterom A. Electrical properties of platinum electrodes: Impedance measurements and time-domain analysis. *Med Biol Eng Comput.* 1978;16(1):1-10. doi:10.1007/BF02442925
  99. Howlader MMR, Doyle TE, Mohtashami S, Kish JR. Charge transfer and stability of implantable electrodes on flexible substrate. *Sensors Actuators B Chem.* 2013;178:132-139. doi:10.1016/j.snb.2012.12.051
  100. Chen N, Tian L, Patil AC, et al. Neural interfaces engineered via micro- and nanostructured coatings. *Nano Today.* 2017;14:59-83. doi:10.1016/j.nantod.2017.04.007
  101. Boehler C, Stieglitz T, Asplund M. Nanostructured platinum grass enables superior impedance reduction for neural microelectrodes. *Biomaterials.* 2015;67:346-353. doi:10.1016/j.biomaterials.2015.07.036
  102. Márton G, Bakos I, Fekete Z, Ulbert I, Pongrácz A. Durability of high surface area platinum deposits on microelectrode arrays for acute neural recordings. *J Mater Sci Mater Med.* 2014;25(3):931-940. doi:10.1007/s10856-013-5114-z
  103. Xue N, Martinez ID, Sun J, Cheng Y, Liu C. Flexible multichannel vagus nerve electrode for stimulation and recording for heart failure treatment. *Biosens Bioelectron.* 2018;112:114-119. doi:10.1016/j.bios.2018.04.043
  104. Lee YJ, Kim HJ, Do SH, Kang JY, Lee SH. Characterization of nerve-cuff electrode interface for biocompatible and chronic stimulating application. *Sensors Actuators, B Chem.* 2016;237:924-934. doi:10.1016/j.snb.2016.06.169
  105. Zátonyi A, Fedor F, Borhegyi Z, Fekete Z. In vitro and in vivo stability of black-platinum coatings on flexible, polymer microECoG arrays. *J Neural Eng.* 2018;15(5). doi:10.1088/1741-2552/aac7f1
  106. Kelly A, Farid N, Krukiewicz K, et al. Laser-Induced Periodic Surface Structure Enhances Neuroelectrode Charge Transfer Capabilities and Modulates Astrocyte Function. *ACS Biomater Sci Eng.* 2020;6(3):1449-1461. doi:10.1021/acsbomaterials.9b01321
  107. Ben-Yoav H, Freeman A, Sternheim M, Shacham-Diamand Y. An electrochemical impedance model for integrated bacterial biofilms. *Electrochim Acta.* 2011;56(23):7780-7786. doi:10.1016/j.electacta.2010.12.025
  108. Paredes J, Becerro S, Arana S. Comparison of real time impedance monitoring of bacterial biofilm cultures in different experimental setups mimicking real field environments. *Sensors Actuators, B Chem.* 2014;195:667-676. doi:10.1016/j.snb.2014.01.098
  109. Paredes J, Becerro S, Arizti F, Aguinaga A, Del Pozo JL, Arana S. Interdigitated microelectrode biosensor for bacterial biofilm growth monitoring by impedance spectroscopy technique in 96-well microtiter plates. *Sensors Actuators, B Chem.* 2013;178:663-670. doi:10.1016/j.snb.2013.01.027
  110. Kim T, Kang J, Lee JH, Yoon J. Influence of attached bacteria and biofilm on double-layer capacitance during biofilm monitoring by electrochemical

- impedance spectroscopy. *Water Res.* 2011;45(15):4615-4622. doi:10.1016/j.watres.2011.06.010
111. Hao J, Li SK. Inner ear drug delivery: Recent advances, challenges, and perspective. *Eur J Pharm Sci.* 2019;126:82-92. doi:10.1016/j.ejps.2018.05.020
  112. Wise AK, Tan J, Wang Y, Caruso F, Shepherd RK. Improved auditory nerve survival with nanoengineered supraparticles for neurotrophin delivery into the deafened cochlea. *PLoS One.* 2016;11(10):1-17. doi:10.1371/journal.pone.0164867
  113. Scheper V, Paasche G, Miller JM, et al. Effects of delayed treatment with combined GDNF and continuous electrical stimulation on spiral ganglion cell survival in deafened guinea pigs. *J Neurosci Res.* 2009;87(6):1389-1399. doi:10.1002/jnr.21964
  114. Shepherd RK, Coco A, Epp SB, Crook JM. Chronic depolarization enhances the trophic effects of brain-derived neurotrophic factor in rescuing auditory neurons following a sensorineural hearing loss. *J Comp Neurol.* 2005;486(2):145-158. doi:10.1002/cne.20564
  115. Yamagata T, Miller JM, Ulfendahl M, et al. Delayed neurotrophic treatment preserves nerve survival and electrophysiological responsiveness in neomycin-deafened guinea pigs. *J Neurosci Res.* 2004;78(1):75-86. doi:10.1002/jnr.20239
  116. Stolle M, Schulze J, Römer A, Lenarz T. Human plasma - rich in growth factors - improves survival and neurite outgrowth of spiral ganglion neurons in vitro. *Tissue Eng.* 2017:1-28. doi:10.1089/ten.TEA.2017.0120
  117. Life Technologie. *Recombinant Human Neurotrophic Factor ( BDNF ) Brain-Derived.*; 2018.
  118. Hartnick CJ, Staecker H, Malgrange B, et al. Neurotrophic effects of BDNF and CNTF, alone and in combination, on postnatal day 5 rat acoustic ganglion neurons. *J Neurobiol.* 1996;30(2):246-254. doi:10.1002/(SICI)1097-4695(199606)30:2<246::AID-NEU6>3.0.CO;2-5
  119. Miller JM, Chi DH, O’Keeffe LJ, Kruszka P, Raphael Y, Altschuler RA. Neurotrophins can enhance spiral ganglion cell survival after inner hair cell loss. *Int J Dev Neurosci.* 1997;15(4-5):631-643. doi:10.1016/S0736-5748(96)00117-7
  120. Warnecke A, Wissel K, Hoffmann A, et al. The biological effects of cell-delivered brain-derived neurotrophic factor on cultured spiral ganglion cells. *Neuroreport.* 2007;18(16):1683-1686. doi:10.1097/WNR.0b013e3282f0b5d7
  121. Landry TG, Wise AK, Fallon JB, Shepherd RK. Spiral ganglion neuron survival and function in the deafened cochlea following chronic neurotrophic treatment. *Hear Res.* 2011;282(1-2):303-313. doi:10.1016/j.heares.2011.06.007
  122. Warnecke A, Scheper V, Buhr I, et al. Artemin improves survival of spiral ganglion neurons in vivo and in vitro. *Neuroreport.* 2010;21(7):517-521. doi:10.1097/WNR.0b013e328339045b
  123. Kaiser O, Paasche G, Stöver T, et al. TGF-beta superfamily member activin A acts with BDNF and erythropoietin to improve survival of spiral ganglion neurons in vitro. *Neuropharmacology.* 2013;75:416-425. doi:10.1016/j.neuropharm.2013.08.008
  124. Meyer H, Stöver T, Fouchet F, et al. Lipidic nanocapsule drug delivery: neuronal protection for cochlear implant optimization. *Int J Nanomedicine.*

- 2012;7:2449-2464. doi:10.2147/IJN.S29712
125. Siepmann J, Siepmann F. Modeling of diffusion controlled drug delivery. *J Control Release*. 2012;161(2):351-362. doi:10.1016/j.jconrel.2011.10.006
  126. Krenzlin S, Vincent C, Munzke L, Gnansia D, Siepmann J, Siepmann F. Predictability of drug release from cochlear implants. *J Control Release*. 2012;159(1):60-68. doi:10.1016/j.jconrel.2011.12.032
  127. Tan F, Walshe P, Viani L, Al-Rubeai M. Surface biotechnology for refining cochlear implants. *Trends Biotechnol.* 2013;31(12):678-687. doi:10.1016/j.tibtech.2013.09.001
  128. Chen A, Holt-Hindle P. Platinum-based nanostructured materials: Synthesis, properties, and applications. *Chem Rev.* 2010;110(6):3767-3804. doi:10.1021/cr9003902
  129. Biswas A, Bayer IS, Biris AS, Wang T, Dervishi E, Faupel F. Advances in top-down and bottom-up surface nanofabrication: Techniques, applications & future prospects. *Adv Colloid Interface Sci.* 2012;170(1-2):2-27. doi:10.1016/j.cis.2011.11.001
  130. McCusker LB, Liebau F, Engelhardt G. Nomenclature of structural and compositional characteristics of ordered microporous and mesoporous materials with inorganic hosts. *Pure Appl Chem.* 2001;73(2):381-394. doi:10.1016/S1387-1811(02)00545-0
  131. Thommes M, Kaneko K, Neimark A V., et al. Physisorption of gases, with special reference to the evaluation of surface area and pore size distribution (IUPAC Technical Report). *Pure Appl Chem.* 2015;87(9-10):1051-1069. doi:10.1515/pac-2014-1117
  132. Xu Y, Zhang B. Recent advances in porous Pt-based nanostructures: synthesis and electrochemical applications. *Chem Soc Rev.* 2014;43:2439-2450. doi:10.1039/c3cs60351b
  133. Yamauchi Y, Kuroda K. Rational design of mesoporous metals and related nanomaterials by a soft-template approach. *Chem - An Asian J.* 2008;3(4):664-676. doi:10.1002/asia.200700350
  134. Wang H, Jeong HY, Imura M, et al. Shape- and size-controlled synthesis in hard templates: sophisticated chemical reduction for mesoporous monocrystalline platinum nanoparticles. *J Am Chem Soc.* 2011;133(37):14526-14529. doi:10.1021/ja2058617
  135. Wang H, Imura M, Nemoto Y, Park S-E, Yamauchi Y. Synthesis of olive-shaped mesoporous platinum nanoparticles (MPNs) with a hard-templating method using mesoporous silica (SBA-15). *Chem Asian J.* 2012;7(4):802-808. doi:10.1002/asia.201100949
  136. Koo JH, Kumar A, Lee S, et al. Pore-Engineered Silica Nanoreactors for Chemical Interaction-Guided Confined Synthesis of Porous Platinum Nanodendrites. *Chem Mater.* 2018;30(9):3010-3018. doi:10.1021/acs.chemmater.8b00628
  137. Zhuang L, Wang W, Hong F, et al. Porous platinum mesoflowers with enhanced activity for methanol oxidation reaction. *J Solid State Chem.* 2012;191:239-245. doi:10.1016/j.jssc.2012.03.043
  138. Pulinthanathu Sree S, Dendooven J, Geerts L, et al. 3D porous nanostructured platinum prepared using atomic layer deposition. *J Mater Chem A.* 2017;5(36):19007-19016. doi:10.1039/C7TA03257A

139. Deng S, Kurttepelı M, Deheryan S, et al. Synthesis of a 3D network of Pt nanowires by atomic layer deposition on a carbonaceous template. *Nanoscale*. 2014;6(12):6939-6944. doi:10.1039/c4nr00982g
140. Attard GS, Corker JM, Göltner CG, Henke S, Templer RH. Liquid-Crystal Templates for Nanostructured Metals. *Angew Chemie Int Ed English*. 1997;36(12):1315-1317. doi:10.1002/anie.199713151
141. Ullah MH, Chung W-S, Kim I, Ha C-S. pH-selective synthesis of monodisperse nanoparticles and 3D dendritic nanoclusters of CTAB-stabilized platinum for electrocatalytic O<sub>2</sub> reduction. *Small*. 2006;2(7):870-873. doi:10.1002/smll.200600071
142. Lee C-L, Wu C-C, Chiou H-P, Syu C-M, Huang C-H, Yang C-C. Mesoporous platinum nanosponges as electrocatalysts for the oxygen reduction reaction in an acidic electrolyte. *Int J Hydrogen Energy*. 2011;36(11):6433-6440. doi:10.1016/j.ijhydene.2011.03.034
143. Kijima T, Yoshimura T, Uota M, et al. Noble-metal nanotubes (Pt, Pd, Ag) from lyotropic mixed-surfactant liquid-crystal templates. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2004;43(2):228-232. doi:10.1002/anie.200352630
144. Burpo FJ, Nagelli EA, Winter SJ, et al. Salt-Templated Hierarchically Porous Platinum Macrotube Synthesis. *ChemistrySelect*. 2018;3(16):4542-4546. doi:10.1002/slct.201800416
145. Wang S, Kuai L, Huang Y, et al. A highly efficient, clean-surface, porous platinum electrocatalyst and the inhibition effect of surfactants on catalytic activity. *Chemistry*. 2013;19(1):240-248. doi:10.1002/chem.201203398
146. Jaworek A, Sobczyk AT. Electro spraying route to nanotechnology: An overview. *J Electrostat*. 2008;66(3-4):197-219. doi:10.1016/j.elstat.2007.10.001
147. Schulz F, Franzka S, Schmid G. Nanostructured surfaces by deposition of metal nanoparticles by means of spray techniques. *Adv Funct Mater*. 2002;12(8):532-536. doi:10.1002/1616-3028(20020805)12:8<532::AID-ADFM532>3.0.CO;2-3
148. Park YK, Yoo SH, Park S. Three-dimensional Pt-coated Au nanoparticle arrays: Applications for electrocatalysis and surface-enhanced Raman scattering. *Langmuir*. 2008;24(8):4370-4375. doi:10.1021/la703169e
149. Kumar A, Ramanath G, D'Arcy-Gall J, et al. Templateless Room-Temperature Assembly of Nanowire Networks from Nanoparticles. *Langmuir*. 2004;20(13):5583-5587. doi:10.1021/la0497649
150. Klajn R, Gray TP, Wesson PJ, et al. Bulk synthesis and surface patterning of nanoporous metals and alloys from supraspherical nanoparticle aggregates. *Adv Funct Mater*. 2008;18(18):2763-2769. doi:10.1002/adfm.200800293
151. Ceysens F, Sree SP, Martens J, Puers R. Fabrication of nanostructured platinum with multilevel porosity for low impedance biomedical recording and stimulation electrodes. *Procedia Eng*. 2015;120:355-359. doi:10.1016/j.proeng.2015.08.635
152. Eickenscheidt M, Schäfer P, Baslan Y, Schwarz C, Stieglitz T. Highly porous platinum electrodes for dry ear-EEG measurements. *Sensors (Switzerland)*. 2020;20(11):1-12. doi:10.3390/s20113176
153. Cho SJ, Mei X, Ouyang J. Direct deposition of gold nanoplates and porous platinum on substrates through solvent-free chemical reduction of metal precursors with ethylene glycol vapor. *Phys Chem Chem Phys*. 2012;14(45):15793-15801. doi:10.1039/c2cp42164j

154. Koczkur BK, Yi Q, Chen A. Nanoporous Pt-Ru Networks and Their Electrocatalytical Properties. 2007:2648-2652. doi:10.1002/adma.200602730
155. Wang J, Thomas DF, Chen A. Nonenzymatic Electrochemical Glucose Sensor Based on Nanoporous PtPb Networks. *Anal Chem.* 2008;80(4):997-1004. doi:10.1021/ac701790z
156. Luo Y, Lee SK, Hofmeister H, Steinhart M, Gösele U. Pt Nanoshell Tubes by Template Wetting. *Nano Lett.* 2004;4(1):143-147. doi:10.1021/nl034897k
157. Mohl M, Kumar A, Leela A, et al. Synthesis of Catalytic Porous Metallic Nanorods by Galvanic Exchange Reaction. *J Phys Chem C.* 2010;114(1):389-393. doi:10.1021/jp9083508
158. Kloke A, Kohler C, Dryzga A, et al. Fabrication of Highly Porous Platinum by Cyclic Electrodeposition of PtCu Alloys: How do Process Parameters Affect Morphology? *J Electrochem Soc.* 2013;160(3):D111-D118. doi:10.1149/2.001304jes
159. Boretius T, Jurzinsky T, Koehler C, Kerzenmacher S, Hillebrecht H, Stieglitz T. High-porous platinum electrodes for functional electrical stimulation. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc.* 2011;2011:5404-5407. doi:10.1109/IEMBS.2011.6091336
160. Pugh D V, Dursun A, Corcoran SG. Formation of nanoporous platinum by selective dissolution of Cu from Cu<sub>0.75</sub>Pt<sub>0.25</sub>. *J Mater Res Soc.* 2003;18(1):216-221.
161. Tammeveski K, Tenno T, Niinisto J. Thermal preparation of thin platinum coatings and their electrochemical and atomic force microscopic characterization. *Appl Surf Sci.* 2000;156:135-142. doi:10.1016/S0169-4332(99)00489-4
162. Lintanf A, Neagu R, Djurado E. Nanocrystalline Pt thin films prepared by electrostatic spray deposition for automotive exhaust gas treatment. *Solid State Ionics.* 2007;177(39-40):3491-3499. doi:10.1016/j.ssi.2006.10.019
163. Nigro R Lo, Malandrino G, Fiorenza P, Fragalá IL. Template-free and seedless growth of pt nanocolumns: Imaging and probing their nanoelectrical properties. *ACS Nano.* 2007;1(3):183-190. doi:10.1021/nn700068u
164. Rao C, Trivedi D. Chemical and electrochemical depositions of platinum group metals and their applications. *Coord Chem Rev.* 2005;249(5-6):613-631. doi:10.1016/j.ccr.2004.08.015
165. Paunovic M, Schlesinger M. *Fundamentals of Electrochemical Deposition.* 2nd ed. New Jersey: John WILEY & Sons; 2005. doi:10.1002/0470009403
166. Kim H, Subramanian NP, Popov BN. Preparation of PEM fuel cell electrodes using pulse electrodeposition. *J Power Sources.* 2004;138(1-2):14-24. doi:10.1016/j.jpowsour.2004.06.012
167. Budevski E, Staikov G, Lorenz WJ. Growth of Crystalline Faces. *Electrochem Phase Form Growth.* 1996:201-261. doi:10.1002/9783527614936.ch5
168. Ponrouch A, Garbarino S, Bertin E, Andrei C, Botton G a., Guay D. Highly Porous and Preferentially Oriented {100} Platinum Nanowires and Thin Films. *Adv Funct Mater.* 2012;22(19):4172-4181. doi:10.1002/adfm.201200381
169. Rajalakshmi N, Dhathathreyan KS. Nanostructured platinum catalyst layer prepared by pulsed electrodeposition for use in PEM fuel cells. *Int J Hydrogen Energy.* 2008;33(20):5672-5677. doi:10.1016/j.ijhydene.2008.05.100
170. Boehler C, Vieira DM, Egert U, Asplund M. NanoPt - A Nanostructured

- Electrode Coating for Neural Recording and Microstimulation. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2020;12(13):14855-14865. doi:10.1021/acsami.9b22798
171. Weremfo A, Tung S, Fong C, Khan A, Hibbert DB, Zhao C. Electrochemically roughened nanoporous platinum electrodes for non-enzymatic glucose sensors. *Electrochim Acta*. 2017;231:20-26. doi:10.1016/j.electacta.2017.02.018
  172. Ivanovskaya AN, Belle AM, Yorita AM, et al. Electrochemical Roughening of Thin-Film Platinum for Neural Probe Arrays and Biosensing Applications. *J Electrochem Soc*. 2018;165(12):G3125-G3132. doi:10.1149/2.0171812jes
  173. Kim HS, Choi H, Flores MC, et al. Noble metal sensitized invasive porous bioelectrodes: Advanced medical device for enhanced neuronal activity and chronic alcohol treatment. *RSC Adv*. 2020;10(71):43514-43522. doi:10.1039/d0ra07922g
  174. Elyahoodayan S, Jiang W, Lee CD, et al. Stimulation and Recording of the Hippocampus Using the Same Pt-Ir Coated Microelectrodes. *Front Neurosci*. 2021;15:1-17. doi:10.3389/fnins.2021.616063
  175. Desai SA, Rolston JD, Guo L, Potter SM. Improving impedance of implantable microwire multi-electrode arrays by ultrasonic electroplating of durable platinum black. *Front Neuroeng*. 2010;3:5. doi:10.3389/fneng.2010.00005
  176. Stanca SE, Hänschke F, Zieger G, et al. Electro-architected porous platinum on metallic multijunction nanolayers to optimize their optical properties for infrared sensor application. *Nanotechnology*. 2018;29(11). doi:10.1088/1361-6528/aaa644
  177. Stanca SE, Hänschke F, Zieger G, et al. Optical Assets of In situ Electro-assembled Platinum Black Nanolayers. *Sci Rep*. 2017;7(1):14955. doi:10.1038/s41598-017-14630-3
  178. Lai M, Riley DJ. Templated electrosynthesis of nanomaterials and porous structures. *J Colloid Interface Sci*. 2008;323(2):203-212. doi:10.1016/j.jcis.2008.04.054
  179. Yuan J, Wang K, Xia X. Highly ordered platinum-nanotubule arrays for amperometric glucose sensing. *Adv Funct Mater*. 2005;15(5):803-809. doi:10.1002/adfm.200400321
  180. Cui CH, Li HH, Yu SH. A general approach to electrochemical deposition of high quality free-standing noble metal (Pd, Pt, Au, Ag) sub-micron tubes composed of nanoparticles in polar aprotic solvent. *Chem Commun*. 2010;46(6):940-942. doi:10.1039/b920705h
  181. Kränzlin N, Niederberger M. Controlled fabrication of porous metals from the nanometer to the macroscopic scale. *Mater Horiz*. 2015. doi:10.1039/C4MH00244J
  182. Stöber W, Fink A. Controlled Growth of Monodisperse Silica Spheres in the Micron Size Range 1. *J Colloid Interface Sci*. 1968;26:62-69. doi:10.1016/0021-9797(68)90272-5
  183. Dziomkina N V, Vancso GJ. Colloidal crystal assembly on topologically patterned templates. *Soft Matter*. 2005;1:265-279. doi:10.1039/b503145c
  184. Gu S, Akama H, Nagao D, Kobayashi Y, Konno M. Preparation of Micrometer-Sized Poly ( methyl methacrylate ) Particles with Amphoteric Initiator in Aqueous Media. *Langmuir*. 2004;20(19):7948-7951. doi:10.1021/Ia049280c
  185. Sasaki M, Hane K. Ultrasonically facilitated twodimensional crystallization of colloid particles Ultrasonically facilitated two-dimensional crystallization of

- colloid particles. *J Appl Phys.* 1996;80(9):5427-5431. doi:10.1063/1.362730
186. Dimitrov AS, Nagayama K. Continuous Convective Assembling of Fine Particles into Two-Dimensional Arrays on Solid Surfaces. *Langm.* 1996;12(5):1303-1311. doi:10.1021/la9502251
187. Bartlett PN, Baumberg JJ, Birkin PR, Ghanem MA, Netti MC. Highly Ordered Macroporous Gold and Platinum Films Formed by Electrochemical Deposition through Templates Assembled from Submicron Diameter Monodisperse Polystyrene Spheres. *Chem Mater.* 2002;14(19):2199-2208. doi:10.1021/cm011272j
188. Walcarius A. Template-directed porous electrodes in electroanalysis. *Anal Bioanal Chem.* 2010;396(1):261-272. doi:10.1007/s00216-009-3069-1
189. Bartlett PN, Birkin PR, Ghanem MA. Electrochemical deposition of macroporous platinum, palladium and cobalt films using polystyrene latex sphere templates. *Chem Commun.* 2000;(17):1671-1672. doi:10.1039/b004398m
190. Choi K-S, McFarland EW, Stucky GD. Electrocatalytic Properties of Thin Mesoporous Platinum Films Synthesized Utilizing Potential-Controlled Surfactant Assembly. *Adv Mater.* 2003;15(23):2018-2021. doi:10.1002/adma.200304557
191. Attard GS, Bartlett PN, Coleman NRB, Elliott JM, Owen JR, Wang JH. Mesoporous Platinum Films from Lyotropic Liquid Crystalline Phases. *Science.* 1997;278:838-840. doi:10.1126/science.278.5339.838
192. Elliott JM, Birkin PR, Bartlett PN, Attard GS. Platinum Microelectrodes with Unique High Surface Areas. *Langmuir.* 1999;15(22):18-22. doi:10.1021/la9908945
193. Park S, Chung TD, Kim HC. Nonenzymatic glucose detection using mesoporous platinum. *Anal Chem.* 2003;75(13):3046-3049. doi:10.1021/ac0263465
194. Torcello-Gómez A, Maldonado-Valderrama J, Jódar-Reyes AB, Cabrerizo-Vílchez MA, Martín-Rodríguez A. Pluronic-covered oil-water interfaces under simulated duodenal conditions. *Food Hydrocoll.* 2014;34:54-61. doi:10.1016/j.foodhyd.2012.12.026
195. Batrakova E V, Kabanov A V. Pluronic block copolymers: evolution of drug delivery concept from inert nanocarriers to biological response modifiers. *J Control Release.* 2008;130(2):98-106. doi:10.1016/j.jconrel.2008.04.013
196. Bruno MM, Franceschini EA, Viva FA, Thomas YRJ, Corti HR. Electrodeposited mesoporous platinum catalysts over hierarchical carbon monolithic support as anode in small PEM fuel cells. *Int J Hydrogen Energy.* 2012;37(19):14911-14919. doi:10.1016/j.ijhydene.2012.02.058
197. Ivanova R, Alexandridis P. Evolution in Structural Polymorphism of Pluronic F127 Poly ( ethylene oxide ) - Poly ( propylene oxide ) Block Copolymer in Ternary Systems with Water and Pharmaceutically Acceptable Organic Solvents: From “Glycols” to “Oils.” *Langmuir.* 2000;16(23):9058-9069. doi:10.1021/la000373d
198. Ratner BD, Hoffmann AS, Schoen FJ, Lemons JE. *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine.* Boston: Academic Press; 1996.
199. Nuzzo RG, Zegarski BR, DuBois LH. Fundamental Studies of the Chemisorption of Organosulfur Compounds on Au( 111). Implications for Molecular Self-Assembly on Gold Surfaces. *J Am Chem Soc.* 1987;109(3):733-

740. doi:10.1021/ja00237a017
200. Graham D, Dingman S. A Step-by-Step Guide for Solution Based Self-Assembly. *Mater Matters*. 2006;1(2):18-19.
201. Ulman A. Formation and Structure of Self-Assembled Monolayers. *Chem Rev*. 1996;96(4):1533-1554. doi:10.1021/cr9502357
202. Dubois LH, Nuzzo RG. Synthesis, structure, and properties of model organic surfaces. *Annu Rev Phys Chem*. 1992;43:437-463. doi:10.1146/annurev.pc.43.100192.002253
203. Lin W-C, Lee S-H, Karakachian M, et al. Tuning the surface potential of gold substrates arbitrarily with self-assembled monolayers with mixed functional groups. *Phys Chem Chem Phys*. 2009;11(29):6199-6204. doi:10.1039/b902044f
204. Love JC, Estroff LA, Kriebel JK, Nuzzo RG, Whitesides GM. Self-assembled monolayers of thiolates on metals as a form of nanotechnology. *Chem Rev*. 2005;105(4):1103-1169. doi:10.1021/cr0300789
205. Stettner J, Frank P, Griesser T, et al. Characterization of Self Assembled Monolayer Formation of 11-Mercaptoundecanoic Acid on Gold Surfaces. In: Al-Shamery K, Horowitz G, Sitter H, Rubahn H-G, eds. *Interface Controlled Organic Thin Films*. Vol 129. Springer Proceedings in Physics. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2009:101-105. doi:10.1007/978-3-540-95930-4
206. Holze R. The adsorption of thiophenol on gold – a spectroelectrochemical study. *Phys Chem Chem Phys*. 2015;17:21364-21372. doi:10.1039/c5cp00884k
207. Thommes M, Kaneko K, Neimark A V, et al. Physisorption of gases, with special reference to the evaluation of surface area and pore size distribution (IUPAC Technical Report). *Pure Appl Chem*. 2015:1-19. doi:10.1515/pac-2014-1117
208. Ende D, Mangold K-M. Impedanzspektroskopie. *Chemie unserer Zeit*. 1993;27(3):134-140. doi:0009-281s1/93/0306-0134
209. Sauer DU. Impedanzspektroskopie – Eine Methode, viele Anwendungen. 1 *Symp Impedanzspektroskopie*. 2006;99:7-11. doi:08210050198x
210. Ruiz GA, Felice CJ. Electrochemical-Fractal Model Versus Randles Model: A Discussion About Diffusion Process. *Int J Electrochem Sci*. 2015;10:8484-8496.
211. Knoblauch C. Impedanzspektroskopie – Ein Überblick von der Theorie bis zur Anwendung. *WOTECH*. 2015;9:1-8. doi:10.7395/2015/Knoblauch1
212. Keiser H, Beccu KD, Gutjahr MA. Abschätzung der Porenstruktur poröser Elektroden aus Impedanzmessungen. *Electrochim Acta*. 1976;21(8):539-543. doi:10.1016/0013-4686(76)85147-X
213. de Levie R. On porous electrodes in electrolyte solutions - IV. *Electrochim Acta*. 1964;9:1231-1245. doi:10.1016/0013-4686(64)85015-5
214. de Levie R. The influence of surface roughness of solid electrodes on electrochemical measurements. *Electrochim Acta*. 1965;10(2):113-130. doi:10.1016/0013-4686(65)87012-8
215. de Levie R. On porous electrodes in electrolyte solutions. *Electrochim Acta*. 1963;8(10):751-780. doi:10.1016/0013-4686(63)80042-0
216. Mercanzini A, Colin P, Bensadoun JC, Bertsch A, Renaud P. In vivo electrical impedance spectroscopy of tissue reaction to microelectrode arrays. *IEEE Trans Biomed Eng*. 2009;56(7):1909-1918. doi:10.1109/TBME.2009.2018457
217. Hamann CH, Vielstich W. *Elektrochemie*. 4. Auflage. Weinheim: WILEY-VCH;

- 2005.
218. Harris DC. *Grundlagen Der Elektrochemie*. 1. Auflage. Wiesbaden: Vieweg; 1998. doi:10.1007/978-3-663-10640-1\_14
  219. Harris AR, Newbold C, Carter P, Cowan R, Wallace G. Measuring the effective area and charge density of platinum electrodes for bionic devices. *J Neural Eng*. 2018;15. doi:10.1088/1741-2552/aaba8b
  220. Wefstaedt P, Scheper V, Lenarz T, Stöver T. Brain-derived neurotrophic factor/glial cell line-derived neurotrophic factor survival effects on auditory neurons are not limited by dexamethasone. *Neuroreport*. 2005;16(18):19-22. doi:00001756-200512190-00008
  221. Johnson RE, Dettre RH. Contact angle hysteresis. III. Study of an idealized heterogeneous surface. *J Phys Chem*. 1964;68(7):1744-1750. doi:10.1021/j100789a012
  222. Dettre R, Johnson RH. Contact Angle Hysteresis. In: Fowkes F, ed. *Contact Angle, Wettability, and Adhesion*. Washington DC: Advances in Chemistry; American Chemical Society; 1964:136-144. doi:10.1021/ba-1964-0043.ch008
  223. Azemi E, Lagenaur CF, Cui XT. The surface immobilization of the neural adhesion molecule L1 on neural probes and its effect on neuronal density and gliosis at the probe/tissue interface. *Biomaterials*. 2011;32(3):681-692. doi:10.1016/j.biomaterials.2010.09.033
  224. He X, Knepper M, Ding C, et al. Promotion of spinal cord regeneration by neural stem cell-secreted trimerized cell adhesion molecule L1. *PLoS One*. 2012;7(9):1-11. doi:10.1371/journal.pone.0046223
  225. Brand Y, Sung M, Chavez E, et al. Neural cell adhesion molecule L1 modulates type I but not type II inner ear spiral ganglion neurite outgrowth in an in vitro alternate choice assay. *J Mol Neurosci*. 2014;51(3):1-18. doi:10.1007/s12031-013-0040-6
  226. Cherry JF, Carlson AL, Benarba FL, et al. Oriented, multimeric biointerfaces of the L1 cell adhesion molecule: an approach to enhance neuronal and neural stem cell functions on 2-D and 3-D polymer substrates. *Biointerphases*. 2012;7(1-4):22. doi:10.1007/s13758-012-0022-1
  227. Müller D. *Etablierung Eines Testsystems Für Die Quantitative Analyse von Neuronalen Adhäsionsmolekülen Auf Goldoberflächen.*; 2015.
  228. Walter J, Ko O, Friehs K, Stahl F, Scheper T. Systematic Investigation of Optimal Aptamer Immobilization for Protein - Microarray Applications. *Anal Chem*. 2008;80(19):7372-7378. doi:10.1021/ac801081v
  229. Cook AD, Pajvani UB, Hrkach JS, Cannizzaro SM, Langer R. Colorimetric analysis of surface reactive amino groups on poly(lactic acid-co-lysine):poly(lactic acid) blends. *Biomaterials*. 1997;18(21):1417-1424. doi:10.1016/S0142-9612(97)00075-6
  230. Kim DY, Ku Y, Ahn JW, Kwon C, Kim HC. Electro-deposited Nanoporous Platinum Electrode for EEG Monitoring. *J Korean Med Sci*. 2018;33(21):1-13.
  231. Schmitz S. *Zellkultur - Der Experimentator*. 3. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag; 2011. doi:10.1007/978-3-8274-2573-7
  232. Peixoto N, Jackson K, Samiyi R, Minnikanti S. Charge storage: Stability measures in implantable electrodes. *31st Annu Int Conf IEEE Eng Med Biol Soc*. 2009:658-661. doi:10.1109/IEMBS.2009.5333449
  233. Jahns M. Nanoporöse Organosilica-Materialien für biomedizinische

- Anwendungen. 2019.
234. Lodermeier J. *Elektrochemische Abscheidung von Metallen Und Legierungen Aus Nichtwässrigen Systemen Und Aktivierung von Passivierten Metalloberflächen Zur Abscheidung Nanoporöser Schichten Aus Wässrigen Lösungen.*; 2006.
  235. Budevski E, Staikov G, Lorenz W, Keusler K. *Electrochemical Phase Formation and Growth.* Weinheim; 1997. doi:10.1002/9783527614936
  236. Strauß T-J. *Entwicklung Eines Neuartigen Nanokompositmaterials Für Die Freisetzung Bioaktiver Substanzen von Neuronalen Elektroden.*; 2020.
  237. Behrens P, Schwarz H-C, Kreisköther KD, Pinkvos T-J. *Hybridsystem Mit Nanoporösen Nanopartikeln in Einer Edelmetallstruktur Und Verfahren Zur Herstellung Hiervon Sowie Dessen Verwendung.* WO 2020/021075 A1; 2020.
  238. Boehler C, Carli S, Fadiga L, Stieglitz T, Asplund M. Tutorial: guidelines for standardized performance tests for electrodes intended for neural interfaces and bioelectronics. *Nat Protoc.* 2020;15(11):3557-3578. doi:10.1038/s41596-020-0389-2
  239. Ehlert N, Badar M, Christel A, et al. Mesoporous silica coatings for controlled release of the antibiotic ciprofloxacin from implants. *J Mater Chem.* 2011;21(3):752. doi:10.1039/c0jm01487g
  240. Ehlert N, Müller PP, Stieve M, Behrens P. Immobilization of alkaline phosphatase on modified silica coatings. *Microporous Mesoporous Mater.* 2010;131(1-3):51-57. doi:10.1016/j.micromeso.2009.11.040
  241. Ehlert N, Mueller PP, Stieve M, Lenarz T, Behrens P. Mesoporous silica films as a novel biomaterial: applications in the middle ear. *Chem Soc Rev.* 2013;42(9):3847-3861. doi:10.1039/c3cs35359a
  242. Lensing R, Bleich A, Smoczek A, et al. Efficacy of nanoporous silica coatings on middle ear prostheses as a delivery system for antibiotics: An animal study in rabbits. *Acta Biomater.* 2013;9(1):4815-4825. doi:10.1016/j.actbio.2012.08.016

## 7 Anhang

### 7.1 Chemikalienverzeichnis

Chemikalie	Reinheit	Hersteller
11-Mercaptoundecansäure	98 %	Sigma-Aldrich
1-Propanthiol	99 %	Sigma-Aldrich
2-Phenylethanthiol	98 %	Sigma-Aldrich
4',6-Diamin-2-phenylindol		AppliChem
8-Amino-1-octanthiol	95 %	Sigma-Aldrich
Aceton	≥99.5 %	Roth
Alexa Fluor®488	-	Jackson ImmunoResearch
Anti-Neurofilament-Antikörper (200 kDa, monoclonal mouse, clone RT97)	-	Leica Biosystems
BSA	≥98 %	Sigma-Aldrich
Carboxyfluorescein Succinimidylester	-	Abcam
CBS	≥99.9 %	Sigma-Aldrich
Cysteamin	≥95 %	Sigma-Aldrich
Dimethylformamid	≥99.8 %	Sigma-Aldrich
Dimethylsulfoxid	≥99.9 %	Sigma-Aldrich
<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>	-	Biochrom
Ethanol, absolut	≥99.5 %	Emplura
Glukose	-	B. Braun
Goldbeschichteter Siliciumwafer	99.9 %	Sigma-Aldrich
HEPES	-	Invitrogen
Hexachloroplatinsäure Hexahydrat	37.3-38.0 % Pt- Anteil	TCI
Insulin	-	Biochrom
Isopropanol	≥99.5 %	Roth
Kälberserum	-	Medizinische Hochschule Hannover
L1CAM	≥85 %	Thermo Fisher Scientific
L1CAM ELISA Kit (Basis-Set)	-	Sino Biological Inc.
L1CAM ELISA Kit (Komplett-Set)	-	Antibodies-online
N2-Zusatz	-	Invitrogen
Natrium-3-mercapto-1-propansulfonat	90 %	Sigma-Aldrich

Natriumhydrogencarbonat	≥95 %	Merck
Natriumhydrogenphosphat-dihydrat	≥95 %	Merck
PBS	Steril-filtered, suitable for cell culture	Sigma-Aldrich
Penicillin	-	Biochrom
Perchlorsäure	70 %	Riedel de Haen
Polystyrol Nanopartikel 50 nm	-	Sigma-Aldrich
Schwefelsäure, konzentriert	≥95-97 %	Sigma-Aldrich
Siliciumwafer	-	Sigma-Aldrich
Streptomycin	-	Medizinische Hochschule Hannover
Sulfo-SDTB	≥95 %	Emelca
TBS mit Tween20	≥99.9 %	Sigma-Aldrich
Tetramethylbenzidin	≥99.9 %	Sigma-Aldrich
Toluol	≥99.7 %	Sigma-Aldrich
Triethylamin	≥99 %	Sigma-Aldrich
Trypsin / Ethylendiamintetraessigsäure-Lösung	-	Medizinische Hochschule Hannover
Wasserstoffperoxid	≥35 %	Sigma-Aldrich
Zitronensäure	99 %	Sigma-Aldrich

## 7.2 Ethische Erklärung über die Isolation der SGC aus neonatalen Ratten

Die Experimente wurden im Sinne der internationalen Richtlinien für Tierschutz der Medizinischen Hochschule Hannover unter Einhalten der Standards entsprechend dem deutschen Tierschutzgesetz und der europäischen Richtlinie 2010/63/Eu über den Tierschutz durchgeführt. Für die *in vitro* Experimente wurde die registrierte Euthanasie (no.:2013/44) mit der lokalen Autorisierung (Zentrales Tierlaboratorium, Medizinische Hochschule Hannover) durchgeführt und nach den gesetzlich vorgeschriebenen Vorgaben gemeldet. Da vorweg keine weitere Behandlung durchgeführt wurde, war keine weitere Genehmigung für die Tötung der Tiere zur Nachforschung durch Gewebeanalysen nötig (§4). Die Ratten aus dem Zuchtbestand von Charles River (Charles River, USA) wurden im lizenzierten zentralen Tierlaboratorium der Medizinischen Hochschule Hannover gezüchtet, geboren und mit ihrem Nachwuchs zur Verwendung in Forschungsstudien gehalten. Die Euthanasie wurde zur Minimierung des Stresslevels der Ratten durch eine lizenzierte Person durchgeführt, bevor die Ratten enthauptet und für Experimente verwendet wurden.

### 7.3 Ergebnisse und Diskussion

#### 7.3.1 Nanoporöse Platinbeschichtung mit kleinen Porendurchmessern

Für die genaue Erläuterung, weshalb die impedanzspektroskopischen Messungen nicht anhand der Nyquist-Auftragung ausgewertet werden konnten, ist eine exemplarische Nyquist-Auftragung mit unterschiedlichen Vergrößerungen in Abbildung 7.1 gezeigt.

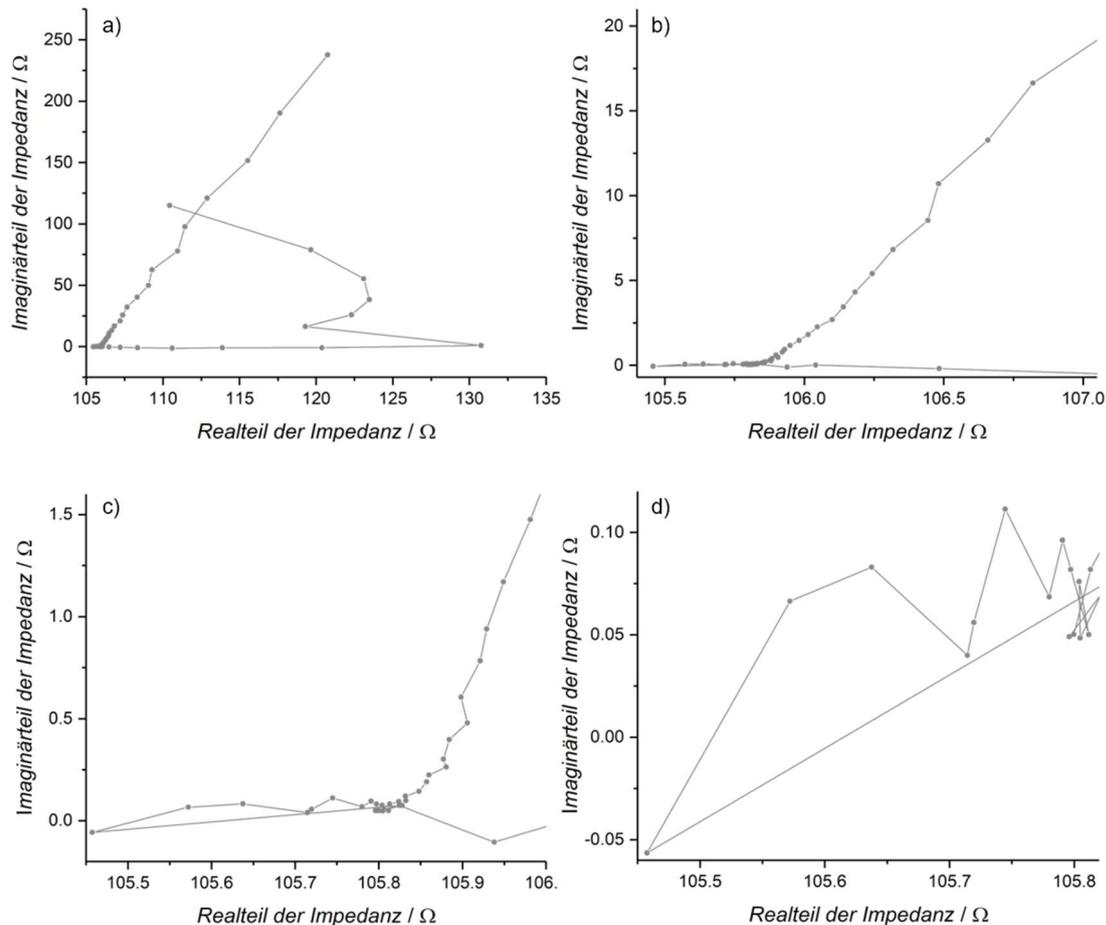


Abbildung 7.1: Impedanzspektren von sp-NPPt-Beschichtungen (1000 Abscheidungszyklen) in der Nyquist-Auftragung, wobei b-d Vergrößerungen der in a dargestellten Übersicht sind.

Die gezeigte Nyquist-Auftragung zeigt nicht den üblichen Verlauf, anhand dessen normalerweise durch den Schnittpunkt mit der x-Achse der Elektrolytwiderstand  $R_E$  bestimmt werden kann (Abbildung 7.2).

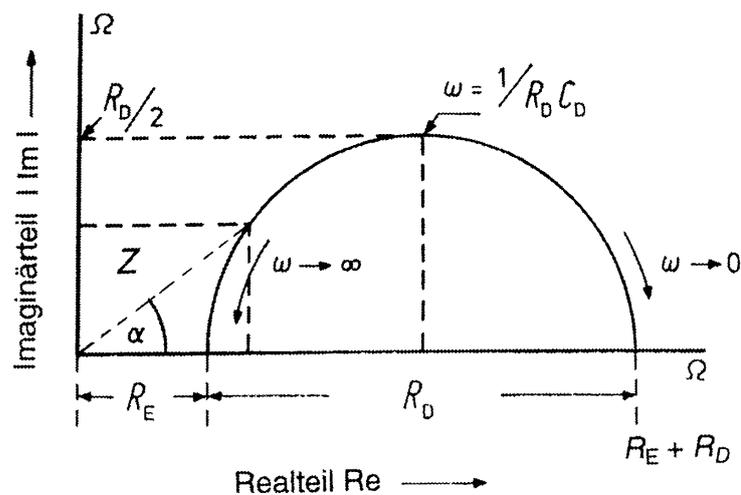


Abbildung 7.2: Beispielhafte Nyquist-Auftragung aus Hamann & Vielstich.<sup>217</sup>

Der zweite Schnittpunkt mit der x-Achse entspricht entsprechend der Summe des Elektrolytwiderstands  $R_E$  und des Durchtrittswiderstands  $R_D$ . Somit können Aussagen über Diffusionsprozesse getroffen werden und folglich Rückschlüsse auf die Zugänglichkeit des Porensystems gezogen werden. Durch Bestimmung des Phasenwinkels, welcher durch die kapazitiven Anteile der Gesamtimpedanz bestimmt wird, kann das elektrochemische Verhalten des Gesamtsystems analysiert werden. Beträgt der Phasenwinkel  $0^\circ$ , so liegt ein Ohmsches Verhalten vor. Ein Kondensator weist einen Phasenwinkel von  $90^\circ$  auf, bei  $45^\circ$  hingegen wird von der Warburg-Impedanz gesprochen, welche durch Diffusionsprozesse hervorgerufen wird.

Folglich können durch den nicht auswertbaren Kurvenverlauf der Nyquist-Auftragung keine Aussagen über die Widerstände der sp-NPPt-Beschichtungen getroffen werden.

## 7 Anhang

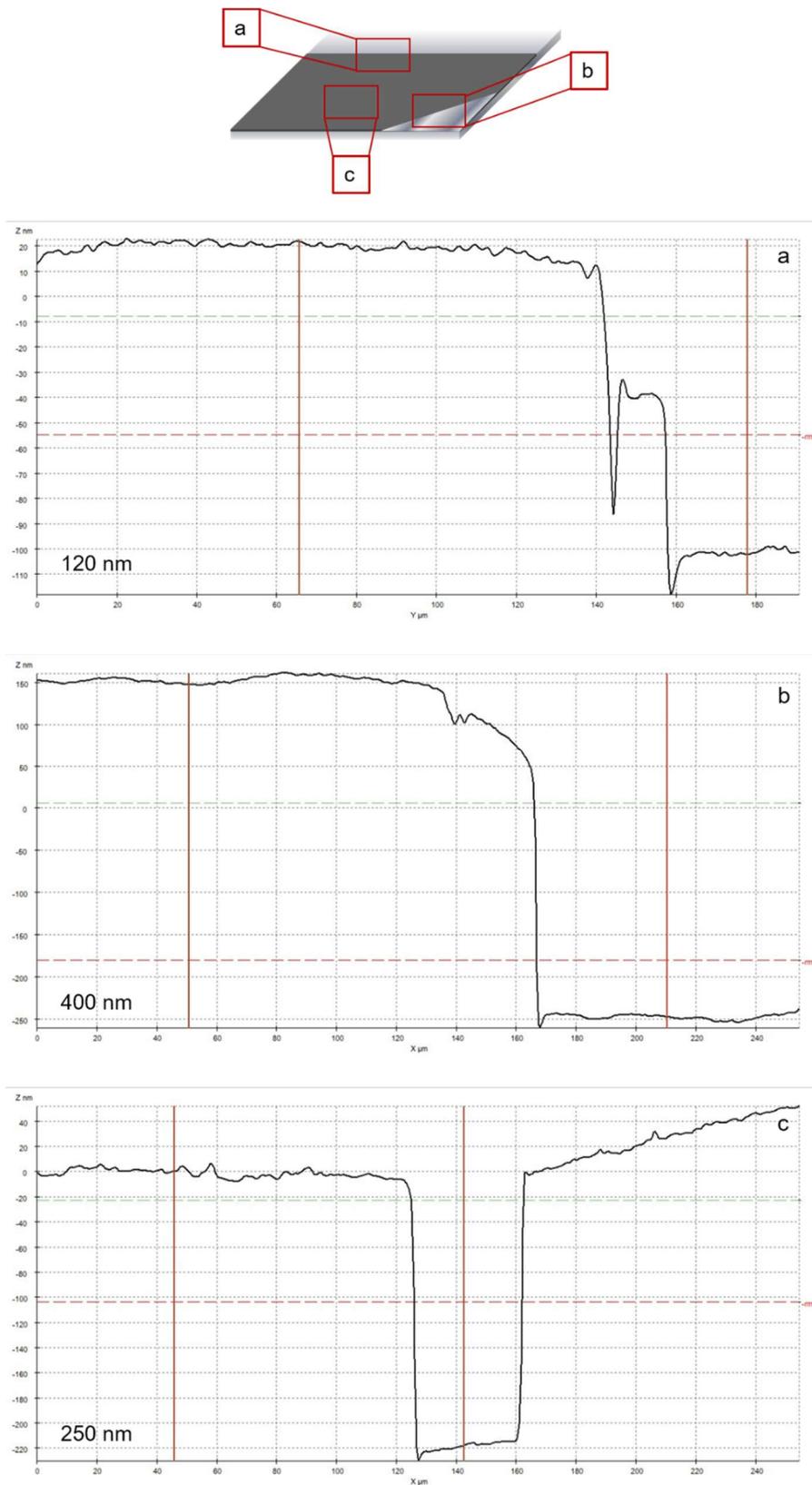


Abbildung 7.3: Höhenprofile der konfokalmikroskopischen Messungen an sp-NPPT-Beschichtung auf Platin unter Verwendung der Standardsynthesebedingungen mit 1000 Abscheidungszyklen in Elektrolysezelle 1.

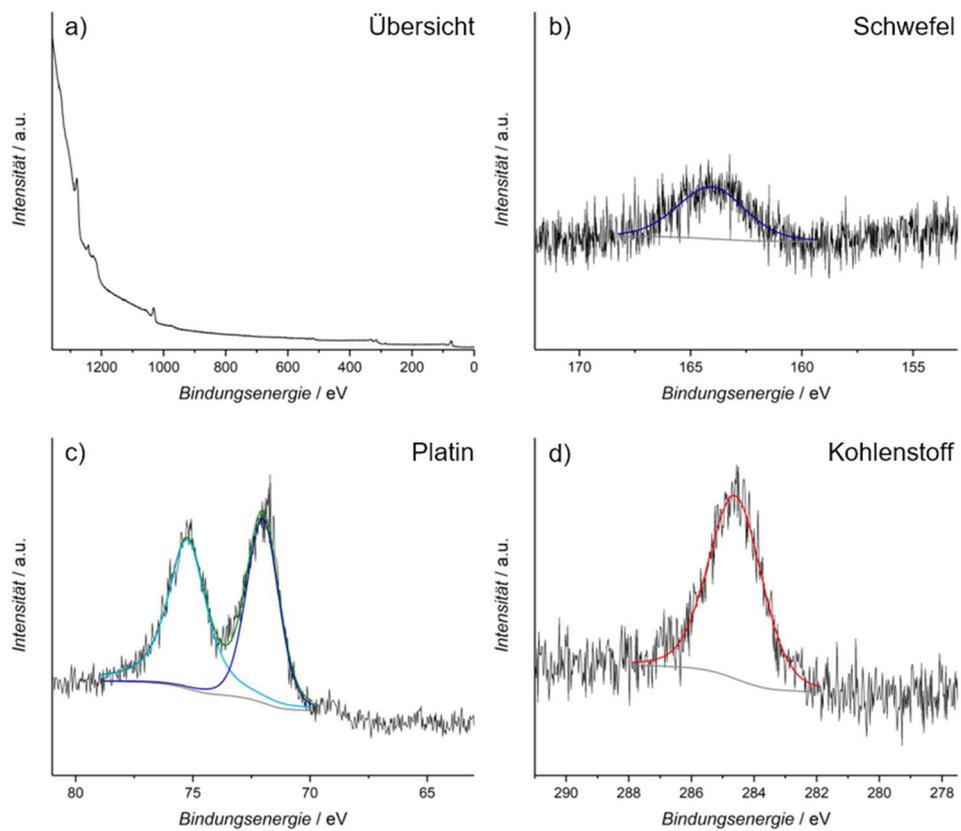


Abbildung 7.4: XPS-Spektrum einer mit 11-Mercaptoundecansäure modifizierten sp-NPpt-Beschichtung (a) sowie Vergrößerungen des Bindungsenergiebereichs von Schwefel (b), Platin (c) und Kohlenstoff (d).

## 7 Anhang

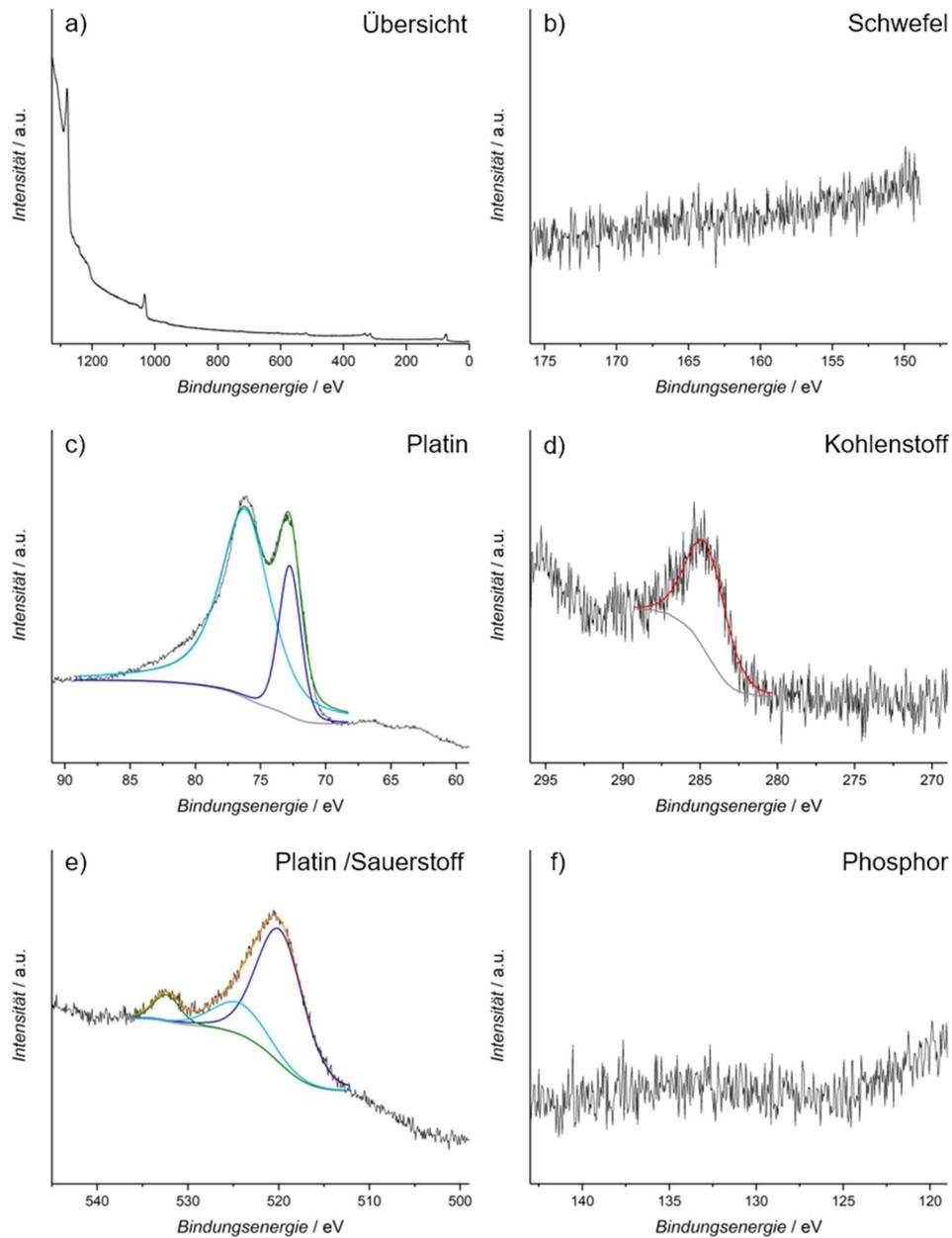


Abbildung 7.5: XPS-Spektrum einer unmodifizierten sp-NPPT-Beschichtung nach eintägiger Lagerung unter Freisetzungsbedingungen (a) sowie Vergrößerungen des Bindungsenergiebereichs von Schwefel (b), Platin (c), Kohlenstoff (d), Platin / Sauerstoff (e) und Phosphor (f).

### Rolipram-Freisetzung unter sterilen Bedingungen in Panzerin

Durch Kontaminationen ändert sich der pH-Wert des Panzerins, welcher mithilfe eines enthaltenden Indikators (Phenolrot) anhand der Färbung festgestellt werden kann. Fotografische Aufnahmen der Freisetzungsrückstände sind in Abbildung 7.6 gezeigt.

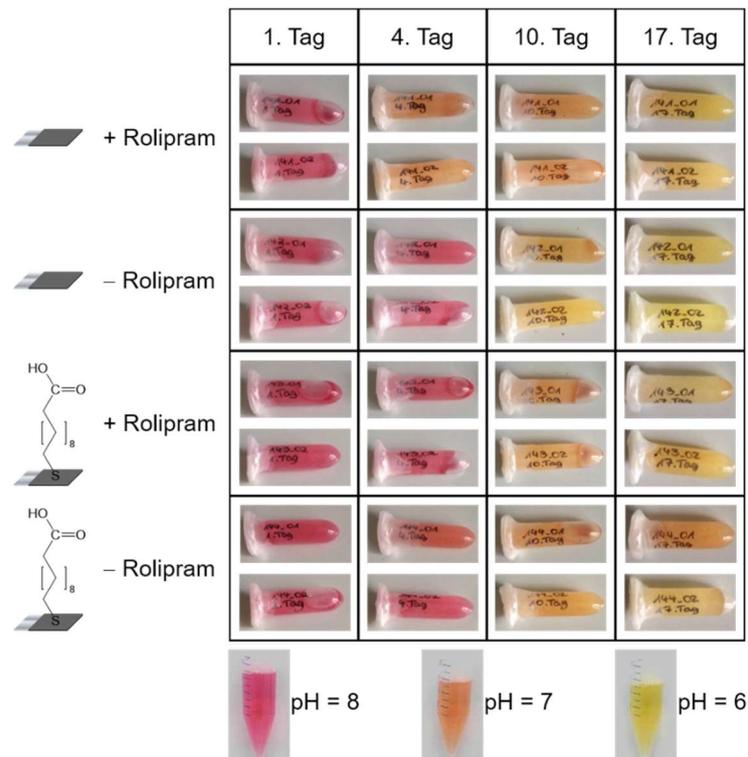


Abbildung 7.6: Fotografische Aufnahmen der durch Kontamination verfärbten Freisetzungsrückstände vom 1. Tag, 4. Tag, 10. Tag und 17. Tag. Als Freisetzungsmittel wurde mit Antibiotika versetztes Panzerin verwendet.

Am ersten Tag der Freisetzung sind alle Überstände frei von Kontaminationen, der pH hat sich nicht verändert und es konnte visuell kein Pilzwachstum festgestellt werden. Bereits beim zweiten Probenumsetzen am 4. Tag der Rolipram-Freisetzung zeigten sich in drei Überständen pH-Änderungen, welche durch Kontaminationen hervorgerufen wurden. Am 10. Freisetzungstag zeigten alle Überstände durch Gelbfärbungen eine pH-Wert-Änderung auf etwa 6, außerdem wurde ein Pilzwachstum visuell festgestellt. Da ab diesem Zeitpunkt alle Proben kontaminiert waren, wurde durch das Umsetzen die Kontamination wie erwartet in alle weiteren Überstände (17. Tag) übertragen. Aufgrund der Kontamination konnten diese Überstände für keine Zellkulturuntersuchungen verwendet werden.

Daher sollten die Proben in den folgenden Freisetzungsvorversuchen nicht umgesetzt werden, um Kontaminationen durch Öffnen der Freisetzungsgläser zu verhindern. Stattdessen wurde für jeden zu vermessenen Zeitpunkt eine Probe hergestellt, die entsprechend lang im Überstand gelagert wurde. Beispielsweise wurde zur Untersuchung des Überstands vom 17. Tag die Probe die gesamten 17 Tage in dem Freisetzungsmittel gelagert. Die fotografischen Aufnahmen der Überstände sind in Abbildung 7.7 dargestellt.

## 7 Anhang

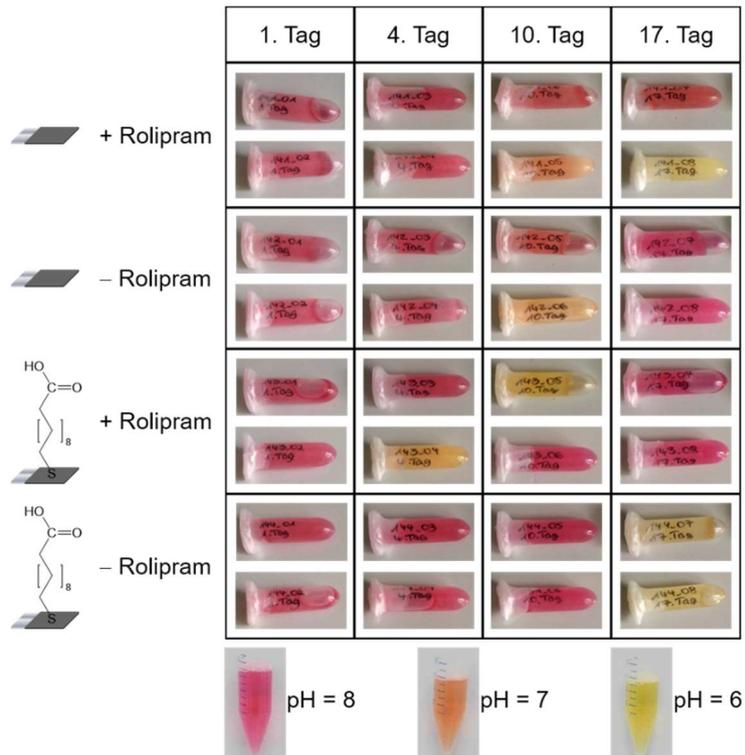


Abbildung 7.7: Fotografische Aufnahmen der durch Kontamination verfärbten Freisetzungsrückstände. Die Proben wurden nicht umgesetzt, es wurde stattdessen über 1 Tag, 4 Tage, 10 Tage sowie 17 Tage aus jeweils einem Substrat freigesetzt. Als Freisetzungsmedium wurde mit Antibiotika versetztes Panzerin verwendet.

Die Kontaminationen konnten im Vergleich zu der in Abbildung 7.6 gezeigten Versuchsreihe minimiert, jedoch nicht verhindert werden. Unabhängig von der chemischen Modifizierung sowie der Rolipram-Freisetzung, wurden bei allen Probenarten mindestens zwei Überstände kontaminiert, weshalb auch mit diesen Überständen keine Zellkulturuntersuchungen durchgeführt werden konnten.

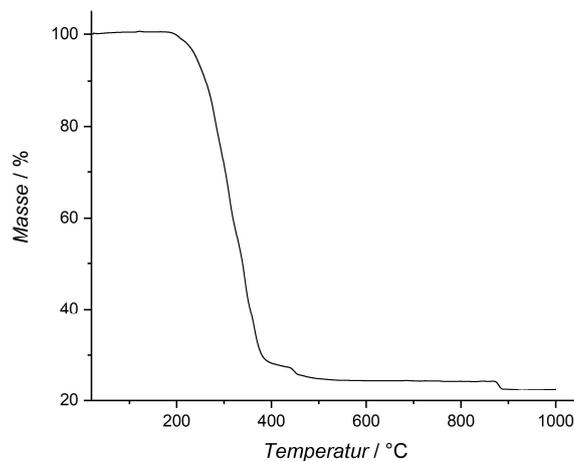


Abbildung 7.8: Thermogravimetrische Analyse von Pluronic® F127 zur Bestimmung der Zersetzungstemperatur.

### 7.3.2 Nanoporöse Platinbeschichtung mit großen Porendurchmessern

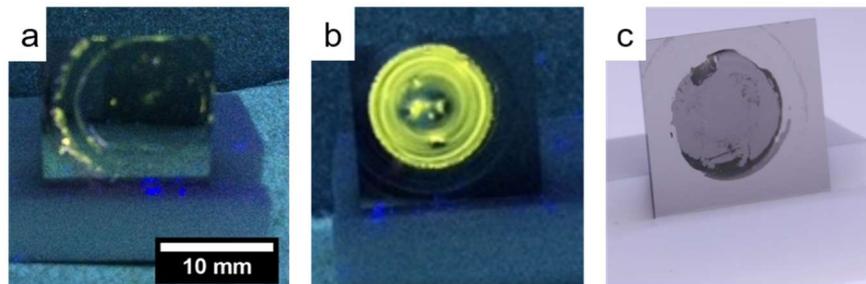


Abbildung 7.9: Fotografische Aufnahme eines mit PLBs beschichteten Platinsubstrats unter Verwendung einer ethanolischen PLBs-Suspension (a) und eines mit PLBs beschichteten Platinsubstrats unter Verwendung einer wässrigen PLBs-Suspension (b) unter UV-Licht. Nach der elektrochemischen Platinabscheidung auf das mit einer ethanolischen PLBs-Suspension beschichteten Substrats sind nur wenige schwarze Bereiche auf der Beschichtung erkennbar (c).

## 7 Anhang

### 7.3.3 L1CAM

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Parameter zur Auswertung der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen mit der Software ImageJ.

Probenname	Einlagerungs- konzentration [ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ]	Substract background	Enhance contrast [%]	Threshold
Au_L1CAM_35_01-1	0.05	5	0.1	Yen
Au_L1CAM_35_01-2	0.05	5	0.1	RenyiEntropy
Au_L1CAM_35_01-3	0.05	5	0.1	RenyiEntropy
Au_L1CAM_35_02-1	0.05	5	0.1	RenyiEntropy
Au_L1CAM_35_02-2	0.05	10	0.1	RenyiEntropy
Au_L1CAM_35_02-3	0.05	5	0.1	RenyiEntropy
Au_L1CAM_36_01-1	0.05	5	0.1	RenyiEntropy
Au_L1CAM_36_01-2	0.05	5	0.1	RenyiEntropy
Au_L1CAM_36_01-3	0.05	5	0.1	RenyiEntropy
Au_L1CAM_36_02-1	0.05	10	0.1	Default
Au_L1CAM_36_02-2	0.05	10	0.1	Default
Au_L1CAM_36_02-3	0.05	5	0.1	RenyiEntropy
Au_L1CAM_37_01-1	1	10	0.4	Default
Au_L1CAM_37_01-2	1	10	0.4	Default
Au_L1CAM_37_01-3	1	5	0.4	Default
Au_L1CAM_37_02-1	1	10	0.1	Li
Au_L1CAM_37_02-2	1	5	0.4	RenyiEntropy
Au_L1CAM_37_02-3	1	5	0.4	RenyiEntropy
Au_L1CAM_39_01-1	100	10	0.4	Li
Au_L1CAM_39_01-2	100	10	0.4	Li
Au_L1CAM_39_01-3	100	10	0.4	Li
Au_L1CAM_39_02-1	100	10	0.1	Li
Au_L1CAM_39_02-3	100	10	0.4	Li
Au_L1CAM_40_01-1	50	10	0.4	IsoData
Au_L1CAM_40_01-2	50	10	0.4	Default
Au_L1CAM_40_01-3	50	10	0.4	IsoData
Au_L1CAM_40_02-1	50	5	0.4	Default
Au_L1CAM_40_02-2	50	5	0.4	RenyiEntropy
Au_L1CAM_41_02-1	25	10	0.4	Default
Au_L1CAM_41_02-2	25	10	0.4	Default
Au_L1CAM_41_02-3	25	10	0.4	Default
Au_L1CAM_42_02-1	10	10	0.4	Default
Au_L1CAM_42_02-2	10	10	0.4	Default
Au_L1CAM_42_02-3	10	10	0.4	Default
Au_L1CAM_43_01-1	1	10	0.4	Default
Au_L1CAM_43_02-1	1	10	0.1	RenyiEntropy

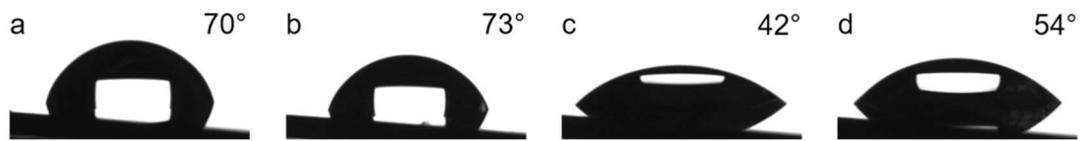


Abbildung 7.10: Kontaktwinkelmessung einer unbeschichteten Goldoberfläche (a), eines in Ethanol gelagerten Goldsubstrats (b), eines Cysteamin-beschichteten Goldsubstrats vor (c) und eines Cysteamin-beschichteten Goldsubstrats nach der Cyclovoltammetrie (d).

## 7.4 Lebenslauf

Kim Dana Kreisköther

Geburtsdatum	17.02.1988
Geburtsort	Solingen
01.01.2019 – heute	<b>Wissenschaftliche Mitarbeiterin</b> am Lehrstuhl Production Engineering of E-Mobility Components an der RWTH Aachen
03/2014 – 12/2018	<b>Wissenschaftliche Mitarbeiterin</b> am Institut für Anorganische Chemie der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
03/2014 – heute	<b>Promotionsstudium</b> zur Dr. rer. nat. in der Arbeits- gruppe von Prof. Dr. Peter Behrens im Institut für Anorganische Chemie der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
10/2011 – 09/2014	<b>Masterstudium</b> im Fach Material- und Nanochemie Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover Titel der Masterarbeit: <i>Nanoporöse Platinbeschichtungen auf Elektroden für biomedizinische Anwendungen</i>
04/2009 – 09/2011	<b>Bachelorstudium</b> im Fach Chemie Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover Titel der Bachelorarbeit: <i>Morphologiekontrolle bei der Abscheidung von Zinkoxid aus wässrigen Lösungen: Abhängigkeit von der Konzentration von zugefügtem Chondroitin-6-sulfat</i>
10/2007 – 03/2009	<b>Bachelorstudium</b> im Fach Chemie Georg-August-Universität Göttingen
06/2007	<b>Abitur</b> Wilhelm-Raabe-Schule in Hannover

## 7.5 Veröffentlichungen und Konferenzbeiträge

### Patent

*Hybridsystem mit Nanoporösen Nanopartikeln in einer Edelmetallstruktur und Verfahren zur Herstellung hiervon sowie dessen Verwendung*

Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 2020/021075

P. Behrens, H. C. Schwarz, K. D. Kreisköther, T.-J. Pinkvos

### Vorträge

*Nanoporous Platinum Coatings for the Advance of Electrode Surfaces*

K.D. Kreisköther, N. Ehlert, N. Wendt, H.-C. Schwarz, J. Schulze, K. Kranz, A. Warnecke, P. Behrens

Conference for Biomedical Engineering (BMT) in Hannover, Deutschland, 2014

*Surface Modification of Neural Electrodes by Nanoporous Platinum Coatings*

K.D. Kreisköther, J. Schulze, D. Warwas, D. Müller, N. Burblied, N. Ehlert, A. Warnecke, P. Behrens

Conference for Engineering of Functional Interfaces (EnFI) in Hannover, Deutschland, 2015

*Improvement of Neural Electrodes by Nanoporous Platinum Coatings*

K.D. Kreisköther, D. Warwas, J. Schulze, D. Müller, N. Ehlert, H.-C. Schwarz, A. Warnecke, P. Behrens

Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biomaterialien (DGBM) in Freiburg, Deutschland, 2015

*Nanoporous Platinum Coatings for Neural Interface Electrodes*

K.D. Kreisköther, D. Warwas, J. Schulze, N. Ehlert, H.-C. Schwarz, A. Warnecke, P. Behrens

Deutsche Zeolith-Tagung (DZT) Gießen, Deutschland, 2016

*Modification of Neural Electrode Surfaces by Nanoporous Platinum Coatings*

K.D. Kreisköther, J. Schulze, N. Ehlert, H.-C. Schwarz, A. Warnecke, P. Behrens

Conference for Biomedical Engineering (BMT) in Basel, Schweiz, 2016

*Nanoporous Platinum Coatings for the Improvement of Neural Interface Electrode Surfaces*

K.D. Kreisköther, J. Schulze, N. Ehlert, H.-C. Schwarz, A. Warnecke, P. Behrens

Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biomaterialien (DGBM) in Aachen, Deutschland, 2016

*Advanced Multi-Purpose Electrodes*

K.D. Kreisköther, T.-J. Pinkvos, N. Schmidt, J. Schulze, A. Warnecke, P. Behrens  
Conference for Biomedical Engineering (BMT) in Aachen, Deutschland, 2018

**Posterbeiträge als Hauptautor**

*Improvement of Electrode Surfaces for Biomedical Applications by Nanoporous Platinum Coatings*

K.D. Kreisköther, N. Ehlert, H.-C. Schwarz, N. Wendt, J. Schulze, K. Kranz, A. Warnecke, P. Behrens  
Conference of the European Society for Biomaterials (ESB) in Liverpool, England, 2014

*Nanoporous Platinum Coatings on Electrodes for Biomedical Applications*

K.D. Kreisköther, N. Ehlert, H.-C. Schwarz, N. Wendt, J. Schulze, K. Kranz, A. Warnecke, P. Behrens  
International Federation of European Zeolite Associations (FEZA) Conference in Leipzig, Deutschland, 2014

*Nanoporous Platinum Coatings for the Modification of Neural Electrodes*

K.D. Kreisköther, N. Ehlert, H.-C. Schwarz, J. Schulze, K. Kranz, A. Warnecke, P. Behrens  
NanoDay des Laboratoriums für Nano- und Quantenengineering in Hannover, Deutschland, 2014

*Nanoporous Platinum Coatings on Neural Electrodes for Biomedical Applications*

K.D. Kreisköther, N. Ehlert, H.-C. Schwarz, N. Wendt, J. Schulze, K. Kranz, A. Warnecke, P. Behrens  
Symposium: Biomaterialien für biomedizinische Anwendungen, Französische Botschaft in Berlin, Deutschland, 2014

*Nanoporous Platinum Coatings for Electrodes in Biomedical Applications*

K.D. Kreisköther, J. Schulze, D. Warwas, Dennis Müller, H.-C. Schwarz, N. Ehlert, K. Kranz, A. Warnecke, P. Behrens  
European Symposium and Exhibition on Biomaterials and Related Areas (BioMAT) in Weimar, Deutschland, 2015

*Nanoporous Platinum Coatings for Improved Electrodes in Biomedical Applications*

K.D. Kreisköther, J. Schulze, D. Warwas, H.-C. Schwarz, N. Ehlert, K. Kranz, A. Warnecke, P. Behrens

Deutsche Zeolith-Tagung (DZT) in Oldenburg, Deutschland, 2015

*Nanoporous Platinum Coatings for the Improvement of the Cochlear Electrode Surface*

K.D. Kreisköther, D. Warwas, J. Schulze, D. Müller, N. Burbli, N. Ehlert, A. Warnecke, P. Behrens

NanoDay des Laboratoriums für Nano- und Quantenengineering in Hannover, Deutschland, 2015

*Nanoporous Noble Metal Coatings for Neural Interface Electrodes*

K.D. Kreisköther, D. Warwas, J. Schulze, N. Ehlert, A. Warnecke, P. Behrens

NanoDay des Laboratoriums für Nano- und Quantenengineering in Hannover, Deutschland, 2016

*Nanoporous Platinum Coatings for Neural Interface Applications*

K.D. Kreisköther, J. Schulze, N. Ehlert, H.-C. Schwarz, A. Warnecke, P. Behrens

Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biomaterialien (DGBM) in Würzburg, Deutschland, 2017

*Nanoporous Platinum Coatings for Surface Modification of Cochlear Electrode Contacts*

K.D. Kreisköther, J. Schulze, N. Ehlert, H.-C. Schwarz, A. Warnecke, P. Behrens

Inner Ear Biology in Hannover, Deutschland, 2017

*Improvement of Neural Electrode Surfaces by Nanoporous Platinum Coatings*

K.D. Kreisköther, J. Schulze, N. Ehlert, H.-C. Schwarz, A. Warnecke, P. Behrens

NanoDay des Laboratoriums für Nano- und Quantenengineering in Hannover, Deutschland, 2017

*Nanoporous Platinum Coatings for Enhanced Properties of Neural Electrodes*

K.D. Kreisköther, J. Schulze, A. Warnecke, P. Behrens

Konferenz der Anorganischen Technischen Chemie (ATC) in Frankfurt, Deutschland, 2018