

**Universität
Rostock**



Traditio et Innovatio

**Zum Einfluss der oberflächennahen elektrischen
Feldverteilung an nanostrukturierten
Biomaterialoberflächen auf das Biosystem**

Dissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doktor-Ingenieur (Dr.-Ing.)

der Fakultät für Informatik und Elektrotechnik

der Universität Rostock

vorgelegt von

Andreas Körtge, geb. am 14.08.1984 in Rostock
aus Rostock

Rostock, den 12. Mai 2015

- 1. Gutachter:** Prof. Dr. Patrick Elter
Fachbereich Life Science Engineering
Technische Hochschule Mittelhessen
Gießen

- 2. Gutachter:** Prof. Dr. Lienhard Pagel
Lehrstuhl für Gerätesysteme und Mikrosystemtechnik
Institut für Gerätesysteme und Schaltungstechnik
Fakultät für Informatik und Elektrotechnik
Universität Rostock
Rostock

- 3. Gutachter:** Prof. Dr. Jan Gimsa
Lehrstuhl für Biophysik
Institut für Biowissenschaften
Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät
Universität Rostock
Rostock

Datum der Verteidigung: 18. November 2015

Kurzreferat

Die topografische Funktionalisierung von Implantaten ist eine häufig angewandte Methode zur Regulierung der Reaktion des angrenzenden Gewebes auf das Biomaterial. Trotz des erfolgreichen Einsatzes sind die Wirkungsmechanismen der Topografie auf das Biosystem jedoch nicht vollends geklärt, so dass die Erforschung neuer Anwendungen weitgehend nach dem Prinzip von Versuch und Irrtum erfolgt. Für eine gezieltere Nutzung topografischer Strukturen ist daher ein besseres Verständnis ihrer Wirkung auf das Biosystem von großer Bedeutung. Es wird vermutet, dass topografische Nanostrukturen insbesondere auf die Proteinadsorption wirken, die die Zelladhäsion auf der Oberfläche und damit wichtige Zellfunktionen beeinflusst. Lokal variierende elektrische Feldstärken nahe der Nanotopografie, die durch elektrochemische Prozesse induziert werden, werden dabei oftmals als mögliche Ursache für die Modulation des Adsorptionsprozesses diskutiert. Für metallische Biomaterialien wurde bisher angenommen, dass die elektrische Feldstärke an Spitzen und Kanten lokal erhöht ist. Eine mögliche Beeinflussung der Feldverteilung durch Passivierungsschichten, die von vielen metallischen Biomaterialien spontan gebildet werden, wird bei dieser Annahme jedoch vernachlässigt. In der vorliegenden Arbeit wurde aus diesem Grund am Beispiel einer topografischen Nanostruktur aus Titan der Einfluss einer dünnen TiO_2 -Passivierungsschicht auf die elektrische Feldverteilung mit Hilfe von FEM-Elektrostatikberechnungen untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die elektrische Feldstärke im konkav gewölbten Bereich einer Modellstruktur im Vergleich zum konvex gewölbten Bereich erhöht und die Feldverteilung damit gegenüber einer rein metallischen Nanostruktur invertiert war. Dieses Ergebnis liefert einen zusätzlichen Erklärungsansatz für die aus der Literatur bekannte Ansammlung von Proteinen in den konkaven Regionen topografischer Nanostrukturen.

Die lokale Variation der elektrischen Feldstärke nahe topografischen Nanostrukturen wird von geometrischen Effekten und lokal variierenden Dispersionswechselwirkungen überlagert. Zur Aufklärung der separaten Wirkung der elektrischen Feldverteilung einer topografischen Nanostruktur auf das Biosystem wurde daher ein topografisch planares, elektronisch nanostrukturiertes Modellsubstrat aus Silizium untersucht, in das 130 nm breite Linien mit einer Periode von 260 nm mit Phosphorionenimplantiert wurden. Es wurde eine bevorzugte Zellausrichtung entlang der Dotterlinien beobachtet, die eine direkte Wirkung der elektronischen Nanostruktur auf das Biosystem vermuten ließ. Die Zellorientierung ergab sich dabei vermutlich als Folge der lateralen Komponente des elektrischen Feldes über der Dotterstruktur. Die Wirkung der elektronischen Nanostruktur auf die Adsorption des Zelladhäsionsproteins Fibronectin und die Adhäsion humaner MG-63-Osteoblasten konnte hingegen auf eine Verschiebung des mittleren Oberflächenpotentials zu einem stark negativen Wert im Vergleich zum elektronisch homogenen Ausgangsmaterial zurückgeführt werden. Die Ergebnisse helfen, die Wirkungsweise der elektrischen Feldverteilung nahe topografischen Nanostrukturen auf die Zellmorphologie aufzuklären.

Abstract

Topographical surface patterning of implants is a commonly used method to regulate the adjacent tissue's response to a biomaterial. Despite their successful application, however, fundamental interaction processes between topographical structures and the biosystem are not fully explained. The exploration of new applications therefore is largely based on the principle of trial and error. For a more targeted use of topographical structures therefore it is of great importance to understand their mechanisms of action on the biosystem. It is assumed that topographical nanostructures act in particular on protein adsorption which affects the cell adhesion to the biomaterial and consequently important cell functions. Locally varying electric field strengths near the nano-topography, which are generated by electrochemical processes, are often discussed as a possible cause for the modulation of the adsorption process. For metallic biomaterials it is often assumed that the electric field strength is increased locally near tips and edges. However, a possible influence on the field distribution by passivation layers that form spontaneously on many metallic biomaterials is neglected in this assumption. In the present work, based on the example of a topographical nanostructure made of titanium, the influence of a thin TiO_2 passivation layer on the electric field distribution was thus investigated using FEM electrostatics calculations. It was shown that the electric field strength increases in the concave region compared to the convex region of a model structure and the field distribution was therefore inverted compared to a purely metallic nanostructure. This result provides an additional explanation for the accumulation of proteins in the concave regions topographical nanostructures known from the literature.

The local electric field strength variation near topographical nanostructures is superimposed by geometric effects and topographically induced locally varying dispersion interactions. To elucidate the separate effect of the field distribution on the biosystem, thus, a topographically planar, electronically nanostructured model substrate was investigated. For this purpose, boron-doped silicon wafers were selectively ion implanted with 130 nm broad lines (260 nm pitch) of phosphorus. A preferred cell alignment along the line structure was observed that suggested a direct effect of the electronic nanostructure on the biosystem. The cell orientation potentially arised as a result of the partial lateral direction of the electric field lines over the electronic nanostructure. The effect of the electronic nanostructure on the adsorption of the cell adhesion protein fibronectin and the adhesion of human MG-63 osteoblasts could, however, be attributed to a shift of the average surface potential to a strong negative value in comparison to the electronically homogeneous wafer starting material. The results help to elucidate the effect of the electric field distribution near topographical nanostructures on cell morphology.

Inhaltsverzeichnis

1	Einführung	1
2	Grundlagen	5
2.1	Biomaterialien und Biokompatibilität	5
2.2	Fest-Flüssig-Grenzflächen	6
2.2.1	Elektrostatische Doppelschichtwechselwirkung	6
2.2.2	Van-der-Waals-Kräfte	8
2.2.3	DLVO-Theorie	9
2.3	Die Grenzfläche zwischen Biomaterial und Biosystem	10
2.3.1	Proteinadsorption	10
2.3.2	Zellbesiedlung	13
2.4	Halbleiter im Kontakt mit dem Biosystem	14
2.4.1	Halbleiter-Elektrolyt-Kontakt	14
2.4.2	pn-Übergang	16
2.4.3	MOS-Struktur	18
2.5	Untersuchungsmethoden	20
2.5.1	Röntgenphotoelektronenspektroskopie	21
2.5.2	Kapazitäts-Spannungs-Spektroskopie	21
2.5.3	Rasterkraftmikroskopische Methoden	22
2.5.4	Strömungspotentialmessung	27
2.5.5	Kontaktwinkelmessung zur Bestimmung der Oberflächen- energie	28
2.5.6	Immunfluoreszenzfärbung	30
2.5.7	Durchflusszytometrie	31
3	Elektrostatik an topografischen Nanostrukturen - Die Rolle von Pas- sivschichten	33
3.1	Die Elektrolytlösung	33
3.2	Die Passivierungsschicht	34
3.3	FEM-Modell	37

3.4	Ergebnisse	39
3.4.1	Die Grenzfläche zwischen Metall und Elektrolytlösung	39
3.4.2	Die Grenzfläche zwischen halbleitender Passivschicht und Elektrolytlösung	41
4	Der Einfluss elektronischer Nanostrukturen auf das Biosystem	45
4.1	Substratpräparation	45
4.2	Substratcharakterisierung	48
4.2.1	Messbedingungen	48
4.2.2	Chemische Oberflächeneigenschaften	51
4.2.3	Elektronische Eigenschaften	53
4.2.4	FEM-Elektrostatikberechnungen	57
4.2.5	Topografie und elektrisches Oberflächenpotential	58
4.2.6	Zeta-Potential	60
4.2.7	Benetzbarkeit und Oberflächenenergie	62
4.2.8	Kraftspektroskopische Analyse der Wechselwirkung zwischen Cantilever und Substrat	64
4.3	Biologische Untersuchungen	66
4.3.1	Messbedingungen	67
4.3.2	Adsorption von Fibronectin	70
4.3.3	Zelladhäsion	71
4.3.4	Zellmorphologie	74
5	Diskussion	79
5.1	Topografische TiO ₂ -Nanostruktur	79
5.2	Untersuchung des Modellsubstrats und seiner Wirkung auf das Biosystem	80
5.2.1	Lokale Variation der Oberflächeneigenschaften	81
5.2.2	Variation integraler Substrateigenschaften	84
5.2.3	Wirkung auf das Biosystem	88
6	Zusammenfassung und Ausblick	97
A	Anhang	103
A.1	Prozedur zur Untersuchung der Zellausrichtung	103
A.2	Einfluss der Topografie des Dotier-Liniengitters auf die Potentialverteilung	105

A.3 Ergänzende KPFM-Messungen	106
Abbildungsverzeichnis	106
Tabellenverzeichnis	109
Literaturverzeichnis	110
Thesen zur Dissertation	129
Publikationsliste	131
Danksagung	133
Selbständigkeitserklärung	135

Abkürzungsverzeichnis

AFM	Rasterkraftmikroskopie (engl. Atomic Force Microscopy)
AK	Antikörper
BSA	Bovines Serumalbumin
CPD	Kontaktpotentialdifferenz (engl. Contact Potential Difference)
DLVO	Theorie kolloidaler Suspensionen nach Derjaguin, Landau, Verwey und Overbeek
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
EZM	Extrazelluläre Matrix
FEM	Finite-Elemente-Methode
FKS	Fetales Kälberserum
FSC	vorwärts gestreut (engl. Forward Scatter)
GAG	Glykosaminoglykan
IEP	Isoelektrischer Punkt
IHP	Innere Helmholtz-Schicht (engl. Inner Helmholtz Plane)
KPFM	Raster-Kelvin-Mikroskopie (engl. Kelvin Probe Force Microscopy)
LSM	Laser-Scanning-Mikroskop
MOS	Metall-Oxid-Halbleiter(engl. Metal Oxide Semiconductor)
MUMPS	Multifrontal Massively Parallel Sparse Direct Solver
OHP	Äußere Helmholtz-Schicht (engl. Outer Helmholtz Plane)
OWRK	Modell nach Owens, Wendt, Rabel und Kaelble zur Bestimmung der Oberflächenenergie aus Kontaktwinkelmessungen
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (engl. Phosphate-Buffered Saline)

PHSRN	Aminosäuresequenz Prolin-Histidin-Serin-Arginin-Asparagin
PZC	Point of Zero Charge
REM	Rasterelektronenmikroskop
RGD	Aminosäuresequenz Arginin-Glycin-Asparginsäure
RLZ	Raumladungszone
SCE	Kalomelektrode (engl. Saturated Calomel Electrode)
SRIM	Stopping and Range of Ions in Matter
SSC	seitwärts gestreut (engl. Side Scatter)
vdW	van der Waals
XPS	Röntgenphotoelektronenspektroskopie (engl. X-Ray Photoelectron Spectroscopy)

1 Einführung

Medizinische Implantate werden je nach ihrer Funktion temporär oder dauerhaft jenseits der Haut- oder Schleimhautbarriere eingebracht, um Körperstrukturen zu unterstützen oder sogar zu ersetzen. Eine Grundlage für einen erfolgreichen Einsatz wird bereits während der Implantation mit der Benetzung der Implantatoberfläche durch Körperflüssigkeiten, wie z.B. Blut oder Serum, gelegt. Vor dem Kontakt mit dem Körpergewebe wird die Biomaterialoberfläche dabei mit einer Schicht aus Proteinen belegt, die die Wechselwirkung des synthetischen Materials mit gewebebildenden Zellen vermittelt. Die Adsorption der Proteine stellt daher einen entscheidenden Abschnitt bei der Integration eines Implantats in das umgebende Körpergewebe dar [1, 2]. Durch Modifikation physikochemischer Oberflächeneigenschaften lassen sich die Proteinadsorption, die Reaktion adhärenter Zellen und damit letztlich die Reaktion des umgebenden Gewebes auf ein Biomaterial beeinflussen [2–5]. Zu diesem Zweck kommen neben funktionellen Beschichtungen, die die Oberflächenchemie verändern [5, 6], vor allem topografische Modifikationen zum Einsatz [7, 8]. Beispielsweise kann die Stabilität und Dauerhaltbarkeit der Verankerung einer Endoprothese im Knochenlager durch eine topografische Strukturierung der Implantatoberfläche entscheidend verbessert werden [9]. Im Falle von Kurzzeitimplantaten, wie z.B. Marknägeln, die bei der Bruchversorgung von Röhrenknochen zum Einsatz kommen, werden hingegen polierte Oberflächen eingesetzt. Diese sollen eine stabile Verbindung zwischen Knochen und Implantat möglichst unterbinden, damit bei einer späteren Explantation keine größeren Defekte im Gewebe entstehen [10].

Trotz des erfolgreichen Einsatzes topografischer Oberflächenmodifikationen bei diesen und weiteren Anwendungsbeispielen sind viele der grundlegenden Prozesse, die im Biosystem an einer solchen strukturierten Oberfläche auf molekularer und Zellebene ablaufen, weitgehend unverstanden, und die Erforschung verbesserter Biomaterialien erfolgt überwiegend durch Probieren [11]. Um topografische Oberflächenstrukturen gezielter für medizinische Anwendungen zu nutzen, ist daher ein besseres Verständnis dieser Prozesse notwendig.

Stochastische Topografien, wie sie für gewöhnlich auf Implantaten im Bereich der

Endoprothetik und der oralen Implantologie eingesetzt werden, setzen sich aus einem breiten Spektrum von Strukturgrößen im Mikro- bis Nanometerbereich zusammen, die alle gleichzeitig auf das Biosystem wirken und so die Interpretation seiner Reaktion erschweren. Daher werden bereits seit Mitte des vergangenen Jahrhunderts periodische Strukturen (z.B. Pfosten- oder Grabenstrukturen) eingesetzt, um die Komplexität dieser Fragestellung auf der Materialseite zu reduzieren [12]. Neben der Ausrichtung von Zellen entlang von Grabenstrukturen oder ähnlichen anisotropen Oberflächenstrukturen durch die sogenannte Kontaktführung (engl. Contact Guidance) konnte seither ein Einfluss von Mikrostrukturen beispielsweise auf die Zelladhäsion [13, 14] sowie auf eine Vielzahl weiterer Zellfunktionen nachgewiesen werden [13, 15–18].

Ein aktuelles Forschungsgebiet sind topografische Nanostrukturen und ihre Wirkung auf das Biosystem. In einer Reihe von Studien konnte gezeigt werden, dass sowohl die Proteinadsorption selbst [2, 19–22] als auch die Adhäsion von Zellen auf einer Biomaterialoberfläche durch Nanotopografien beeinflusst werden [2, 21, 23, 24]. Die Bindung der Zellen an das Biomaterial hat wiederum Einfluss auf viele Zellfunktionen, darunter die Proliferation, Morphologie und Differenzierung [25]. Diese Strukturen werden daher als ein Schlüsselfaktor zur Regulierung des Biosystems im Kontakt mit Biomaterialien angesehen [2].

Von einigen Autoren wird die elektrostatische Wechselwirkung als eine der Haupttriebkraft der Proteinadsorption angesehen [26–29]. So werden als mögliche Erklärung für den Wirkungsmechanismus topografischer Nanostrukturen oftmals lokal erhöhte elektrische Feldstärken nahe Spitzen und Kanten angeführt, die die Proteinadsorption modulieren [30–34] und dadurch die nachfolgende Zelladhäsion beeinflussen [8, 11, 24]. Die Wirkung der lokal veränderlichen elektrischen Oberflächeneigenschaften auf das Biosystem an realen topografisch strukturierten Biomaterialoberflächen ist jedoch untrennbar mit weiteren Effekten, wie lokal variierenden Dispersionswechselwirkungen und geometrischen Einflüssen verknüpft [20, 22, 24, 30–32, 34]. Wie stark jeder der einzelnen Faktoren an solchen Strukturen auf das Biosystem wirkt, konnte aus diesem Grunde bisher nicht mit Bestimmtheit gesagt werden.

Ausgehend von dieser komplexen biologischen und physikochemischen Situation an der topografisch nanostrukturierten Fest-Flüssig-Grenzfläche ergeben sich zwei Fragestellungen, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit behandelt werden. Zum einen

stellt sich die Frage, welchen Einfluss eine Nanotopografie auf die Verteilung der oberflächennahen elektrischen Felder an der Grenzfläche zwischen Biomaterial und der Körperflüssigkeit hat, und wie sich die für viele metallische Implantatmaterialien relevante native Passivierungsschicht auf die Feldverteilung auswirkt. Zum anderen ist die konkrete Rolle der elektrischen Feldverteilung einer Nanostruktur bei der Proteinadsorption und bei der Zellbesiedlung Ziel der Untersuchungen.

Die Variation der elektrischen Feldstärke nahe einer topografischen Nanostruktur wird mit Hilfe von FEM-Elektrostatikberechnungen untersucht. Als Modellsystem wird hierfür eine Nanotopografie aus Titan im Kontakt mit einer Elektrolytlösung mit physiologischer Salzkonzentration betrachtet. Dabei wird der Einfluss einer nativen Passivierungsschicht auf die Feldverteilung berücksichtigt, die entgegen der einfachen Modellvorstellung einer rein metallischen Oberfläche bei den meisten metallischen Biomaterialien im direkten Kontakt mit dem Biosystem steht. Die Berechnungen unterstützen und ergänzen die von Elter et al. [22, 34] durchgeführten experimentellen Untersuchungen und Computersimulationen der Proteinadsorption an topografisch nanostrukturierten Biomaterialoberflächen.

Um die Rolle der elektrischen Feldverteilung von topografisch nanostrukturierten Biomaterialoberflächen bei der Proteinadsorption sowie bei der Zellbesiedlung aufzuklären, wird in der vorliegenden Arbeit ein Halbleiter-Modellsubstrat, das die lokale Variation der elektrischen Feldstärke einer topografischen Nanostruktur nachbildet, vorgeschlagen und untersucht. Dabei weist das Modellsubstrat jedoch eine vernachlässigbare topografische Variation auf. Lokal variierende Dispersionswechselwirkungen und geometrische Effekte werden dadurch ausgeschlossen. Die aus der Materialcharakterisierung gewonnenen Erkenntnisse werden dabei mit Hilfe biologischer Untersuchungsmethoden verifiziert.

2 Grundlagen

2.1 Biomaterialien und Biokompatibilität

Die genaue Definition des Begriffs Biomaterial ist seit einigen Jahren Gegenstand zahlreicher Debatten und wurde bis heute mehrfach geändert und ergänzt. Eine einheitliche Terminologie konnte erst 1986 mit der Consensus Conference on Definitions in Biomaterials der Europäischen Gesellschaft für Biomaterialien erreicht werden. Nach der dort beschlossenen Definition ist ein Biomaterial „ein nichtlebender Werkstoff für Medizinprodukte, der dafür vorgesehen ist, mit biologischen Systemen in Wechselwirkung zu treten“ [35]. Eine Grundvoraussetzung für die Verwendbarkeit eines Werkstoffs als Biomaterial ist dabei seine Biokompatibilität. Unter dieser wird die Verträglichkeit zwischen technischem und biologischem System verstanden [36]. Im Allgemeinen wird ein Biomaterial als biokompatibel angesehen, wenn es in Kontakt mit biologischem Gewebe die beabsichtigte therapeutische Funktion ausübt, ohne dabei unerwünschte lokale oder systemische Nebeneffekte auszulösen [37]. Die Integrationseigenschaften eines Biomaterials werden direkt durch die hauptsächlich an der Grenzfläche zum biologischen System stattfindenden Gewebereaktionen bestimmt. Je nach Art dieser Reaktionen werden biokompatible Werkstoffe in drei Kategorien eingeteilt [36]:

- Inerte Materialien werden mit einer nicht adhärenen Bindegewebskapsel umgeben,
- bioaktive Materialien bilden eine feste Bindung mit funktionellem Gewebe aus,
- degradable Materialien können von körpereigenem Gewebe ersetzt werden.

2.2 Fest-Flüssig-Grenzflächen

2.2.1 Elektrostatistische Doppelschichtwechselwirkung

In Kontakt mit Flüssigkeiten bilden Festkörper, Partikel, Proteine etc. eine Oberflächenladung aus. Dies geschieht beispielsweise durch Dissoziation von gebundenen Carboxyl- ($-\text{COOH} \rightarrow -\text{COO}^- + \text{H}^+$) und/oder Hydroxygruppen ($-\text{OH} \rightarrow -\text{O}^- + \text{H}^+$), durch Adsorption oder Bindung von Ionen aus der Lösung (z.B. $-\text{OH}^-$) und durch Elektronenaustausch an der Grenzfläche [3, 38]. Die Oberflächenladung wird in der Flüssigkeit durch eine ionische Gegenladung kompensiert, so dass das Gesamtsystem elektrisch neutral bleibt.

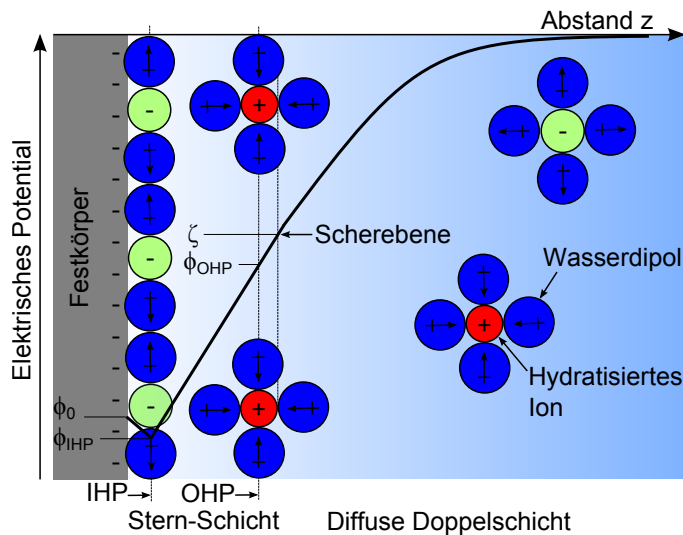


Abb. 2.1: Schematische Darstellung der elektrochemischen Doppelschicht und des Verlaufs des elektrischen Potentials nach dem Modell von Stern. An die immobile Stern-Schicht, bestehend aus der inneren (IHP) und äußeren Helmholtz-Schicht (OHP), schließt sich an der hydrodynamischen Scherebene die mobile oder auch diffuse Doppelschicht an, nach [39].

Nach Stern [40] setzt sich diese Gegenladung aus einem starren Anteil (der sogenannten Stern-Schicht) und dem von Gouy [41] und Chapman [42] erstmals beschriebenen diffusen Anteil zusammen (s. Abb. 2.1). Die Stern-Schicht wird wiederum in die innere Helmholtz-Schicht (engl. Inner Helmholtz plane; IHP) und die äußere Helmholtz-Schicht (engl. Outer Helmholtz plane; OHP) unterteilt. Die IHP besteht aus adsorbierten Ionen, die ihre Hydrathülle teils oder komplett abgestreift haben und so dichter an der Oberfläche adsorbieren können. Der kleinste Abstand, in dem sich zur Oberfläche entgegengesetzt geladene hydratisierte Ionen anlagern können, entspricht der Grenze der OHP.

Die Stern-Schicht kann als Kapazität beschrieben werden, mit einem zur Oberflä-

chenladung σ_0 des Festkörpers proportionalen Potentialabfall $\Delta\phi_S$ [38]:

$$\Delta\phi_S = \phi_0 - \phi_{OHP} = \frac{d_{OHP}}{\epsilon}\sigma_0. \quad (2.1)$$

Mit dem Oberflächenpotential ϕ_0 , dem elektrischen Potential ϕ_{OHP} an der Grenze der OHP, der Dicke d_{OHP} und der Permittivität ϵ der Stern-Schicht. Die Verteilung der Ionenkonzentration in der Elektrolytlösung in der diffusen Doppelschicht kann mit Hilfe der Boltzmann-Verteilung in folgender Form beschrieben werden [43]:

$$c_i(\vec{r}) = c_i^0 \exp\left(\frac{-q_i\phi(\vec{r})}{k_B T}\right), \quad (2.2)$$

mit der Elektrolytkonzentration c_i^0 in weiter Entfernung von der Oberfläche, der Ionenladung q_i , dem elektrischen Potential ϕ am Ort \vec{r} , der Boltzmann-Konstante k_B und der absoluten Temperatur T . Einsetzen von Gl. 2.2 in die Poisson-Gleichung

$$\vec{\nabla} \left(\epsilon(\vec{r}) \vec{\nabla} \phi(\vec{r}) \right) = -\rho(\vec{r}) = -\sum_i q_i c_i, \quad (2.3)$$

die das Potential mit der lokalen Ladungsträgerdichte ρ verknüpft, liefert die Poisson-Boltzmann-Gleichung [43]

$$\vec{\nabla} \left(\epsilon(\vec{r}) \vec{\nabla} \phi(\vec{r}) \right) = -\rho(\vec{r}) = -\sum_i q_i c_i^0 \exp\left(\frac{-q_i\phi(\vec{r})}{k_B T}\right). \quad (2.4)$$

Gouy [41] und Chapman [42] gaben für den vereinfachten Fall, dass die Permittivität in der Elektrolytlösung konstant ist und für moderate Oberflächenpotentiale eine Lösung von Gl. 2.4 in eindimensionaler Betrachtung an:

$$\phi(z) = \phi_0 \exp\left(-\frac{z}{\kappa}\right). \quad (2.5)$$

Dabei ist z der Abstand zur Oberfläche und κ die Debye-Länge, eine für die Elektrolytlösung charakteristische Abschirmlänge, in der das elektrische Potential der lokalen Überschussladung auf das $1/e$ -fache abfällt [38]. Diese liegt für Elektrolytlösungen mit physiologischer Salzkonzentration ($\approx 0,1$ M) bei näherungsweise 1 nm [44].

Die Grenze zwischen Stern- und diffuser Schicht entspricht für planare Oberflächen näherungsweise der hydrodynamischen Grenze zwischen Festkörper und Flüssigkeit [39]. Das elektrische Potential an dieser Scherebene, das sogenannte Zeta-Potential ζ , das die elektrischen Oberflächeneigenschaften eines Materials in Flüssigkeit charakterisiert [39], kann für moderate Zeta-Potentiale mit dem Oberflächenpotential über die Gleichung

$$\phi_0 = \zeta \exp\left(\frac{d_{OHP}}{\kappa}\right) \quad (2.6)$$

verknüpft werden [45].

Nähern sich zwei Partikel oder ein Partikel an eine Oberfläche soweit an, dass sich ihre Doppelschichten überlagern, treten zwischen ihnen repulsive Wechselwirkungen auf, die entgegen der landläufig verbreiteten Meinung nicht elektrostatischer, sondern osmotischer Natur sind [38]: Im Überlappungsbereich erfolgt eine Erhöhung der Gegenionenkonzentration, wodurch ein osmotischer Überdruck aufgebaut wird. Für die Doppelschicht-Wechselwirkungsenergie U_{DS} zwischen einem Makromolekül/einer Kugel mit dem Radius R und einer planaren Oberfläche mit demselben Oberflächenpotential ϕ_0 ergibt sich in einer 1:1-Elektrolytlösung die Beziehung [38]:

$$U_{DS} = RZ \exp(-\kappa z). \quad (2.7)$$

Dabei ist $Z = 64\pi\epsilon(k_B T/e_0)^2 \tanh^2(qe_0\phi_0/4k_B T)$ eine Wechselwirkungskonstante mit der Elementarladung e_0 und der Ladungszahl q der Elektrolytionen.

2.2.2 Van-der-Waals-Kräfte

Unter dem Sammelbegriff der van-der-Waals (vdW)-Kräfte werden nicht-kovalente Kräfte zwischen einzelnen Atomen und/oder Molekülen zusammengefasst, deren Wechselwirkungsenergie U_{vdW} mit der sechsten Potenz des Abstandes r abfällt:

$$U_{vdW}(r) = -\frac{C}{r^6}. \quad (2.8)$$

Sie werden unterteilt in Kräfte zwischen permanenten Dipolen (Keesom-Wechselwirkung), zwischen einem permanenten und einem induzierten Dipol (Debye-Wechselwirkung) und zwischen fluktuierenden (also sich gegenseitig induzierenden) Dipolen (London-Wechselwirkung) [38]. Dabei ist C ein Wechselwirkungskoeffizient, der die Stärken der drei vdW-Wechselwirkungen aufsummiert [38]. Die London-Wechselwirkung, oder auch Dispersions-Wechselwirkung, liefert in Flüssigkeit für gewöhnlich den größten Beitrag zu den vdW-Wechselwirkungen [38] und spielt bei Adsorptionsvorgängen in Flüssigkeit eine besondere Rolle, da sie allgegenwärtig ist und Ionen und Proteine unabhängig von ihrer Ladung auf einer Oberfläche gegen Desorption stabilisiert [11].

2.2.3 DLVO-Theorie

Die Gesamtwechselwirkung von Partikeln und Oberflächen in Flüssigkeit muss sowohl die Doppelschicht- als auch die van-der-Waals-Wechselwirkung berücksichtigen. Die nach Derjaguin und Landau [46] und Verwey und Overbeek [47] benannte DLVO-Theorie konnte durch Aufsummierung beider Wechselwirkungen einfache Kriterien für die Stabilität kolloidaler Suspensionen ableiten und so erfolgreich eine Vielzahl experimentell beobachteter Phänomene erklären [38].

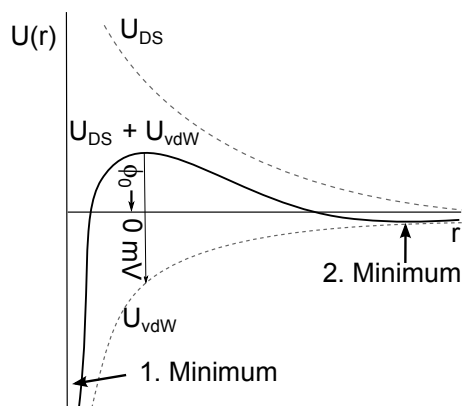


Abb. 2.2: Prinzipieller Verlauf der Wechselwirkungspotentiale in einer Elektrolytlösung in Abhängigkeit vom Abstand zur Oberfläche. Die Wechselwirkungsenergie ist proportional zur Partikelgröße (Radius) bzw. zur Wechselwirkungsfläche (zwischen zwei planaren Oberflächen), nach [38].

Abb. 2.2 stellt das resultierende Wechselwirkungspotential als Funktion des Abstandes zwischen zwei Körpern dar. Aus der Aufsummierung von U_{DS} und U_{vdW} ergibt sich in Abhängigkeit von der Konzentration der Elektrolytlösung und der Oberflächenladungsdichte eine langreichweitige Abstoßung mit einer mehr oder weniger stark ausgeprägten Energiebarriere, die eine Adsorption im ersten energetischen Minimum verhindern kann. Dennoch kann für stärker konzentrierte Elek-

trolytlösungen ein zweites energetisches Minimum entstehen, in dem das System als kinetisch stabil bezeichnet wird (im Gegensatz zum thermodynamisch stabilen Zustand im ersten Energieminimum). Für geringe Oberflächenladungen bzw. den Fall $\phi_0 \rightarrow 0$ nähert sich die Wechselwirkungskurve der reinen van-der-Waals-Wechselwirkungskurve an, die zwei Körper ziehen sich in diesem Fall stark über große Reichweiten an [38].

2.3 Die Grenzfläche zwischen Biomaterial und Biosystem

Abb. 2.3 zeigt eine schematische Darstellung der Grenzfläche zwischen Biomaterial und biologischem System. Diese setzt sich aus dem Festkörper und der umgebenden physiologischen Flüssigkeit zusammen, die neben Wasser anorganische Ionen (Na^+ , Cl^- , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} etc.), Proteine, Lipide und Glykosaminoglykane (GAG) enthält [48]. Viele medizinisch relevante Biomaterialien, wie etwa Titan und seine Legierungen, bilden außerdem eine Passivierungsschicht aus, deren Eigenschaften bei der Wechselwirkung mit dem biologischen System berücksichtigt werden müssen (s. Kapitel 3).

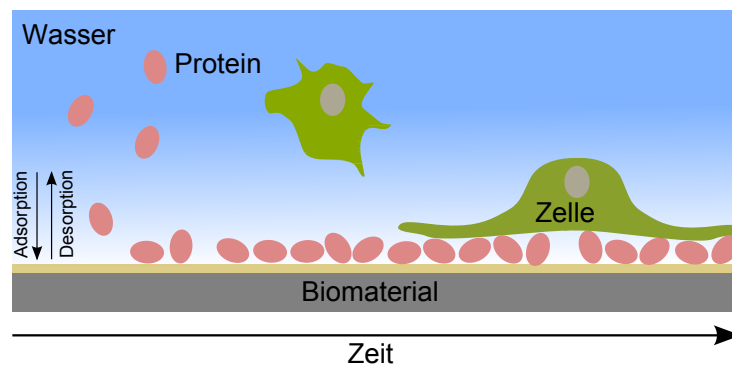


Abb. 2.3: Vereinfachte Darstellung der Grenzfläche zwischen Biomaterial und Biosystem, nach [11].

2.3.1 Proteinadsorption

An der Grenzfläche laufen eine Vielzahl von physikalischen, chemischen und biologischen Prozessen ab. Nach der Bildung der elektrochemischen Doppelschicht er-

folgt mit der Adsorption von Proteinen an der Festkörperoberfläche der initiale biologische Prozess, der mit dem Kontakt zwischen Biomaterial und Biosystem einhergeht [11, 49]. Dieser wird von den Eigenschaften und der Konzentration der Proteine, der Zusammensetzung der umgebenden biologischen Flüssigkeit sowie den Eigenschaften des Biomaterials beeinflusst [22, 29, 49, 50] und entscheidet im Wesentlichen über die Biokompatibilität des Materials [11]. Durch Diffusion bewegen sich die Proteine aus der Flüssigkeit in Richtung der Biomaterialoberfläche, wo sie abhängig von den auftretenden Wechselwirkungen adsorbieren können [11, 49].

Der Prozess der Adsorption aus einem Proteingemisch ist schematisch in Abb. 2.4 dargestellt. Entsprechend ihrer größeren Beweglichkeit diffundieren kleine Proteine aus der Lösung im Mittel schneller zur Oberfläche als große und adsorbieren dort zuerst. Serumalbumin als kleines Protein, das in einer hohen Konzentration im Serum vorliegt, adsorbiert sehr schnell, gefolgt von größeren Proteinen wie z.B. Immunglobulinen, Fibrinogen und Fibronectin [49, 51]. Je nach Material- und Proteineigenschaften können größere Proteine eine höhere Affinität zur Oberfläche aufweisen, d.h. sie können potentiell mehr Bindungen mit der Substratoberfläche ausbilden. Proteine mit geringerer Affinität können so verdrängt werden. Die adsorbierte Proteinschicht ist daher einem ständigen Umbau ausgesetzt (Vroman-Effekt) [52].

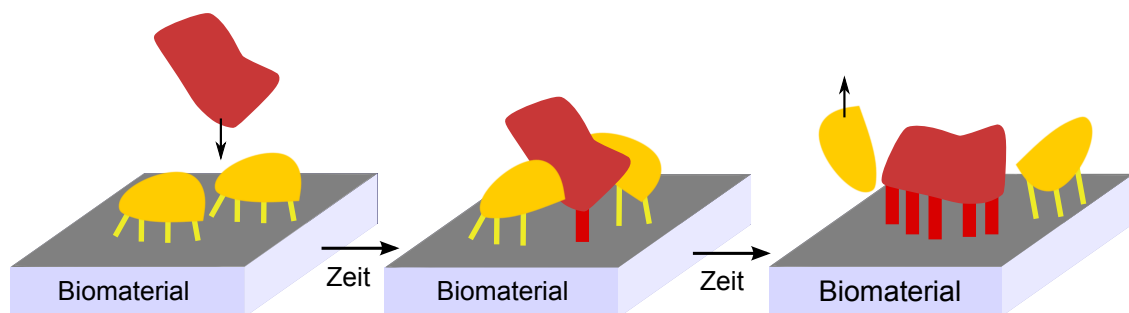


Abb. 2.4: Schema der konkurrierenden Adsorption verschiedener Proteine (Vroman-Effekt). Auf der linken Seite der drei Teilabbildungen sind zwei gelbe Proteine bereits adsorbiert (symbolisiert durch die Linien). Aufgrund der größeren Affinität zur Oberfläche verdrängt das langsamer adsorbierende rote Protein mit der Zeit die gelben Proteine. Nach [49]

Das an der Grenzfläche gebildete komplexe Netzwerk aus Biomolekülen wird als extrazelluläre Matrix (EZM) bezeichnet. Die EZM vermittelt über Adhäsionsfaktoren spezifische Bindungsstellen für Zellen, die über Transmembranproteine in der Zellmembran, die sogenannten Integrine, an diese Bindungsstellen andocken [53]. Zellen, die die Oberfläche erreichen, wenn die erste Adsorption von Proteinen bereits

stattgefunden hat, „sehen“ somit nicht mehr nur die bloße Biomaterialoberfläche, sondern eine Proteinschicht, deren Struktur und Zusammensetzung die Wechselwirkung des Biomaterials mit dem Biosystem bestimmt [11].

Im Kontakt mit einer Biomaterialoberfläche können Proteine je nach Stärke der Protein-Substrat- und der Protein-Protein-Wechselwirkungen ihre Form verändern und aufgrund dieser Konformationsänderung ihre biologische Funktion verlieren [11]. Abb. 2.5 stellt die Entstehung von Konformationsänderungen auf einer Biomaterialoberfläche schematisch dar.

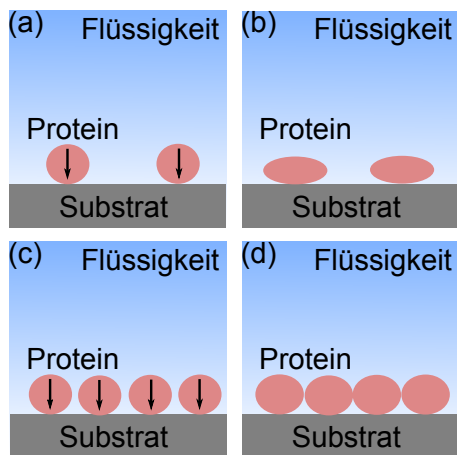


Abb. 2.5: Schematische Darstellung der Oberflächendenaturierung von Proteinen. (a),(b) Geringe Proteinkonzentration: Die Proteine breiten sich auf der Oberfläche aus und können dabei von einem nativen (a) in einen denaturierten Zustand (b) übergehen. (c),(d) Eine höhere Proteinkonzentration kann der Oberflächendenaturierung entgegenwirken, nach [11].

Einer der wichtigsten Adhäsionsfaktoren der EZM ist das Glykoprotein Fibronectin [11]. Der prinzipielle Aufbau des Makromoleküls ist in Abb. 2.6 dargestellt. Es besteht aus zwei Polypeptidketten, die sich in ihrem Aufbau nahezu gleichen, und am C-Terminus über Disulfidbrücken verbunden sind. Die Ketten sind jeweils modular aus Domänen vom Typ FNI, FNII und FNIII aufgebaut. Es sind Bindungsstellen zu Komponenten der EZM, wie z.B. Kollagen und Heparin vorhanden und darüber hinaus finden sich spezifische Bindungssequenzen für zahlreiche Zellrezeptoren. Insbesondere die wichtige (Arginin-Glycin-Asparaginsäure; RGD)- und die (Prolin-Histidin-Serin-Arginin-Asparagin; PHSRN)-Zellbindungssequenz befinden sich in zwei benachbarten FNIII-Domänen [54, 55]. Im Gegensatz zu den FNI- und FNII-Domänen, die durch Disulfidbrücken in ihrer Struktur stabilisiert werden, enthält die FNIII-Domäne keine derartige Bindung und kann durch Protein-Substrat-Wechselwirkungen ihren Faltungszustand verändern. Im Falle einer Konformationsänderung der RGD- bzw. der PHSRN-Sequenz wird davon ausgegangen, dass diese durch die Integrine der Zellen schlechter erreicht werden können und die Zelladhäsion eingeschränkt wird [11].

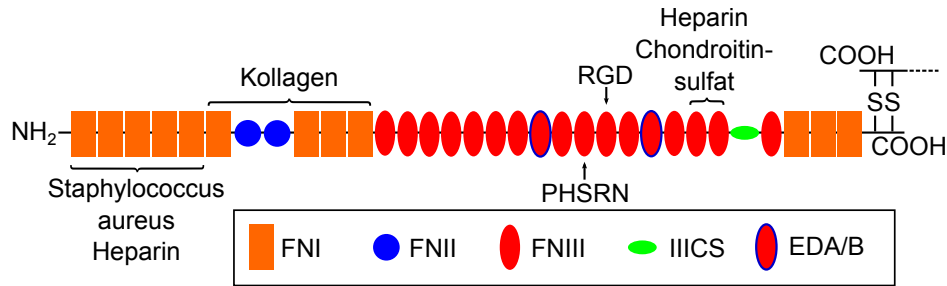


Abb. 2.6: Aufbau und Bindungsstellen von Fibronectin. Das Molekül ist aus zwei fast identischen Polypeptidketten aufgebaut, die über zwei Disulfidbrücken in der Nähe des C-Terminus miteinander verbunden sind. Die Ketten bestehen hauptsächlich aus aneinandergereihten Domänen vom Typ FNI, FNII und FNIII, nach [11,56].

Der isoelektrische Punkt (IEP) des Moleküls wird mit 5,5–6,0 angegeben [57]. Dadurch besitzt Fibronectin bei einem physiologischen pH-Wert von 7,4 eine negative Gesamtladung. Allerdings wird vermutet, dass die Wechselwirkung von Fibronectin mit einer geladenen Oberfläche durch die lokale Ladung von Bindungsgruppen gesteuert wird. Insbesondere die Heparin-Bindungsstellen im Molekül, die mit einem IEP von 8,2–9,0 bei pH 7,4 positiv geladen sind, werden als dominante Faktoren bei der elektrostatischen Wechselwirkung mit Oberflächen vermutet [57, 58].

2.3.2 Zellbesiedlung

Da die bei der Zellbesiedlung ablaufenden Vorgänge spezifisch für den jeweiligen Zelltyp und sehr komplex sind, werden diese hier nur schematisch wiedergegeben. Beim Kontakt einer Zelle mit einer Biomaterialoberfläche ist diese bereits mit der elektrochemischen Doppelschicht und der EZM belegt. Die Zelloberfläche und die sich darauf befindenden Proteine treten in Wechselwirkung mit der Grenzfläche. Daher beeinflusst der genaue Aufbau der Zellmembran die Zell-Material-Interaktion [11]. Die Zellmembran ist vereinfacht in Abb. 2.7 dargestellt. Sie besteht aus einer Lipid-Doppelmembran. Die Lipide sind dabei derart angeordnet, dass ihre hydrophoben Enden im Innern der Membran verborgen sind. Die spezifische Bindung an die EZM wird primär von den in der Zellmembran enthaltenen Integrinen bestimmt [25]. Dabei handelt es sich um Transmembranproteine, die eine Heterodimer-artige Struktur, bestehend aus einer α - und einer β -Unterstruktur, aufweisen. Allein im menschlichen Organismus sind 24 verschiedene Kombinationen dieser Unterstrukturen bekannt [25].

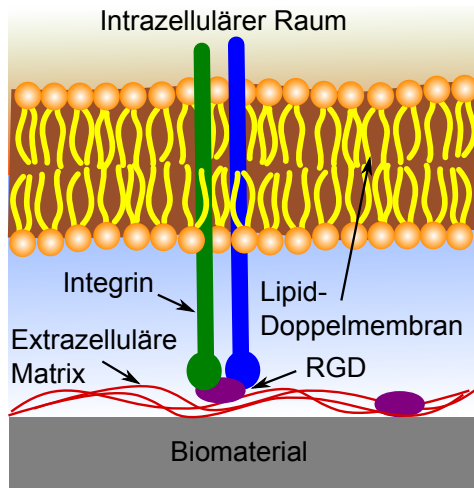


Abb. 2.7: Schematische Darstellung einer Zellmembran. Integrine verbinden die extrazelluläre Matrix mit dem intrazellulären Raum, nach [59].

In Abb. 2.7 ist zudem die prinzipielle Wirkungsweise der Integrine dargestellt. Diese binden an spezifische Bindungsstellen in der EZM, wie beispielsweise die RGD-Sequenz. Diese spezifischen Bindungen haben Einfluss auf viele Zellfunktionen, darunter die Proliferation, Morphologie und Differenzierung [25]. Darüber hinaus wird während der Besiedlung der Oberfläche von den Zellen selbst eine eigene EZM in den extrazellulären Raum sezerniert, und das bestehende Netzwerk aus Biomolekülen wird um- und abgebaut [60].

Neben der spezifischen Bindung an die EZM ist die Zelle ebenso nicht-spezifischen Kräften, also vor allem der elektrostatischen und den Dispersionskräften, an der Grenzfläche ausgesetzt [11]. Insbesondere in der Anfangsphase der Adhäsion liefern diese einen wichtigen Beitrag, wenn die spezifische Bindung noch nicht so weit fortgeschritten ist. Osteoblastenzellen tragen bei physiologischem pH-Wert beispielsweise eine negative Nettoladung, die mit den elektrischen Feldern an der Grenzfläche in Wechselwirkung tritt [33].

2.4 Halbleiter im Kontakt mit dem Biosystem

2.4.1 Halbleiter-Elektrolyt-Kontakt

Wird ein Halbleiter in Kontakt mit einer Elektrolytlösung gebracht, treten über die Fest-Flüssig-Phasengrenze hinweg Elektronentransferreaktionen auf, die die Bildung einer Potentialdifferenz zur Folge haben (s. Abb. 2.8). Diese setzt sich aus dem

Potentialabfall im Halbleiter ($\Delta\phi_{HL}$) und im Elektrolyten ($\Delta\phi_{EL}$) zusammen und wird durch die Differenz des Fermi-Niveaus E_F im Halbleiter und des Redoxpotentials E_{Red} im Elektrolyten bestimmt [44]. Für ihre Berechnung ist die Bezugnahme beider Energiewerte auf eine gemeinsame Referenz, beispielsweise die Kalomelelektrode (engl. Saturated Calomel Electrode; SCE), notwendig. Im Gegensatz zu einem Metall, bei dem sich die Oberflächenladung in einer sehr dünnen Schicht befindet, ist die Ladung im Halbleiter in einer Raumladungsschicht verteilt. Die Änderung des Potentials $\Delta\phi_{HL}$ kann wie bei der Gouy-Chapman-Theorie über die Poisson-Gleichung berechnet werden, wobei im nicht-entarteten Fall, d.h. das Fermi-Niveau befindet sich weder im Leitungs- noch im Valenzband, die Boltzmann-Statistik angewendet werden kann [44].

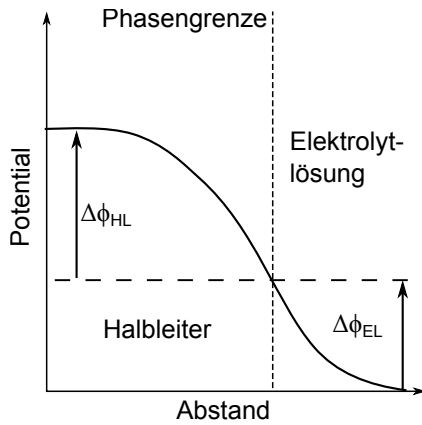


Abb. 2.8: Schematischer Verlauf des Potentials an der Phasengrenze zwischen Halbleiter und Elektrolytlösung, nach [44].

Die Ladungsdichte ρ im Bereich der Raumladung entspricht für einen n-leitenden Halbleiter demnach gleich die Summe der statischen ionisierten Donatordichte N_D^+ und der mobilen Elektronendichte n [44]

$$\rho_n(\vec{r}) = N_D^+ - n(\vec{r}) = N_D^+ \left(1 - \exp \frac{e_0\phi(\vec{r})}{k_B T} \right) \quad (2.9)$$

und für einen p-leitenden Halbleiter gleich der Summe der statischen ionisierten Akzeptordichte N_A^- und der mobilen Löcherdichte p :

$$\rho_p(\vec{r}) = N_A^- + p(\vec{r}) = N_A^- \left(1 + \exp \frac{-e_0\phi(\vec{r})}{k_B T} \right). \quad (2.10)$$

2.4.2 pn-Übergang

Die einfachste mittels Dotierung erzeugbare Halbleiterstruktur ist der sogenannte pn-Übergang. Dieser besteht aus zwei Regionen mit unterschiedlicher Dotierung, wobei in den negativ (n)-dotierten Bereich fünfwertige Elemente (Donatoren) und in den positiv (p)-dotierten Bereich dreiwertige Elemente (Akzeptoren) in das Siliziumgitter eingebracht werden und dort die vierwertigen Siliziumatome ersetzen. Somit stehen im n-Bereich zusätzliche Elektronen und im p-Bereich zusätzliche Löcher als frei bewegliche Ladungsträger zur Verfügung. Ändert sich die Konzentration dieser Störstellen (Donatorkonzentration N_D , Akzeptorkonzentration N_A) sprunghaft an der Grenze vom p- zum n-Gebiet, wird der Übergang als abrupt bezeichnet. Gilt außerdem $N_A \ll N_D$ oder $N_A \gg N_D$, handelt es sich um einen einseitigen oder asymmetrischen Übergang [61].

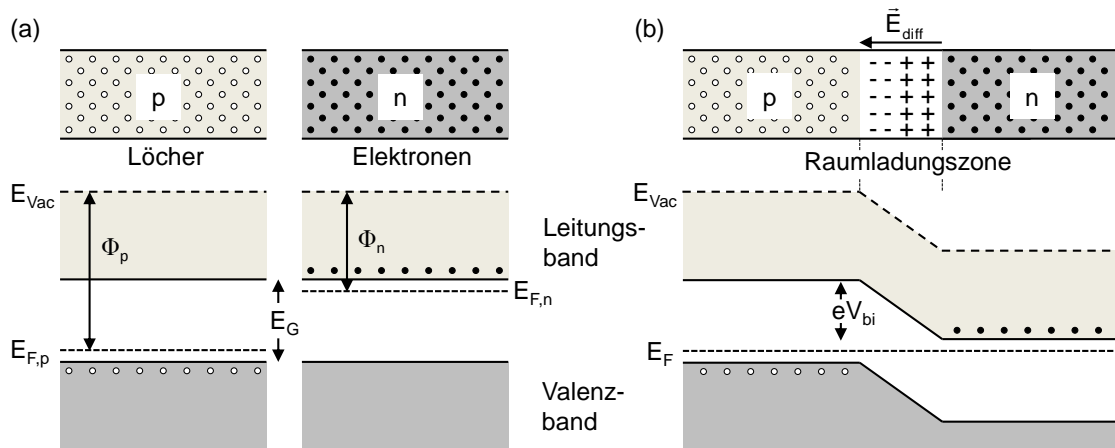


Abb. 2.9: Bändermodell des pn-Übergangs (a) vor der Verbindung von p- und n-Halbleiter und (b) nach der Verbindung im thermischen Gleichgewicht.

Das Bändermodell eines p- und eines n-Halbleiters vor und nach der Verbindung im thermischen Gleichgewicht ist in Abb. 2.9 dargestellt. E_G bezeichnet die Bandlücke. Durch Diffusion in den jeweils entgegengesetzt dotierten Bereich findet ein Konzentrationsausgleich der Majoritätsträger (n-Halbleiter: Elektronen, p-Halbleiter: Löcher) statt. Elektronen streben in das p-dotierte Gebiet und rekombinieren dort mit Löchern. Löcher aus dem p-dotierten Gebiet wiederum bewegen sich in das n-dotierte Gebiet und rekombinieren dort mit freien Elektronen. Es bleiben ortsfeste ionisierte Donator- bzw. Akzeptoratome zurück, die eine Raumladungszone (RLZ) bilden. Das resultierende elektrische Feld \vec{E}_{diff} verhindert eine

weitere Diffusion, und es stellt sich ein thermisches Gleichgewicht ein. Im Bändermodell entspricht dies dem Angleichen der Fermi-Niveaus im p- und n-dotierten Gebiet. Es bildet sich eine interne elektrische Potentialdifferenz, die sogenannte Diffusionsspannung (engl. Built-in Voltage) V_{bi} , aus:

$$V_{bi} = \frac{k_B T}{q} \ln \frac{N_D N_A}{n_i^2}, \quad (2.11)$$

mit der Boltzmann-Konstante k_B , der Temperatur T und der intrinsischen Ladungsträgerdichte n_i . Die entstandene Potentialbarriere verhindert weitere Ladungsträgerbewegungen über die RLZ hinweg. Durch Anlegen einer externen Spannung V_a an den pn-Übergang wird die Potentialbarriere größer ($V_a < 0$ an den p-dotierten Bereich angelegt, entspricht einer Verbreiterung der RLZ) oder kleiner ($V_a > 0$ an den p-dotierten Bereich angelegt, entspricht einer Verkleinerung der RLZ).

Ausgehend von der Schottky-Näherung, bei der ausschließlich ionisierte Störstellen in der Raumladungszone angenommen werden und von einem abrupten Übergang zu den p- und n-dotierten elektrisch neutralen Bereichen ausgegangen wird, berechnet sich die Kapazität des pn-Übergangs C_j zu [61]

$$C_j = \sqrt{\frac{q\epsilon_S}{2(V_{bi} - V_a)} \frac{N_A N_D}{N_A + N_D}}. \quad (2.12)$$

Mit Hilfe der C-V-Spektroskopie kann die Dotierungskonzentration eines asymmetrischen pn-Übergangs bestimmt werden. Dafür wird $1/C^2$

$$\frac{1}{C_j^2} = \frac{2}{q\epsilon_S} \frac{N_A + N_D}{N_A N_D} (V_{bi} - V_a) \quad (2.13)$$

gegen die externe Spannung V_a aufgetragen. Die Dotierungskonzentration wird aus dem Anstieg der Kurve

$$\frac{d(1/C_j^2)}{dV_a} = -\frac{2}{q\epsilon_S} \frac{N_A + N_D}{N_A N_D} \quad (2.14)$$

bestimmt [61].

2.4.3 MOS-Struktur

Ideale MOS-Struktur

Die MOS-Struktur besteht aus dem Halbleitersubstrat, das auf der Vorderseite über eine dünne Oxidschicht mit einer Metallschicht, dem sogenannten Gate-Kontakt, verbunden ist. Auf der Rückseite bildet eine weitere Metallschicht einen ohmschen Kontakt (Bulk-Kontakt) mit dem Substrat.

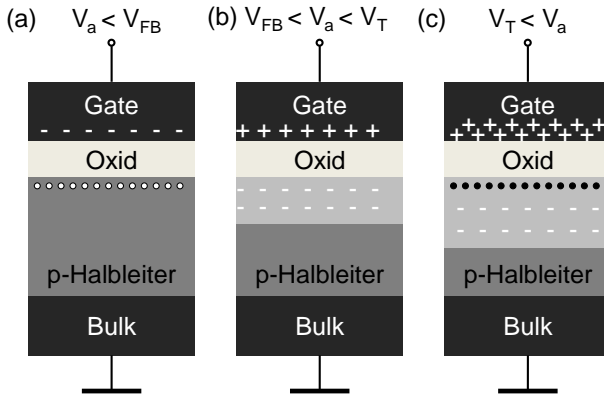


Abb. 2.10: Ladungsverteilung der nMOS-Struktur (p-Substrat) unter (a) Anreicherung, (b) Verarmung und (c) Inversion. V_{FB} ist die Flachbandspannung. Diese muss an das Gate angelegt werden, um den Flachbandfall herbeizuführen, in dem keine Ladungen im Halbleiter existieren. V_T ist die Schwellenspannung.

In Abhängigkeit von der an das Gate angelegten Spannung V_a sind drei Betriebsmodi der MOS-Struktur zu unterscheiden: Anreicherung, Verarmung und Inversion. Die drei Modi mit den dazugehörigen Ladungsträgerverteilungen sind für ein p-leitendes Substrat in Abb. 2.10 dargestellt. Für negative Spannungen stellt sich für die betrachtete nMOS-Struktur (p-leitendes Substrat) eine Anreicherung von Löchern an der Grenzfläche zwischen Oxid und Halbleiter ein (siehe Abb. 2.10a). Im Falle der Verarmung (siehe Abb. 2.10b) werden die beweglichen Löcher im Halbleiter durch eine positive Spannung verdrängt. Es bleibt eine negativ geladene Raumladungszone bestehend aus ionisierten Akzeptor-Störstellen zurück. Bei noch größeren positiven Spannungen bildet sich zusätzlich zur Raumladungszone eine negativ geladene Inversionsschicht bestehend aus Elektronen an der Grenzfläche zwischen Oxid und Halbleiter aus.

In Anreicherung verhält sich die MOS-Struktur wie ein Plattenkondensator mit der metallischen Gate-Elektrode, der Oxidschicht als Dielektrikum und dem Halbleiter als zweite Elektrode. Für $V_a < V_{FB}$ entspricht die Kapazität C_A der des Oxids:

$$C_A = C_{Oxid} = \frac{\epsilon_0 \epsilon_{Oxid}}{d_{Oxid}}. \quad (2.15)$$

In Verarmung wird die Kapazität der MOS-Struktur aus den in Reihe geschalteten Kapazitäten des Oxids und der Raumladungszone berechnet [62]:

$$\frac{1}{C_V} = \frac{1}{C_{Oxid}} + \frac{1}{C_{RLZ}}, \quad (2.16)$$

mit

$$C_{RLZ} = \frac{\epsilon_0 \epsilon_S}{d_{RLZ}}. \quad (2.17)$$

Die Ausdehnung der Raumladungszone und damit ihre Kapazität ist dabei abhängig vom Oberflächenpotential ϕ_S an der Grenzfläche zwischen Oxid und Halbleiter (entspricht der Bandverbiegung im Halbleiter) [62]:

$$d_{RLZ} = \sqrt{\frac{2\phi_S \epsilon_0 \epsilon_S}{qN_A}}. \quad (2.18)$$

Oberhalb der Schwellenspannung V_T kommt es zur Inversion im Halbleiter. Das Verhalten der Kapazität ist daher von der Reaktionszeit (engl. Response Time) der Minoritätsladungsträger (Elektronen für ein p-Substrat) abhängig [62]. Wird die Gatespannung V_a mit einer Wechselspannung ($V_0 \cdot \exp(i\omega t)$) überlagert, ergeben sich in Abhängigkeit von deren Frequenz (NF: Niederfrequenz, HF: Hochfrequenz) unterschiedliche Kapazitäten. Für niedrige Frequenzen (typischerweise < 10 Hz) befindet sich das System im thermischen Gleichgewicht. Genau wie im Anreicherungsregime ergibt sich für die NF-Kapazität in Inversion

$$C_{I,NF} = C_{Oxid}. \quad (2.19)$$

Bei hohen Frequenzen (typischerweise $> 10^5$ Hz) können die Minoritätsladungsträger ihre Konzentration nicht mehr an die schnell wechselnde Spannung anpassen [62]. Eine differentielle Änderung der Ladungsträgerdichte auf der Gate-Elektrode δQ_M führt daher zu einer Modulation der Ladungsdichte $-\delta Q_{RLZ}$ durch Majoritätsladungsträger an der Grenze der in Inversion maximal ausgedehnten Raumladungszone ($d_{RLZ,max}$) zum elektrisch neutralen Substrat. Die HF-Kapazität in

Inversion ergibt sich somit zu

$$\frac{1}{C_{I,HF}} = \frac{1}{C_{Oxid}} + \frac{1}{C_{RLZ,max}}. \quad (2.20)$$

Reale MOS-Struktur

Der ideale MOS wurde zum Verständnis der prinzipiellen Vorgänge, die sich in der Struktur abspielen, eingeführt. In der Realität verändert jedoch das Vorhandensein von Oxidladungen die elektrischen Eigenschaften. Diese Ladungen setzen sich dabei aus drei Anteilen zusammen: eine feste Ladung an der Grenzfläche zwischen Silizium und SiO_2 , eine im Oxid verteilte ortsfeste Ladung und beweglichen Ladungen, die durch die Gegenwart von Alkalimetallatomen, wie z.B. Natrium oder Kalium, bei der Prozessierung der Wafer hervorgerufen werden [62]. Letztere können durch eine saubere Prozessführung vermieden werden und wurden daher für die untersuchten Wafer ausgeschlossen.

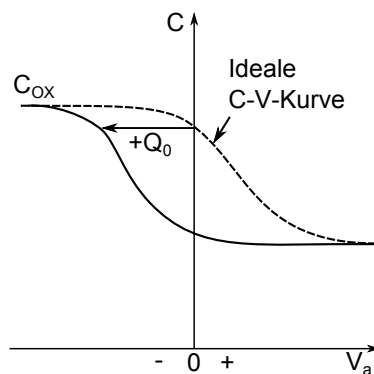


Abb. 2.11: Hochfrequenz-Kapazität einer MOS-Struktur in Abhängigkeit von der Gate-Spannung V_a . Eine positive Oxidladung an der Grenzfläche zwischen p-dotiertem Silizium und SiO_2 verschiebt die Kurve zu negativen Spannungen, nach [62].

Abb. 2.11 zeigt den Einfluss einer positiven Oxidladung $+Q_0$ an der Grenzfläche zwischen Oxid und p-leitendem Silizium. Die ideale Kapazitäts-Kurve wird zu negativen Gate-Spannungen verschoben.

2.5 Untersuchungsmethoden

Im Folgenden werden die für die Substratcharakterisierung und die biologischen Untersuchungen genutzten Methoden vorgestellt. Es wurden Methoden gewählt, die

eine oberflächensensitive Charakterisierung chemischer, elektrischer und energetischer Eigenschaften der Substrate, vor allem auch im Kontakt mit Flüssigkeiten, leisten.

2.5.1 Röntgenphotoelektronenspektroskopie

Die Röntgenphotoelektronenspektroskopie (engl. X-ray Photoelectron Spectroscopy; XPS) ist mit einer maximalen Informationstiefe von 10 nm und einer Nachweisgrenze von 0,1 Atomprozent eine sehr oberflächensensitive Untersuchungsmethode [63]. Die zu untersuchenden Proben werden dafür mit Röntgenstrahlung bekannter Energie bestrahlt, was zur Photoionisation der in der Probe enthaltenen Elemente führt. Rumpfelektronen werden emittiert und ihre kinetische Energie E_{kin} gemessen.

Aus der Beziehung

$$E_B = h\nu - E_{kin} - W, \quad (2.21)$$

mit der Photonenenergie $h\nu$, der kinetischen Energie E_{kin} der Elektronen und der Austrittsarbeit W des Spektrometers, lässt sich die Bindungsenergie E_B der emittierten Elektronen berechnen, die sowohl eine Aussage über das emittierende Element als auch über das atomare Energieniveau des Elektrons macht. Je nachdem in welcher chemischen Form ein Element vorliegt, zeigen XPS-Spektren zudem Unterschiede in der Bindungsenergie der Rumpfelektronen. Dieser als chemische Verschiebung bekannte Effekt kann zur Verschiebung der Linien bis zu einigen Elektronenvolt führen und erlaubt somit eine Aussage über den chemischen Bindungszustand der detektierten Elemente [63].

2.5.2 Kapazitäts-Spannungs-Spektroskopie

Die Dotierungskonzentration der Substratmodifikationen hat entscheidenden Einfluss auf die elektrischen Oberflächeneigenschaften. Aus dem für das Wafer-Ausgangsmaterial angegebenen Intervall des spezifischen elektrischen Widerstands von 5 bis 20 mΩ cm war die Dotierungskonzentration von Bor jedoch nur näherungsweise bekannt ($2,5 \cdot 10^{18}$ – $2 \cdot 10^{19}$ cm⁻³ [61]). Die C-V-Spektroskopie ist ein

bewährtes Verfahren, mit dem sich die Ladungsträgerverteilung in einem dotierten Halbleiter untersuchen lässt. Durch Anlegen einer Gleichspannung, die mit einer Wechselspannung überlagert ist, wird hierbei die Ladungsträgerverteilung im Halbleiter verändert, was zu einer Änderung der Kapazität führt. Ist der prinzipielle Aufbau der untersuchten Struktur bekannt, lässt sich aus den gewonnenen C-V-Kurven eine Vielzahl von Informationen über die elektronischen Eigenschaften gewinnen.

2.5.3 Rasterkraftmikroskopische Methoden

Abb. 2.12 zeigt das Funktionsprinzip eines Rasterkraftmikroskops (engl. Atomic Force Microscope; AFM). Das Gerät besteht aus einem Kraftsensor und einem Piezo-Positionierungssystem, die über einen Feedback-Controller miteinander gekoppelt sind. Ein zentraler Bestandteil des Kraftsensors ist der sogenannte Cantilever, ein elastischer Federbalken aus Silizium oder Siliziumnitrid, an dessen probenzugewandter Seite sich eine nur wenige Nanometer breite Spitze befindet. In Abhängigkeit von der auf den Cantilever wirkenden Kraft erfolgt eine elastische Auslenkung.

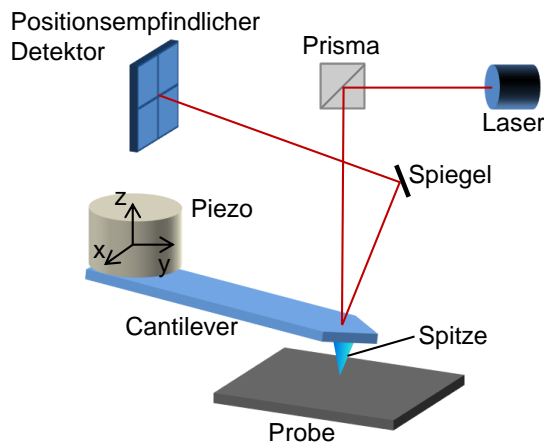


Abb. 2.12: Funktionsprinzip des Rasterkraftmikroskops.

Üblicherweise wird diese Auslenkung mit Hilfe eines optischen Hebels gemessen. Dafür wird ein Laserstrahl auf die Oberseite des Cantilevers gelenkt. In Abhängigkeit von der Auslenkung fällt die Reflexion des Laserstrahls auf eine bestimmte Position eines Vier-Quadranten-Detektors. Aus den horizontalen und vertikalen Differenzen der von den einzelnen Detektoren gemessenen Lichtintensität lässt sich

die vertikale Verbiegung des Cantilevers sowie seine Torsion bestimmen. Ein Piezo-Positionierungssystem ermöglicht eine sub-nanometergenaue relative Verschiebung von Cantilever und Probe in lateraler (x,y) sowie vertikaler (z) Richtung.

Raster-Kelvin-Mikroskopie

Die Raster-Kelvin-Mikroskopie (engl. Kelvin Probe Force Microscopy; KPFM) ist eine AFM-basierte Methode, mit der die elektrischen Oberflächeneigenschaften leitender und nichtleitender Proben untersucht werden können. Der KPFM liegt die Ausbildung einer Kontaktpotentialdifferenz V_{CPD} (engl. Contact Potential Difference; CPD) zwischen zwei elektrisch verbundenen Materialien mit unterschiedlichen Austrittsarbeiten zugrunde [64]. Im Falle der Cantilever-Spitze und einer Probe ist diese als

$$V_{CPD} = \frac{\Phi_{Spitze} - \Phi_{Probe}}{-e_0} \quad (2.22)$$

definiert [64], mit der Austrittsarbeit der Spitze Φ_{Spitze} , der Austrittsarbeit der Probe Φ_{Probe} und der Elementarladung e_0 .

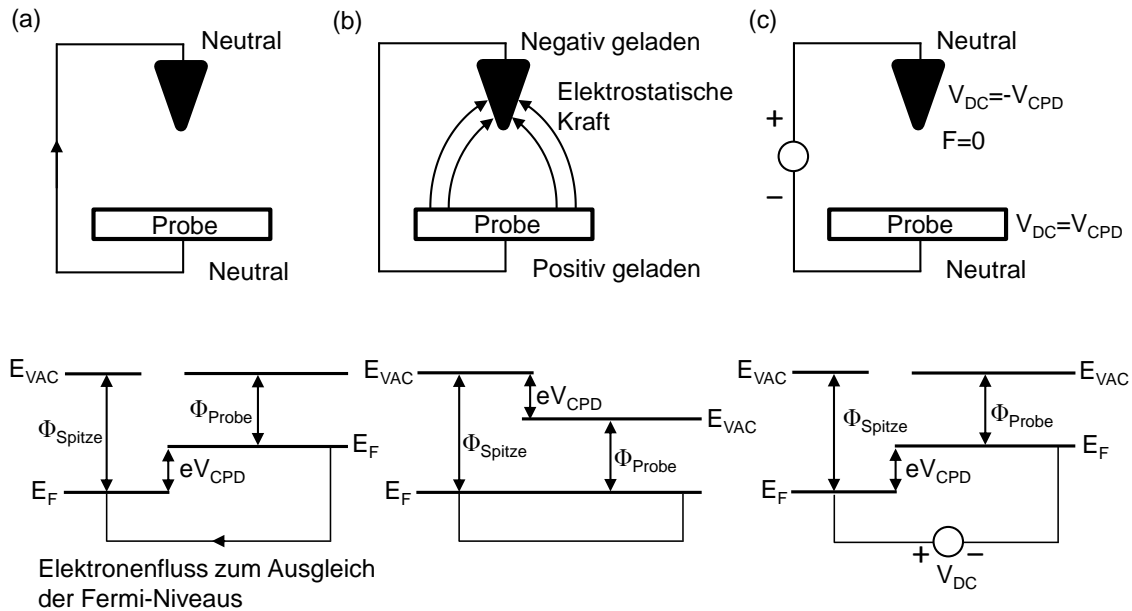


Abb. 2.13: Definition und grundsätzliche Messung der Kontaktpotentialdifferenz nach [64].

Abb. 2.13 veranschaulicht die Ausbildung der CPD anhand des Kontaktes zwischen Cantilever-Spitze und Probe. Wenn beide Materialien noch nicht elektrisch verbunden sind, unterscheiden sich ihre Fermi-Niveaus. Werden Spitze und Probe elektrisch verbunden, fließen Elektronen vom Material mit der kleineren Austrittsarbeit (Probe) zum Material mit der größeren Austrittsarbeit (Spitze), bis sich die zwei Fermi-Niveaus angeglichen haben (Abb. 2.13a und b). Im Gleichgewichtszustand sind Probe und Spitze elektrisch geladen, was eine elektrostatische Kraft zur Folge hat (Abb. 2.13b).

Die Kraft zwischen Spitze und Probe berechnet sich zu

$$F = -\left. \frac{\partial U}{\partial z} \right|_Q = -\frac{1}{2} V^2 \frac{\partial C}{\partial z} \propto \frac{1}{2} \frac{V^2}{z^2}, \quad (2.23)$$

mit der elektrostatischen Energie des Systems aus Spitze und Probe $U = \frac{1}{2} CV^2$, die in erster Näherung der eines Plattenkondensators entspricht, der Kapazität C und der Potentialdifferenz zwischen Spitze und Probe V . Durch Anlegen einer externen Spannung V_{DC} kann diese Kraft aufgehoben werden (siehe Abb. 2.13c).

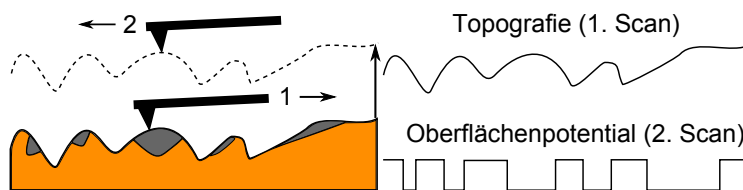


Abb. 2.14: Prinzipielle Messung des Oberflächenpotentials mit der Two-Pass-Methode.

Eine etablierte Methode zur Messung der CPD ist die sogenannte Two-Pass-Messung (s. Abb. 2.14). Hierbei wird beim ersten Durchgang jeder gescannten Linie das Höhenprofil im intermittierenden Modus¹ aufgenommen.

Im zweiten Scandurchgang derselben Linie wird das gespeicherte Höhenprofil in einer vorgegebenen Höhe über der Probe abgefahren, jedoch wird der Cantilever jetzt nicht mehr mechanisch angeregt. Stattdessen wird eine Spannung, bestehend aus einem Gleichspannungsanteil V_{DC} und einem Wechselspannungsanteil V_{AC} , an

¹Im intermittierenden Modus wird der Cantilever durch einen Piezokristall nahe seiner Resonanzfrequenz zu Schwingungen angeregt. Der Cantilever wird gerade soweit angenähert, dass sich die Spitze im Bereich der anziehenden Van-der-Waals-Kräfte befindet und die Probe im Umkehrpunkt der Schwingung berührt. Tritt die Spitze in Wechselwirkung mit der Probe, ändert sich die Resonanzfrequenz des Cantilevers. Bei konstanter Anregungsfrequenz durch den Piezokristall folgt daraus eine Änderung der Phasendifferenz zwischen Anregung und Schwingung und demzufolge auch der Schwingungsamplitude.

den Cantilever angelegt. Die Frequenz ω der Wechselspannung liegt dicht an der Resonanzfrequenz des Cantilevers, um eine hohe Empfindlichkeit zu gewährleisten. Das zeitabhängige Potential an der Spitze ergibt sich somit als Summe der CPD und der externen Spannung zu:

$$V = V_{CPD} \pm V_{DC} + V_{AC} \sin(\omega t) \quad (2.24)$$

Einsetzen in Gl. 2.23 liefert die kapazitive Kraft zwischen Spitze und Probe:

$$F \propto \frac{1}{2z^2} \left[(V_{CPD} \pm V_{DC})^2 + 2(V_{CPD} \pm V_{DC}) V_{AC} \sin(\omega t) + V_{AC}^2 \sin^2(\omega t) \right]. \quad (2.25)$$

Wird V_{CPD} nicht durch V_{DC} kompensiert, wirkt wie eingangs erläutert eine elektrostatische Kraft auf den Cantilever. Bei Betrachtung von Term zwei in Gl. 2.25 lässt sich erkennen, dass diese Kraft mit der Frequenz der Wechselspannung moduliert ist und zu einer Schwingung des Cantilevers führt. Mit Hilfe eines Lock-in-Verstärkers und der Regelungselektronik des AFM lässt sich die Schwingung durch Anpassen von V_{DC} aufheben. Der Betrag von V_{DC} entspricht dabei der CPD. Das Vorzeichen von V_{DC} hängt davon ab, ob die Spannung an die Probe oder an die Spitze angelegt wird [65]:

$$V_{DC} = \pm V_{CPD}. \quad (2.26)$$

Mit „+“ für eine an die Probe angelegte Spannung und „-“ für eine an die Spitze des Cantilevers angelegte Spannung V_{DC} [65].

Kraftspektroskopie

Bei der Kraftspektroskopie wird die auf den Cantilever wirkende Kraft in Abhängigkeit vom Abstand zur Probe gemessen. Voraussetzung dafür ist die Übersetzung der Auslenkung des Laserstrahls auf dem Vier-Quadranten-Detektor in eine Krafteinheit. Um dies zu gewährleisten, muss zunächst die Sensitivität des optischen Hebels bestimmt werden, indem der Cantilever auf eine harte Oberfläche aufgesetzt wird und die Spannungsdifferenzen des Detektors gegen den Abstand von Spitze und Oberfläche aufgetragen werden [66]. Aus der bekannten Verschiebung des Piezoaktors wird hierbei der Abstand bestimmt. Durch diesen Kalibrierungsschritt lässt

sich die vertikale Biegung des Cantilevers durch eine Längeneinheit statt durch eine Spannungsdifferenz des Detektors ausdrücken. Im nächsten Schritt wird der Cantilever von der Oberfläche zurückgezogen und seine Federkonstante aus seinen thermischen Schwingungen bestimmt [67, 68]; die Auslenkung des Cantilevers lässt sich somit in eine Kräfteinheit übersetzen.

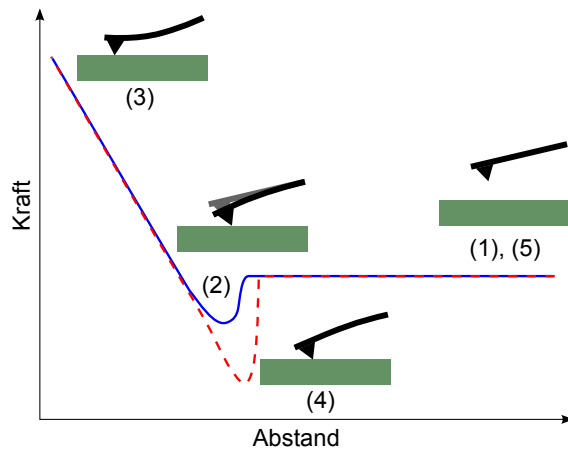


Abb. 2.15: Schematische Darstellung einer Kraft-Abstands-Kurve, die aus Annäherungs-(blau) und Rückziehkurve (rot) besteht. Weitere Erläuterungen siehe Text.

Als Ergebnis einer kraftspektroskopischen Messung wird die auf den Cantilever wirkende Kraft gegen den Abstand zwischen Cantilever und Probe aufgetragen. In Abb. 2.15 ist der Verlauf einer solchen Kraft-Abstands-Kurve, bestehend aus Annäherungs- (blau) und Rückziehkurve (rot), dargestellt. Dabei entspricht der Abstand in diesem Fall der Strecke, die der z-Piezoaktor zurücklegt. Für eine Messung wird der kraftfreie Cantilever (1; Nulllinie) solange an die Oberfläche angenähert, bis die Spitze in Wechselwirkung mit der Probe tritt. Übersteigt die Summe der anziehenden Kräfte die Rückstellkraft des Cantilevers, wird dieser in Richtung Oberfläche ausgelenkt (2; „Snap-in“). Der Cantilever wird weiter angenähert, bis eine vorgegebene Auslenkung bzw. Kraft erreicht ist (3). Der Anstieg der Kraft-Abstands-Kurve wird durch die elastischen Eigenschaften der Probe und des Cantilevers sowie durch die Spitzengeometrie bestimmt. Der Cantilever wird im weiteren Verlauf der Messung zurückgezogen. Zunächst bleibt die Spitze dabei an der Oberfläche haften, bis die Rückstellkraft die adhäsiven Kräfte übersteigt (4) und der Cantilever wieder in den kraftfreien Zustand übergeht (5).

Mit Hilfe des (x,y)-Piezopositionierungssystems des AFM lassen sich zudem Kraftkarten von Oberflächen erstellen. Zu diesem Zweck wird eine Vielzahl von kraftspektroskopischen Messungen durchgeführt, die in Form eines feinen Messpunkterasters über die Probe gelegt werden. Auf diese Weise können sowohl die ortsabhängig auf

den Cantilever wirkenden Kräfte als auch die Kontaktpunkte (z -Achse) simultan ermittelt werden und ermöglichen somit eine eindeutige Zuordnung von Topografie und Kraft.

2.5.4 Strömungspotentialmessung

Das Zeta-Potential trifft eine Aussage über die Oberflächenladung eines Biomaterials in Flüssigkeit und ist daher eine wichtige physikochemische Materialeigenschaft, die die Reaktion des Biosystems beeinflusst [3,29,69]. Die hier genutzte Strömungspotentialanalyse ermöglicht die Bestimmung des Zeta-Potentials einer makroskopischen Festkörperoberfläche, im Gegensatz zur Elektrophorese, bei der in Flüssigkeit dispergierte elektrisch geladene Partikel durch Anlegen eines elektrischen Feldes in Bewegung versetzt werden und das Zeta-Potential aus der elektrophoretischen Mobilität bestimmt wird. Abb. 2.16 zeigt die schematische Darstellung des für die Messung verwendeten Spaltkanals, der aus zwei planparallel angeordneten Proben gebildet wird [39].

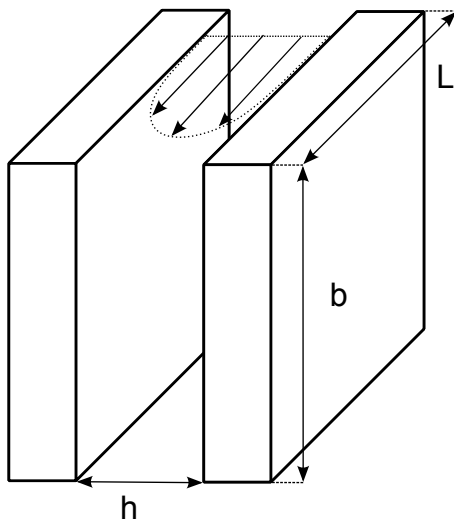


Abb. 2.16: Schematische Darstellung des Spaltkanals für die Messung des Strömungspotentials. $L = b = 10$ mm, $h = 90\text{--}100$ μm . Weitere Erläuterungen siehe Text.

Die durch den Spaltkanal strömende Messflüssigkeit bewirkt eine Ladungstrennung des mobilen diffusen Anteils der elektrochemischen Doppelschicht gegenüber dem immobilen Anteil. Das sich ausbildende Strömungspotential wird mit zwei Elektroden am Ein- und Ausgang des Spaltkanals detektiert. Das Zeta-Potential ζ ist mit

dem Strömungspotential V_S über Gl. 2.27 verknüpft [70]:

$$\zeta(V_S) = \frac{\eta K_B}{\epsilon_F} \frac{dV_S}{dp}, \quad (2.27)$$

mit der dynamischen Viskosität η der Messflüssigkeit, der spezifischen elektrischen Leitfähigkeit K_B des Spaltkanals, der relativen Permittivität ϵ_F der Messflüssigkeit und dem Druckabfall p über den Spaltkanal.

2.5.5 Kontaktwinkelmessung zur Bestimmung der Oberflächenenergie

Die Benetzbarkeit einer Biomaterialoberfläche ist ein weiterer wichtiger Parameter, der die Biokompatibilität beeinflusst. Die Kontaktwinkelmessung am liegenden Tropfen (engl. Sessile Drop Technique) ist eine etablierte oberflächensensitive Methode, mit der sich die Benetzbarkeit und daraus die Oberflächenenergie eines Festkörpers bestimmen lässt.

Die Oberflächenenergie γ ist ein Maß für die Energie, die benötigt wird, um neue Oberflächen bei Flüssigkeiten oder Festkörpern zu erzeugen. Dementsprechend wird sie definiert als Energie E , die zum Erzeugen der Oberfläche je Fläche A aufgewendet werden muss [71]:

$$\gamma = \frac{E}{A}. \quad (2.28)$$

Im Gegensatz zur Oberflächenspannung von Flüssigkeiten lässt sich die Oberflächenenergie eines Festkörpers jedoch nicht ohne Weiteres direkt bestimmen, da bei der Oberflächenvergrößerung Energie dissipiert wird, beispielsweise durch Verformungsarbeit. Daher wird die Oberflächenenergie indirekt über die Kontaktwinkelmessung bestimmt.

Kommt eine Flüssigkeit mit einem Festkörper in Kontakt, können zwei Fälle auftreten: Es erfolgt die totale Benetzung, d.h. die Flüssigkeit bildet einen dünnen Film auf dem Festkörper, oder es erfolgt die partielle Benetzung, bei der die Flüssigkeit einen Tropfen mit einem Kontaktwinkel $0^\circ < \Theta < 180^\circ$ ausbildet. Im Regime der partiellen Benetzung stellt die Youngsche Gleichung eine Beziehung zwischen

der Oberflächenenergie des Festkörpers γ_S , der Grenzflächenenergie γ_{LS} zwischen Festkörper und Flüssigkeit, der Oberflächenspannung γ_L der Flüssigkeit und dem Kontaktwinkel Θ her:

$$\cos \Theta = \frac{\gamma_S - \gamma_{LS}}{\gamma_L}. \quad (2.29)$$

Dabei gilt die Gleichung streng genommen nur für atomar ebene Grenzflächen. Für topografisch strukturierte Oberflächen wurde von Wenzel [72] eine Beziehung zwischen dem hypothetischen Flüssigkeitskontaktwinkel θ und dem auf der nicht-idealen Oberfläche gemessenen Kontaktwinkel θ^* über den sogenannten Rauheitskoeffizient r angegeben, der das Verhältnis der realen Oberfläche zur geometrischen Projektion der Oberfläche angibt:

$$\cos \theta^* = r \cos \theta. \quad (2.30)$$

Das nach Owens, Wendt, Rabel und Kaelble [73–75] benannte OWRK-Modell zur Bestimmung der Oberflächenenergie aus Kontaktwinkelmessungen nimmt an, dass sich die aus der Youngschen Gleichung bekannte Grenzflächenenergie γ_{LS} aus der Oberflächenspannung der Flüssigkeit γ_L und der Oberflächenenergie des Festkörpers γ_S sowie aus den gleichartigen Wechselwirkungen zwischen der festen und der flüssigen Phase zusammensetzt. Diese Wechselwirkungen werden als geometrischer Mittelwert² eines dispersiven Anteils γ^D und eines polaren Anteils γ^P der Oberflächenspannung γ_L bzw. der Oberflächenenergie des Festkörpers γ_S interpretiert [73–75]:

$$\gamma_{LS} = \gamma_S + \gamma_L - 2 \left(\sqrt{\gamma_S^D \cdot \gamma_L^D} + \sqrt{\gamma_S^P \cdot \gamma_L^P} \right). \quad (2.31)$$

Der dispersive Anteil beinhaltet nach der OWRK-Methode die Keesom-, Debye- und die London-Kräfte. Letztere werden dabei aufgrund ihrer langen Reichweite und Allgegenwärtigkeit als dominanter Anteil der dispersiven Kräfte zwischen makroskopischen Körpern angesehen [73, 76]. Der polare Anteil macht nach Owens

²Eine weitergehende Betrachtung zur Verwendung des geometrischen Mittelwerts zur Berechnung der Grenzflächenenergie wird in der grundlegenden Arbeit von Fowkes [76] durchgeführt.

und Wendt [73] eine Aussage über die Ausprägung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Festkörper und Flüssigkeit.

Einsetzen von Gl. 2.31 in Gl. 2.29 liefert die Gleichung

$$\frac{\gamma_L (1 + \cos \Theta)}{2\sqrt{\gamma_L^D}} = \sqrt{\gamma_S^P} \cdot \sqrt{\frac{\gamma_L^P}{\gamma_L^D}} + \sqrt{\gamma_S^D}, \quad (2.32)$$

die die Form einer Geradengleichung hat. Zur Bestimmung der Oberflächenenergie nach der OWRK-Methode werden die Kontaktwinkel mehrerer Testflüssigkeiten mit bekanntem dispersiven Anteil γ_L^D und polaren Anteil γ_L^P der Oberflächenspannung gemessen und $\gamma_L(1 + \cos \Theta)/2\sqrt{\gamma_L^D}$ gegen $\sqrt{\gamma_L^P/\gamma_L^D}$ aufgetragen.

Der dispersive Anteil γ_S^D der Oberflächenenergie des Festkörpers ergibt sich damit aus dem Quadrat des y-Achsenabschnitts und der polare Anteil γ_S^P aus dem Quadrat der Geradensteigung. Die Oberflächenenergie γ_S des Festkörpers entspricht letztendlich der Summe aus dem polaren und dem dispersiven Anteil [73]:

$$\gamma_S = \gamma_S^D + \gamma_S^P. \quad (2.33)$$

2.5.6 Immunfluoreszenzfärbung

Die Untersuchung der Proteinadsorption erfolgte mittels indirekter Immunfluoreszenzfärbung. Das Prinzip der Methode ist schematisch in Abb. 2.17 dargestellt. Dabei bindet ein primärer Antikörper spezifisch an eine bestimmte für das Protein charakteristische Zielstruktur, das Epitop. Ein zweiter mit einem Fluoreszenzfarbstoff konjugierter sekundärer Antikörper bindet wiederum spezifisch an den primären Antikörper.

Das markierte Protein lässt sich nach Anregung des Fluoreszenzfarbstoffes mit einer UV-Lampe mit breitbandigem Spektrum oder mit einem Laser durch Detektion der Fluoreszenzintensität nachweisen, wobei die Fluoreszenzintensität als proportional zur adsorbierten Proteinmenge angenommen wird. Der Farbstoff hat eine diskrete Anregungsenergie, d.h. er kann mit Licht einer bestimmten Wellenlänge, die üblicherweise im nicht sichtbaren ultravioletten Bereich liegt, angeregt werden.

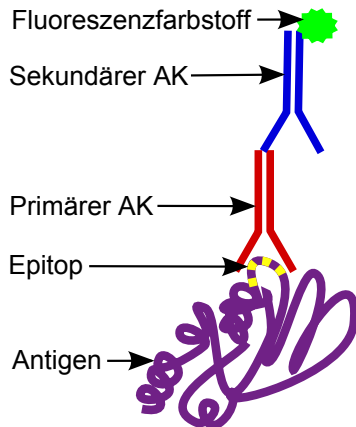


Abb. 2.17: Funktionsprinzip der indirekten Immunfluoreszenzfärbung. Der primäre Antikörper (AK) bindet spezifisch an das Epitop des Antigens. Der sekundäre AK ist mit einem fluoreszierenden Farbstoff konjugiert und erkennt den primären AK nach Merkmalen, die spezifisch für den Organismus sind, aus dem der primäre Antikörper stammt.

Durch strahlungslose Übergänge (vibronische und Lösungsmittelrelaxation) wird Energie dissipiert und die Relaxation in den elektronischen Grundzustand hat dementsprechend die Emission eines Photons mit einer kleineren Energie als das anregende Photon zur Folge. Gegenüber der direkten Immunfluoreszenzfärbung, bei der der Fluoreszenzfarbstoff bereits an den primären Antikörper gebunden ist, wird durch die indirekte Methode eine verbesserte Empfindlichkeit erreicht, die auch die Messung kleinster Proteinmengen erlaubt [77].

2.5.7 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie erlaubt in kurzer Zeit quantitative Einzelzellanalysen großer Zellpopulationen. Das Funktionsprinzip der Methode ist in Abb. 2.18 dargestellt.

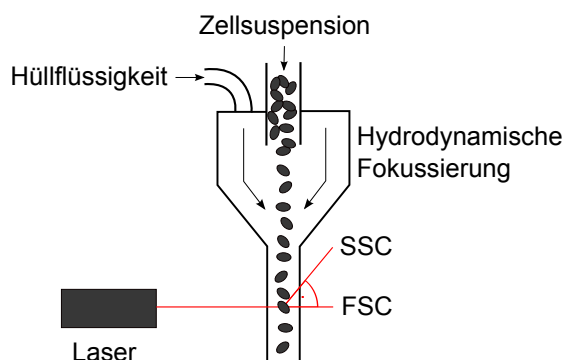


Abb. 2.18: Prinzip der Durchflusszytometrie. Zellen in Suspension werden durch eine Hüllflüssigkeit fokussiert und nacheinander einzeln am optischen Messpunkt, in dem ein Laser fokussiert wird, vorbeigeführt. Das vorwärts gestreute Licht des Lasers (engl. Forward Scatter, FSC) wird als Maß für die Zellgröße detektiert. Das seitwärts gestreute Licht (engl. Side Scatter, SSC) ist ein Maß für die Granularität der Zelle.

Eine Zellsuspension wird dabei durch eine Hüllflüssigkeit, die meist aus Puffer- oder Kochsalzlösungen besteht, verdünnt und anschließend fokussiert, so dass die

suspendierten Zellen einzeln nacheinander am Messpunkt vorbeigeführt werden. Dort durchtreten sie einen fokussierten Laserstrahl. Das an den Zellen vorwärts gestreute Licht (engl. Forward Scatter; FSC) ist ein Maß für die Größe und das 90° zum Laser gestreute Licht (engl. Side Scatter; SSC) ein Maß für die Granularität des Zytoplasmas, d.h. die innere Zellstruktur, sowie für die Oberflächenstruktur der Zellen [78]. Somit wird eine eindeutige Identifizierung sowie Unterscheidung bestimmter Zellen ermöglicht und anderweitige Partikel, Schmutz oder Luftbläschen können von der weiteren Analyse ausgeschlossen werden.

3 Elektrostatik an topografischen Nanostrukturen - Die Rolle von Passivschichten

Für die Simulation der Proteinadsorption an topografischen Nanostrukturen wurden bisher einfache metallische Oberflächen angenommen, an denen das elektrische Feld an erhabenen Strukturen erhöht und in Senken verringert ist. Viele medizinisch relevante metallische Biomaterialien bilden entgegen dieser einfachen Modellvorstellung jedoch eine Passivierungsschicht aus, die im Kontakt mit dem biologischen System steht. Im Folgenden Kapitel wird daher die Verteilung der elektrischen Feldstärke an einer topografischen Modellstruktur aus Titan unter Berücksichtigung der TiO₂-Passivierungsschicht mit FEM-Elektrostatikberechnungen untersucht.

3.1 Die Elektrolytlösung

Kommt ein Festkörper mit einer wässrigen Elektrolytlösung in Kontakt, bildet sich fast augenblicklich die elektrochemische Doppelschicht an der Oberfläche aus; die Oberflächenladung wird durch eine ionische Gegenladung kompensiert. Die Gegenionen in der Elektrolytlösung schirmen das elektrische Oberflächenpotential ϕ_0 ab, wodurch es in der Lösung exponentiell abfällt. Die Debye-Länge beträgt dabei in einer symmetrischen 0,1-molaren 1:1-Elektrolytlösung etwa 1 nm [44]. Für hohe Oberflächenpotentiale kann die Behandlung der Ionen als Punktladungen zu unrealistisch hohen Ionendichten nahe der Oberfläche führen [79]. Daher wird für die Ionenkonzentration ein von Kilic et al. [79] vorgeschlagener Ausdruck

$$c_i = \frac{c_i^0 (-q_i \phi / k_B T)}{1 + 2\nu \sinh (|q_i| \phi / 2k_B T)^2} \quad (3.1)$$

verwendet, der sterische Effekte durch die Einführung des Packungsparameters $\nu = 2a^3 c_i^0$ berücksichtigt. a entspricht der effektiven Ionengröße und wird hier als

Stokes-Durchmesser der hydratisierten Elektrolytionen d_i interpretiert. Die ionische Raumladungsdichte in der Elektrolytlösung ergibt sich somit zu

$$\rho_{El} = \sum_{i=1}^2 \frac{q_i c_i^0 (-q_i \phi / k_B T)}{1 + 4d_i^3 c_i^0 \sinh(|q_i| \phi / 2k_B T)^2}. \quad (3.2)$$

3.2 Die Passivierungsschicht

Die elektronischen Eigenschaften der Passivierungsschicht von Titan werden in der Literatur mit denen eines n-Halbleiters gleichgesetzt, wobei Sauerstoff-Fehlstellen als Donatoren fungieren [80–83]. Im Kontakt mit einer Elektrolytlösung bildet sich, genau wie beim Kontakt zwischen Metall und Elektrolytlösung, eine Potentialdifferenz über die Fest-Flüssig-Grenzfläche aus. Jedoch ist die Leitfähigkeit eines Halbleiters für gewöhnlich niedriger als die einer Elektrolytlösung, sodass sich der Potentialabfall überwiegend im Festkörper ausbildet und dort eine Verbiegung der Energiebänder zur Folge hat. Daher muss bei der Behandlung der Grenzfläche Halbleiter/Elektrolytlösung eine zusätzliche diffuse Raumladung im Halbleiter berücksichtigt werden [84].

Aus Gründen der Vereinfachung werden im Folgenden einige Annahmen für das betrachtete Halbleitermodell eingeführt: (i) Die TiO_2 -Schicht soll eine ideale elektronische Bandstruktur besitzen, (ii) das System ist im thermischen Gleichgewicht, d.h. die Fermi-Niveaus sind angeglichen, (iii) Oberflächenzustände an der Fest-Flüssig-Grenzfläche werden vernachlässigt, (iv) die Halbleiterschicht ist nicht entartet, (v) der Übergang vom Titan zur TiO_2 -Schicht ist abrupt, (vi) das Auftreten einer Inversionsschicht, d.h. die Ansammlung von Minoritätsladungsträgern im TiO_2 , wird aufgrund der geringen Bandverbiegung ausgeschlossen.

Anhand einer planaren Grenzfläche zwischen Titan und NaCl-Elektrolytlösung ist das untersuchte System in Abb. 3.1 dargestellt. Dabei wird das Metall durch eine 3 bis 10 nm dicke Passivierungsschicht von der Elektrolytlösung getrennt [86]. Im thermischen Gleichgewicht ergibt sich die Potentialdifferenz über die Grenzfläche zu

$$\Delta\phi_{Ti-Körper} = \frac{E_{Ti} - E_{Körper}}{e_0}, \quad (3.3)$$

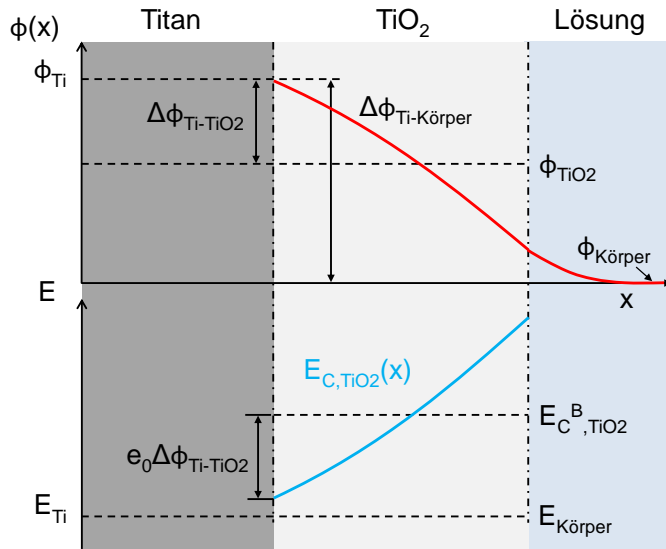


Abb. 3.1: Verlauf des elektrischen Potentials (rote Kurve) und der unteren Leitungsbandkante (blaue Kurve) in der TiO_2 -Passivierungsschicht an einer planaren Grenzfläche Titan/Elektrolytlösung im thermischen Gleichgewicht. Der Galvani-Potentialabfall $\Delta\phi_{\text{Ti-Körper}}$ wird durch die Differenz zwischen der Austrittsarbeit des Titan E_{Ti} und der Referenzenergie in der Elektrolytlösung $E_{\text{Körper}}$ hervorgerufen. Nach [85].

mit der Elementarladung e_0 , der Austrittsarbeit E_{Ti} von Titan und der Referenzenergie $E_{\text{Körper}}$ in der Elektrolytlösung, die äquivalent zum Normalredoxpotential der Körperflüssigkeit unter physiologischen Bedingungen ist [82,87]. Der Verlauf des elektrischen Potentials in der Passivierungsschicht entspricht der Bandverbiegung und bezieht sich auf die Energie der unteren Leitungsbandkante in der TiO_2 -Schicht $E_{\text{C,TiO}_2}^{\text{B}}$ (s. Abb. 3.1).

Wird nur die räumliche Variation der Elektronendichte n berücksichtigt, ist die Raumladungsdichte im Halbleiter ρ_{TiO_2} mit dem elektrischen Potential über den Ausdruck [44]

$$\rho_{\text{TiO}_2} = e_0 (N_D - n) = e_0 N_D \left[1 - \exp\left(\frac{\phi - \phi_{\text{TiO}_2}}{kT}\right) \right] \quad (3.4)$$

verknüpft, wobei N_D der maximalen Dichte der Sauerstoff-Fehlstellen und ϕ_{TiO_2} dem Flachbandpotential entspricht. Die Lage von ϕ_{TiO_2} relativ zum elektrischen Potential an der Titanoberfläche ϕ_{Ti} ist durch die Potentialdifferenz $\Delta\phi_{\text{Ti-TiO}_2}$ definiert:

$$\begin{aligned}
 \phi_{TiO_2} &= \phi_{Ti} + \Delta\phi_{Ti-TiO_2} \\
 &= \phi_{Ti} + \frac{E_{Ti} - E_{TiO_2}}{e_0} \\
 &= \phi_{Ti} + \frac{E_{Ti} - \chi_{TiO_2} - (E_{C,TiO_2}^B - E_{F,TiO_2})}{e_0} \\
 &= \phi_{Ti} + \frac{E_{Ti} - \chi_{TiO_2} - kT \ln(N_C/N_D)}{e_0}, \tag{3.5}
 \end{aligned}$$

mit der Austrittsarbeit E_{TiO_2} von TiO_2 , die sich als Summe der Elektronenaffinität χ_{TiO_2} und der Energielücke ($E_{C,TiO_2}^B - E_{F,TiO_2}$) zwischen der unteren Leitungsbandkante und dem Fermi-Niveau ergibt. Diese Energielücke wiederum entspricht dem Ausdruck $kT \ln(N_C/N_D)$ mit der effektiven Zustandsdichte der Elektronen $N_C = 2(2\pi m_e^* kT/h^2)^{3/2}$ im Leitungsband, dem Planckschen Wirkungsquantum h und der effektiven Masse der Elektronen m_e^* in der TiO_2 -Schicht.

Durch Einsetzen von Gl. 3.5 in Gl. 3.4 ergibt sich die Raumladungsdichte in der Passivierungsschicht zu

$$\rho_{TiO_2} = e_0 N_D \left[1 - \exp \left(\frac{e_0 (\phi - \phi_{Ti}) + \chi_{TiO_2} + kT \ln(N_C/N_D) - E_{Ti}}{kT} \right) \right]. \tag{3.6}$$

Ein weiterer wichtiger Punkt bei der Diskussion der Grenzfläche zwischen Titan und einer Elektrolytlösung ist die pH-abhängige Oberflächenladung der TiO_2 -Passivierungsschicht. Titanhydroxide verhalten sich amphoterisch, d.h. sie zeigen in Abhängigkeit von der räumlichen Orientierung der Bindung der Hydroxidgruppe an die oberflächennahen Titankationen sowohl saure als auch basische Eigenschaften [81]. Im Kontakt mit einer wässrigen Elektrolytlösung hat dieses amphoterische Verhalten eine pH-abhängige Bildung negativ und positiv geladener Hydroxide zur Folge, die in der Literatur als potentialbestimmende Ionen bezeichnet werden [48]. Der pH-Wert, bei dem die aus den Titanhydroxiden resultierende Oberflächenladung gleich null ist (engl. Point of Zero Charge, PZC), wird hier als näherungsweise neutral angenommen [81]. Dementsprechend ist die passivierte Titanoberfläche bei pH 7,4 negativ geladen. Obwohl Körperflüssigkeiten als Puffer wirken und den

pH-Wert konstant zwischen 7,35 und 7,45 halten, kann es beispielsweise im Knochengewebe aufgrund einer Implantation zu einem starken Abfall des pH-Wertes auf bis etwa 5 kommen [88]. Dementsprechend wurde in der Betrachtung der pH-Abhängigkeit der Oberflächenladung ein pH-Bereich von 5 bis 7,5 angenommen. Nach Ridley et al. [89] variiert die Oberflächenladungsdichte σ_S des TiO_2 in diesem Bereich näherungsweise zwischen 0,05 und $-0,05 \text{ C/m}^2$. Der Einfluss von σ_S auf die Verteilung der elektrischen Feldstärke nahe der Oberfläche wurde in einer Parameterstudie untersucht.

3.3 FEM-Modell

Finite-Elemente-basierte Elektrostatikberechnungen wurden mit dem kommerziell erhältlichen Programmpaket COMSOL Multiphysics (v4.2; COMSOL Multiphysics GmbH, Göttingen) unter Verwendung eines direkten Löser (engl. Multifrontal Massively Parallel Sparse Direct Solver, MUMPS) und eines nichtlinearen iterativen Löser durchgeführt.

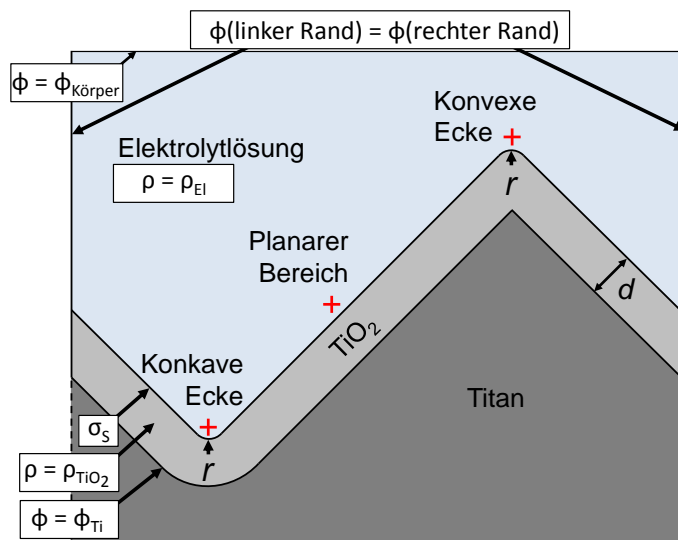


Abb. 3.2: Simulationsbox der topografischen Nanostruktur aus Titan mit den verwendeten Randbedingungen und Domänen. Nach [85].

Abb. 3.2 zeigt den Kontakt zwischen einer passivierten Nanostruktur aus Titan und einer wässrigen Elektrolytlösung mit physiologischer Salzkonzentration in einer zweidimensionalen Simulationsbox für die die Poisson-Gleichung numerisch gelöst wurde. Als Modellgeometrie wurde eine Grabenstruktur gewählt, ähnlich wie die von Elter et al. [22, 34] experimentell und mittels Computersimulationen un-

tersuchten Graben-Nanostrukturen. Diese stellt die einfachste topografische Variation einer Oberfläche dar und enthält gleichzeitig alle wesentlichen geometrischen Merkmale, wie z.B. konkav und konvex gewölbte sowie planare Strukturelemente. Darüber hinaus konnte die Komplexität des Problems und der rechentechnische Aufwand stark reduziert werden, indem ein zweidimensionaler Schnitt eines Grabens betrachtet wurde. Die Modellgeometrie besteht aus drei planaren Regionen sowie einer konvexen und einer konkaven 90° -Ecke mit dem Eckenradius r . Es wurde eine Passivierungsschicht mit konstanter Dicke d angenommen, die im Kontakt mit einer wässrigen 0,137-molaren NaCl-Lösung steht. Aufgrund des besonderen Oxidierungsvorgangs von Titan [80,90,91] wurde außerdem angenommen, dass das Wachstum der TiO_2 -Schicht ausschließlich in Richtung des Metalls stattfindet. Dementsprechend resultiert das Wachstum einer Schicht mit der Dicke d an der konkaven Ecke in einem Radius $r + d$ des konkaven Randes zwischen TiO_2 - und Titandomäne. An der konvexen Ecke muss in Abhängigkeit vom Verhältnis von r zu d zwischen zwei Fällen unterschieden werden. (i) $r/d > 1$: Der Radius der konvexen Ecke des konvexen Randes zwischen TiO_2 - und Titandomäne ist $r - d$. (ii) $r/d \leq 1$: Es wird eine scharfe konvexe Ecke gebildet. Im letzteren Fall wurde ein Radius von 0,2 nm (entspricht näherungsweise dem Atomradius von Titan) eingeführt, um numerische Probleme zu vermeiden. Das Gitternetz aus Dreieckselementen wurde solange verfeinert, bis der relative Fehler (a posteriori) der elektrischen Feldstärke in der Elektrolytlösung nahe dem planaren Strukturelement unter 1 % fiel. Nach viermaliger Verfeinerung des Gitternetzes ergab sich somit eine Anzahl von $3,2 \cdot 10^5$ Dreieckselementen. Die Iteration des nichtlinearen Löser wurde gestoppt, wenn die relative Fehlerabschätzung für jeden Iterationsschritt kleiner als $1 \cdot 10^{-6}$ war.

Das elektrische Potential ϕ_{Ti} wurde an der Grenzfläche Titan/ TiO_2 angelegt (Dirichlet-Randbedingung) und fällt in „unendlicher“ Entfernung in der Elektrolytlösung auf das Referenzpotential $\phi_{Körper}$ ab (oberer Rand: $\phi = \phi_{Körper}$). Die Modellgeometrie erlaubt die Verwendung periodischer Randbedingungen am linken und rechten Rand. Die pH-abhängige Oberflächenladung σ_S wurde mittels Neumann-Randbedingungen an der Grenzfläche von TiO_2 -Passivierungsschicht und Elektrolytlösung festgelegt. Die Raumladungsdichten in der Elektrolytlösung und in der Passivierungsschicht ergeben sich durch Gl. 3.2 und 3.6.

Zusätzlich zum Kontakt zwischen der passivierten Nanostruktur und einer Elektrolytlösung wurde ebenfalls die Elektrostatik einer Metall-Nanostruktur im Kontakt

Tabelle 3.1: Zusammenfassung der verwendeten Parameterwerte.

Parameter	Wert	Quelle
c_i^0 (mol/l)	0,137	
T (K)	298,15	
ϵ_{El}	79	[92]
ϵ_{TiO_2}	48; 78; 110	[48]
d_{Na^+} (nm)	0,368	[93]
d_{Cl^-} (nm)	0,242	[93]
E_{Ti} (eV)	4,1	[94]
E_{SCE} (eV)	4,75	[95]
χ_{SCE} (eV)	4,04	[3]
m_e^* (m_e)	5,6	[96]
ϕ_S (mV)	-100	[97]
σ_S (C/m ²)	-0,05; 0; 0,05	[89]
$\phi_{Körper}$ (mV _{SCE})	350; 450; 550	[87]
N_D (10 ²⁰ cm ⁻³)	1; 1,5; 2	[82]
d (nm)	3; 5; 10	[86]
r (nm)	1; 3; 5	

mit einer Elektrolytlösung berechnet. In diesem Fall wurde die Dicke d der Passivierungsschicht gleich null gesetzt und ein konstantes elektrisches Potential ϕ_S an der Grenzfläche zwischen Metall und Elektrolytlösung mit Hilfe von Dirichlet-Randbedingungen eingestellt. Die verwendeten Modellparameter sind in Tabelle 3.1 zusammengefasst. Für einige Parameter sind in der Literatur mehrere Werte angegeben (ϵ_{TiO_2} , $\phi_{Körper}$, N_D , d). Die Oberflächenladungsdichte σ_S wurde entsprechend dem physiologisch relevanten pH-Bereich in einer Parameterstudie variiert. Mit Gl. 3.3 und 3.5 wurden das elektrische Potential an der Grenzfläche Titan/TiO₂ zu $\phi_{Ti} = 1,10$ V und das Flachbandpotential in der TiO₂-Schicht zu $\phi_{TiO_2} = 1,14$ V berechnet.

3.4 Ergebnisse

3.4.1 Die Grenzfläche zwischen Metall und Elektrolytlösung

Abb. 3.3a zeigt den Kontakt zwischen einer metallischen Grabenstruktur und einer Elektrolytlösung, der als Vergleich für die spätere Diskussion der Grenzfläche zwischen einer nanostrukturierten Titanoberfläche und einer Elektrolytlösung dienen

soll (s. Abschnitt 3.4.2). Die Metalloberfläche ist durch keine Passivierungsschicht bedeckt ($d = 0$ nm) und es wird ein festes Oberflächenpotential $\phi_S = -100$ mV an die Grenzfläche zwischen Festkörper und Flüssigkeit angelegt. Der Radius der konvexen und der konkaven Ecke wurde auf 3 nm festgelegt. Aufgrund der starken ioni-schen Abschirmung in der wässrigen NaCl-Elektrolytlösung (Debye-Länge < 1 nm) werden ortsabhängige Unterschiede der elektrischen Feldstärke in einem Abstand von wenigen Nanometern von der Oberfläche kompensiert. Daher wurden die Werte der elektrischen Feldstärke am planaren, am konvex und am konkav gebogenen Strukturelement in einem Abstand von 0,3 nm von der Fest-Flüssig-Grenzfläche bestimmt (s. Abb. 3.3b).

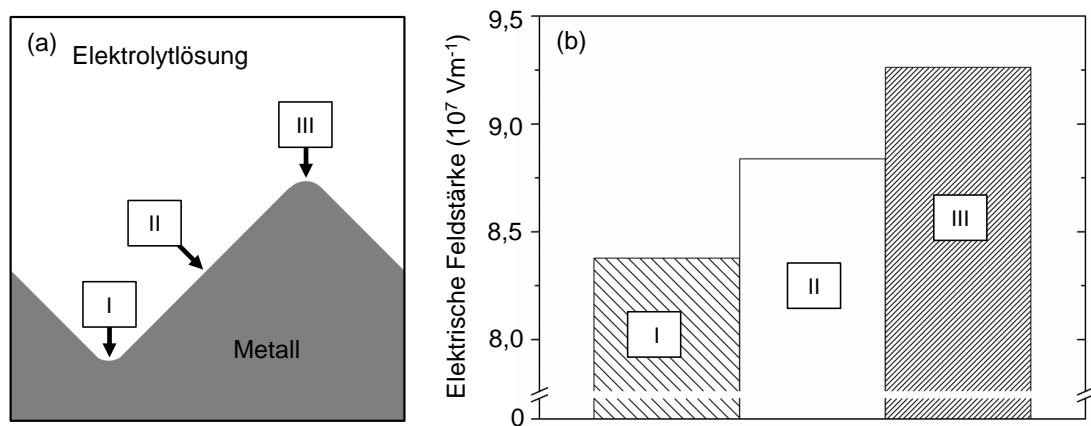


Abb. 3.3: (a) Querschnitt der metallischen Nanostruktur im Kontakt mit einer NaCl-Elektrolytlösung. (b) Elektrische Feldstärken in einem Abstand von 0,3 nm von der Fest-Flüssig-Grenzfläche an der konkaven Ecke (I), am planaren Bereich (II) und an der konvexen Ecke (III). Nach [85].

Verglichen mit der Position nahe dem planaren Strukturelement (II) ist die elektrische Feldstärke an der konvexen Ecke um 5 % erhöht und an der konkaven Ecke um 5 % verringert. Diese relativ kleine Variation der Feldstärke kann auf die hohe ioni-sche Raumladungsdichte in der Elektrolytlösung zurückgeführt werden. So wurde in einer vergleichenden Simulation mit einer 0,01-molaren NaCl-Elektrolytlösung bereits ein Anstieg von 15 % an der konvexen Ecke und ein Abfall von 20 % an der konkaven Ecke im Vergleich zum planaren Strukturelement berechnet. Zudem stellt die Verwendung der zweidimensionalen Grabenstruktur einen weiteren Grund für den relativ kleinen Effekt der Topografie auf die oberflächennahen elektrischen Feldstärken dar, da die Wölbung der Oberfläche nur in zwei Dimensionen auftritt. Für eine dreidimensionale Spitze bzw. eine Senke wird ein stärkerer Einfluss der

Topografie auf die lokalen elektrischen Feldstärken erwartet.

3.4.2 Die Grenzfläche zwischen halbleitender Passivschicht und Elektrolytlösung

Die Simulationsbox mit der topografisch nanostrukturierten Titanoberfläche im Kontakt mit einer Elektrolytlösung ist in Abb. 3.4a dargestellt. Die Modellgeometrie besteht aus einer 5 nm dicken TiO_2 -Passivierungsschicht auf der Grabenstruktur und der angrenzenden 0,137-molaren NaCl-Elektrolytlösung. Der Radius der konvexen und der konkaven Ecke wurde wie beim Kontakt zwischen Metall und Elektrolytlösung (s. Abschnitt 3.4.1) erneut auf 3 nm festgelegt. Hierbei wurde eine Oberflächenladung $\sigma_S = 0 \text{ C/m}^2$ angenommen, die einem pH-Wert nahe 7 entspricht.

Die Verteilung der elektrischen Feldstärke für das System unter Berücksichtigung der halbleitenden Passivierungsschicht ist in Abb. 3.4b dargestellt. Genau wie beim Kontakt zwischen Metall und Elektrolytlösung fällt die elektrische Feldstärke nahe der Grenzfläche zwischen halbleitendem TiO_2 und Flüssigkeit aufgrund der starken ionischen Abschirmung innerhalb eines geringen Abstands stark ab. Die konkave (s. Abb. 3.4c, d) und die konvexe Ecke (s. Abb. 3.4e, f) sind daher zusätzlich stark vergrößert dargestellt. Aus einem Vergleich von Abb. 3.4d und f lässt sich erkennen, dass die Verteilung des elektrischen Feldes nahe der Fest-Flüssig-Phasengrenze gegenüber dem Kontakt zwischen Metall und Elektrolytlösung (s. Abb. 3.3b) invertiert ist: Die elektrische Feldstärke an der konkaven Ecke ist Vergleich zum planaren Bereich erhöht, wohingegen sie an der konvexen Ecke verringert ist.

Ein Vergleich der elektrischen Feldstärken nahe der konvexen und der konkaven Ecke sowie dem planaren Bereich für drei verschiedene Oberflächenladungsdichten σ_S , die einem pH-Wert-Bereich von 5 bis 7,5 entsprechen, ist in Abb. 3.5 dargestellt. Bei einem pH-Wert von 5 ist die elektrische Feldstärke an der konvexen und an der konkaven Ecke im Vergleich zum planaren Bereich um 20 % verringert bzw. um 10 % erhöht. Diese Invertierung der Verteilung der elektrischen Feldstärke im Vergleich zur Grenzfläche zwischen Metall und Elektrolytlösung wird dabei über den gesamten pH-Wert-Bereich aufrechterhalten und zeigt die stärkste Ausprägung nahe dem physiologischen pH-Wert: Bei pH 7,5 wurde ein starker Abfall der elek-

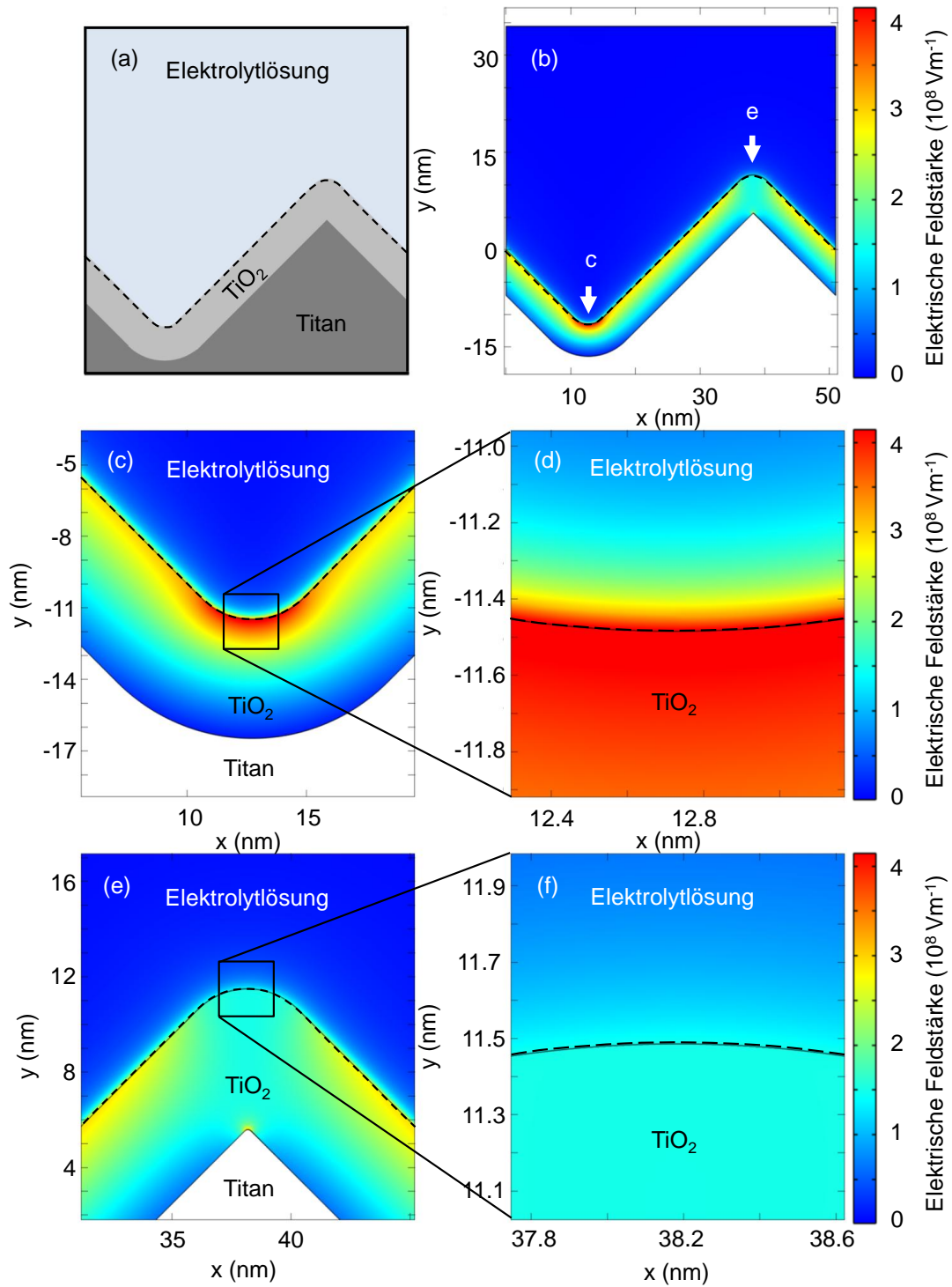


Abb. 3.4: (a) Querschnitt der passivierten topografisch nanostrukturierten Titanoberfläche im Kontakt mit einer NaCl-Elektrolytlösung und (b) die Verteilung der elektrischen Feldstärke. (c), (d) Vergrößerte Darstellung der konkaven Ecke. (e), (f) Vergrößerte Darstellung der konvexen Ecke. Nach [85].

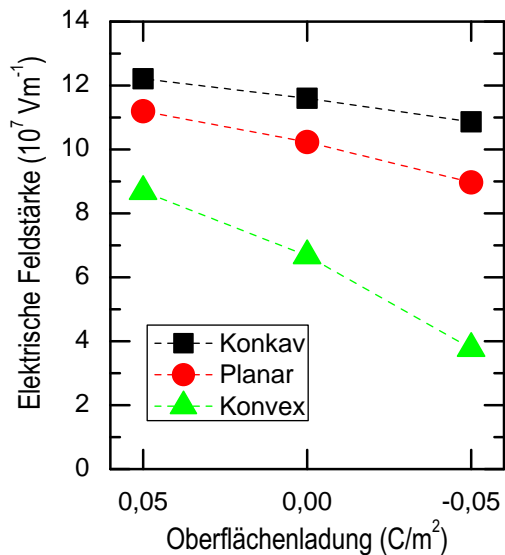


Abb. 3.5: Elektrische Feldstärke in der NaCl-Elektrolytlösung in einem Abstand von 0,3 nm von der Fest-Flüssig-Grenzfläche für drei verschiedene Oberflächenladungsdichten σ_S , die einem pH-Wert-Bereich von 5 bis 7,5 entsprechen. Nach [85].

trischen Feldstärke von 60 % und ein Anstieg von 20 % an der konvexen bzw. an der konkaven Ecke berechnet.

Die berechnete Verteilung der elektrischen Feldstärke in der Elektrolytlösung nahe der metallischen und der passivierten Grabenstruktur lässt sich mit Hilfe von Abb. 3.6 interpretieren.

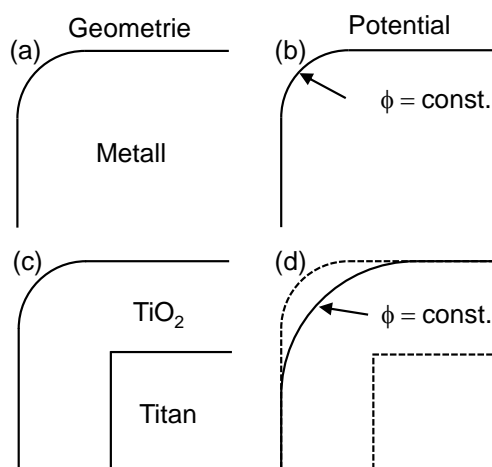


Abb. 3.6: (a) Geometrie der konvexen Ecke der metallischen Grabenstruktur und (b) Verlauf der Äquipotentiallinie an der Metalloberfläche. (c) Geometrie der konvexen Ecke der mit einer TiO_2 -Passivierungsschicht bedeckten Grabenstruktur aus Titan und (d) Verlauf einer Äquipotentiallinie in der halbleitenden Passivierungsschicht. Nach [85].

Die Äquipotentiallinie an der Metalloberfläche folgt strikt der Geometrie, d.h. das Oberflächenpotential ist überall konstant (s. Abb. 3.6)a, b). Aufgrund einer erhöhten Feldliniendichte folgen aus dieser Verteilung des elektrischen Potentials größere elektrische Feldstärken an der konvexen Ecke. Unter Berücksichtigung der halbleitenden TiO_2 -Passivierungsschicht ändert sich dieses typisch metallische Verhalten: Hier kann die Äquipotentiallinie nicht der Geometrie der Oberfläche folgen. Das

Oberflächenpotential hängt von der Krümmung der Oberfläche ab und ist nicht überall konstant. An der konvexen Ecke hat dies ein lokal verringertes Oberflächenpotential zur Folge (s. Abb. 3.6c, d).

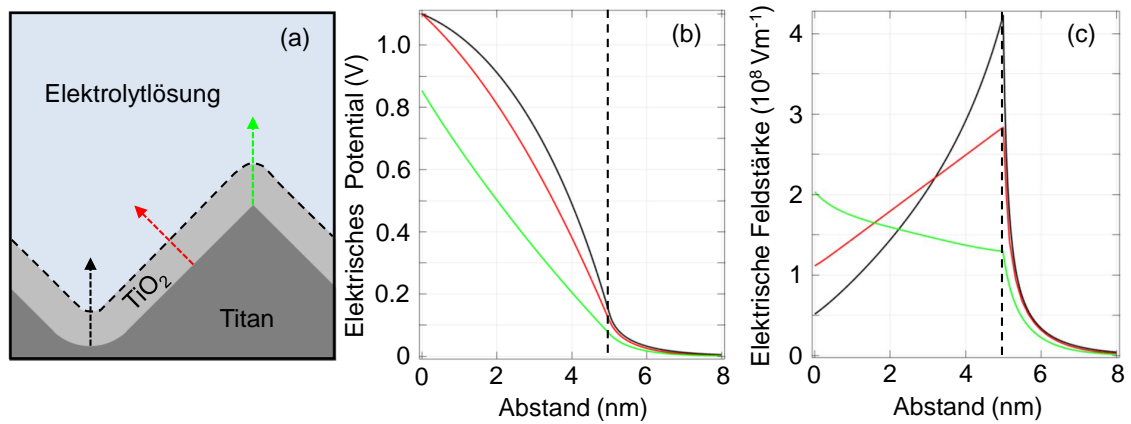


Abb. 3.7: (a) Querschnitt der nanostrukturierten Titanoberfläche im Kontakt mit einer Elektrolytlösung. Die Pfeile entsprechen Schnittlinien senkrecht zur Oberfläche an der konkaven Ecke (schwarz), dem planaren Bereich (rot) und der konvexen Ecke (grün). (b) Verlauf des elektrischen Potentials entlang der Schnittlinien. (c) Verlauf der elektrischen Feldstärke entlang der Schnittlinien. Nach [85].

Der Einfluss des im Vergleich zur metallischen Oberfläche veränderten Potentialverlaufs bei der passivierten Titanoberfläche auf die Verteilung der elektrischen Feldstärke nahe der Fest-Flüssig-Grenzfläche ist in Abb. 3.7 dargestellt. Entlang der senkrecht zur Oberfläche verlaufenden Schnittlinien (s. Abb. 3.7a) ergeben sich unterschiedliche Verläufe des elektrischen Potentials (s. Abb. 3.7b). An der konkaven Ecke (schwarze Kurve) fällt das elektrische Potential innerhalb der Schicht nahe der Grenzfläche von TiO₂ und Elektrolytlösung stärker ab als im planaren Bereich (rote Kurve) und als an der konvexen Ecke (grüne Kurve). Dementsprechend ergeben sich im Vergleich erhöhte elektrische Feldstärken nahe der Oberfläche (s. Abb. 3.7c). Unterschiede in der elektrischen Feldstärke werden jedoch innerhalb von etwa 2 nm Abstand von der Oberfläche durch lokal unterschiedliche ionische Abschirmung ausgeglichen.

4 Der Einfluss elektronischer Nanostrukturen auf das Biosystem

Seit der Entwicklung des ersten funktionstüchtigen Silizium-Transistors im Jahr 1954 hat die Bedeutung von Silizium in der Halbleitertechnologie bis heute beständig zugenommen. Der Elementhalbleiter ist dementsprechend das wohl meist studierte und im Hinblick auf die Elektronik bzw. elektrischen Eigenschaften am besten charakterisierte Element im Periodensystem. Mit der zunehmenden Miniaturisierung von Halbleiterbauelementen wurden bis heute Strukturgrößen geschaffen, die in der Größenordnung von Biomolekülen liegen und Silizium somit für die Untersuchung biologischer Fragestellungen immer mehr in den Fokus rücken [98]. Aufgrund der exakt einstellbaren elektronischen Eigenschaften sowie seiner Biokompatibilität [99, 100] eignet sich Silizium daher als ein Modellsystem für die Untersuchung des Einflusses lokal variierender elektrischer Oberflächeneigenschaften auf das Biosystem.

Dieser Einfluss wird im Folgenden mit Hilfe einer planaren Dotier-Linienstruktur untersucht. Durch die fehlende topografische Variation soll die Wirkung geometrischer Effekte, wie z.B. der besseren Erreichbarkeit erhabener Strukturen oder der Unterbindung der Oberflächendiffusion, und lokal variierender Dispersionswechselwirkungen auf das Biosystem ausgeschlossen werden. Das Linienmuster erlaubt dabei eine einfache, niederdimensionale Variation der Dotierdichte und dementsprechend der lokalen elektrischen Feldstärke, ähnlich der Feldstärkevariation nahe einer topografischen Grabenstruktur, wie sie von Elter et al. [22, 24] untersucht wurde (s. Abschnitt 3.4.1 und 3.4.2).

4.1 Substratpräparation

Dotier-Liniengitter mit 130 nm breiten p- und n⁺-dotierten Bereichen wurden von IHP (Innovations for High Performance Microelectronics; Leibniz-Institut für innovative Mikroelektronik, Frankfurt (Oder)) mittels Fotolithografie und Ionenim-

plantation in 200 mm-Siliziumwafer (750 μm eingeschrieben und im Rahmen einer Kooperation bereitgestellt. Die Linienbreite von 130 nm stellt dabei die kleinste vom IHP in Standardtechnologie gefertigte Strukturgröße dar. Diese ließ einen Einfluss auf die Proteinadsorption und die Zellbesiedlung erwarten (vgl. z.B. Strukturgröße in [24]).

Als Ausgangsmaterial für die Dotierstruktur diente mit Bor p-dotiertes (10^{18} – 10^{19} cm^{-3}) Czochralski-Silizium (100) mit einem spezifischen elektrischen Widerstand von 5–20 $\text{m}\Omega \text{ cm}$. Das in der Arbeit von Birkholz et al. [98] für die Ionenimplantation verwendete Arsen ist potentiell zytotoxisch [101]. So wird z.B. bei typischerweise für den Kontakt mit Knochengewebe eingesetzten Hydroxylapatit-Beschichtungen der Grenzwert von Arsen mit maximal 3 mg/kg angegeben [102]. Mit der angestrebten Dotierdichte von $1 \cdot 10^{21} \text{ cm}^{-3}$ ergäbe sich jedoch ein Massenanteil von näherungsweise $5 \cdot 10^4 \text{ mg/kg}$. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit Phosphor in die Wafer implantiert. Sowohl für dieses Element als auch für Bor und Silizium sind dem Verfasser keine zytotoxischen Effekte bekannt.

Auf die wichtigsten Prozessschritte der Probenherstellung soll hier nur kurz eingegangen werden. Die Prozessierung der Wafer ist detailliert in [98] beschrieben. Die Wafer wurden nacheinander den folgenden Prozessschritten unterzogen:

1. Reinigung der Waferoberfläche und Entfernung der nativen Oxidschicht mittels nasschemischer Verfahren (Piranha-Ätzung, Flusssäure-Ätzung, RCA-Reinigung)
2. Erzeugung einer 5 nm dicken SiO_2 -Schicht durch thermische Oxidation
3. Aufbringen einer für die KrF-Lithografie (248,4 nm) optimierten 25 nm dicken Antireflexionsschicht aus siliziumhaltigem Nitrid (Si[54 %], N[44 %] [103]) mittels chemischer Niederdruckgasphasenabscheidung
4. Erzeugung der Fotolackmaske (Dicke: 335 nm)
5. Fotolithografische Strukturierung der Lackmaske (130 nm-Fotolithografie)
6. Ionenimplantation von Phosphor (Ionenenergie/-dosis: 20 keV/ $3 \cdot 10^{15} \text{ cm}^{-2}$)
7. Plasmaveraschung der Lackmaske in einer Sauerstoffatmosphäre
8. Nasschemische Entfernung der SiN_x -Schicht mittels Flusssäure- und Piranha-Ätzung

9. Temperung in einer Stickstoffatmosphäre bei 1010 °C für 15 s (Ausheilen von Kristalldefekten)
10. Nasschemische Entfernung der SiO₂-Schicht mittels Flußsäure- und Piranha-Ätzung

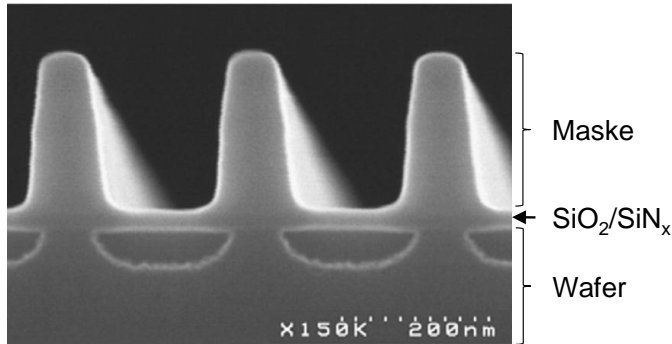


Abb. 4.1: REM-Querschnittsaufnahme des Dotier-Liniengitters an einer Bruchkante nach erfolgter Ionenimplantation. Auf der Waferoberfläche befinden sich das SiO₂/SiN_x-Schichtsystem und die Fotolackmaske. Aus [98].

Abb. 4.1 zeigt eine elektronenmikroskopische Querschnittsaufnahme des Dotier-Liniengitters nach erfolgter Ionenimplantation. Auf der Waferoberfläche befinden sich das SiO₂/SiN_x-Schichtsystem und die strukturierte, etwa 335 nm dicke Fotolackmaske. Die Bruchkante wurde für diese Aufnahme einer dekorativen Ätzung unterzogen, um den Kontrast zwischen dem kristallinen Wafer und den durch den Ionenbeschuss amorphisierten Bereichen zu verbessern. Die Ionenenergie und -dosis wurden mit 20 keV und $3 \cdot 10^{15} \text{ cm}^{-2}$ derart gewählt, dass sich eine möglichst hohe Dotierdichte von etwa $1 \cdot 10^{21} \text{ cm}^{-3}$ nahe der Waferoberfläche ergab (siehe Abschnitt 4.2.3). Nach der abschließenden nasschemischen Entfernung der Fotolackmaske und des SiO₂/SiN_x-Schichtsystems befinden sich die ionenimplantierten n⁺-dotierten Linien somit direkt an der Waferoberfläche und werden nur von einer nativen 1–2 nm dicken Oxidschicht bedeckt.

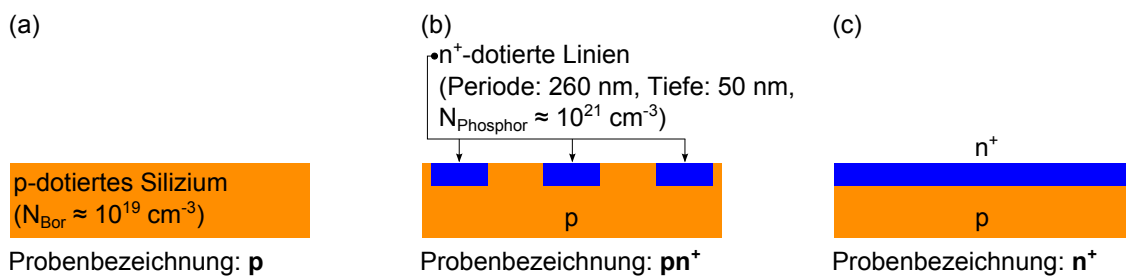


Abb. 4.2: Schematische Darstellung der untersuchten Substratmodifikationen. (a) Das Wafer-Ausgangsmaterial (Bezeichnung: p), (b) das Dotier-Liniengitter (Bezeichnung: pn⁺) und (c) der an der Oberfläche durchgängig mit Phosphor ionenimplantierte Wafer (Bezeichnung: n⁺).

Zur Untersuchung eines etwaigen chemischen Einflusses des Phosphors auf das biologische System wurde darüber hinaus ein an der Oberfläche durchgängig mit Phosphor ionenimplantierter Wafer hergestellt (Weglassen der Prozessschritte 4 und 5). Das Ausgangsmaterial diente als Referenzsubstrat, wobei hier lediglich die native Oxidschicht mit nasschemischen Verfahren entfernt wurde (Prozessschritt 10). Abb. 4.2 stellt die in dieser Arbeit verwendeten Proben schematisch dar und führt die Probenbezeichnungen ein.

4.2 Substratcharakterisierung

4.2.1 Messbedingungen

Röntgenphotoelektronenspektroskopie

Die Untersuchung der chemischen Zusammensetzung der Substratoberflächen erfolgte mit einem AXIS Ultra DLD XPS-System (Kratos Analytical Ltd., Manchester, Vereinigtes Königreich), das mit einer monochromatischen Aluminium- K_{α} -Röntgenquelle (1468,68 eV) und einem Halbkugelanalysator ausgestattet ist. Die Proben wurden in einem Bereich von $700 \mu\text{m} \times 300 \mu\text{m}$ angeregt und die senkrecht zur Oberfläche emittierten Elektronen detektiert. Auf jeder Modifikation wurde je ein Übersichtsspektrum (Bindungsenergie von 0 bis 1390 eV, Schrittweite 1 eV) mit einer Passenergie des Halbkugelanalysators von 160 eV und einer Leistung der Röntgenquelle von 150 W aufgenommen. Darüber hinaus wurden Detailspektren einzelner Elemente (Schrittweite 0,1 eV) mit einer Passenergie von 20 eV und einer Leistung von 225 W aufgenommen. Die Auswertung der Spektren erfolgte mit dem Programm CasaXPS (v2.3.15; Casa Software Ltd.).

Kapazitäts-Spannungs-Spektroskopie

Die Messungen von Kapazitäts-Spannungs (C-V)- und Strom-Spannungs (I-V)-Messungen an dem als pn-Übergang geschalteten oberflächennah durchgängig ionenimplantierten Substrat (n^+) sowie die C-V-Messungen an der MOS-Struktur

(p) bzw. den MOS-ähnlichen Strukturen (pn^+ und n^+) wurden mit einem Potentiostaten (Reference 600TM, Gamry Instruments, Warminster PA, USA) durchgeführt. Die der Gate-Spannung überlagerte Wechselspannung hatte eine Frequenz von 1 MHz und einen Effektivwert von 10 mV.

Raster-Kelvin-Mikroskopie

Die AFM-Messungen wurden mit einem Nanowizard II (JPK Instruments, Berlin) durchgeführt. Das Gerät kann modular auf verschiedene Messmodi erweitert werden, die auch die Charakterisierung elektrischer Oberflächeneigenschaften erlauben. Der AFM-Kopf enthält eine optische Kraftmesseinheit (850 nm-Infrarotlaser) und einen Piezoscanner (lateraler (x,y)-Scanbereich $100\ \mu\text{m} \times 100\ \mu\text{m}$, vertikaler z-Scanbereich $15\ \mu\text{m}$).

Für die KPFM-Untersuchungen der elektrischen Oberflächeneigenschaften wurde das herstellereigene KPFM-Modul (KelvinProbe Module; JPK Instruments, Berlin) verwendet. Die Messungen erfolgten mit hochgradig dotierten Silizium-Cantilevern mit einer Resonanzfrequenz von 320 kHz und Spitzenradien von 2 nm (SSS-NCH, NanoWorld AG, Neuchâtel, Schweiz) bzw. 8 nm (NCH, NanoWorld AG, Neuchâtel, Schweiz).

Kraftspektroskopie

Die Auswirkung der Ionenimplantation auf die elektrischen Oberflächeneigenschaften in Flüssigkeit wurde mit Hilfe der AFM-basierten Kraftspektroskopie in PBS untersucht. In der Untersuchung wurden auf jeder Substratmodifikation mindestens fünf Mal 100 Kraft-Abstands-Kurven aufgenommen, die in Form eines Rasters aus 10×10 Messpunkten in einem Bereich von $5\ \mu\text{m} \times 5\ \mu\text{m}$ angeordnet waren (Andruckkraft 1 nN, Kontaktzeit 1,5 s, Geschwindigkeit $1\ \mu\text{m}/\text{s}$). Aus den erhaltenen Kraft-Abstands-Kurven wurde die „Snap-in“-Kraft sowie die maximale Adhäsionskraft bestimmt. Für die vergleichenden Messungen wurde derselbe Cantilever aus Siliziumnitrid mit Siliziumspitze verwendet (Typ MSNL, $0,07\ \text{N}/\text{m}$; Bruker AFM Probes, Mannheim). Auf dem Dotier-Liniengitter (pn^+) wurde darüber hinaus eine Kraftkarte aus einem engmaschigen Raster aus 30×30 Messpunkten in einem Bereich von $260\ \text{nm} \times 260\ \text{nm}$ erstellt, um die lokal auf den Cantilever wirkenden Kräfte zu ermitteln.

Strömungspotentialmessungen

Strömungspotentialmessungen zur Bestimmung des Zeta-Potentials der Substratmodifikationen wurden in 0,1-molarer NaCl-Lösung mit einem elektrokinetischen Analysegerät (SurPASS; Anton Paar GmbH, Ostfildern-Scharnhausen) durchgeführt. Ein pH-Wert von 7,0 wurde mittels Titration von 1 M KOH- und 0,1 M HCL-Lösung eingestellt. In vier Messungen je Substratmodifikation strömten 500 ml der Elektrolytlösung mit einem maximalen Überdruck von 400 mbar durch den Spaltkanal.

Kontaktwinkelmessungen

Ergänzend zur Charakterisierung der elektrischen Oberflächeneigenschaften wurde die Benetzbarkeit und die Oberflächenenergie der Substrate mit einem digitalen Kontaktwinkelmessgerät (OCA 15EC; DataPhysics Instruments GmbH, Filderstadt) durch Kontaktwinkelmessungen am liegenden Tropfen (Tropfenvolumen = 0,5 μ l) untersucht. Tropfenbilder wurden mit der Digitalkamera des OCA-Systems aufgenommen und mit der Software SCA 20 (v4.1.11) des Messgerätes analysiert. Aus den Kontaktwinkeln von destilliertem Wasser und weiteren polaren und apolaren Testflüssigkeiten mit bekanntem dispersiven γ_L^D und polaren Anteil γ_L^P der Oberflächenspannung (s. Tabelle 4.1) wurde die Oberflächenenergie der Substrate mit Hilfe der Owens-Wendt-Rabel-Kaelble (OWRK)-Methode [73–75] ebenfalls mit der Software SCA 20 bestimmt.

Tabelle 4.1: Für die Kontaktwinkelmessungen verwendete Testflüssigkeiten mit dem jeweiligen polaren und dispersiver Anteil der Oberflächenspannungen. Werte aus [104] (Thiodiglycol [105]).

Flüssigkeit	Reinheitsgrad	Oberflächenspannung (mN/m)		
		Polar	Dispersiv	Gesamt
1-Bromnaphthalin	> 97 %	0,0	44,6	44,6
Diiodmethan	> 99 %	0,0	50,8	50,8
Thiodiglycol	> 99 %	18,0	35,0	53,0
Glycerin	> 99,5 %	26,4	37,0	63,4
Destilliertes Wasser	p.a.	51,0	21,8	72,8

4.2.2 Chemische Oberflächeneigenschaften

Die XPS-Übersichtsspektren der Proben sind in Abb. 4.3a dargestellt. Im Spektrum der Probe (p) wurden die Linien der detektierten Elemente exemplarisch bezeichnet. In allen drei Spektren konnte Silizium, Sauerstoff, Kohlenstoff und geringe Mengen Stickstoff identifiziert werden. Der Kohlenstoff-Peak ist auf Kohlenwasserstoffverunreinigungen zurückzuführen, die generell auftreten, wenn Oberflächen der Luft ausgesetzt sind [63]. Für das Auftreten der Stickstoff-Linie sind zwei Ursachen denkbar: Reste der SiN_x -Antireflexionsschicht, die mit der nasschemischen Reinigung der Waferoberflächen nicht vollends entfernt werden konnten oder gasförmiger Stickstoff, der im Produktionsprozess während der abschließenden Temperung adsorbiert ist. Eine eindeutige Unterscheidung ist dabei aufgrund der geringen Signalintensitäten nicht möglich.

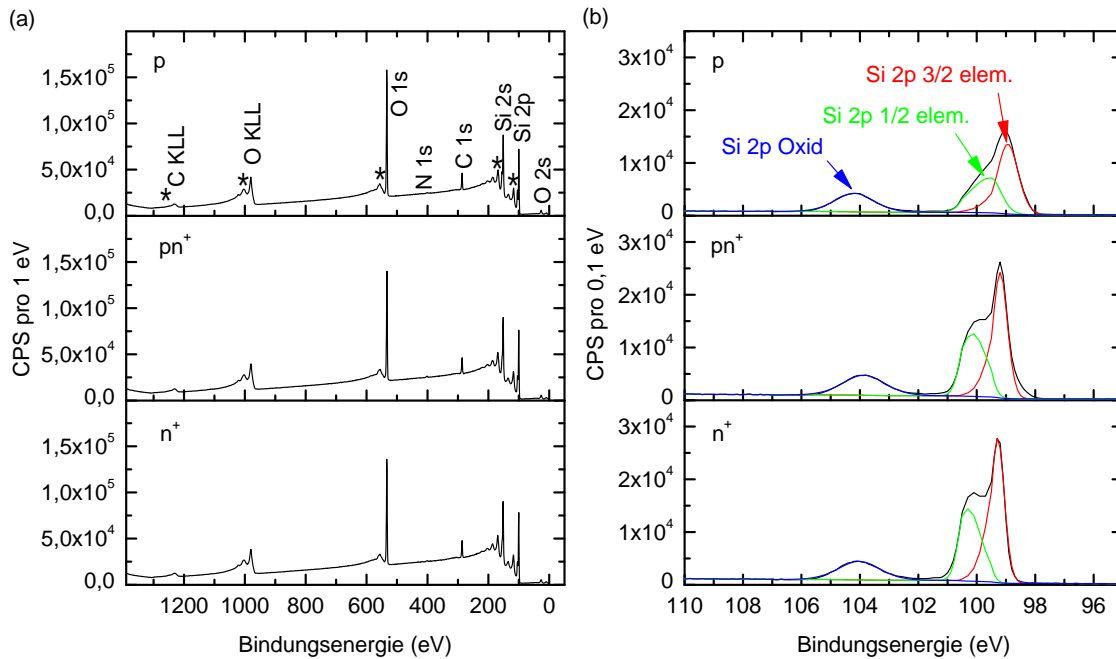


Abb. 4.3: (a) Die XPS-Übersichtsspektren der Substratmodifikationen. In allen drei Spektren wurden Sauerstoff, Stickstoff, Kohlenstoff und Silizium jedoch nicht die Dotierelemente Bor und Phosphor detektiert. Plasmonen sind mit einem * markiert. (b) Detailspektren der Silizium-Linie (Si 2p).

Die Dotierungselemente Bor und Phosphor wurden auf keiner der drei Substratmodifikationen detektiert. Für Bor wurde dieses Ergebnis erwartet, da dessen Konzentration mit 0,002 bis 0,02 At% (s. Abschnitt 4.1) unterhalb der XPS-

Nachweisgrenze von 0,1 At % liegt [63]. Das ionenimplantierte Phosphor hätte angesichts einer Konzentration von ca. 2 At % jedoch nachweisbar sein müssen. Als Erklärung für das Nichtvorhandensein der Phosphor-Peaks bieten sich zwei mögliche Ursachen an: Einerseits ist der Phosphor-Wirkungsquerschnitt für die verwendete Photonenenergie vergleichsweise klein [106], was geringe Signalintensitäten zur Folge hat, und darüber hinaus erschwert die Überlagerung von Plasmonen-Peaks (*) mit den Bindungsenergien des Phosphors (P 2p 1/2: 130,33 eV [107]; P 2s: 187,95 eV [108]) das Auffinden auswertbarer Peaks zusätzlich. Die XPS-Messung deutet somit darauf hin, dass die Substratmodifikationen im Rahmen der Nachweisgrenze der verwendeten Untersuchungsmethode eine identische Oberflächenchemie aufweisen.

In Abb. 4.3b ist das Detailspektrum der Silizium-Linie (Si 2p) dargestellt. Durch die chemische Verschiebung der Bindungsenergie ließ sich, neben den durch die Spin-Bahn-Kopplung aufgespaltenen Energieniveaus des elementaren Siliziums Si 2p 1/2 elem. (grüne Kurve) und Si 2p 3/2 elem. (rote Kurve) [109], oxidisch gebundenes Silizium (Si 2p Oxid, blaue Kurve) [110] identifizieren.

Tabelle 4.2: Bindungsenergien und Konzentrationen der identifizierten Elemente. Die Daten der mit ** gekennzeichneten Peaks wurden aus dem Detailspektrum der Si 2p-Linie berechnet.

	Probe		
	p	pn ⁺	n ⁺
Bindungsenergie (eV)			
C 1s	285,9	285,9	285,9
N 1s	400,9	400,9	400,9
O 1s	533,9	532,9	533,9
Si 2p	99,9	99,9	99,9
Si 2p elem.**	99,4	99,7	99,8
Si 2p Oxid**	104,2	103,9	104,0
Konzentration (At.%)			
C 1s	13,3	13,8	14,3
N 1s	0,8	0,9	0,5
O 1s	38,5	36,1	34,6
Si 2p	48,8	50,8	52,0
Si 2p elem.**	34,4	37,6	38,4
Si 2p Oxid**	11,6	10,9	10,3

Die Bindungsenergien und Konzentrationen der identifizierten Elemente sind in Ta-

belle 4.2 zusammengefasst. Die auf dem Ausgangsmaterial (p) erhöhte Menge an Sauerstoff lässt vermuten, dass die Oxidschicht im Vergleich zu den beiden ionenimplantierten Modifikationen dicker ist. Erhärtert wird dies durch die Konzentrationen des elementaren und des in Form von SiO_2 gebundenen Siliziums, die aus dem Detailspektrum der Silizium-Linie (Si 2p) gewonnen wurden: Auf dem Ausgangsmaterial wurde eine verringerte Konzentration elementaren Siliziums detektiert, was zusätzlich für eine dickere Oxidschicht spricht.

4.2.3 Elektronische Eigenschaften

Borkonzentration

Mittels Kapazitäts-Spannungs (C-V)-Spektroskopie wurde im Folgenden die Konzentration der Borstörstellen des Waferausgangsmaterials untersucht. Dafür wurde die native Oxidschicht des an der Oberfläche durchgängig mit Phosphor ionenimplantierten Wafers (n^+) durch Ätzen mit 10%iger Flusssäure entfernt und der Chip anschließend auf Vorder- und Rückseite mit Kontakten (Silberleitlack, ca. $3 \times 3 \text{ mm}^2$) versehen. Die Struktur entspricht in der Vertikalen somit einem pn-Übergang mit einem ca. $750 \mu\text{m}$ dicken p-dotierten und einem extrem schmalen n^+ -dotierten Bereich von ca. 50 nm Dicke. Eine exemplarische Strom-Spannungs (I-V)-Kennlinie der Struktur ist in Abb. 4.4a dargestellt. Sie zeigt das für pn-Dioden typische Sperrverhalten: Für an den p-dotierten Bereich angelegte negative Spannungen bis ca. -2 V fließt nur ein sehr geringer Strom; dies entspricht der Sperrrichtung. Unterhalb dieser Spannung erfolgt ein Durchbruch und die Struktur wird auch in Sperrrichtung leitend. Bei positiven Spannungen ab ca. 2 V ist die Struktur leitend und es fließt ein Strom, der mit größeren Spannungen exponentiell ansteigt; dies entspricht der Durchlassrichtung.

Die gemessene I-V-Kurve weicht vom idealen Verlauf, bei der die Schwellenspannung (Spannung bei der der Strom in Durchlassrichtung merklich größer als der Sperrstrom ist) bei typischerweise $0,6\text{--}0,7 \text{ V}$ liegt, stark ab. Diese Abweichung lässt sich unter Berücksichtigung eines Serienwiderstands R_s und eines Shunt-Widerstands R_{sh} verstehen, die vermutlich auf die nicht-idealen ohmschen Kontakte bzw. auf prozess- oder materialbedingte Defekte im Wafermaterial zurückzuführen sind [111]. Angesichts der Verschiebung der gemessenen Kurve um etwa 2 V

gegenüber dem idealen I-V-Verlauf lassen sich die Widerstände auf Werte in der Größenordnung von näherungsweise $1 \cdot 10^2 \Omega$ abschätzen.

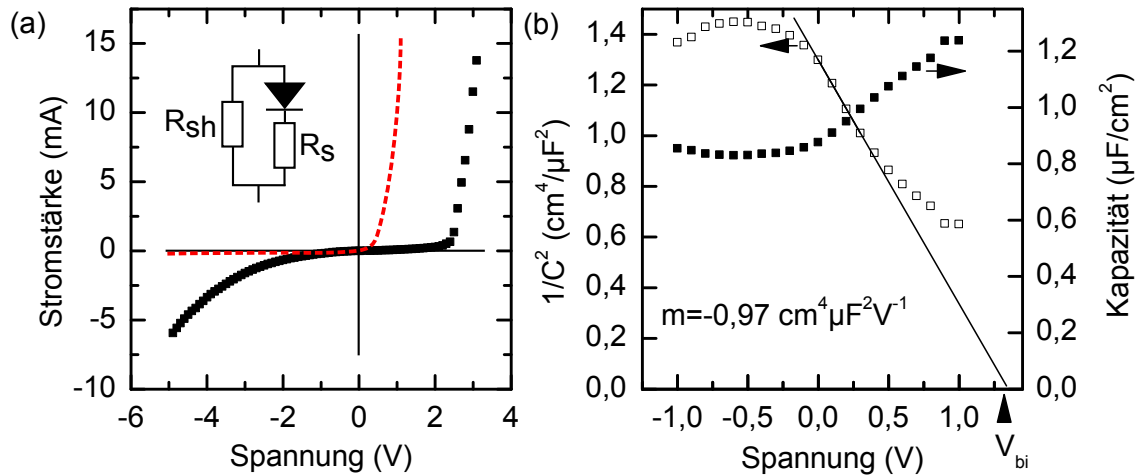


Abb. 4.4: (a) Ideale (rote gestrichelte Kurve) und gemessene (schwarze Symbole) Strom-Spannungs-Kennlinie mit Ersatzschaltbild (R_s Kontaktwiderstand, R_{sh} Shunt-Widerstand) und (b) Kapazitäts- und $1/C^2$ -Spannungs-Verlauf der oberflächennah durchgängig mit Phosphor ionenimplantierten Modifikation (n^+) ohne Oxid.

Die in der C-V-Spektroskopie an den p-dotierten Bereich angelegte Spannung V_a wurde zwischen -1 und $+1$ V variiert. Abb. 4.4b zeigt den spannungsabhängigen Verlauf der Kapazität und der $1/C^2$ -Kurve des pn-Übergangs. Für positive Spannungen zwischen 0 und $0,5$ V ergibt sich für Letztere ein nahezu linearer Verlauf. Unter Annahme eines asymmetrischen pn-Übergangs ($N_{Phosphor} \gg N_{Bor}$) lässt sich die Konzentration der Akzeptor-Störstellen damit durch Einsetzen des Anstiegs der $1/C^2$ -Kurve in Gl. 2.13 (S.17) berechnen [61]:

$$N_{Bor} \approx -\frac{2}{q\epsilon_S} \frac{1}{\frac{d(1/C_j^2)}{dV_a}} = 1,2 \cdot 10^{19} \text{ cm}^{-3}. \quad (4.1)$$

Dieser Wert liegt im durch den spezifischen elektrischen Widerstand vorgegebenen Intervall für die Dotierungskonzentration des Bors und zeigt, dass die C-V-Messung trotz der oben diskutierten nicht-idealen Kontakte eine verlässliche Methode zur Charakterisierung der Ladungsträgerverteilung im Halbleiter ist.

Darüber hinaus lässt sich die Diffusionsspannung V_{bi} des pn-Übergangs aus dem Schnittpunkt der Geraden mit der Spannungs-Achse ermitteln [61]. Der abgelesene

Wert von 1,3 V liegt in guter Übereinstimmung mit dem analytisch ermittelten Wert von ca. 1,2 V, der durch Einsetzen der Phosphorkonzentration $N_{Phosphor}$ (s. Kapitel 4.1) und der experimentell bestimmten Borkonzentration N_{Bor} in Gl. 2.11 (S.17) berechnet wurde.

Phosphorkonzentration

Die Verteilung des ionenimplantierten Phosphors im Silizium wurde mit Hilfe von SRIM (Stopping and Range of Ions in Matter) [112], einem frei erhältlichen Softwarepaket für die Analyse des Ionentransports in Materie, berechnet. Für die in Abschnitt 4.1 beschriebene Geometrie der Antireflexionsschicht, die Materialparameter und die verwendeten Prozessparameter der Ionenimplantation ergibt sich in der Tiefe die in Abb. 4.5 gezeigte Gaußverteilung mit einer Halbwertsbreite von näherungsweise 40 nm.

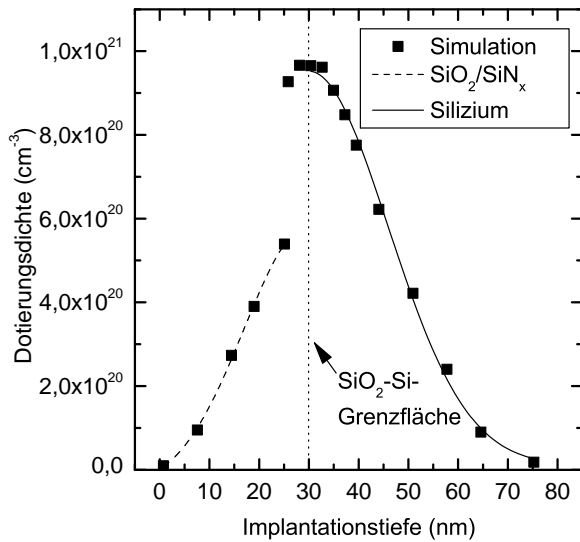


Abb. 4.5: Mit SRIM [112] simulierte Konzentrations-Tiefenverteilung von Phosphor im Siliziumwafer (Ionenenergie $E_{Phosphor} = 20$ keV, Ionendosis $D_{Phosphor} = 3 \cdot 10^{15}$ cm⁻²).

Das Schichtsystem aus SiN_x und SiO₂ bewirkt eine Anhebung des Maximums der Dotierungsdichte ($N_{Phosphor} \approx 9,5 \cdot 10^{20}$ cm⁻³) an die Waferoberfläche, und in weniger als 50 nm Tiefe fällt die Phosphorkonzentration auf null ab. Die laterale Breite der Konzentrationsverteilung unter der Lackmaske des Dotier-Liniengitters (pn⁺), die mit einer Fehlerfunktion beschrieben wird [113], wurde ebenfalls mit SRIM bestimmt; hier ergaben sich Werte um 10 nm. Die mit Phosphor ionenimplantierten Linien des Dotiergitters (pn⁺) sind somit scharf von den Bor-dotierten Linien des Ausgangsmaterials abgegrenzt.

Oxidladungen

Neben den Dotierelementen wirken sich Ladungen in der nativen SiO_2 -Schicht, die sich bei Kontakt der Wafer mit Luft zwangsläufig bildet, entscheidend auf die elektrischen Eigenschaften von Halbleiterbauelementen und deren elektrische Oberflächeneigenschaften aus [62]. Erneut wurden die Substrate mittels C-V-Spektroskopie untersucht. Im Gegensatz zu den Messungen zur Bestimmung der Borstörstellendichte in Abschnitt 4.2.3 wurde jedoch ein Kontakt auf die intakte native Oxidschicht auf der Vorderseite und ein weiterer ohmscher Kontakt auf der Rückseite der Proben aufgebracht. Für das Wafer-Ausgangsmaterial (p) ergibt sich dementsprechend eine MOS-Struktur bzw. für die beiden ionenimplantierten Modifikationen pn^+ und n^+ MOS-ähnliche Strukturen.

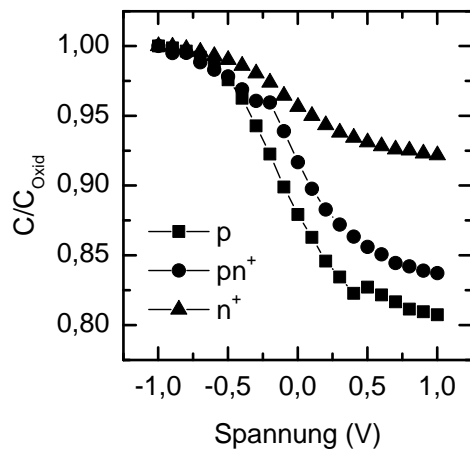


Abb. 4.6: C-V-Verläufe der drei Substratmodifikationen mit nativer Oxidschicht.

Abb. 4.6 zeigt die gemessenen C-V-Verläufe. Die Verschiebung zu negativeren Gate-Spannungen in der Reihenfolge $\text{n}^+ \rightarrow \text{pn}^+ \rightarrow \text{p}$ deutet auf positive Ladungen in den Oxidschichten des Dotier-Liniengitters (pn^+) und des Ausgangswafers (p) hin [62]. Als Folge aus dieser positiven Oberflächenladung ist daher von einer Verschiebung des Oberflächenpotentials von n^+ und pn^+ gegenüber p in positive Richtung im Vergleich zum oberflächenladungsfreien Idealfall auszugehen. Dabei wurde davon ausgegangen, dass die Kapazität des pn-Übergangs in der Probe n^+ in Reihe mit der MOS-Kapazität geschaltet ist. Aufgrund der extrem kleinen räumlichen Ausbreitung der pn-Kapazität wurde die MOS-Kapazität als dominanter Anteil in der Gesamtkapazität angenommen.

4.2.4 FEM-Elektrostatikberechnungen

Die aus der SRIM-Simulation gewonnene Verteilung des ionenimplantierten Phosphors (s. Abb. 4.7) und die mit C-V-Messungen ermittelte Borstörstellendichte wurden im Folgenden genutzt, um die Potentialverteilung an der Oberfläche des Dotier-Liniengitters (pn^+) numerisch mit COMSOL Multiphysics (v4.2; COMSOL Multiphysics GmbH, Göttingen) zu berechnen. Dafür wurde die Raumladungsdichte [61, 114]

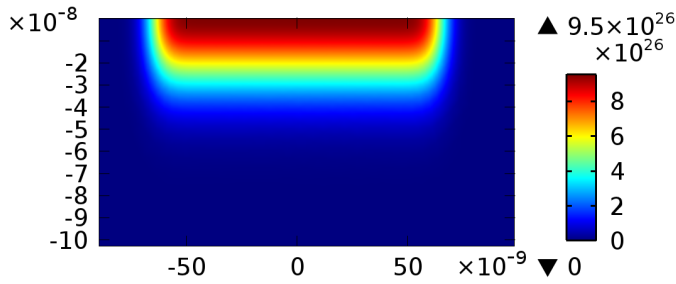


Abb. 4.7: Das zwei-dimensionale Dotierprofil des Dotiergitters.

$$\begin{aligned}\rho(x, y) &= q(p - n + N_D^+(x, y) - N_A^-) = q(p - n + N) \\ &= q \left(-2n_i \sinh \left(\frac{\phi - \phi_T \cdot \sinh^{-1} \left(-\frac{N}{2n_i} \right)}{\phi_T} \right) + N \right)\end{aligned}\quad (4.2)$$

in die Poisson-Gleichung (s. Gl. 2.3) eingesetzt. Dabei ist p die Löcher- und n die Elektronendichte, N_D^+ die Dichte ionisierter Donatoren, N_A^- die Dichte der ionisierten Akzeptoren, n_i die intrinsische Ladungsträgerdichte des Siliziums und ϕ_T die thermische Spannung.

Abb. 4.8a zeigt die numerische Lösung des elektrischen Potentials für die so erhaltene Poisson-Gleichung. Aus dem extrahierten Verlauf des Oberflächenpotentials (Abb. 4.8b) wird ersichtlich, dass sich über den n^+ -dotierten Linien ein um etwa 1,1 V positiveres Oberflächenpotential als über den p -dotierten Linien ausbildet. In den Bereichen der stärksten lateralen Potentialgradienten sind dementsprechend die stärksten elektrischen Feldstärken zu beobachten (s. Abb. 4.8c,d). Die Pfeile in Abb. 4.8c geben die Richtung des elektrischen Feldes an. An den Grenzbereichen der ionenimplantierten Linien zeigt es durch die lokal variierende Ladungsträgerdichte nicht mehr senkrecht zur Oberfläche, sondern enthält eine laterale Komponente.

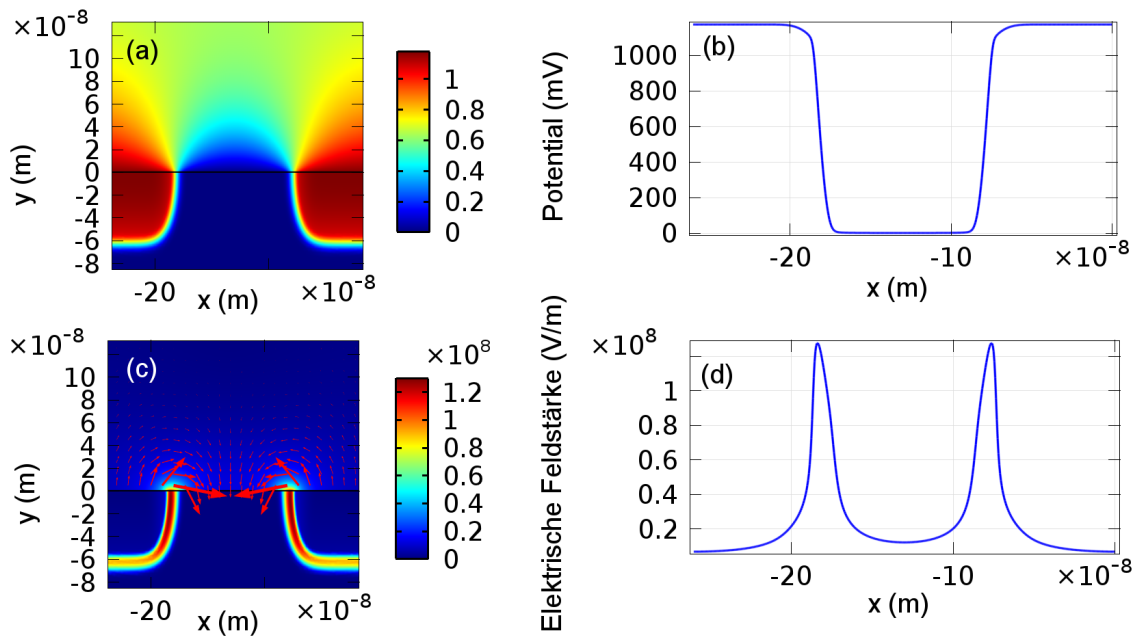


Abb. 4.8: Numerische Berechnung der Elektrostatik des Dotier-Liniengitters. (a) Elektrisches Potential, (b) Verlauf des Oberflächenpotentials, (c) elektrische Feldstärke (Oberflächenplot + Pfeildarstellung der Feldrichtung), (d) Verlauf der elektrischen Feldstärke entlang der Oberfläche.

Die Elektrostatikberechnungen der Dotierstruktur zeigen somit, dass mit der Ionenimplantation von Phosphor in Form eines Liniennusters eine lokale Variation der elektrischen Feldstärke erzeugt werden kann, deren Periode in der Größenordnung von Biomolekülen liegt.

4.2.5 Topografie und elektrisches Oberflächenpotential

Mit Hilfe von KPFM-Messungen wurde die tatsächliche Oberflächenpotentialvariation des Dotier-Liniengitters (pn^+) überprüft und das mittlere Oberflächenpotential aller Substratmodifikationen ermittelt. Zusätzlich lieferten die Messungen die Substrattopografien. Abb. 4.9a,c zeigt die Topografie des nanostrukturierten Dotier-Liniengitters. Mit den KPFM-Messungen und REM-Aufnahmen konnte gezeigt werden, dass das Dotiergitter über die gesamte Waferfläche eine gleichmäßige Struktur mit einer Periode von (259 ± 3) nm und einer topografischen Variation von $(10,3 \pm 0,6)$ nm aufweist. Die flachen Gräben der Struktur wurden als Phosphorimplantierte Bereiche identifiziert [98].

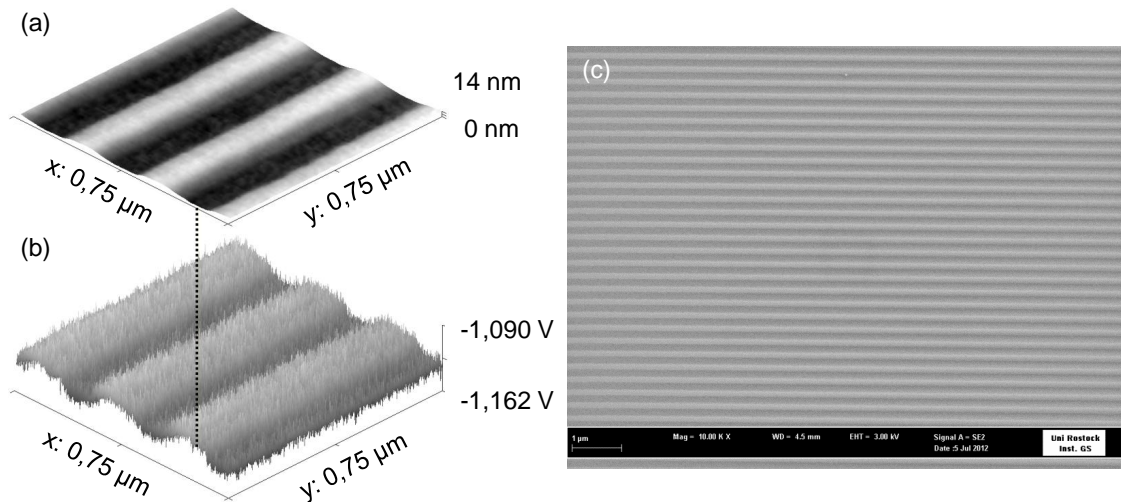


Abb. 4.9: (a) Topografie-Scan ($750 \mu\text{m} \times 750 \mu\text{m}$) des nanostrukturierten Dotier-Liniengitters. Die flachen Gräben (dunklere Bereiche) entsprechen den ionenimplantierten 130 nm breiten Linien. (b) Im dazugehörigen Scan des Oberflächenpotentials wurden positivere Werte (hellere Bereiche) über den ionenimplantierten Linien gemessen. (c) REM-Aufnahme des Dotier-Liniengitters (10.000 -fache Vergrößerung, Maßstabsbalken $1 \mu\text{m}$).

Tabelle 4.3 fasst die aus den AFM-Messungen gewonnenen Rauheitsparameter zusammen. Durch den lokalen Beschuss mit Ionen steigt die Rauheit in den Gräben des Dotier-Liniengitters (pn^+) im Vergleich zu den Kämmen leicht an. Insgesamt wurde auf pn^+ im Vergleich zu den beiden elektronisch homogenen Oberflächenmodifikationen p und n^+ ein Anstieg der Rauheit von einigen Nanometern gemessen, welcher jedoch aufgrund des sehr geringen Aspektverhältnis von $0,080 \pm 0,001$ zu keiner merklichen Variation der Rauheitskoeffizienten (Vergrößerung der realen zur projizierten Oberfläche) führte.

Tabelle 4.3: Aus KPFM-Messungen gewonnene topografische und elektrische Oberflächeneigenschaften: R_a -Wert, Rauheitskoeffizient r und Oberflächenpotential (Mittelwert \pm Standardabweichung, $N = 5$).

Probe	R_a (nm)	r	Oberflächenpotential (mV)
p	$0,35 \pm 0,04$	$1,035 \pm 0,007$	$75,0 \pm 16,2$
pn^+	$3,71 \pm 0,09$	$1,045 \pm 0,011$	$-138,4 \pm 24,4$
pn^+ (Kamm)	$0,39 \pm 0,06$		
pn^+ (Graben)	$0,50 \pm 0,04$		
n^+	$0,56 \pm 0,03$	$1,042 \pm 0,008$	$162,5 \pm 14,5$

Abb. 4.9b zeigt den Oberflächenpotential-Scan des Dotier-Liniengitters (pn^+). Die gestrichelte Linie in Abb. 4.9 deutet an, dass die positiveren Potentialwerte über den mit Phosphor ionenimplantierten Linien gemessen wurden, was mit der erwarteten Verteilung des Oberflächenpotentials eines pn -Übergangs übereinstimmt [61]. Die Variation des Oberflächenpotentials zwischen den n^+ - und p -dotierten Linien ist mit $(24,2 \pm 7,3)$ mV um ein bis zwei Größenordnungen kleiner als die aus der Differenz der Austrittsarbeiten der unterschiedlich dotierten Bereiche erwartete Variation, die näherungsweise bei 1 eV liegt. Bei Keysight Technologies durchgeführte KPFM-Messungen mit einem alternativen AFM-System (Keysight 5500 Scanning Probe Microscope, Keysight Technologies) ergaben eine Potentialvariation von bis zu 250 mV (s. Abb. A.3, S. 106).

In Tabelle 4.3 sind die aus den KPFM-Messungen erhaltenen mittleren Oberflächenpotentiale für alle drei Substratmodifikationen zusammengefasst. Der jeweilige Absolutwert enthält dabei einen konstanten Offset, der von verschiedenen Einflussfaktoren, wie z.B. dem verwendeten Cantilever, der elektrischen Kontaktierung der Proben und den Feedback-Parametern des AFM, abhängt. Daher wurden alle drei Substratmodifikationen wiederholt unter denselben Bedingungen mit demselben Cantilever gemessen³. Der an der Oberfläche durchgängig mit Phosphor ionenimplantierte Wafer (n^+) hatte ein im Vergleich zum unbehandelten Wafer (p) positiveres Oberflächenpotential, was ebenfalls dem theoretisch vorhergesagten Ergebnis entspricht. Auch hier ist der Unterschied mit etwa 90 mV jedoch um etwa eine Größenordnung kleiner als die, die aus der Austrittsarbeitdifferenz des oberflächennah n^+ - und des p -dotierten Siliziums erwartet wurde. Eine Interpretation der Messungen wird in Abschnitt 5.2.1 und 5.2.2 diskutiert.

4.2.6 Zeta-Potential

Die Messung des Strömungspotentials ermöglicht keine ortsauflösende Messung elektrischer Oberflächeneigenschaften, jedoch wurde erwartet, dass Unterschiede des mittleren Oberflächenpotentials der Substrate an Luft in Umgebung einer Flüssigkeit ebenso eine Veränderung des Zeta-Potentials zur Folge haben. Abb. 4.10 zeigt die in physiologischer 0,1 M Kochsalzlösung gemessenen Zeta-Potentiale der

³Die zwischen den Substraten ausgebildeten Unterschiede des mittleren Oberflächenpotentials wurden außerdem durch Messungen mit weiteren Cantilevern desselben Typs bestätigt.

Proben zusammen mit den an Luft gemessenen Oberflächenpotentialen. Erneut wurden auf dem Dotier-Liniengitter (pn^+) stärker negative Potentialwerte gemessen als auf dem Ausgangsmaterial (p), wohingegen die durchgängig ionenimplantierte Waferoberfläche (n^+) ein positiveres Zeta-Potential aufwies. Es zeigt sich ein linearer Zusammenhang (s. schwarze Symbole in Abb. 4.10), der für moderate Zeta-Potentiale unter Annahme einer konstanten Dicke der starren Doppelschicht der theoretischen Vorhersage entspricht [45] (s. Gl. 2.6, S.8).

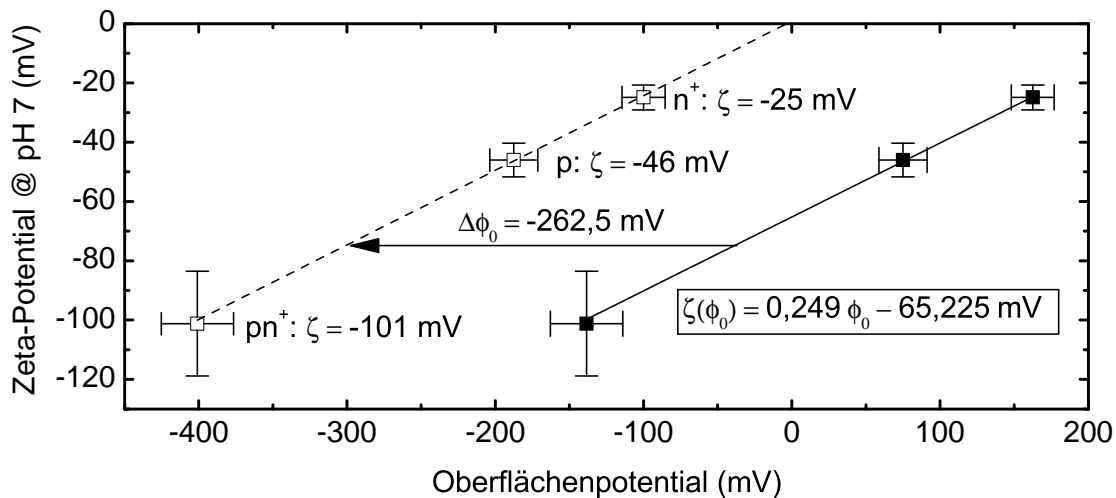


Abb. 4.10: Lineare Korrelation zwischen Oberflächenpotential und Zeta-Potential (Mittelwert \pm Standardabweichung, $N = 4$). Die mit KPFM gemessenen Oberflächenpotentiale (schwarze Symbole) wurden in negative Richtung verschoben (weiße Symbole), sodass für $\phi_0 = 0 \rightarrow \zeta = 0$ gilt.

Mit KPFM konnten nur relative Änderungen zwischen den Oberflächenpotentialen der Modifikationen gemessen werden, da die Austrittsarbeit des Cantilevers nicht bekannt war. Die Oberflächenpotentialwerte enthalten daher einen unbekanntem Offset-Wert und konnten nicht auf ein Referenzpotential im Elektrolyten, wie es bei der Zeta-Potentialmessung der Fall ist, bezogen werden. Unter der Annahme, dass für $\phi_0 = 0$ mV ebenfalls das Zeta-Potential $\zeta = 0$ mV ist [115], können die Messwerte der Oberflächenpotential-Achse jedoch aufgrund des linearen Zusammenhangs in negative Richtung verschoben werden (weiße Symbole in Abb. 4.10) und der Offset dementsprechend abgezogen werden.

4.2.7 Benetzbarkeit und Oberflächenenergie

Der Kontakt zwischen Biomaterial und Biosystem findet im Allgemeinen in einer wässrigen Umgebung statt. Die Benetzbarkeit der Materialoberfläche ist daher ein weiterer wichtiger Parameter, der auf Proteine und Zellen einwirkt.

Tabelle 4.4: Kontaktwinkel der Testflüssigkeiten (Mittelwert \pm Standardabweichung, $N = 5$) und die mit der OWRK-Methode berechneten Oberflächenenergien.

		p	pn ⁺	n ⁺
Kontaktwinkel (°)	1-Bromnaphthalin	21,7 \pm 2,8	15,4 \pm 3,7	21,6 \pm 2,1
	Diiodmethan	43,0 \pm 1,1	42,0 \pm 1,1	40,3 \pm 1,4
	Thiodiglycol	26,5 \pm 5,5	16,2 \pm 4,1	28,2 \pm 2,7
	Glycerin	32,9 \pm 1,8	20,8 \pm 2,8	50,2 \pm 1,3
	Wasser	46,7 \pm 5,2	25,9 \pm 4,6	54,7 \pm 2,2
Oberflächenenergie (mJ/m ²)	gesamt	55,8	64,9	50,9
	polar	18,8	28,8	13,7
	dispers	37,0	36,1	37,2

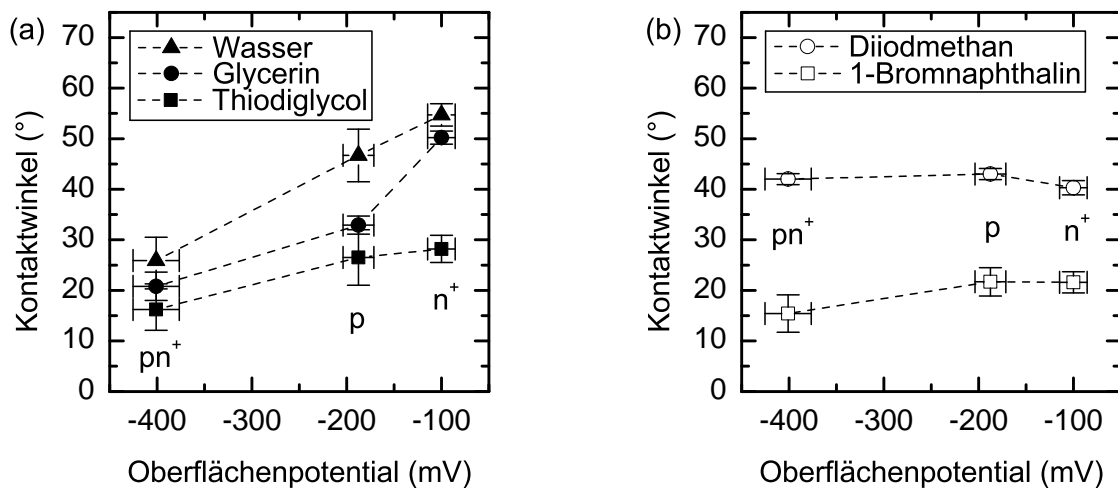


Abb. 4.11: Die Kontaktwinkel (a) polarer (Wasser, Glycerin, Thiodiglycol) und (b) apolarer Flüssigkeiten (Diiodmethan, 1-Bromnaphthalin) in Abhängigkeit vom korrigierten Oberflächenpotential (s. Abb. 4.10). Die Linien dienen der Veranschaulichung.

Die Ergebnisse der Kontaktwinkelmessungen sind in Tabelle 4.4 zusammengefasst. Der Kontaktwinkel des unbehandelten Wafers (p) stimmt mit Werten von vergleichbaren an Luft gealterten Siliziumwafern überein [116]. Ein Vergleich des Wasserkontaktwinkels des Ausgangsmaterials (p) mit den beiden ionenimplantierten Modifi-

kationen zeigt, dass das Dotier-Liniengitter (pn^+) eine bessere Benetzbarkeit aufweist, wohingegen der an der Oberfläche durchgängig mit Phosphor ionenimplantierte Wafer (n^+) hydrophober ist. Die beiden weiteren polaren Testflüssigkeiten Glycerin und Thiodiglycol zeigen das gleiche Benetzungsverhalten. Die Kontaktwinkel der apolaren Testflüssigkeiten 1-Bromnaphthalin und Diiodmethan blieben hingegen nahezu konstant.

Abb. 4.11 fasst die Ergebnisse der Kontaktwinkel- mit denen der Oberflächenpotentialmessungen zusammen. Die Benetzbarkeit der polaren Testflüssigkeiten Wasser, Glycerin und Thiodiglycol in Abhängigkeit vom Oberflächenpotential verhält sich ähnlich (Abb. 4.11a): Mit in positiver Richtung ansteigendem Oberflächenpotential verschlechtert sich die Benetzbarkeit. Die im Gegensatz dazu nur schwach variierenden Kontaktwinkel der unpolaren Flüssigkeiten 1-Bromnaphthalin und Diiodmethan in Abb. 4.11b deuten darauf hin, dass durch die Ionenimplantation ausschließlich der polare Anteil der Oberflächenenergie modifiziert wurde und somit nur die Benetzbarkeit polarer Flüssigkeiten beeinflusst wird.

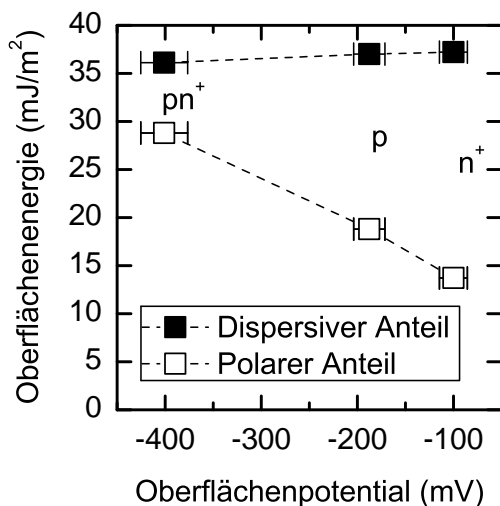


Abb. 4.12: Abhängigkeit der Oberflächenenergie vom Oberflächenpotential. Der polare Anteil der Oberflächenenergie sinkt mit Zunahme des Oberflächenpotentials. Der dispersive Anteil bleibt näherungsweise konstant. Die gestrichelten Linien dienen der Veranschaulichung.

Aus den Kontaktwinkeln der fünf Testflüssigkeiten wurde im Folgenden die Oberflächenenergie der drei Wafermodifikationen mit Hilfe der OWRK-Methode berechnet. Die Ergebnisse der Berechnungen sind ebenfalls in Tabelle 4.4 zusammengefasst. Die Oberflächenenergie des Dotier-Liniengitters (pn^+) ist gegenüber dem unbehandelten Ausgangsmaterial (p) erhöht, wohingegen für den durchgängig an der Oberfläche ionenimplantierten Wafer (n^+) ein Abfall berechnet wurde. Bei Betrachtung der beiden Anteile der Oberflächenenergie fällt auf, dass der Anstieg bzw. Abfall alleinig durch den polaren Anteil hervorgerufen wird, der für pn^+ 53% größer bzw. für

n^+ 27% kleiner ist als beim Wafer-Ausgangsmaterial (p). Der disperse Anteil kann dagegen für alle drei Modifikationen als nahezu konstant angenommen werden. Abb. 4.12 verdeutlicht, dass sich mit zunehmendem negativen Oberflächenpotential ein größerer polarer Anteil der Oberflächenenergie einstellt, wobei der dispersive Anteil näherungsweise konstant bleibt. Dies deutet darauf hin, dass alleinig der durch die Variation der elektrischen Oberflächeneigenschaften veränderte polare Anteil die Benetzbarkeit beeinflusst.

4.2.8 Kraftspektroskopische Analyse der Wechselwirkung zwischen Cantilever und Substrat

Das Anlegen einer Spannung in einer wässrigen Umgebung kann zu elektrochemischen Reaktionen und störenden Kräften führen, was die Anwendbarkeit der KPFM stark einschränkt. Daher wurde mit der Kraftspektroskopie ein indirekter Weg gewählt, um eine Aussage über die Auswirkung der Ionenimplantation auf die elektrischen Oberflächeneigenschaften in Flüssigkeit treffen zu können. Abb. 4.13 zeigt exemplarische Kraft-Abstands-Kurven, die auf den drei Oberflächenmodifikationen in PBS gemessen wurden. Während beim Ausgangsmaterial (p) und dem Dotier-Liniengitter (pn^+) kein „Snap-in“ und nur sehr geringe Adhäsionskräfte gemessen wurden, zeigten die Kraft-Abstands-Kurven des an der Oberfläche durchgängig mit Phosphor ionenimplantierten Wafers (n^+) einen deutlich ausgeprägten „Snap-in“ sowie größere Adhäsionskräfte.

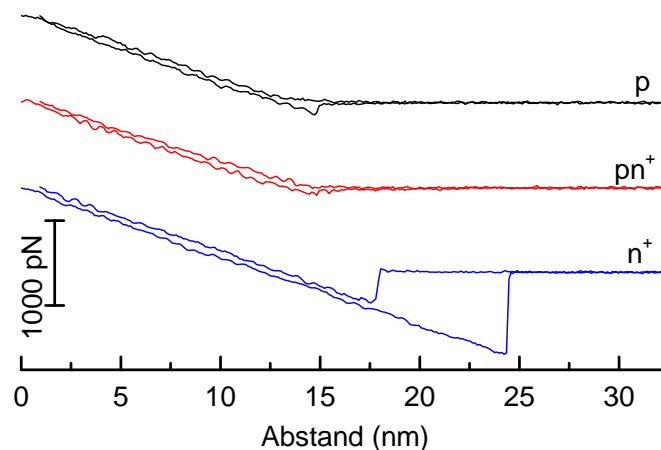


Abb. 4.13: Exemplarische Kraft-Abstands-Kurven der drei Substrate.

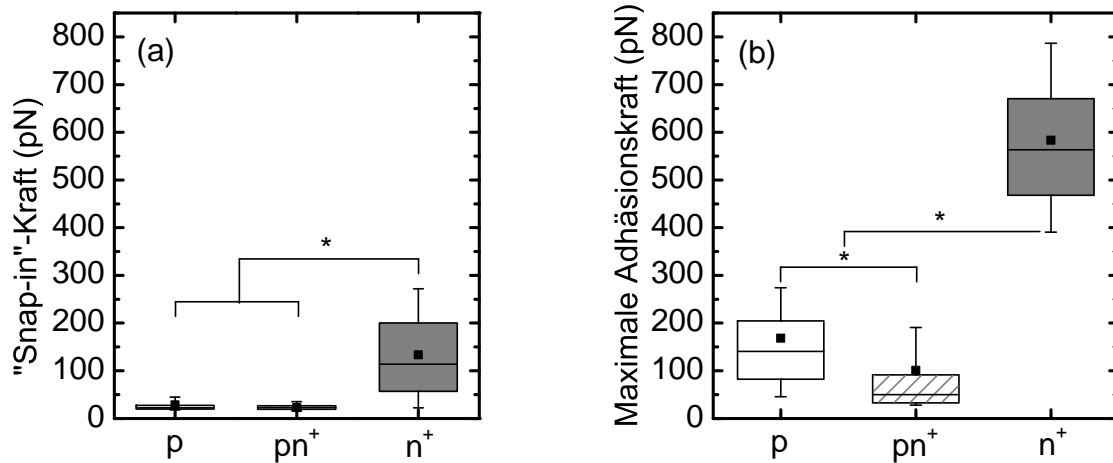


Abb. 4.14: (a) Snap-in-Kraft in der Annäherungskurve und (b) maximale Adhäsionskraft in der Rückziehkurve zwischen der Cantilever-Spitze und den Substratmodifikationen. Die Box schließt jeweils 50 % und die „Whisker“ 100 % der Daten ein. Der Punkt markiert den Mittelwert und die Linie den Median ($N > 500$). Die Sterne markieren Datensätze, die nach einem Mann-Whitney-U-Test für ungepaarte Stichproben ($p < 0,001$) signifikant unterschiedlich sind.

Abb. 4.14 fasst die kraftspektroskopischen Messungen zusammen. Im Gegensatz zum Ausgangsmaterial (p) und dem Dotier-Liniengitter (pn⁺) wurde der Cantilever ab einem bestimmten Abstand auf die durchgängig n⁺-oberflächenimplantierte Modifikation (n⁺) gezogen (s. Abb. 4.14a). Die Kraftwerte von (p) und (pn⁺) liegen im Bereich des thermischen Rauschens und gehen gegen null. In den Rückziehkurven wurde ebenfalls die größte mittlere Adhäsionskraft zwischen Cantilever-Spitze und (n⁺) und eine größere Adhäsionskraft des Cantilevers auf dem Ausgangsmaterial (p) als auf dem Dotiergitter (pn⁺) gemessen.

Im nächsten Schritt wurde das Dotier-Liniengitter (pn⁺) genauer untersucht. Dafür wurde ein feinmaschiges Raster (30×30 Messpunkte in einem Bereich von $260 \text{ nm} \times 260 \text{ nm}$) über die Probe gelegt. Abb. 4.15a zeigt das gemessene Höhenprofil. Die Linien der Dotierstruktur verlaufen vertikal, wobei die beiden dunkleren Bereiche n⁺-leitend und der hellere Bereich p-leitend ist (s. Abschnitt 4.1, S. 45). Aus dem Vergleich mit der Karte der maximalen Adhäsionskräfte aus der Rückziehkurve in Abb. 4.15b lässt sich erkennen, dass in den ionenimplantierten Bereichen größere Adhäsionskräfte zwischen Cantilever-Spitze und Substrat wirken als im nicht-ionenimplantierten Bereich.

Im Folgenden wurden die Werte der maximalen Adhäsionskraft aus den Kraft-

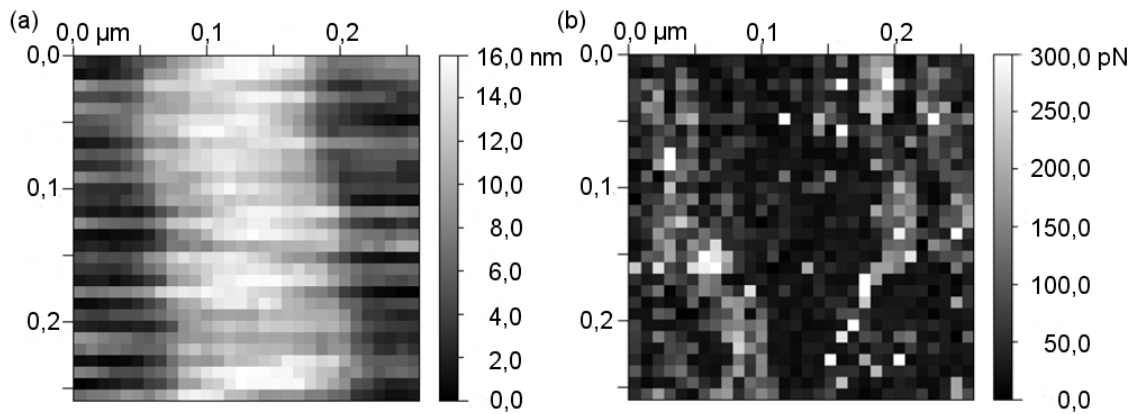


Abb. 4.15: Mittels Kraftspektroskopie gemessene (a) Topografie und (b) die dazugehörige Kraftkarte des Dotier-Liniengitters.

Abstands-Kurven entsprechend dem Höhenprofil sortiert. Dabei wurden die Werte aus dem Bereich der Flanken der Erhöhung nicht berücksichtigt. Abb. 4.16 vergleicht die Werte der Adhäsionskraft im p-leitenden und im n^+ -leitenden Bereich. Die Adhäsionskraft ist im ionenimplantierten Bereich signifikant erhöht (Mann-Whitney-U-Test, $p < 0,05$, $N > 180$). Die Verteilung der Adhäsionskräfte auf den unterschiedlich dotierten Linien des Dotier-Liniengitters (pn^+) entspricht somit der Tendenz der Adhäsionskräfte auf den elektronisch homogenen Substratmodifikationen p und n^+ (vgl. Abb. 4.14b).

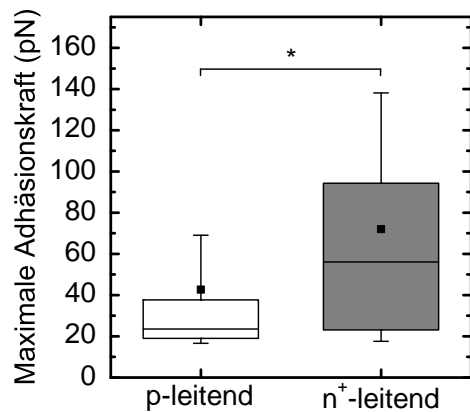


Abb. 4.16: Lokal variierende Adhäsionskraft zwischen Cantilever-Spitze und Dotier-Liniengitter (pn^+). Die Box schließt jeweils 50 % und die „Whisker“ 100 % der Daten ein. Der Punkt markiert den Mittelwert und die Linie den Median. Der Stern markiert die nach dem Mann-Whitney-U-Test ($p < 0,05$, $N > 180$) signifikant unterschiedlichen Adhäsionskräfte.

4.3 Biologische Untersuchungen

Nachdem im vorherigen Kapitel die Auswirkung der Ionenimplantation von Phosphor auf die elektrischen Oberflächeneigenschaften an Luft und im Kontakt mit

einer wässrigen Elektrolytlösung untersucht wurden, soll im Folgenden anhand einiger ausgewählter Beispiele der Einfluss der Modellsubstrate auf das biologische System gezeigt werden. Es wird die Adsorption von Fibronectin sowie die Adhäsion und Morphologie humaner MG-63-Osteoblasten auf den Modellsubstraten diskutiert.

4.3.1 Messbedingungen

Zellkultur

Die Zellkultivierung sowie die biologischen Untersuchungen mittels Fluoreszenzmikroskopie und Durchflusszytometrie wurden in Kooperation mit dem Arbeitsbereich Zellbiologie der Universitätsmedizin Rostock durchgeführt. Für die zellbiologischen *in vitro*-Untersuchungen wurde die humane Osteoblasten-Zelllinie MG-63 (ATTC® CRL-1427™, Passage 88; American Type Culture Collection, LGC Promochem, Wesel) verwendet, die erstmals von Billiau et al. [117] beschrieben wurde. MG-63 weist funktionelle Eigenschaften eines frühen Osteoblastenstadiums auf und wird in der medizinischen Grundlagenforschung aufgrund der fortgesetzten Zellteilung, der einfachen Verfügbarkeit sowie der Wiederholbarkeit eingesetzt [118]. Darüber hinaus zeigt diese Zelllinie eine hohe Sensitivität hinsichtlich physikochemischer Materialcharakteristika und wurde bereits vielfach für die Untersuchung der Zell-Material-Wechselwirkung eingesetzt [119–121].

Vor der Aussaat auf den Substraten wuchsen die Zellen im Nährmedium, bestehend aus Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), 10 % fetalem Kälberserum (FKS), 1 % Gentamycin sowie 0,02 % Plasmocin, in einer 5%igen CO₂-Atmosphäre bei 37 °C und 85%iger relativer Luftfeuchtigkeit im Brutschrank zu einem subkonfluenten Zellrasen heran [60]. Die Konfluenz, das Wachstum und die Morphologie der Zellen wurden mit Hilfe eines inversen Lichtmikroskops (Axiovert25, Carl Zeiss) kontrolliert. Befanden sich die Zellen in der gewünschten Dichte, wurden sie durch Spülen mit PBS und durch Zugabe einer Trypsin-Ethylendiamintetraacetat-Lösung abgelöst und in Suspension gebracht. Für die Bestimmung der Anzahl von vitalen Zellen wurden 100 µl aus der Zellsuspension entnommen, in 10 ml Pufferlösung verdünnt und mit einem Zellzähler (CASY Model TT - Cell Counter and Analyzer, Schärfer System, Roche Innovatis AG, Basel, Schweiz) analysiert. Die Zelldichte

betrug zwischen $1 \cdot 10^4$ und $1 \cdot 10^5$ Zellen/cm² [60]. Die Zellkultur auf den Substraten erfolgte im Nährmedium (DMEM + 10 % FKS) sowie in serumfreiem Medium (DMEM).

Konfokale Fluoreszenzmikroskopie

Die Adsorption von Fibronectin sowie die Besiedlung humaner MG-63-Osteoblasten auf den Substratchips wurde mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie mit einem Laser-Scanning-Mikroskop (LSM) untersucht. Reflektiertes und vom Präparat außerhalb der Fokusebene emittiertes Licht lässt sich bei dieser Methode mit Hilfe einer variablen, vor dem Detektor positionierten Lochblende, dem Pinhole, unterdrücken. Durch das punktuelle Abrastern der Probe mit dem fokussierten Laser des LSM wird zudem eine Reduzierung des Streulichts außerhalb des untersuchten Probenvolumens bewirkt, sodass im Vergleich zur konventionellen Fluoreszenzmikroskopie schärfere, kontrastreiche Abbildungen der untersuchten Proben erzeugt werden können.

Als Messgerät diente ein invertiertes Fluoreszenzmikroskop (Axio Observer Z1, Carl Zeiss, Oberkochen) in Kombination mit einem LSM (Laser Scanning System 780, Carl Zeiss, Oberkochen), das über sieben verschiedene interne Laser (405–633 nm) und einen hochempfindlichen 32-Kanal-GaAsP-Detektor verfügt. Darüber hinaus steht ein externer Argon-Laser (488 nm) zur Verfügung. Das verwendete Objektiv ist ein Ölimmersionsobjektiv (63x Plan-Apochromat, NA 1,4, AA 1,4 mm). Für *in vitro*-Aufnahmen lebender Zellen über einen längeren Zeitraum ist das LSM mit einem CO₂-Inkubationssystem und einer Temperaturregelung ausgestattet.

Immunfluoreszenzfärbung von Fibronectin

Die Substrate wurden für 60 min mit 2 µg/ml Fibronectin (Plasma-Fibronectin aus Rinderserum; Sigma-Aldrich, München) in PBS und mit einer Lösung aus DMEM und 10 % FKS inkubiert. Für die spezifische Markierung des Fibronectins wurde ein polyklonales Immunglobulin im Verhältnis 1:100 in PBS mit 1 % BSA als primärer Antikörper verwendet (Fibronectin-Antikörper H-300; Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg). H-300 bindet an den C-Terminus des Fibronectinmoleküls. Das BSA diente zum Blockieren der nicht spezifischen Anlagerung von Antikörpern an die

Substrate. Die Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte für 60 min in einem Schüttler (IKA MTS 2/4 digital Mikrotiterschüttler, IKA GmbH, Staufen), um die Antikörper gleichmäßig auf den Substratoberflächen zu verteilen. Der sekundäre Antikörper (Goat anti-rabbit IgG-CFL 488; Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg), der mit dem Fluoreszenzfarbstoff CruzFluor™ 488 (Absorptionsmaximum 496 nm, Emissionsmaximum 519 nm) konjugiert ist, wurde im Verhältnis 1:200 in PBS mit 1 % BSA verwendet. Die Inkubation erfolgte für 30 min im Schüttler im Dunkeln, um ein vorzeitiges Ausbleichen des Fluoreszenzfarbstoffes zu vermeiden. Zwischen den einzelnen Schritten wurden die Proben jeweils vorsichtig mit PBS gespült, wobei darauf geachtet wurde, dass die Substrate stets mit Flüssigkeit benetzt blieben. Die Proben wurden in Flüssigkeit (PBS) kopfüber in eine Analysekommer mit Glasboden (μ -Slide 2 Well Glass Bottom, ibidi GmbH, München) gelegt und untersucht. Die Anregung der Fluoreszenz erfolgte mit dem externen Argon-Laser (488 nm). Die LSM-Aufnahmen wurden mit der Bildanalysesoftware ImageJ (v1.49e) ausgewertet. Die Fluoreszenzintensität wurde als proportional zur Summe der Grauwerte aller Pixel der Aufnahme angenommen [122].

Zellmembranfärbung

Die Zellmembranen der MG-63-Osteoblasten wurden mit dem lipophilen Membranfarbstoff PKH26 (PKH26 Red Fluorescent Cell Linker Kit, Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, MO, USA) angefärbt. Die Anregung des Farbstoffs erfolgte mit einem internen Argon-Laser (514 nm).

Zelladhäsionsbestimmung mittels Durchflusszytometrie

Die Adhäsion von MG-63-Osteoblasten auf den Substratchips nach 60-minütiger Kultivierung wurde mittels Durchflusszytometrie untersucht [123]. Zwischen $1 \cdot 10^4$ und $1 \cdot 10^5$ in 300 μ l serumhaltigem (10 % FKS) oder serumfreiem DMEM suspendierte Zellen wurden auf 1 cm \times 1 cm große Chips (p, pn⁺, n⁺) gegeben und für 1 h bei 37 °C in 5 %iger CO₂-Atmosphäre kultiviert. Nach Ablauf der Kultivierungszeit wurde der Überstand abpipettiert und die Probenoberflächen mit 100 μ l PBS gespült. Die im Überstand und in der PBS-Spülung enthaltenen nicht adhären-ten Zellen wurden mit einem Durchflusszytometer (FACSCalibur, BD Biosciences - Becton Dickinson, Erembodegem, Belgien) mit der Software CellQuest Pro 4.0.1

hinsichtlich ihrer Größe und Granularität analysiert und gezählt. Der prozentuale Anteil adhärenter Zellen wurde auf die insgesamt auf die Oberflächen gegebenen Zellzahl bezogen, die parallel mit einer Referenzzählung von 300 μ l Zellsuspension ermittelt wurde.

Rasterelektronenmikroskopie

Die Topografie der Substrate und die Morphologie adhärenter MG-63-Zellen auf den Substraten wurde mittels Feldemissions-Rasterelektronenmikroskopie (FESEM; Supra 25, Zeiss, Oberkochen) untersucht. Das verwendete FESEM erlaubt aufgrund der typischen Beschleunigungsspannungen zwischen 1 und 3 kV das Abbilden biologischer Objekte auch ohne vorherige Beschichtung mit leitfähigen Gold- oder Kohlenstoffschichten. Die relativ niedrige Energie des Primärelektronenstrahls hat darüber hinaus zur Folge, dass die Eindringtiefe der Elektronen verringert wird, wodurch eine oberflächenspezifische Abbildung der Probe ermöglicht wird.

Die Präparation der Zellen für die FESEM-Aufnahmen erfolgte am Elektronenmikroskopischen Zentrum der Universität Rostock. Nach Abschluss der Kultivierung wurden die Substrate mit den Zellen mit PBS gespült und mit 2,5 % Glutardialdehyd (GA) fixiert. Anschließend wurde das GA mit einem 0,1 %igen Natriumphosphat-Puffer ausgewaschen. Eine aufsteigende Aceton-Konzentrationsreihe (5 min 30 %, 5 min 50 %, 10 min 75 %, 15 min 90 %, 2 · 10 min 100 %) wurde verwendet, um den Zellen Wasser zu entziehen [60]. Abschließend erfolgte eine Kritische-Punkt-Trocknung.

4.3.2 Adsorption von Fibronektin

Abb. 4.17 zeigt die mittels Fluoreszenzmikroskopie quantifizierte Menge des indirekt gefärbten Fibronektins auf den Substraten nach der Adsorption aus der Lösung mit einer Volumenkonzentration von 2 μ g/ml in PBS und aus DMEM unter Zugabe von 10 % FKS. Sowohl nach Adsorption aus der reinen Fibronektinlösung (Abb. 4.17a) als auch nach Adsorption aus dem Proteingemisch (Abb. 4.17b) zeigten sich im Vergleich zu den beiden elektrisch homogenen Oberflächen erhöhte Mengen von Fibronektin auf dem Dotier-Liniengitter (pn^+). Aufgrund der relativ kleinen Versuchsanzahl bei der Untersuchung der Adsorption aus der reinen Fibronektinlösung

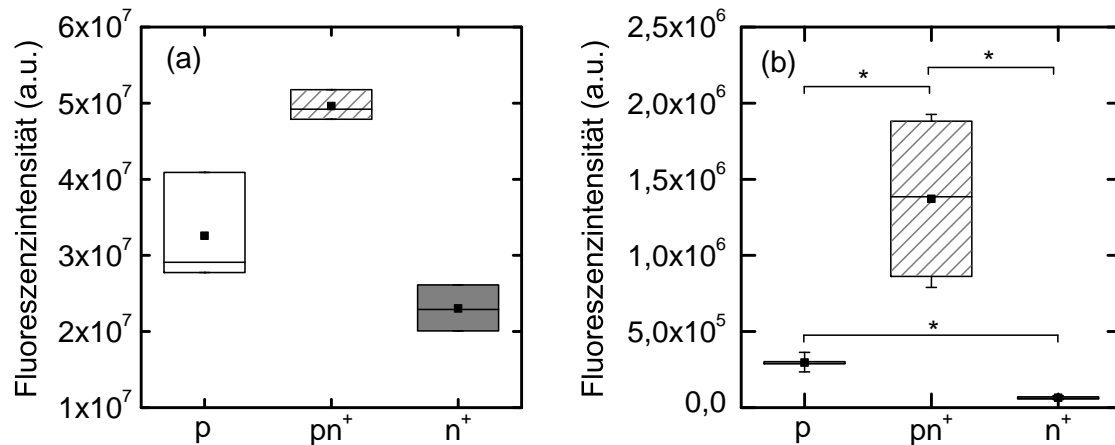


Abb. 4.17: Boxplot der adsorbierten Menge Fibronectin auf den Substraten nach 60 min Inkubation (a) mit einer $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ -Lösung ($N = 3$) und (b) mit DMEM unter Zugabe von 10 % FKS ($N = 5$). Die Boxen schließen (a) 100 % der Daten ein bzw. (b) 50 % und die „Whisker“ 100 %. Der Punkt markiert den Mittelwert und die Linie den Median. Die Sterne markieren die nach dem Mann-Whitney-U-Test ($N = 5$, $p < 0,05$) signifikant unterschiedlichen Fluoreszenzintensitäten.

zeigte der Mann-Whitney-U-Test keine signifikanten Unterschiede. Es ist jedoch davon auszugehen, dass bei größerer Versuchszahl eine signifikant erhöhte Menge Fibronectin auf dem Dotier-Liniengitter (pn^+) im Vergleich zum an der Oberfläche durchgängig ionenimplantierten Wafer (n^+) auftritt.

4.3.3 Zelladhäsion

Der generelle Einfluss der Anwesenheit von Proteinen im Kulturmedium auf die Zelladhäsion wurde im Folgenden untersucht. Dafür wurden die Zellen mit und ohne Proteinen im Medium kultiviert. Abb. 4.18 zeigt repräsentative LSM-Bilder von PHK26-gefärbten MG-63-Osteoblasten, die für 60 min in serumfreiem DMEM (links) und in DMEM unter Zugabe von 10 % FKS (rechts) kultiviert wurden. Für die LSM-Aufnahmen mussten die Proben aus der Kulturschale in ein mit PBS gefülltes Deckglas-Schälchen überführt werden. Da das LSM invertiert ist, lagen die Proben zudem über Kopf. Nicht-adhärenente Zellen wurden daher vermutlich beim Eintauchen in das PBS abgelöst und sedimentierten anschließend.

Während bei der serumfreien Kultivierung keine qualitativen Unterschiede in der Zellbelegung der Oberflächen festgestellt werden konnten, unterschied sich das

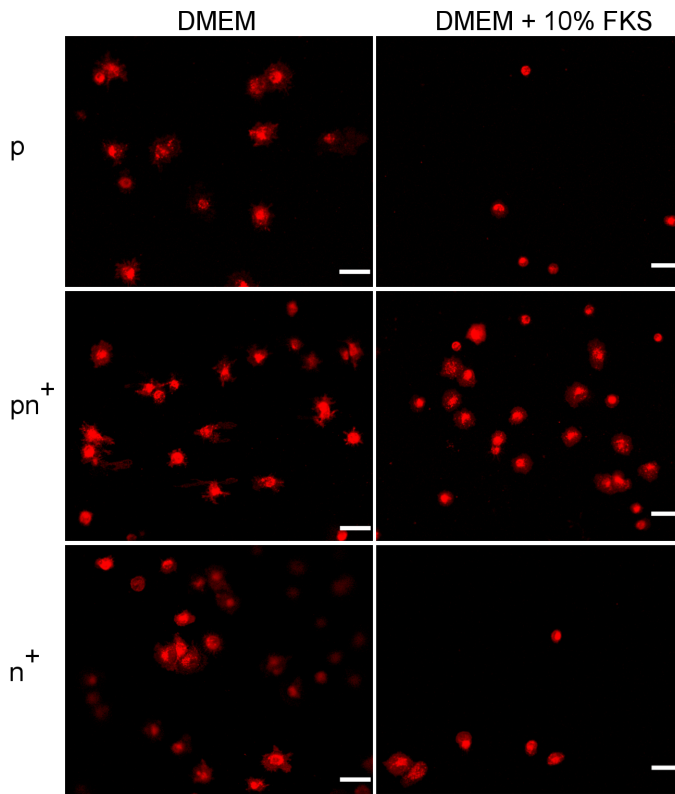


Abb. 4.18: Repräsentative LSM-Aufnahmen von PKH26-gefärbten MG-63-Osteoblasten auf den elektronisch modifizierten Substraten nach 60 min Kultur in DMEM ohne Zusätze (links) und in DMEM unter Zugabe von 10 % FKS (rechts) (Maßstabsbalken 50 μm).

Dotier-Liniengitter (pn^+) in der Anzahl der adhärennten Zellen deutlich von den beiden elektrisch homogenen Oberflächen.

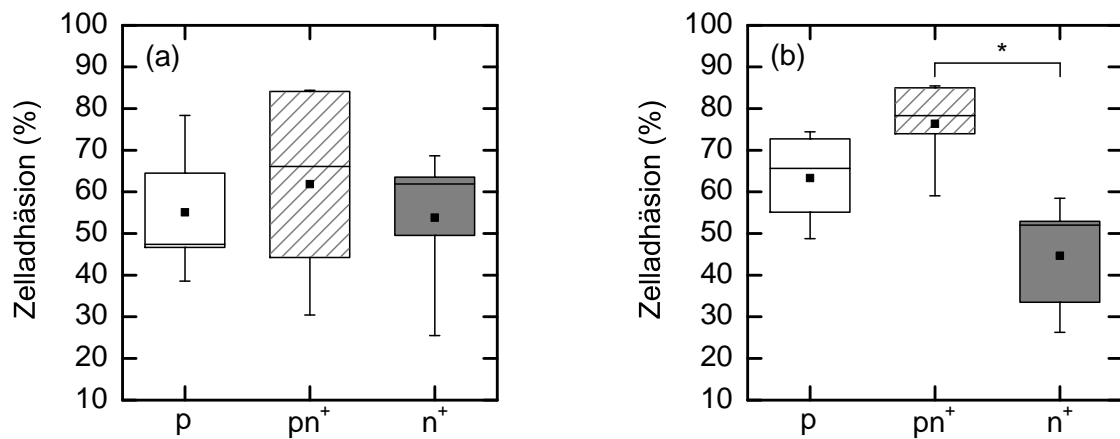


Abb. 4.19: Boxplots der Zelladhäsion auf den Substratmodifikationen nach 60 min Kultivierung in (a) serumfreiem Medium und (b) Medium unter Zugabe von 10 % FKS. Die Box schließt jeweils 50 % und die „Whisker“ 100 % der Daten ein. Der Punkt markiert den Mittelwert und die Linie den Median. Der Stern markiert die nach dem Mann-Whitney-U-Test ($N = 5$, $p < 0,05$) signifikant unterschiedliche Zelladhäsion auf pn^+ und n^+ .

Eine quantitative Auswertung der Zelladhäsion mittels Durchflusszytometrie bestätigte dieses Ergebnis: Auf dem Dotier-Liniengitter (pn^+) war die Zelladhäsion unter Zugabe von FKS gegenüber der Modifikation (n^+) signifikant erhöht. Im serumfreien Medium wurden hingegen keine Unterschiede festgestellt (s. Abb. 4.19a,b).

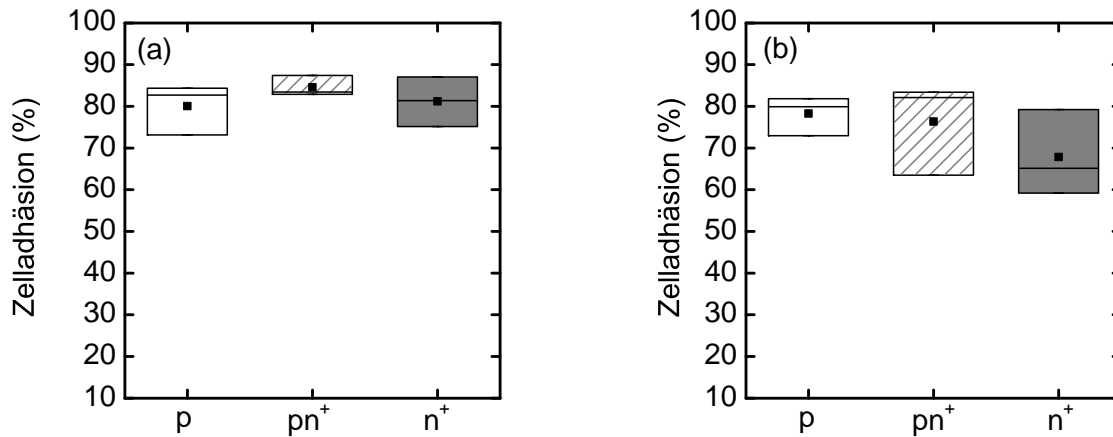


Abb. 4.20: Boxplots der Zelladhäsion nach 60 min Kultivierung in serumfreiem Medium auf für 60 min (a) mit 2 µg/ml Fibronectin und auf (b) mit 10 % FKS in DMEM präinkubierten Substraten. Die Box schließt jeweils 100 % der Daten ein. Der Punkt markiert den Mittelwert und die Linie den Median ($N = 3$).

Die Adhäsion der MG-63-Osteoblasten auf den zuvor mit Proteinen inkubierten Substraten wurde ebenfalls mittels Durchflusszytometrie untersucht. Abb. 4.20 zeigt die ermittelten Adhäsionswerte. Sowohl auf den mit einer 2 µg/ml-Fibronectinlösung präinkubierten Substraten als auch auf den mit der 10%igen FKS-Lösung inkubierten Substraten wurden dabei keine Unterschiede in der Zelladhäsion ermittelt. Offenbar lagen trotz der erhöhten Menge Fibronectin, die nach der Inkubation der Substrate auf dem Dotier-Liniengitter (pn^+ , s. Abb. 4.17) ermittelt wurde im Vergleich zur Modifikation (n^+) effektiv eine ähnliche Anzahl spezifischer Bindungsstellen vor.

Die konstante Zelladhäsion nach vorheriger Inkubation der Substrate mit der reinen Fibronectinlösung (s. Abb. 4.20a) sowie die im Gegensatz zur variierenden Zelladhäsion auf den bloßen Substraten bei Kultivierung in serumhaltigem DMEM (s. Abb. 4.19b) konstante Zelladhäsion nach vorheriger Inkubation mit der 10%igen FKS-Lösung (s. Abb. 4.20b) legten folgende Vermutungen nahe: (i) Der Effekt der erhöhten Fibronectinmenge auf dem Dotier-Liniengitter (pn^+) war für die Zelladhäsion nicht ausschlaggebend. (ii) Die Zusammensetzung und/oder Struktur der

adsorbierten Proteinschicht hat sich im Laufe der Adsorptionszeit verändert (vgl. Abb. 4.19b und 4.20b). (iii) Eine weitere Komponente des Serums war für die beobachteten Effekte verantwortlich.

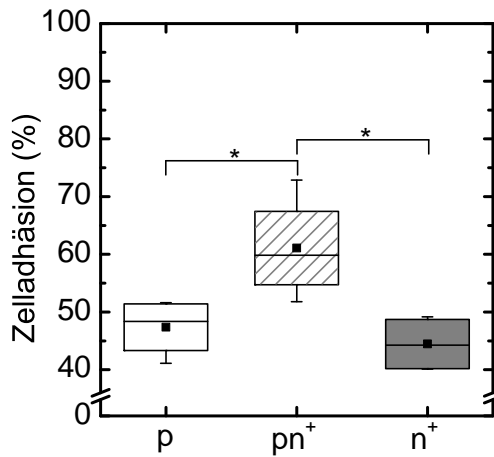


Abb. 4.21: Boxplot der Zelladhäsion auf den Substraten nach 60 min Kultivierung in DMEM unter Zugabe von 20 mg/ml bovinem Serumalbumin. Die Box schließt jeweils 50 % und die „Whisker“ 100 % der Daten ein. Der Punkt markiert den Mittelwert und die Linie den Median. Die Sterne markieren die nach dem Mann-Whitney-U-Test für ungepaarte Stichproben ($N = 4$, $p < 0,05$) signifikant unterschiedliche Zelladhäsion auf dem Dotier-Liniengitter (pn^+) im Vergleich zum Ausgangsmaterial (p) und dem an der Oberfläche durchgängig mit Phosphor ionenimplantierten Wafer (n^+).

Da bovines Serumalbumin der Hauptbestandteil von FKS ist und zudem als relativ kleines Molekül eine hohe Wahrscheinlichkeit aufweist, als eines der ersten Proteine zu adsorbieren [51], wurde der Einfluss der Gegenwart von Serumalbumin mit einer hohen Konzentration von 20 mg/ml im Medium (DMEM) auf die Zelladhäsion untersucht. Abb. 4.21 zeigt, dass die Zelladhäsion auf dem Dotier-Liniengitter (pn^+) im Vergleich zu den anderen Substratmodifikationen tatsächlich ebenfalls erhöht war (vgl. Abb. 4.19b). Dabei wurde insgesamt ein Abfall der Adhäsion gegenüber der Kultivierung in DMEM mit 10 % FKS festgestellt, der offenbar auf den Mangel an Adhäsionsfaktoren zurückzuführen war. Augenscheinlich war das Serumalbumin für die verwendeten Versuchsparameter das Protein mit dem stärkeren Einfluss auf die Zelladhäsion, und Fibronectin spielte eine untergeordnete Rolle.

4.3.4 Zellmorphologie

MG-63-Osteoblasten wurden ohne Zusatz von Serumproteinen im Kulturmedium (DMEM) für 24 Stunden auf den Substraten kultiviert. Abb. 4.22 zeigt REM-Aufnahmen der Zellen auf den bloßen Substraten nach der Kultivierung in serumfreiem Medium. Auf dem Ausgangsmaterial (p; Abb. 4.22a) sind die Zellen gleichmäßig ausgebreitet und zeigen große und flache Zellkörper. Im Vergleich dazu ist die

Zellfläche auf dem an der Oberfläche durchgängig mit Phosphor ionenimplantierten Substrat (n^+ ; Abb. 4.22c) stark reduziert.

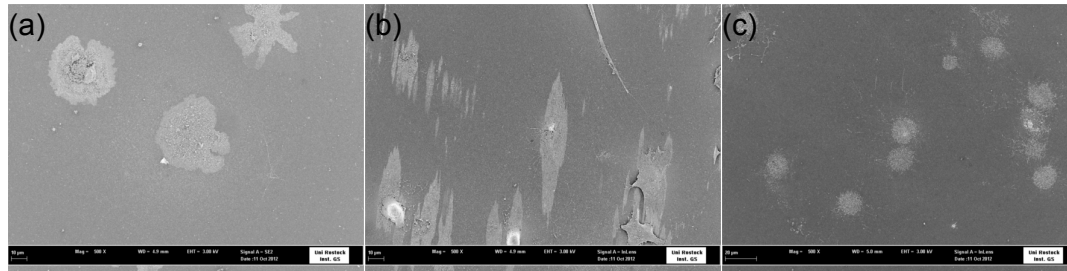


Abb. 4.22: Morphologie der MG-63-Osteoblasten auf (a) dem Wafer-Ausgangsmaterial (p), (b) dem Dotier-Liniengitter (pn^+) und (c) dem an der Oberfläche durchgängig mit Phosphor ionenimplantierten Wafer (n^+) nach 24 h Kultivierung in DMEM ohne Zusatz von FKS (500-fache Vergrößerung, Maßstabsbalken $20\ \mu\text{m}$).

Die Zellen auf dem Dotier-Liniengitter (pn^+ ; Abb. 4.22b) sind ebenfalls weit ausgebreitet, zeigen im Gegensatz den beiden elektronisch homogenen Oberflächen jedoch eine Vorzugsausrichtung entlang der Struktur, die in einem Winkel von 80° zur Bildhorizontalen verläuft.

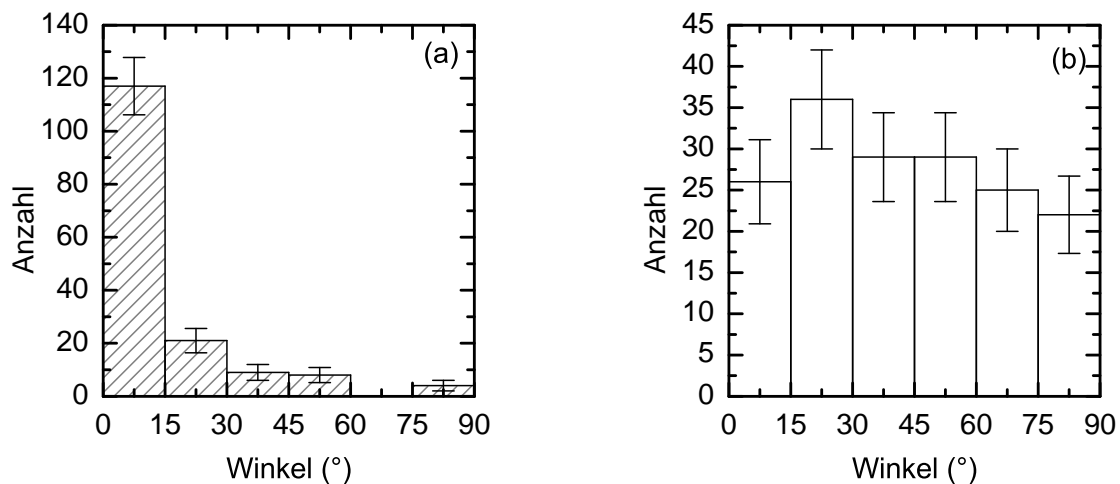


Abb. 4.23: Zellorientierung (a) auf dem Dotier-Liniengitter (pn^+ ; Anzahl \pm Poisson-Standardabweichung, $N = 159$) und (b) dem Wafer-Ausgangsmaterial nach der Kultivierung in serumfreiem Medium (p; Anzahl \pm Poisson-Standardabweichung, $N = 167$).

Die Auswertung der Zellorientierung⁴ ergab eine starke bevorzugte Ausrichtung der

⁴Die Ausrichtung der Zellen wurde mittels ImageJ (v.1.49e) untersucht. Eine detaillierte Beschreibung der Prozedur ist im Anhang A.1 dargestellt.

MG-63-Osteoblasten entlang der Linien der Dotierstruktur (pn^+) (s. Abb. 4.23a; der Winkel bezieht sich auf die Richtung der Linien).

Dieser beträchtliche Effekt wurde angesichts der marginalen topografischen Variation des Dotier-Liniengitters (pn^+) nicht erwartet und lässt vermuten, dass die oberflächennahe Verteilung des elektrischen Feldes für die Ausrichtung ursächlich ist. Zum Vergleich ist ebenfalls ein Histogramm für das Ausgangsmaterial (p) dargestellt, auf dem erwartungsgemäß keine bevorzugte Ausrichtung ermittelt wurde (s. Abb. 4.23b; der Winkel bezieht sich hier auf die Bildhorizontale).

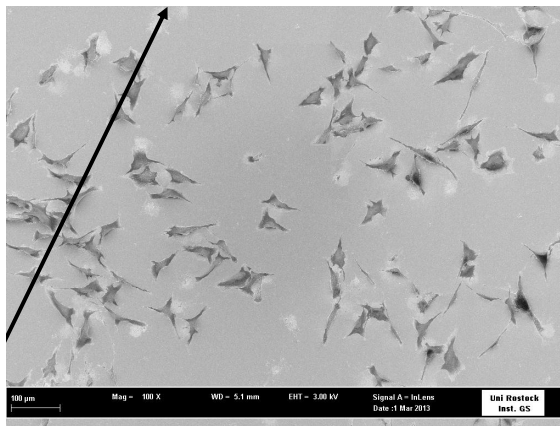


Abb. 4.24: Morphologie der MG-63-Osteoblasten auf dem Dotier-Liniengitter pn^+ nach 24 h Kultivierung in DMEM ohne Zusatz von FKS (vorherige 1-stündige Inkubation des Substrats mit einer $10 \mu\text{g/ml}$ -Fibronectinlösung). Die Linien der Dotierstruktur verlaufen im Winkel von $63,5^\circ$ zur Bildhorizontalen (100-fache Vergrößerung, Maßstabsbalken $100 \mu\text{m}$).

Nach vorheriger Inkubation des Dotier-Liniengitter (pn^+) mit einer Fibronectinlösung ($10 \mu\text{g/ml}$ in PBS) stellte sich nach 24-stündiger Kultivierung in serumfreiem Medium hingegen keine Vorzugsorientierung der Zellen ein (s. Abb. 4.24 und 4.25). Die Zellen waren genau wie auf den elektronisch homogenen Substraten gleichverteilt ausgerichtet.

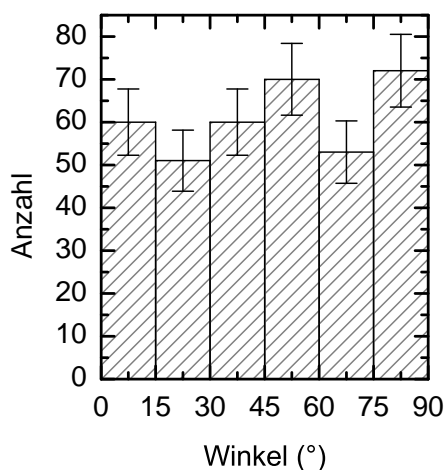


Abb. 4.25: Histogramm der Zellorientierung auf dem Dotier-Liniengitter nach 24 h Kultivierung und vorheriger Inkubation des Substrats mit einer $10 \mu\text{g/ml}$ -Fibronectinlösung (Anzahl \pm Poisson-Standardabweichung, $N = 350$). Der Winkel bezieht sich auf die Bildhorizontale.

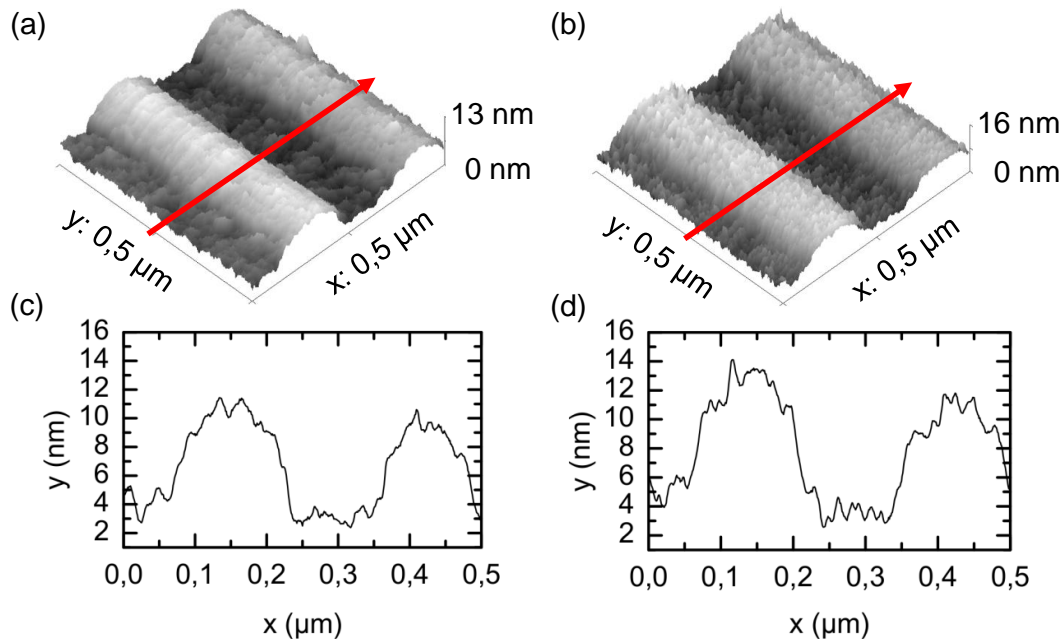


Abb. 4.26: Vergleich der Topografien des unbeschichteten (a, c) und des mit einer 2 nm dicken Platinschicht versehenen Dotiergitters (b, d).

Um zu überprüfen, ob die Ausrichtung der Zellen auf dem Dotier-Liniengitter (pn^+) durch die Verteilung des elektrischen Feldes oder eventuell doch durch die schwache periodische Topografie begründet war, wurde eine nur 2 nm dünne Platinschicht mittels physikalischer Gasphasenabscheidung (engl. Physical Vapour Deposition, PVD; Sputteranlage EMITECH SC7640, Quorum Technologies, Sussex, Vereinigtes Königreich) auf das Dotier-Liniengitter aufgebracht.

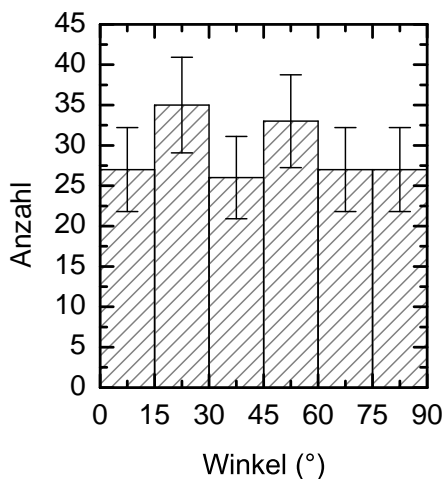


Abb. 4.27: Histogramm der Zellorientierung auf einem mit 2 nm Platin beschichteten Dotier-Liniengitter nach 24 h Kultivierung in serumfreiem Medium (Anzahl \pm Poisson-Standardabweichung, $N = 175$). Der Winkel bezieht sich auf die Bildhorizontale.

Die Metallbeschichtung bewirkt ein konstantes Oberflächenpotential, sodass die Po-

tentialunterschiede des Halbleitersubstrats ausgeglichen werden. Die Schichtdicke wurde mit Hilfe eines Schwingquarzes eingestellt, der Teil des Beschichtungssystems ist. Ein Vergleich der Topografien des unbeschichteten und des mit einer 2 nm dicken Platinschicht versehenen Dotiergitters ist in Abb. 4.26 dargestellt. Die Höhenvariation der periodischen Struktur blieb trotz der Platinbeschichtung erhalten.

Die Winkelverteilung der MG-63-Osteoblasten auf dem platinbeschichteten Dotier-Liniengitter (pn^+) in Abb. 4.27 zeigt, dass die Zellen gleichverteilt orientiert sind. Dies deutet darauf hin, dass tatsächlich die elektrische Feldverteilung nahe der Oberfläche für die bevorzugte Zellausrichtung verantwortlich war.

5 Diskussion

5.1 Topografische TiO₂-Nanostruktur

In Kapitel 3 wurde der Einfluss einer halbleitenden TiO₂-Passivierungsschicht auf die lokale Verteilung der elektrischen Feldstärke an einer nanostrukturierten Titan-Elektrolyt-Grenzfläche mit Hilfe von FEM-Elektrostatikberechnungen untersucht. Im Gegensatz zu einer rein metallischen Oberfläche, mit erhöhten elektrischen Feldstärken an erhabenen (konvexen) und verringerten elektrischen Feldstärken an nach innen gewölbten (konkaven) Strukturen (s. Abb. 3.3, S. 40), wurde eine Inversion der Feldverteilung berechnet: An der konvexen Ecke einer Modellstruktur ergab sich eine Verringerung und an der konkaven Ecke eine Erhöhung der elektrischen Feldstärke (s. Abb. 3.4, S. 42). Dabei wurde der Effekt für den gesamten betrachteten pH-Wert-Bereich von 5 bis 7,5, der durch eine pH-abhängige Oberflächenladung in die Berechnung einfluss, berechnet. Darüber hinaus ergab sich die stärkste Ausprägung der Inversion nahe dem physiologischen pH-Wert von 7,4 (s. Abb. 3.5, S. 43).

Studien von Elter et al. [22, 32, 34] deuten darauf hin, dass Proteine bevorzugt in konkav gewölbten Bereichen topografischer Nanostrukturen adsorbieren. So wurden mittels orts aufgelöster Einzelmolekül-Kraftspektroskopie erhöhte Mengen Fibronectin in den Gräben einer topografisch nanostrukturierten Linienstruktur (Periode 180 nm, Grabentiefe 120 nm) nachgewiesen [22]. Unterstützt wurden diese Experimente durch Brownian-Dynamics-Simulationen der Adsorption von Lysozym, ein aufgrund seiner einfachen Struktur und geringen Größe für die Modellrechnungen geeignetes Protein. Auch hier stellten sich erhöhte Proteinmengen in den konkaven Bereichen einer nanostrukturierten Modelloberfläche ein [32, 34]. Dabei wurden für die Simulationen auf der DLVO-Theorie basierte Algorithmen verwendet, die als Protein-Protein-Wechselwirkung und Wechselwirkung zwischen Protein und Festkörperoberfläche die elektrostatische sowie die Dispersionswechselwirkung berücksichtigten [34]. Das an der topografischen Nanostruktur ortsabhängige Wechselwirkungspotential zwischen Oberfläche und Protein enthielt hier erhöhte elektrische

Feldstärken, die an den konvexen Kanten der metallischen Oberfläche angenommen wurden. Die Ergebnisse der zitierten Arbeiten wurden mit einem mehrstufigen Adsorptionsmechanismus interpretiert: Die Proteine adsorbieren eingangs aufgrund einer besseren Erreichbarkeit und den lokal erhöhten elektrischen Feldstärken vornehmlich nahe konvexen Bereichen der im Nanometerbereich topografisch strukturierten Oberfläche. Durch Oberflächendiffusion tritt eine Bewegung der Proteine hin zu den konkaven Bereichen auf, wo diese dann durch eine erhöhte Dispersionswechselwirkung stabilisiert werden und ihren endgültigen Adsorptionsort einnehmen [34].

Eine stärkere elektrostatische Wechselwirkung nahe den konkaven Bereichen der passivierten Nanotopografie aus Titan, die aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit hervorgeht, kann eine lokal stärkere Anziehung von entgegengesetzt zur Oberfläche geladenen Proteinen und somit eine vermehrte Adsorption zur Folge haben. Die numerischen Elektrostatikberechnungen unterstützen somit die zitierten experimentellen Ergebnisse und liefern zudem einen alternativen Erklärungsansatz für die Akkumulation von Proteinen in den konkaven Bereichen einer Nanotopografie.

5.2 Untersuchung des Modellsubstrats und seiner Wirkung auf das Biosystem

Die Materialcharakterisierung der Modellsubstrate in Kapitel 4.2 deckte zwei grundlegende Effekte auf: Zum einen hatte die lokale Phosphor-Ionenimplantation des Dotier-Streifengitters (pn^+) eine lokale Variation der elektrischen Oberflächeneigenschaften zur Folge; dieser Effekt wird in Abschnitt 5.2.1 diskutiert. Zum anderen wurde im Vergleich zum p-dotierten Waferausgangsmaterial (p) und einem an der Oberfläche durchgängig mit Phosphor ionenimplantierten (und damit n^+ -leitenden) Wafer (n^+) aber ebenso eine Veränderung integraler Oberflächeneigenschaften beobachtet; dies wird in Abschnitt 5.2.2 näher beleuchtet. Die Wirkung der Modellsubstrate auf das Biosystem wird in Abschnitt 5.2.3 diskutiert.

5.2.1 Lokale Variation der Oberflächeneigenschaften

Oberflächenpotentialvariation

Die durch die lokale Phosphor-Ionenimplantation induzierte Oberflächenpotentialvariation des Dotier-Liniengitters (pn^+) wurde in Abschnitt 4.2.5 mittels AFM-basierter Raster-Kelvin-Mikroskopie (KPFM) an Luft untersucht. In Übereinstimmung mit FEM-Elektrostatikberechnungen (s. Abb. 4.8, S. 58) ergaben die KPFM-Messungen ein im Vergleich zu den p-dotierten Linien positiveres Oberflächenpotential über den n^+ -dotierten Linien (s. Abb. 4.9, S. 59). Jedoch lag die gemessene Variation mit $(24,2 \pm 7,3)$ mV um zwei Größenordnungen niedriger als die berechnete. Der geringe gemessene Unterschied ist unter anderem auf den beim verwendeten AFM-System methodenbedingt relativ hohen Abstand zwischen Cantilever-Spitze und Probe zurückzuführen [124], der bei etwa 50 nm lag. So ergaben bei Keysight Technologies in Auftrag gegebene vergleichende Messungen mit einem alternativen AFM-System, welches die Topografie und das Oberflächenpotential in einem Scandurchgang aufnimmt [125] und den Cantilever dadurch bei der Potentialmessung dichter an der Oberfläche vorbeiführt, einen Potentialunterschied von bis zu 250 mV (s. Abb. A.3, S. 106). Darüber hinaus wird in der Literatur als möglicher Grund für einen verringerten Unterschied der Potentialdifferenz an der Oberfläche eines lateralen pn -Übergangs das Vorhandensein von Oberflächenzuständen und Oxidladungen angeführt, die eine Verbiegung der Energiebänder nahe der Oberfläche bewirken können [65, 126]: Im p-dotierten Gebiet hatte dies ein positiveres und im n^+ -dotierten Gebiet ein negativeres Oberflächenpotential zur Folge, wodurch sich die gesamte Potentialdifferenz stark verringerte.

Ausgehend von einer Oberflächenpotentialvariation auf dem Dotier-Liniengitter (pn^+), die im Bereich zwischen den theoretisch vorhergesagten 1100 mV und den experimentell ermittelten 250 mV lag, wurde durch die scharf voneinander abgegrenzten hochgradig n^+ - und p-dotierten Linien eine lokale Variation der elektrischen Feldstärke im Bereich von etwa $1 \cdot 10^7$ – $1 \cdot 10^8$ V/m berechnet (s. Abb. 4.8d, S. 58). Angesichts einer elektrischen Feldstärke im Bereich von wenigen 10^8 V/m, die durch die elektrochemische Doppelschicht an einer geladenen Oberfläche in Flüssigkeit erzeugt wird [38], stellt dies eine beträchtliche Variation dar. Elter et al. [32, 34] haben in Brownian-Dynamics-Simulationen der Adsorption von Lysozym an topografischen Modellstrukturen gezeigt, dass lokale Feldstärkeerhöhungen in dieser

Größenordnung zu einer bevorzugten initialen Adsorption der Proteine in Bereichen erhöhter elektrischer Feldstärke führen.

Um darüber hinaus einordnen zu können, wie stark die gemessene und berechnete Variation der oberflächennahen elektrischen Feldstärke im Vergleich zu einer topografischen Nanostruktur ausfällt, wurde in Kapitel 3.4.2 die Feldverteilung an einer nanostrukturierten Titan-Elektrolyt-Grenzfläche mit Hilfe von FEM-Elektrostatikberechnungen untersucht. Die Feldstärkevariation zwischen einem nach innen gewölbten (konkaven) und einem erhabenen (konvexen) Bereich der Nanotopografie fiel mit etwa $0,8 \cdot 10^8$ V/m ähnlich groß wie die des Dotier-Liniengitters aus (s. Abb. 3.5, S. 43). Demzufolge ermöglicht die lokale Dotierung von Siliziumwafern prinzipiell eine Nachbildung der elektrischen Feldstärkeverteilung einer topografischen Nanostruktur.

Aus den lokal unterschiedlich geladenen Bereichen auf der Dotierstruktur resultierte zudem ein elektrisches Feld mit einer lateralen Komponente nahe der Oberfläche. Das bedeutet, dass die elektrischen Feldlinien teilweise parallel zur Oberfläche verliefen (s. Abb. 4.8c, S.58). Hoda und Kumar [127] haben ebenfalls anhand von Brownian-Dynamics-Simulationen gezeigt, dass solche parallel zur Oberfläche gerichteten elektrischen Felder die Orientierung und Konformation von Polyelektrolyten, die einfachen Proteinketten ähneln, verändern können. Daher muss neben einer etwaigen Auswirkung der lokal erhöhten elektrischen Feldstärke auch die Feldorientierung bei der Diskussion der Reaktion des biologischen Systems berücksichtigt werden.

Topografische Variation des Dotier-Liniengitters

Für das Auftreten der topografischen Variation von $(10,3 \pm 0,6)$ nm auf dem Dotier-Liniengitter (s. Abb. 4.9a, S.59), die ebenfalls mittels AFM gemessen wurde, mögen zwei Effekte verantwortlich gewesen sein: Die Kombination aus dem Abbau von Druckspannungen als Folge der leicht veränderten Gitterkonstante in den ionenimplantierten Bereichen und deren bevorzugtes Ätzen aufgrund von Kristallgitterschäden, die ebenfalls durch die Ionenimplantation hervorgerufen werden, wurde von Birkholz et al. [98] vorgeschlagen. Allerdings betrug die topografische Variation in der zitierten Arbeit weniger als 1 nm bei vergleichbaren Ionendosen und -energien.

Vielmehr wurde vermutet, dass Reste der für die Ionenimplantation notwendigen oxidhaltigen Maske durch die nasschemische Reinigung nicht vollends entfernt werden konnten. In der Dissertation von Ratzke [114] wurde auf diese Möglichkeit hingewiesen. So konnte dort durch Ätzen mit Flußsäure (HF) eine leichte Verringerung der topografischen Variation erreicht werden. Auf eine nachträgliche HF-Ätzung der Wafer wurde in der vorliegenden Arbeit jedoch bewusst verzichtet, da dies eine verstärkte Belegung der Substratoberfläche mit organischen (z.B. kurzkettige Kohlenwasserstoffe aus der Luft) und anorganischen Verunreinigungen zur Folge gehabt hätte [128], die sich nur mit einem erheblichen technischen Aufwand hätten entfernen lassen. FEM-Elektrostatikberechnungen ergaben zudem, dass die Topografie des Dotier-Liniengitters (pn^+) einen vernachlässigbaren Einfluss auf die Verteilung des Oberflächenpotentials erwarten ließ (s. Abb. A.2 im Anhang A.2).

Variation der lokalen Adhäsionskraft zwischen Cantilever und Dotier-Liniengitter

Der Einfluss der lokalen Oberflächenpotentialvariation des Dotier-Liniengitters (pn^+) auf die elektrostatische Wechselwirkung in Flüssigkeit wurde mittels AFM-basierter Kraftspektroskopie in Abschnitt 4.2.8 untersucht. Die Messungen in PBS ergaben eine im Vergleich zu den p-leitenden Linien um 75 % erhöhte mittlere Adhäsionskraft der Silizium-Cantileverspitze auf den n^+ -leitenden Phosphorimplantierten Linien (s. Abb. 4.16c, S.66).

Dieses Ergebnis lässt sich mit Hilfe der DLVO-Theorie unter Beachtung des lokalen Oberflächenpotentials der unterschiedlich dotierten Linien der Probe pn^+ qualitativ verstehen: Sowohl die Siliziumspitze des Cantilevers als auch das Dotier-Liniengitter (pn^+) sind bei einem pH-Wert von 7,4 negativ geladen. Da die repulsive Doppelschichtwechselwirkung mit Abnahme der Oberflächenladung bzw. mit dem Betrag des Oberflächenpotentials ebenfalls abnimmt und die van-der-Waals-Wechselwirkung konstant bleibt, ergibt sich für die positiver als die p-leitenden Linien (und damit effektiv weniger stark geladenen) n^+ -leitenden Phosphorimplantierten Linien eine stärker attraktive Gesamtwechselwirkung. Verglichen mit einem ca. 30 %igen Anstieg der elektrostatischen Kraft zwischen Substrat und dem bei pH 7,4 positiv geladenen Protein Lysozym, wie er von Elter et al. [34] mit numerischen Feldberechnungen an der konvexen Ecke einer topografischen Nanostruktur berechnet wurde, ist dies ein beträchtlicher Effekt.

5.2.2 Variation integraler Substrateigenschaften

Mittleres Oberflächenpotential

Die KPFM-Messungen offenbarten neben der lokalen Variation des elektrischen Oberflächeneigenschaften eine Verschiebung des mittleren Oberflächenpotentials des Dotier-Liniengitters (pn^+) im Vergleich zu den beiden elektrisch homogenen Substraten (Ausgangsmaterial p und oberflächennah durchgängig ionenimplantierter Wafer n^+ , Reihenfolge: $- pn^+ \rightarrow p \rightarrow n^+ +$; s. Tabelle 4.3, S. 59). Dass das Oberflächenpotential des Dotier-Liniengitters (pn^+) im Vergleich zum Ausgangsmaterial (p) deutlich negativer war, überrascht auf den ersten Blick. Hier hätte sich ein Wert zwischen (p) und (n^+) ergeben müssen.

Eine mögliche Erklärung für die gemessenen Unterschiede des mittleren Oberflächenpotentials zwischen den Substratmodifikationen p, pn^+ und n^+ könnten die bereits als mögliche Ursache für die topografische Variation des Dotier-Liniengitters diskutierten Reste der SiN_x/SiO_2 -Maske liefern. Neben der Auswirkung auf die Topografie deuteten Messungen mittels Kapazitäts-Spannungs-Spektroskopie in Abschnitt 4.2.3 darauf hin, dass sich im Vergleich zur Substratmodifikation n^+ positive Oberflächenladungen in den Oxidschichten des Dotier-Liniengitters (pn^+) und des Ausgangsmaterial-Wafers (p) befinden (s. Abb. 4.6, S. 56).

Möglicherweise verhinderten die an der Oberfläche von n^+ überall an der Oberfläche vorhandenen Maskenreste die Bildung einer defektreichen Si-SiO₂-Grenzfläche bzw. einer nativen SiO₂-Schicht. Folglich konnten sich keine zusätzlichen Oxidladungen ausbilden. Das Substrat p erhielt während der Prozessierung keine Maske, da die Ionenimplantation hier nicht erfolgte. Dementsprechend konnte sich nach der abschließenden nasschemischen Reinigung eine natürliche, defektreiche Grenzfläche/Oxidschicht bilden, die für gewöhnlich positive Ladungen trägt [62]. Unterstützt wird diese Interpretation durch die XPS-Messungen in Abschnitt 4.2.2, die auf eine im Vergleich zu den beiden ionenimplantierten Substraten dickere Oxidschicht auf dem Ausgangsmaterial-Substrat (p) hindeuteten (s. Abb. 4.3b, S. 51). Auf dem Dotier-Liniengitter ist die Oberfläche jeweils zur Hälfte mit den Maskenresten und zur Hälfte mit der nativen Oxidschicht bedeckt, was wiederum eine effektiv kleinere positive Oberflächenladung und eine geringere Verschiebung des mittleren Oberflächenpotentials in positive Richtung als bei Probe p zur Folge hatte.

Zeta-Potential

Mittels Strömungspotentialmessungen wurde das Zeta-Potential der Substrate in einer NaCl-Elektrolytlösung mit physiologischer Salzkonzentration in Abschnitt 4.2.6 gemessen. In Übereinstimmung mit den KPFM-Messungen des mittleren Oberflächenpotentials wurde im Vergleich zum Waferausgangsmaterial (p) für das Dotier-Liniengitter ein negativeres Zeta-Potential und für das an der Oberfläche durchgängig ionenimplantierte Substrat (n^+) ein positiveres Zeta-Potential ermittelt (Reihenfolge: $-pn^+ \rightarrow p \rightarrow n^+$). Darüber hinaus ergab sich ein linearer Zusammenhang zwischen beiden Potentialen mit einem Verhältnis der Variation des Zeta-Potentials zu der des Oberflächenpotentials $\Delta\zeta/\Delta\phi_0 \approx 0,25$ (s. Abb. 4.10, S. 61).

Unter Annahme einer konstanten Dicke und Zusammensetzung der starren Doppelschicht entspricht ein linearer Zusammenhang zwischen der Änderung des Zeta- und der des Oberflächenpotentials gerade der theoretischen Vorhersage (vgl. Gl. 2.6, S. 8) [45]. So wurde beispielsweise von Bousse et al. [115] durch Messung des Oberflächen- und Zeta-Potentials von Siliziumnitrid in Abhängigkeit vom pH-Wert in einer 0,1 M NaCl-Lösung ein ähnlicher Zusammenhang entdeckt, wobei das dort ermittelte Verhältnis der Variationen beider Potentiale mit $\Delta\zeta/\Delta\phi_0 \approx 0,1$ kleiner ausfiel. Dabei muss jedoch beachtet werden, dass das Oberflächenpotential von den Autoren ebenfalls in Flüssigkeit gemessen wurde [115]. Das in der vorliegenden Arbeit an Luft gemessene Oberflächenpotential unterscheidet sich von dem in Flüssigkeit aufgrund der sich im Kontakt mit der Elektrolytlösung einstellenden Verbiegung der Energiebänder in den Halbleitersubstraten [44] und kann daher nur einen Hinweis auf das Oberflächenpotential in Flüssigkeit geben.

Benetzbarkeit und Oberflächenenergie

Der Einfluss der Ionenimplantation auf die Benetzbarkeit und Oberflächenenergie wurde mit Hilfe von Kontaktwinkelmessungen polarer und apolarer Flüssigkeiten in Abschnitt 4.2.7 untersucht. Mit Hilfe dieser Methode wurde ein etwaiger Einfluss der Dotierung auf die dispersiven Oberflächeneigenschaften überprüft. Die apolaren Flüssigkeiten Diiodmethan und 1-Bromnaphthalin zeigten nahezu konstante Kontaktwinkel auf allen Substraten (s. Tabelle 4.4 und Abb. 4.11b, S. 62). Für die polaren Flüssigkeiten Wasser, Glycerin und Thiodiglycol ergab sich wie zuvor bei den KPFM- und bei den Strömungspotentialmessungen dieselbe Reihenfolge

der Substrate hinsichtlich der Benetzbarkeit (gute Benetzbarkeit $pn^+ \rightarrow p \rightarrow n^+$ schlechte Benetzbarkeit; s. Tabelle 4.4 und Abb. 4.11a, S. 62). Die aus den Kontaktwinkeln mit der OWRK-Methode berechneten Anteile der Oberflächenenergie spiegeln dementsprechend die Benetzbarkeitseigenschaften wider: Es wurde ein nahezu konstanter dispersiver Anteil berechnet und ein polarer Anteil, der in der bereits mehrfach erwähnten Reihenfolge variierte (hohe polare OF-Energie $pn^+ \rightarrow p \rightarrow n^+$ kleine polare OF-Energie; s. Abb. 4.12, S. 63).

Der Einfluss der durch die Ionenimplantation induzierten topografischen Variation des Dotiergitters (pn^+) auf die Benetzbarkeit lässt sich mit dem Wenzel-Modell [72] (s. Gl. 2.30, S. 29) abschätzen: Die zwischen den Substratmodifikationen nur marginal abweichenden Rauheitskoeffizienten (s. Tabelle 4.3, S. 59) lassen je nach Größe des Kontaktwinkels einen durch die Topografie veränderten Kontaktwinkel von $0,5$ – $1,5^\circ$ erwarten, was jedoch merklich unterhalb der gemessenen Unterschiede des Kontaktwinkels zwischen den Substratmodifikationen liegt. Folglich ist davon auszugehen, dass die beobachtete Variation des polaren Anteils der Oberflächenenergie allein auf die durch die Ionenimplantation veränderten elektrischen Oberflächeneigenschaften zurückzuführen ist.

Nach Owens und Wendt [73] und Van Oss et al. [45, 129] beschreibt der polare Anteil der Oberflächenenergie die Fähigkeit einer Festkörperoberfläche, Wasserstoffbrückenbindungen mit einer Flüssigkeit auszubilden. Diese nicht-kovalenten Bindungen sind hauptsächlich coulombscher Natur, d.h. vom Typ der elektrostatischen Wechselwirkung [38, 130, 131]. Demnach lässt sich qualitativ verstehen, dass das am stärksten negativ geladene Dotier-Liniengitter (pn^+) die positiv geladenen Protonen polarer Flüssigkeiten am stärksten anzieht. Daraus folgt ein Anstieg der polaren Oberflächenenergie mit stärker negativem Oberflächenpotential (s. Abb. 4.12, S. 63).

Der beobachtete Einfluss der elektrischen Oberflächeneigenschaften auf die Benetzbarkeit lässt sich gut in die bestehende Literatur einordnen. Von Aronov et al. [132–134] wurde die Benetzbarkeit von Hydroxylapatit [132] und SiO_2 [133, 134] durch Beschuss mit einem niederenergetischen Elektronenstrahl variiert. Mit positiverem Oberflächenpotential wurde auch hier eine verringerte Benetzbarkeit von Wasser beobachtet. In der von den Autoren entwickelten Theorie, die auf der Elektrobenetzung basiert, werden die Grenzflächenenergie zwischen Festkörper und Flüssigkeit sowie die Oberflächenenergie des Festkörpers allein durch einen elektro-

statischen Einfluss beim Beschuss mit Elektronen reduziert, wobei Letztere immer am stärksten verringert wird [134]. Die Youngsche Gleichung (s. Gl. 2.29, S.29) sagt dementsprechend kleinere Kontaktwinkel voraus, je größer die durch Elektronen induzierte positive Oberflächenladung ist. Nakao et al. [135] variierten die elektrischen Oberflächeneigenschaften von Polystyrol-Oberflächen mittels Ionenimplantation von Natrium und Neon und beobachteten mit positivem Anstieg des Zeta-Potentials ebenfalls einen Anstieg des Wasserkontaktwinkels. Hurwitz et al. [136] haben einen Zusammenhang zwischen dem Wasserkontaktwinkel und Zeta-Potential von Polyamidmembranen beschrieben, das mittels pH-Titration variiert wurde. Auch hier konnte ein positiv linearer Zusammenhang zwischen dem Wasserkontaktwinkel und dem Zeta-Potential beobachtet werden, der auf die zunehmende Orientierung von Wassermolekülen an der Grenzfläche zurückgeführt wurde [136].

Mittlere Adhäsionskraft zwischen Cantilever und Substrat

Aus der kraftspektroskopischen Untersuchung der Wechselwirkung zwischen der Siliziumspitze eines Cantilevers und den Substraten in Abschnitt 4.2.8 wurde neben der lokalen Kraftvariation auf dem Dotier-Liniengitter (pn^+) ebenfalls die mittlere Adhäsionskraft in PBS ermittelt. Die Reihenfolge der gemessenen „Snap-in“-Kräfte aus den Annäherungskurven ($F_{pn^+} = F_p \approx 0 \ll F_{n^+}$; s. Abb. 4.14a, S. 65) kann ebenfalls mit der DLVO-Theorie erklärt werden: Oberhalb eines kritischen Oberflächenpotentials wirkt bei konstanter van-der-Waals-Kraft ab einem bestimmten Abstand zwischen Cantilever und Substrat insgesamt eine attraktive Wechselwirkung. Der Cantilever wird dementsprechend vom am geringsten negativ geladenen oberflächennah durchgängig ionenimplantierten Wafer (n^+) angezogen und es erfolgt der „Snap-in“. Die Potentialwerte von p und pn^+ lagen offenbar unterhalb dieses Grenzwertes, d.h. die Oberflächen beider Substratmodifikationen trugen eine stärker negative Oberflächenladung. Nach der DLVO-Theorie folgt eine stärker ausgeprägte Energiebarriere im Wechselwirkungspotential, wodurch über alle Abstände eine repulsive Wechselwirkung aufrechterhalten bleibt.

Die Annäherungskurven des an der Oberfläche durchgängig ionenimplantierten Wafers (n^+) lieferten darüber hinaus Informationen über die Reichweite der elektrostatischen Wechselwirkung in PBS. So wurde vor dem „Snap-in“ in etwa 5 nm Abstand von der Oberfläche eine elektrostatische Abstoßung zwischen Cantilever

und Substrat beobachtet. Diese Entfernung stimmt näherungsweise mit der Abstandsabhängigkeit von DLVO-Kräften überein, die von Israelachvili et al. [137] in einer 0,1 M NaCl-Elektrolytlösung zwischen zwei negativ geladenen Glimmer-Oberflächen gemessen wurden.

Auch die aus den Rückziehkurven ermittelten Adhäsionskräfte ($F_{pn^+} < F_p \ll F_{n^+}$; s. Abb. 4.14b) lassen sich mit Hilfe der DLVO-Theorie verstehen. Entsprechend der am schwächsten negativen Oberflächenladung des an der Oberfläche durchgängig ionenimplantierten Wafers (n^+) ist die repulsive Doppelschichtwechselwirkung mit der ebenfalls negativ geladenen Silizium-Spitze am schwächsten ausgeprägt. Dementsprechend ist das erste Energieminimum im Vergleich zu p und pn^+ am tiefsten und die Kraft, die aufgewendet werden muss, um Spitze und Substrat zu trennen, am größten. Für die stärker negativ geladenen Substrate erfolgt letztendlich eine Anhebung des ersten Energieminimums, was zu einer Reduktion der Adhäsionskräfte führt.

5.2.3 Wirkung auf das Biosystem

Die Untersuchung des Einflusses der Substrate auf das Biosystem in Abschnitt 4.3 erfolgte auf zwei Ebenen: Zum einen wurde die adsorbierte Menge Fibronectin, eines der Schlüsselproteine für die Zelladhäsion in der extrazellulären Matrix [22,24], mittels Immunfluoreszenzfärbung und Fluoreszenzmikroskopie quantifiziert. Und zum anderen wurde der Einfluss der durch die Substrate modulierten Proteinadsorption und darüber hinaus der Abwesenheit von Proteinen bei der Zellkultivierung auf die Adhäsion und Morphologie humaner MG-63-Osteoblasten mittels Durchflusszytometrie und Rasterelektronenmikroskopie untersucht.

Zelladhäsion unter Anwesenheit/Abwesenheit von Proteinen im Kulturmedium

Um zu überprüfen, ob ein direkter Einfluss der Substratmodifikationen auf die Zellen besteht oder die Anwesenheit von Proteinen eine Grundvoraussetzung für eine zwischen den Substraten variierende Zelladhäsion ist, wurden die MG-63-Osteoblasten für 60 min in serumfreiem DMEM und DMEM unter Zusatz von 10 % FKS kultiviert. Nach der serumfreien Kultivierung konnte aus LSM-Aufnahmen,

für die die Zellen mit dem rot fluoreszierenden Farbstoff PKH26 markiert wurden, kein Unterschied in der Anzahl adhärenter Zellen ausgemacht werden (s. Abb. 4.18 links, S. 72). Dieses qualitative Ergebnis konnte durch die Quantifizierung der Zelladhäsion mittels Durchflusszytometrie belegt werden. So wurden zwischen den Substraten ebenfalls keine Unterschiede in der Zelladhäsion nach Kultivierung in serumfreiem DMEM festgestellt (s. Abb. 4.19a, S. 72).

Dass unter den gewählten Versuchsbedingungen tatsächlich die Proteinadsorption der für die Zelladhäsion entscheidende Faktor war, zeigten die LSM-Aufnahmen der MG-63-Osteoblasten auf den Substraten nach der Kultivierung in serumhaltigem Medium (s. Abb. 4.18 rechts, S. 72). Sowohl auf dem Waferausgangsmaterial (p) als auch auf dem an der Oberfläche durchgängig ionenimplantierten Wafer (n^+) wurde eine beträchtlich verringerte Anzahl von Zellen im Vergleich zum Dotier-Liniengitter (pn^+) beobachtet. Die mittels Durchflusszytometrie ermittelte, im Vergleich zum Substrat n^+ signifikant erhöhte Zelladhäsion auf dem Dotier-Liniengitter (pn^+) bestätigte dieses Ergebnis zudem (s. Abb. 4.19b, S. 72). Die Ergebnisse der Zelladhäsionsuntersuchungen zeigen somit, dass die unterschiedlichen elektrischen Eigenschaften der Substrate offenbar keinen direkten Einfluss auf die nicht-spezifische Adhäsion der MG-63-Osteoblasten nahmen bzw. der Einfluss nicht ausreichte, um die Zelladhäsion zu beeinträchtigen. Vielmehr deuten sie darauf hin, dass die Eigenschaften der aus dem serumhaltigen Kulturmedium adsorbierten Proteinschicht durch die Oberflächeneigenschaften der Substrate beeinflusst wurde, was wiederum eine veränderliche Zelladhäsion zur Folge hatte.

Lee et al. [138] haben den Einfluss einer variierenden Benetzbarkeit auf die nicht-spezifische Zelladhäsion mit Hilfe von verschiedenen selbstorganisierenden Monoschichten (SAM) untersucht. Ohne Serumproteine im Kulturmedium zeigte sich dabei lediglich auf einer NH_2 -terminierten Schicht eine gegenüber den anderen Schichten beträchtlich veränderte Zelladhäsion. Die Arbeit von Faucheux et al. [139] deutet jedoch darauf hin, dass diese Gruppe im Gegensatz zu den anderen planaren SAM eine beträchtliche topografische Struktur aufweist, die möglicherweise die erhöhte nicht-spezifische Zelladhäsion zur Folge hatte. Die in der vorliegenden Arbeit unter serumfreier Kultivierung ermittelten identischen Zelladhäsionswerte auf den planaren, chemisch identischen Siliziumsubstraten entsprechen somit den Erwartungen. Ein Großteil der Studien, die sich mit dem Einfluss elektrischer (Oberflächenladung, Zeta-Potential) und energetischer Oberflächeneigenschaften auf die

Adhäsion verschiedener Zellen befassen, führte die Untersuchungen in Anwesenheit von Proteinen im Medium oder als präadsorbierte Schicht durch [29, 69, 139–144], daher lässt sich für diese Art der Zellkultur eine bessere Einordnung in die Literatur vornehmen.

Im Hinblick auf die Benetzbarkeit zeigte sich sowohl in Untersuchungen von van Kooten et al. [140] an verschiedenen Polymeren und Glas als auch in Untersuchungen von Faucheux et al. [139] an SAM mit verschiedenen Endgruppen, dass mit einer besseren Benetzbarkeit eine stärkere Adhäsion von Zellen, in den konkreten Fällen von Fibroblasten, einhergeht. Der Einfluss des Zeta-Potentials von mit SAM modifizierten Siliziumchips auf die Adhäsion von Lymphoblasten wurde von Kirby et al. [143] untersucht. Diese ergaben für ein Zeta-Potential nahe null eine gegenüber stärker negativ geladenen Oberflächen verringerte Zelladhäsion und zeigen damit dieselbe Tendenz, die auch von Bodhak et al. [144] für negativ polarisiertes Hydroxylapatit (HA) im Vergleich zu unpolarisiertem HA beobachtet wurde. Dargahi et al. [145] zeigten, dass Endothelzellen auf mit Fibronectin präinkubiertem Gold, das mit unterschiedlichen Spannungen beaufschlagt wurde, am stärksten auf der negativ geladenen Goldoberfläche adhärten.

Die eigenen Ergebnisse sowie die zitierten Literaturbeispiele mit verschiedenen Zelltypen auf alternativen Modellsystemen lassen für planare Substrate einen fundamentalen Zusammenhang zwischen der Zelladhäsion in Anwesenheit von Proteinen im Medium und der Benetzbarkeit bzw. dem Zeta-Potential vermuten: Mit einem stärker negativen Zeta-Potential (einer besseren Benetzbarkeit) der Biomaterialoberfläche geht in Anwesenheit von Serumproteinen im Kulturmedium eine stärkere Zelladhäsion einher.

Zelladhäsion auf präadsorbierten Proteinschichten

Angesichts des Einflusses der Modellsubstrate auf die Zelladhäsion in Gegenwart von Proteinen im Kulturmedium wurde durch eine präadsorbierte Proteinschicht eine Verstärkung des Effekts erwartet. So wurden mit Hilfe von Fluoreszenzmikroskopie-Aufnahmen von Immunfluoreszenz-gefärbtem Fibronectin sowohl nach einstündiger Adsorption aus einer Fibronectinlösung mit einer Konzentration von 2 µg/ml in Pufferlösung (PBS) als auch nach Adsorption aus 10%igem

fetalem Kälberserum (FKS)-Lösung in DMEM beträchtliche Unterschiede der Fibronectinmenge auf den Substratmodifikationen ermittelt (s. Abb. 4.17, S. 71).

Überraschenderweise zeigte die Untersuchung der Zelladhäsion für die mit einer 2 µg/ml-Fibronectinlösung und mit serumhaltigem Kulturmedium (10 % FKS in DMEM) für 60 min präinkubierten Substrate jedoch trotz dieser verschiedenen adsorbierten Fibronectinmengen keine Unterschiede (s. Abb. 4.20, S. 73). Vermutlich wurde das adsorbierte Fibronectin aufgrund der geringen Konzentration in der reinen Lösung durch Substrat-Protein-Wechselwirkungen denaturiert, d.h. es hat seine native Konformation und somit auch seine biologische Funktion verloren [24, 146]. Da der primäre Antikörper an den nicht von Denaturierung betroffenen C-Terminus der Fibronectinmoleküle andockt, wurden diese somit auch im denaturierten Zustand markiert. Von Meadows et al. [146] wurde beispielsweise gezeigt, dass bei einer Fibronectinkonzentration von 1 µg/ml isolierte Fibronectinmoleküle auf einer negativ geladenen Oberfläche überwiegend im denaturierten Zustand vorliegen. Erst ab höheren Konzentrationen ist eine Stabilisierung durch Protein-Protein-Wechselwirkungen zu erwarten [146]. Elter et al. [24] haben z.B. ab einer Konzentration von 25 µg/ml eine Stabilisierung der nativen Konformation des Fibronectin auf Siliziumwafern beobachtet.

Für topografische Nanostrukturen wurde von Elter et al. [22,24] gezeigt, dass die im Vergleich zu einer planaren Referenz erhöhte Menge Fibronectin ausreichte, um die Proteine gegen Oberflächendenaturierung zu stabilisieren und so aufgrund der erhöhten Anzahl spezifischer Bindungsstellen eine erhöhte Zelladhäsion auf den Strukturen hervorzurufen. Auf der elektronischen Nanostruktur in dieser Arbeit reichte die erhöhte Menge Fibronectin anscheinend jedoch nicht aus. Sein Faltungszustand veränderte sich durch Protein-Substrat-Wechselwirkungen, was einen Verlust der biologischen Funktion zur Folge hatte. So konnten keine zusätzlichen spezifischen Bindungsstellen angeboten werden und die Zelladhäsion von MG-63-Osteoblasten war auf allen Substraten gleich stark ausgeprägt. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die lokal erhöhten Dispersionswechselwirkungen an topografischen Strukturen, die gerade die Größe von Proteinen aufweisen, zu einer weiteren Stabilisierung gegen Desorption und damit auch bei geringen Proteinkonzentrationen zu einem so starken Anstieg der Oberflächenkonzentration führen, dass die Proteine gegen Oberflächendenaturierung geschützt werden.

Die Literatur zum Einfluss der Oberflächenladung und Benetzbarkeit auf die Ad-

sorption von Fibronectin an vergleichbaren Modelloberflächen ist rar und widerspricht sich zum Teil. In der Studie von Dargahi et al. [145] wurde beispielsweise gezeigt, dass Fibronectin bei einer vergleichbaren Konzentration von 1 µg/ml eher auf positiv als auf negativ polarisierten Goldoberflächen adsorbierte. Dies wurde auf die elektrostatische Anziehung des in der phosphatgepufferten Lösung (pH 7,4) insgesamt negativ geladenen Moleküls zurückgeführt, dessen isoelektrischer Punkt etwa bei pH 5,0 liegt. Jedoch wurde von Bodhak et al. [58] eine entgegengesetzte Tendenz beobachtet: Hier war die adsorbierte Menge Fibronectin auf thermisch induziert negativ geladenem Hydroxylapatit im Vergleich zu positiv und ungeladenem Hydroxylapatit beträchtlich erhöht. Dies wurde darauf zurückgeführt, dass die drei Heparin-Bindungsstellen im Fibronectinmolekül einen isoelektrischen Punkt zwischen 8,2–9,0 besitzen und bei physiologischem pH somit positiv geladen sind. Die Studie deckt sich zudem mit der von Lu et al. [57], in der vermutet wurde, dass Fibronectin durch eben diese Bindungsstellen bevorzugt auf negativ geladenen bioaktiven Gläsern adsorbiert.

FKS enthält hingegen eine Mischung aus einer Vielzahl von Proteinen. Neben Fibronectin befinden sich darunter Serumalbumin, Fibrinogen und verschiedene Immunglobuline mit Konzentrationen im Bereich von einigen mg/ml [51]. Im Gegensatz zur Adsorption aus der niedrig konzentrierten reinen Fibronectinlösung wurde daher erwartet, dass die Fibronectinmoleküle durch die in der FKS-Lösung anwesenden Proteine stabilisiert wurde. Vermutlich spielten hier weitere Adhäsionsfaktoren eine übergeordnete Rolle und die unterschiedlichen Fibronectinmengen auf den Substraten konnten keine Änderung der Zelladhäsion induzieren.

Dennoch wurde, wie bereits oben diskutiert, unter Anwesenheit des FKS im Kulturmedium auf den bloßen Substraten eine beträchtliche Änderung der Zelladhäsion festgestellt. Als einziger Unterschied zu den Versuchen mit der präadsorbierten Proteinschicht aus der FKS-Lösung wurde die Adsorptionszeit identifiziert: War die Proteinschicht während der Besiedlung der Oberfläche mit Zellen in der serumhaltigen Zellkultur noch im Auf- und Umbau begriffen, so stellte sich bei den Versuchen mit den präadsorbierten Proteinen im Laufe der Inkubation ein Gleichgewicht ein. Das bedeutet, dass die Proteinschicht, auf die die Zellen bei der Kultivierung im serumhaltigen Medium stießen, eine andere war als nach 60 min Inkubationszeit. Es wurde daher vermutet, dass ein kleineres Protein, das schneller auf der Oberfläche adsorbierte, die Zelladhäsion beeinflusste. Der Hauptbestandteil von FKS ist Se-

rumalbumin, das dafür bekannt ist, aufgrund seiner geringen Größe und der hohen Konzentration schnell auf Oberflächen zu adsorbieren und dort Bindungsstellen für größere und langsamer adsorbierende Proteine zu blockieren [51, 147]. Von Grinnell und Feld [148] wurde darüber hinaus vermutet, dass insbesondere Serumalbumin in Konkurrenz mit Fibronectin und weiteren Adhäsionsfaktoren adsorbiert.

Um mehr über die Rolle des Serumalbumins für die Zelladhäsion auf den Substraten zu erfahren, wurde diese daher erneut mittels Durchflusszytometrie nach 60-minütiger Kultivierung der MG-63-Osteoblasten in DMEM unter Zugabe von 20 mg/ml untersucht. Tatsächlich zeigte sich hier ebenfalls eine signifikant erhöhte Zelladhäsion auf dem Dotier-Liniengitter (s. Abb. 4.21, S. 74).

Dieses Ergebnis ist ein Hinweis darauf, dass Serumalbumin für die Zelladhäsion unter Anwesenheit von Serum bei der Zellkultur eine wichtige Rolle spielt. Verstehen lässt es sich unter Berücksichtigung der Literatur zum Einfluss der Oberflächenladung und der Benetzbarkeit auf die Adsorption von Serumalbumin. Im Hinblick auf die Auswirkung elektrischer Oberflächeneigenschaften wurde von mehreren Autoren gezeigt, dass die Adsorption von Serumalbumin mit stärker negativem Oberflächenpotential [149–151] stark eingeschränkt wird. Dies wird dabei auf den isoelektrischen Punkt von etwa 4,7–4,9 [151] zurückgeführt, wodurch das Molekül beim physiologischen pH 7,4 eine negative Ladung trägt. Ein Einfluss der Oberflächenenergie auf das Adsorptionsverhalten von Serumalbumin wurde darüber hinaus von Arima et al. [147] in ihrer Studie auf unterschiedlich benetzbaren selbstorganisierenden Monoschichten (engl. Self-assembled monolayer, SAM) nachgewiesen: Serumalbumin widersetzte sich hier der Verdrängung durch Serumproteine, die die Zelladhäsion vermitteln, auf hydrophoben SAM mit geringer Oberflächenenergie stärker als auf hydrophilen. Dadurch war in dieser Studie die Zelladhäsion auf mit Albumin präinkubierten hydrophilen SAM im Vergleich zu den hydrophoben SAM erhöht [147]. Diese Ergebnisse konnten von Wertz und Santore [152] anhand der konkurrierenden Adsorption von Serumalbumin und Fibrinogen auf ebenfalls mittels SAM modifizieren unterschiedlich benetzbaren Oberflächen bestätigt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Adsorption von Serumalbumin, welches während der Zellkultivierung aus dem Kulturmedium (DMEM + 10% FKS) adsorbierte, offenbar auf dem am stärksten negativ geladenen Dotier-Liniengitter (pn^+) unterdrückt. Fibronectin und weitere adhäsive Faktoren konnten so besser adsorbieren und im Vergleich zu den schwächer negativ geladenen Oberflächen p und n^+

eine größere Anzahl spezifischer Bindungsstellen für die Zellen anbieten, was wiederum eine erhöhte Zelladhäsion zur Folge hatte. Im Falle der Zellkultur in Medium unter Zugabe von Serumalbumin verhinderte das adsorbierte Protein - das selbst keine spezifischen Bindungsstellen bereitstellt - offenbar die Adsorption von Zelladhäsionsproteinen, die von den Zellen sezerniert werden. Auf dem Dotier-Liniengitter konnte adsorbiertes Serumalbumin am besten verdrängt werden, wodurch sich eine stärkere Zelladhäsion ausbildete als auf den schwächer negativ geladenen elektronisch homogenen Substratmodifikationen.

Bevorzugte Zellausrichtung

Die Auswertung der Zellmorphologie auf dem Dotier-Liniengitter (pn^+) nach 24-stündiger Kultivierung der MG-63-Osteoblasten in DMEM ohne Zusatz von FKS in Abschnitt 4.3.4 ergab einen interessanten Effekt: Die Zellen zeigten bei Abwesenheit jeglicher Proteine im Kulturmedium eine bevorzugte Ausrichtung entlang der Linien der Struktur (s. Abb. 4.22, S. 75).

Für topografische Graben-Nanostrukturen ist dieses Phänomen aus der Literatur bekannt [11, 153, 154]. Die meisten Modelle, die die Zellmigration und -morphologie auf einer Biomaterialoberfläche beschreiben, basieren auf spezifischen Bindungen der Zelle mit der extrazellulären Matrix. Eine erhöhte Bindungsanzahl von Zellrezeptoren mit der adsorbierten Proteinschicht führt zur Bildung von fokalen Adhäsionsstrukturen, die wiederum über das Aktinzytoskelett eine mechanische Verbindung zum gesamten Zellkörper gewährleisten, und so auf die Migration und Morphologie wirken [155, 156]. Als möglicher Mechanismus, der die Zellausbreitung auf topografischen Graben-Nanostrukturen bestimmt, wurde von Elter [11] dementsprechend vorgeschlagen, dass die Aktin-Polymerisation der Zellen senkrecht zu den Gräben aufgrund der ständigen Unterbrechung des Zellkontaktes bei der Ausbreitung in diese Richtung schwächer ausgeprägt ist als parallel zur Struktur. Folglich könnten sich parallel zu den Gräben längere Aktin-Filamente ausbilden, die die Ausbreitung in diese Richtung begünstigen. Parallel zu den Gräben würde sich eine stärkere treibende Kraft für die Zellausbreitung ergeben als senkrecht zu diesen. Die Zelle nimmt somit eine länglich ausgerichtete Form an [11].

Die schwache topografische Variation des Gitters mit einem Aspektverhältnis von $0,080 \pm 0,001$ ließ hingegen keine bevorzugte Zellausrichtung erwarten (s. Abb. 4.9,

S. 59). So wurde von Loesberg et al. [153] für Fibroblasten auf Grabenstrukturen unterhalb einer Grabentiefe von 35 nm kein derartiger Effekt erzielt. Von Lamers et al. [154] wurde näherungsweise derselbe Grenzwert für Osteoblasten angegeben. Um einen Einfluss der Topografie des Dotier-Liniengitters auf die Zellausrichtung weiter auszuschließen, wurde in der vorliegenden Arbeit zudem eine 2 nm dünne Platinschicht auf das Substrat aufgebracht, die die topografische Variation aufrechterhielt und gleichzeitig die lokal variierende elektrische Feldstärke gegenüber den Zellen abschirmte. Es zeigte sich keinerlei bevorzugte Ausrichtung auf diesem Platin-beschichteten Dotiergitter, was darauf hindeutet, dass der Einfluss der Topografie auf die Zellmorphologie als vernachlässigbar angesehen werden kann (s. Abb. 4.27, S.77). Zudem zeigten die Zellen durchweg einen engen Kontakt zum Dotier-Liniengitter. Daher wird der oben beschriebene Einfluss eines immer wieder unterbrochenen Zellkontaktes auf die Zellausrichtung ausgeschlossen.

Da die bevorzugte Ausrichtung auf der Dotier-Linienstruktur nur in Abwesenheit von Proteinen im Kulturmedium und ohne eine vorherige Inkubation mit Proteinen auftrat, ist es zudem unwahrscheinlich, dass spezifische Zell-EZM-Bindungen dafür verantwortlich waren. Vielmehr wurde angenommen, dass die Zellen direkt in Wechselwirkung mit dem oberflächennahen elektrischen Feld traten. Insbesondere in der initialen Phase der Adhäsion haben diese nicht-spezifischen Wechselwirkungen einen wichtigen Anteil an der Anheftung der Zelle an die Biomaterialoberfläche [11,33].

Dass Zellen sich in Anwesenheit elektrischer Felder in Abhängigkeit von der Feldrichtung ausrichten, ist aus der Literatur bekannt. Beispielsweise wurde von Zhao et al. [157] bei Epithelzellen aus der Hornhaut von Rindern, von Onuma et al. [158] bei Mausfibroblasten, von Cooper et al. [159] bei amphibischen Neuralleistenzellen und von McCaig und Dover [160] bei Muskelzellen von Froschembryonen eine bevorzugte Zellausrichtung beobachtet. Entgegen der intuitiv vermuteten Orientierung parallel zur Richtung der elektrischen Feldlinien richteten sich die Zellen jedoch senkrecht zum elektrischen Feld aus. Im Hinblick auf die klinische Anwendung konnte gezeigt werden, dass die durch elektrische Felder induzierte bevorzugte Zellausrichtung und -migration eine für die Wundheilung förderliche Wirkung hat [161,162].

Eine Umverteilung der in der Zellmembran stets vorhandenen Proteine in einem von außen angelegten elektrischen Feld wird als mögliche Erklärung für die bevorzugte Zellausrichtung genannt [157,160]. Je nachdem, wie diese Membranbestandteile

geladen sind, erfolgt eine Ansammlung an der zur Kathode oder zur Anode zugewandten Flanke der Zelle. Dadurch wird in irgendeiner Weise die Aktinpolymerisation verändert, was letztlich die Ausbreitung der Zellen senkrecht zur Richtung der Feldlinien begünstigt [157]. Die in der vorliegenden Arbeit beobachtete bevorzugte Ausrichtung der MG-63-Osteoblasten entlang der Dotier-Linienstruktur wurde somit vermutlich durch die laterale Orientierung der elektrischen Feldlinien hervorgerufen, die senkrecht zur Richtung der unterschiedlich dotierten Linien zeigten (s. Abb. 4.8c, S.58).

6 Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von lokal im Nanometerbereich variierenden elektrischen Feldern auf das Biosystem untersucht. Ziel der Untersuchungen war es, die Rolle der elektrostatischen Kraft bei der Proteinadsorption und der Zellbesiedlung auf topografisch nanostrukturierten Biomaterialoberflächen besser zu verstehen. Zu diesem Zweck wurden zwei Ansätze gewählt: Zum einen wurden FEM-Elektrostatikberechnungen eingesetzt, um die Verteilung des elektrischen Feldes an einer Graben-Nanostruktur zu berechnen. Mit den Ergebnissen können vorausgehende experimentelle Studien und Computersimulationen der Proteinadsorption an topografischen Nanostrukturen besser interpretiert werden. Zum anderen wurde in experimentellen Untersuchungen die separate Wirkung einer im Nanometerbereich lokal variierenden elektrischen Feldverteilung, wie sie an topografischen Nanostrukturen auftritt, auf das Biosystem studiert. Dazu wurde ein Modellsubstrat aus Silizium verwendet, das die oberflächennahe elektrische Feldverteilung einer topografischen Nanostruktur nachbildet, dabei jedoch eine nahezu planare Oberfläche aufweist. Auf diese Weise wurden geometrische Effekte und der Einfluss lokal variierender Dispersionswechselwirkungen auf das Biosystem, die die elektrostatische Wechselwirkung an topografischen Nanostrukturen normalerweise überlagern, ausgeschaltet. Im Rahmen dieser Arbeit gelang es erstmalig, einen Nachweis des Einflusses der oberflächennahen elektrischen Feldverteilung an einer Nanostruktur auf die Morphologie von Osteoblasten zu führen.

Während bisherige Simulationsarbeiten zur Proteinadsorption an topografischen Nanostrukturen rein metallische Oberflächen als Randbedingungen annehmen, bei denen in oberflächennahen konvex gewölbten Bereichen lokal erhöhte und nahe konkav gewölbten Bereichen lokal verringerte elektrische Feldstärken auftreten, wurde in dieser Arbeit der Einfluss einer für viele metallische Biomaterialien relevanten Passivierungsschicht berücksichtigt. Anhand einer Graben-Nanostruktur aus Titan, die mit einer dünnen TiO_2 -Passivierungsschicht bedeckt ist, wurde mittels FEM-Elektrostatikberechnungen die Verteilung des elektrischen Feldes nahe der Grenzfläche zu einer wässrigen Elektrolytlösung mit physiologischer Salzkonzentration berechnet. Es wurde gezeigt, dass das Vorhandensein der Passivierungsschicht eine

Inversion der Feldverteilung im Vergleich zu einer rein metallischen topografischen Modellstruktur zur Folge hat: Nahe der konvexen Kante der passivierten Struktur wurde eine Verringerung und nahe der konkaven Kante eine Erhöhung der elektrischen Feldstärke im Vergleich zu einem planaren Bereich der Grenzfläche berechnet. Diese Feldverteilung wurde über den gesamten betrachteten pH-Wert-Bereich von 5,5–7,5 aufrechterhalten, der über eine pH-abhängige Oberflächenladung in die Berechnungen einfließt. Die oberflächennah erhöhte elektrische Feldstärke in den konkaven Bereichen einer topografischen Nanostruktur könnte zu einer verstärkten Anziehung entgegengesetzt geladener Proteine bzw. Proteinbestandteile führen und liefert somit eine ergänzende bzw. unterstützende Erklärung für die von Elter et al. [22, 34] experimentell und per Computersimulation ermittelten erhöhten Proteinmengen in dieser Region.

Zur Untersuchung der separaten Wirkung von lokal im Nanometerbereich variierenden elektrischen Feldern auf das Biosystem wurde ein Modellsubstrat aus Silizium vorgeschlagen und untersucht. Dieses ermöglichte durch selektive Ionenimplantation von Phosphor in Form eines 130 nm-Linienmusters eine definierte Variation der oberflächennahen elektrischen Feldstärke bei einer nahezu planaren Topografie. Als Referenzsubstrat wurde ein unbehandelter Wafer des Ausgangsmaterials verwendet, und ein zusätzlicher Wafer wurde an der Oberfläche durchgängig mit Phosphor ionenimplantiert, um einen etwaigen chemischen Einfluss des Dotierungselements auf das Biosystem zu untersuchen.

Aus der Materialcharakterisierung der Dotier-Linienstruktur mittels Raster-Kelvin-Mikroskopie ging hervor, dass die Ionenimplantation erwartungsgemäß eine lokale Variation des Oberflächenpotentials auf der Dotier-Linienstruktur zur Folge hatte. Die resultierende Variation der elektrischen Feldstärke lag in derselben Größenordnung wie die berechnete nahe der topografisch nanostrukturierten TiO_2 -Elektrolyt-Grenzfläche. Zudem wurde mittels kraftspektroskopischer Messungen der nicht-spezifischen Wechselwirkung zwischen Cantilever und Substrat in einer Elektrolytlösung mit physiologischer Salzkonzentration gezeigt, dass die selektive Ionenimplantation zu einer lokal variierenden elektrostatischen Kraft führte. Diese Messungen konnten im Rahmen der DLVO-Theorie interpretiert werden.

Die Untersuchung der Adsorption von Immunfluoreszenz-gefärbtem Fibronectin mittels Laser-Scanning-Mikroskopie (LSM) ergab im Vergleich zu den beiden elektronisch homogenen Substraten nach 60-minütiger Inkubationszeit aus einer

2 µg/ml-Lösung eine erhöhte Menge Fibronectin auf der Dotier-Linienstruktur. Dieses Ergebnis ließ vermuten, dass die aufgrund der erhöhten Proteinmenge größere Anzahl spezifischer Zellbindungsstellen zu einer stärkeren Zelladhäsion führt. Jedoch wurde mittels Durchflusszytometrie gezeigt, dass die verwendeten MG-63-Osteoblasten auf den vor der Kultivierung mit Fibronectin inkubierten Substratmodifikationen die gleiche Adhäsion ausbildeten. Daraus wurde geschlussfolgert, dass die an topografischen Nanostrukturen hinzukommenden lokal erhöhten Dispersionswechselwirkungen eine zusätzliche stabilisierende Wirkung auf adsorbierte Proteine haben, durch die auf mit Fibronectin inkubierten Substraten höhere Zelladhäsionswerte erzielt werden.

Des Weiteren wurde in der Charakterisierung der Materialeigenschaften der Substratmodifikationen gezeigt, dass das Dotier-Liniengitter im Vergleich zu den beiden elektronisch homogenen Substraten an der Oberfläche sehr viel stärker negativ geladen war. Dies konnte sowohl durch Oberflächen- und Zeta-Potentialmessungen als auch durch die Berechnung der Oberflächenenergie aus Kontaktwinkelmessungen belegt werden. Alle Messungen gaben dabei ein in sich schlüssiges Gesamtbild ab: Durch die Ionenimplantation wurde der polare Anteil der Oberflächenenergie verändert, wobei dieser umso größer war, je stärker negativ die Oberflächenladung der jeweiligen Substratmodifikation war. Theoretisch hätte das mittlere Oberflächenpotential des Dotier-Liniengitters zwischen dem Wert des Waferausgangsmaterials und dem des an der Oberfläche durchgängig ionenimplantierten Wafers liegen müssen. Die Verschiebung hin zu einem beträchtlich stärker negativen Oberflächenpotential wurde anhand von Kapazitäts-Spannungs- und XPS-Messungen auf lokalisierte Oberflächenladungen an der Grenzfläche zwischen Silizium und SiO₂-Schicht zurückgeführt.

Aufgrund der starken Verschiebung des mittleren Oberflächenpotentials zwischen dem unbehandelten Ausgangswafer und der Dotier-Linienstruktur lassen sich die beobachteten Reaktionen des Biosystems nicht eindeutig auf die lokale Oberflächenpotentialvariation der elektronischen Nanostruktur zurückführen. So werden sowohl die adsorbierte Fibronectinmenge als auch dessen Faltungszustand durch die Gesamtoberflächenladung eines Substrats beeinflusst. Die insgesamt erhöhte Menge Fibronectin, die aus einer Serumlösung und einer reinen Fibronectin-Lösung auf dem Dotier-Liniengitter adsorbierte, lässt sich durch die im Vergleich zur Referenz wesentlich stärker negativ geladene Oberfläche erklären. Außerdem muss davon aus-

gegangen werden, dass die stark negativ geladene Oberfläche eine im Vergleich zu den schwächer negativ geladenen Substratmodifikationen vermehrte Denaturierung des Fibronektins zur Folge hatte.

Auch die auf der Dotierstruktur erhöhte Zelladhäsion nach Kultivierung in serumhaltigem Medium bzw. in Medium unter Zugabe von Serumalbumin konnte auf die Beeinflussung eben dieses Proteins durch die mittleren Oberflächeneigenschaften der Substrate zurückgeführt werden. Das Serumalbumin adsorbierte am schwächsten auf der Dotierstruktur und konnte so durch im Serum enthaltenen bzw. von den Zellen sezernierten Adhäsionsfaktoren ausgetauscht werden, wodurch diese mit ihren spezifischen Bindungsstellen die Zelladhäsion verstärkten.

Die Wirkung der oberflächennahen elektrischen Feldverteilung des nanostrukturierten Dotier-Linienmusters auf das Biosystem konnte anhand der bevorzugten Ausrichtung der MG-63-Osteoblasten nachgewiesen werden. FEM-Elektrostatikberechnungen zeigten, dass die lokal unterschiedliche Dotierung eine Besonderheit gegenüber homogen geladenen Oberflächen zur Folge hatte. Das elektrische Feld enthielt in den oberflächennahen Bereichen eine laterale Komponente, die senkrecht zur Richtung der Dotierlinien zeigte. Die Zellen richteten sich wiederum senkrecht zum elektrischen Feld und somit parallel zu den Linien aus.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das Ziel der Nachbildung der Verteilung der elektrischen Feldstärke einer topografischen Nanostruktur mit dem untersuchten Modellsubstrat realisiert werden konnte. Die verwendete Dotier-Linienstruktur wies eine lokale Feldstärkevariation auf, die in der Größenordnung einer in der vorliegenden Arbeit ebenfalls theoretisch betrachteten topografischen Nanostruktur lag. Lokal variierende Dispersionswechselwirkungen und geometrische Einflüsse auf das Biosystem, die an einer topografischen Struktur die Wirkung der Elektrostatik überlagern, wurden durch die nahezu planare Oberfläche des Modellsubstrats aufgehoben. Die bevorzugte Ausrichtung serumfrei kultivierter MG-63-Osteoblasten entlang der Linien der Dotierstruktur wurde auf die elektrische Feldverteilung zurückgeführt. Einschränkend muss jedoch bemerkt werden, dass die lokale Variation der elektrischen Oberflächeneigenschaften mit einer starken Variation der integralen Oberflächeneigenschaften einherging. Dadurch ließen sich die in den biologischen Untersuchungen gezeigten starken Einflüsse auf die Adsorption von Fibronektin und die Adhäsion humaner MG-63-Osteoblasten nicht eindeutig auf die elektronische Nanostrukturierung zurückführen.

Im Hinblick auf zukünftige Untersuchungen wird vorgeschlagen, dass der Unterschied zwischen den mittleren Oberflächenpotentialen der elektronischen Nanostruktur und der elektronisch homogenen Referenz nach Möglichkeit aufgehoben bzw. klein im Vergleich zur lokalen Potentialvariation gewählt werden sollte. Dadurch ließe sich der Effekt der Variation des elektrischen Feldes auf die lokalen Eigenschaften des Biosystems, z.B. der Faltungszustand und die Menge adsorbierter Proteine oder die Lage und Anzahl von Zellrezeptoren, separat untersuchen. Dies könnte beispielsweise realisiert werden, indem zusätzliche konstante Potentiale an die Substrate angelegt werden oder indem eine definierte Oberflächenladung bereits im Fertigungsprozess in die Referenz eingebracht wird.

Die Anwesenheit von Serumalbumin im Kulturmedium hat sich als wichtiger Faktor für die Beeinflussung der Zelladhäsion auf den Substraten herausgestellt. Daher ist das Adsorptionsverhalten des Serumproteins, insbesondere auch in Konkurrenz mit weiteren Serumproteinen wie z.B. Fibronectin, eine sehr interessante Fragestellung, die sich aus dieser Arbeit ergibt. Ortsauflösende biologische Methoden wären dabei ein wichtiges Werkzeug, das eine Zuordnung der lokalen Variation des Oberflächenpotentials zu den Eigenschaften adsorbierter Proteine ermöglicht. Eine Möglichkeit wäre die Einzelmolekül-Kraftspektroskopie (engl. Single-Molecule Force Spectroscopy; SMFS), jedoch haben erste eigene, an dieser Stelle nicht dokumentierte Untersuchungen mit dieser Methode darauf hingedeutet, dass diese für das betrachtete planare Modells substrat aus Silizium ungeeignet ist. Das Fibronectin wies im vorliegenden Fall offenbar eine ähnliche Affinität zu den aus Silizium gefertigten Cantilevern auf und adsorbierte stark auf diesen, wodurch keine Aussage mehr über die Eigenschaften der auf den Substraten adsorbierten Biomoleküle getroffen werden konnte. Eine vielversprechende, ähnlich leistungsstarke Methode ist die STED (engl. Stimulated Emission Depletion)-Mikroskopie, deren laterale Auflösung sich immer weiter in den Bereich unterhalb von 10 nm verlagert. Durch die Verwendung von verschiedenen Antikörpern, die an unterschiedliche Epitope eines Proteins andocken, ließen sich durch Immunfluoreszenzfärbung zahlreiche Informationen, wie beispielsweise die adsorbierte Proteinmenge, der Faltungszustand und die Orientierung der Moleküle, gewinnen.

Es ist allgemein anerkannt, dass anisotrope topografische Nano- und Mikrostrukturen eine bevorzugte Ausrichtung (engl. Contact Guidance) und Migration von Zellen zur Folge haben. Diesen Effekt nutzen einige Hersteller von Zahnimplantaten

beispielsweise aus, indem durch mikrostrukturierte Führungsnuten das Herunterwachsen des Epithels vom Implantat unterbunden wird. Aufgrund der komplizierten Fertigung dieser regulären Strukturen mittels zerspanender oder Ätzverfahren wird eine Anwendung auf geometrisch komplexeren Implantaten jedoch erschwert. Darüber hinaus bergen topografisch funktionalisierte Oberflächen die Gefahr einer erhöhten Belastung des Gewebes mit Verschleißpartikeln, die Entzündungsreaktionen zur Folge haben können. Hier könnte sich für die selektive Dotierung von Implantatoberflächen ein potentiell Anwendungsfeld eröffnen. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Dotier-Linienstruktur ebenfalls eine starke Beeinflussung der Morphologie von MG-63-Osteoblasten bewirken konnte. Denkbar wäre eine selektive Dotierung der nativen TiO_2 -Passivierungsschicht von Implantaten aus Titan und Titanlegierungen, die ebenfalls halbleitende Eigenschaften aufweist. Auf diese Weise könnten die in dieser Arbeit mit dem Silizium-Modellsubstrat erzielten anisotropen elektronischen Nanostrukturen möglicherweise auf reale Implantate übertragen werden.

A Anhang

A.1 Prozedur zur Untersuchung der Zellausrichtung

Abb. A.1 veranschaulicht die Vorgehensweise bei der Analyse der Zellausrichtung mit ImageJ (v.1.49e). Aus der REM-Aufnahme (Abb. A.1a) wurde der unregelmäßige Hintergrund subtrahiert („Subtract background“; Abb. A.1b). Mit der Funktion „Threshold“ wurde ein Graustufengrenzwert festgelegt, ab dem alle Graustufen schwarz (Graustufe $>$ Grenzwert) oder weiß (Graustufe $<$ Grenzwert) dargestellt werden (Abb. A.1c). Mit einem Median-Filter („Despeckle“; Pixelwerte wurden durch den Median der Pixelwerte in der direkten Nachbarschaft (3x3 Pixel) ersetzt) wurde anschließend das Rauschen aus dem Bild entfernt (Abb. A.1d). Die Größe der auszuwertenden Zellen wurde auf 500 bis 1500 Pixel festgelegt. Dadurch wurden ebenso kleine Partikel als auch große Zellhaufen weitestgehend von der Analyse ausgeschlossen. Abb. A.1e zeigt die Umrisse der für die Analyse berücksichtigten Zellen. Abschließend wurden an die Zellumrisse Ellipsen angepasst, die dieselbe Fläche und denselben Schwerpunkt sowie Orientierung (Richtung der Hauptachse der Ellipse) wie die Zelle besitzen (Abb. A.1f).

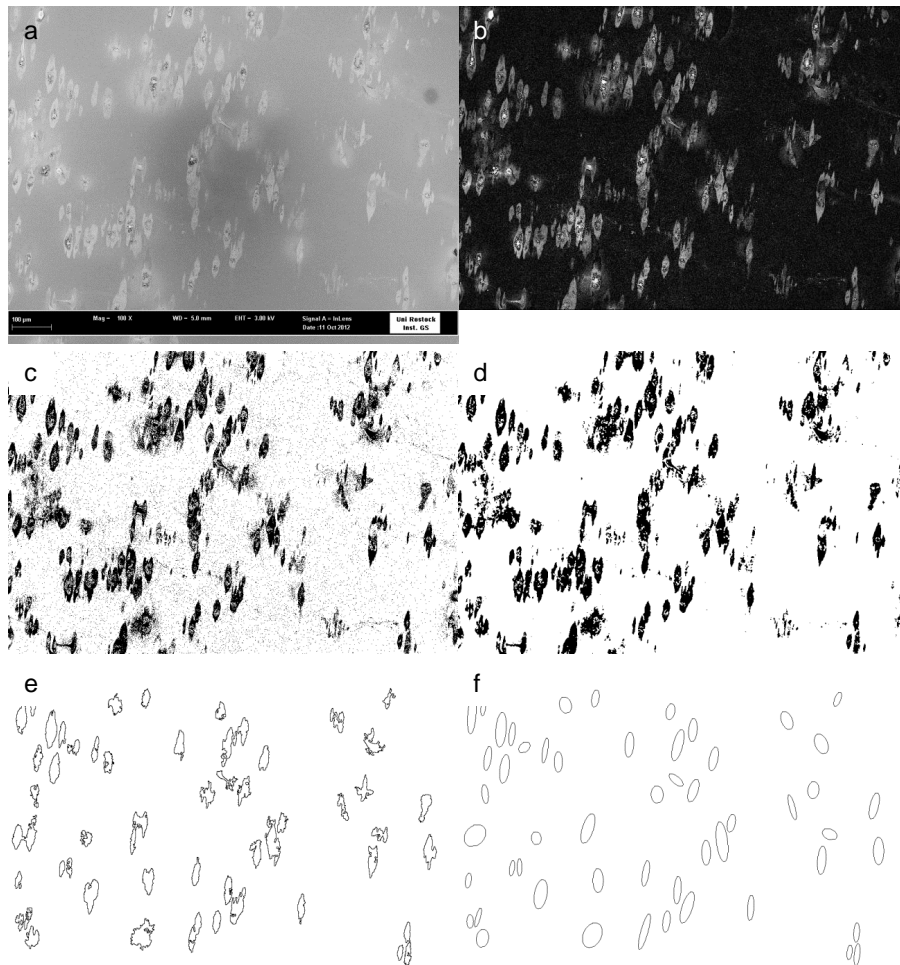


Abb. A.1: (a)REM-Aufnahme von MG-63-Osteoblasten auf dem Dotier-Liniengitter (pn^+) ohne vorherige Inkubation der Oberfläche mit Proteinen. Die Linien verlaufen im Winkel von 80° zur Horizontalen. (b) Rolling-Ball-Algorithmus (Radius 20 Pixel): Subtraktion des Hintergrunds aus der Originalaufnahme. (c) Einstellen eines Graustufengrenzwertes (Threshold, Invertierung): Oberhalb des Threshold werden alle Grauwerte als schwarz und unterhalb alle Grauwerte als weiß dargestellt. (d) Despeckle-Algorithmus: Rauschunterdrückung. (e) Umrisse der markierten und analysierten Zellen (Zellfläche zwischen 500 und 1500 Pixeln). (f) Ellipsen der analysierten Zellen.

A.2 Einfluss der Topografie des Dotier-Liniengitters auf die Potentialverteilung

Um den möglichen Einfluss der Topografie des Dotier-Liniengitters auf die Verteilung des Oberflächenpotentials auszuschließen, wurden die FEM-Elektrostatikberechnungen ebenfalls mit einer topografisch strukturierten Oberfläche wiederholt. Der Vergleich einer planaren und einer Oberfläche mit einem R_z -Wert von 10 nm in Abb. A.2 zeigt, dass der Einfluss bei dieser geringen topografischen Variation vernachlässigbar ist.

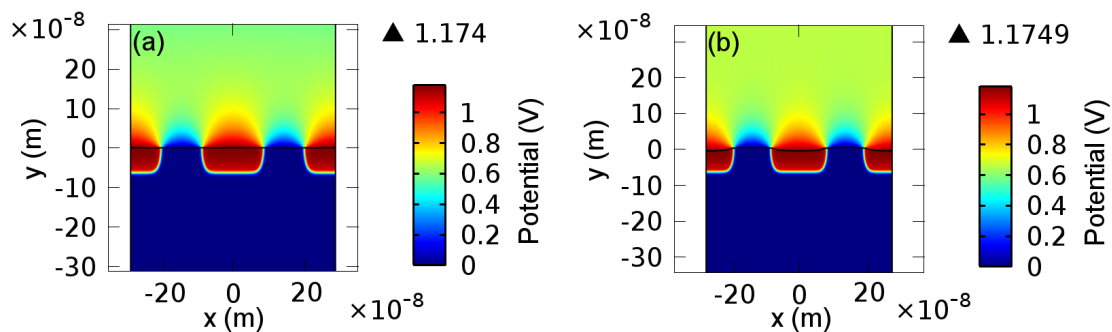


Abb. A.2: Einfluss der topografischen Variation des Dotier-Liniengitters auf die Potentialverteilung. Im Vergleich zum planaren Modell (a) konnte kein merklicher Unterschied auf der topografisch strukturierten Oberfläche (b) nachgewiesen werden.

A.3 Ergänzende KPFM-Messungen

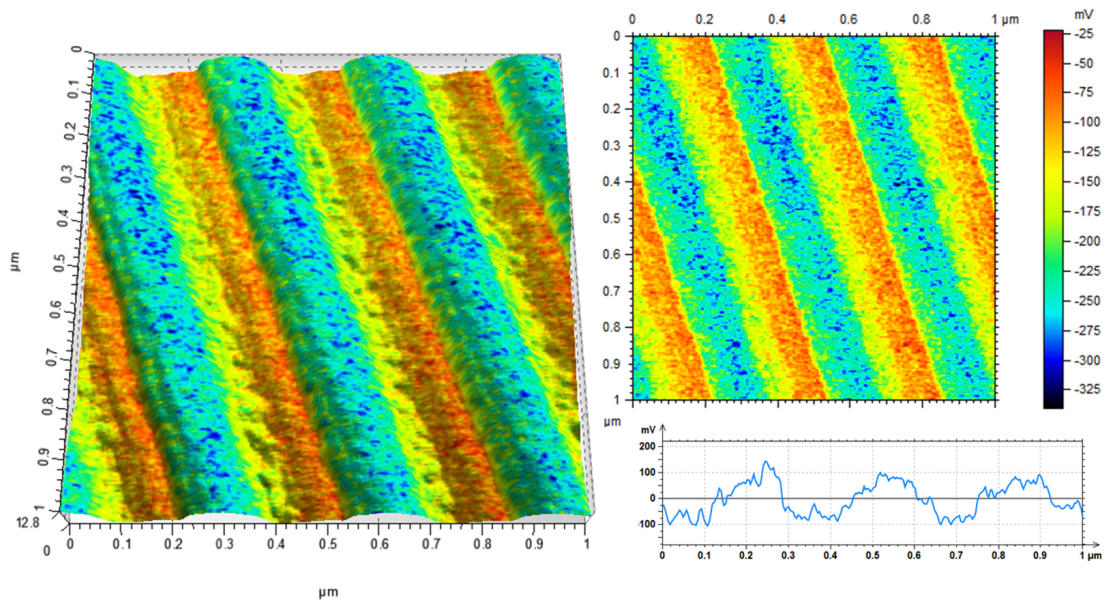


Abb. A.3: Ergebnisse der bei Keysight Technologies in Auftrag gegebenen KPFM-Messungen des Dotier-Liniengitters. Es wurde eine Oberflächenpotentialvariation von etwa 250 mV gemessen, die dieselbe Tendenz wie die Ergebnisse der Messungen mit dem JPK-Gerät aufweist.

Abbildungsverzeichnis

2.1	Schematische Darstellung der elektrochemischen Doppelschicht nach dem Modell von Stern	6
2.2	Verlauf der Wechselwirkungspotentiale in einer Elektrolytlösung in Abhängigkeit vom Abstand zur Oberfläche	9
2.3	Die Grenzfläche zwischen Biomaterial und Biosystem	10
2.4	Schematische Darstellung des Vroman-Effekts	11
2.5	Schematische Darstellung der Oberflächendenaturierung von Proteinen	12
2.6	Aufbau und Bindungsstellen von Fibronectin	13
2.7	Schematische Darstellung einer Zellmembran	14
2.8	Schematischer Verlauf des Potentials an der Phasengrenze zwischen Halbleiter und Elektrolytlösung	15
2.9	Bändermodell des pn-Übergangs	16
2.10	Betriebsmodi der MOS-Struktur	18
2.11	Verlauf Hochfrequenz-Kapazität einer MOS-Struktur in Abhängigkeit von der angelegten Spannung–Der Einfluss von Oxidladungen .	20
2.12	Funktionsprinzip des Rasterkraftmikroskops	22
2.13	Definition und grundsätzliche Messung der Kontaktpotentialdifferenz	23
2.14	Prinzipielle Messung des Oberflächenpotentials mit der Two-Pass-Methode	24
2.15	Schematische Darstellung der Kraft-Abstands-Kurve eines kraftspektroskopischen Experiments	26
2.16	Schematische Darstellung des für die Messung des Strömungspotentials verwendeten Spaltkanals	27
2.17	Funktionsprinzip der indirekten Immunfluoreszenzfärbung	31
2.18	Prinzip der Durchflusszytometrie	31
3.1	Verlauf des elektrischen Potentials und der unteren Leitungsbandkante in der TiO ₂ -Passivierungsschicht an einer planaren Grenzfläche zwischen Titan und Elektrolytlösung im thermischen Gleichgewicht	35
3.2	Simulationsbox der topografischen Nanostruktur aus Titan	37

3.3	Ortsabhängige elektrische Feldstärken an einer metallischen Nanostruktur im Kontakt mit einer NaCl-Elektrolytlösung	40
3.4	Verteilung der elektrischen Feldstärke an der topografisch nanostrukturierten Titanoberfläche im Kontakt mit einer NaCl-Elektrolytlösung	42
3.5	pH-abhängige Verteilung der elektrischen Feldstärke nahe der topografischen Nanostruktur aus Titan	43
3.6	Vereinfachte Erklärung der berechneten Potentialverläufe an einer metallischen und einer passivierten Nanostruktur	43
3.7	Verlauf des Potentials und der elektrischen Feldstärke senkrecht zur nanostrukturierten Titanoberfläche	44
4.1	REM-Querschnittaufnahme des Dotier-Liniengitters nach erfolgter Ionenimplantation	47
4.2	Übersicht über die verwendeten Substratmodifikationen	47
4.3	XPS-Spektren der Substratmodifikationen	51
4.4	Strom-Spannungs-, Kapazitäts-Spannungs- und $1/C^2$ -Spannungs-Verlauf der oberflächennah durchgängig mit Phosphor ionenimplantierten Modifikation	54
4.5	Mit SRIM simulierte Konzentrations-Tiefenverteilung von Phosphor im Siliziumwafer	55
4.6	Kapazitäts-Spannungs-Verläufe der Substratmodifikationen mit erhaltener nativer Oxidschicht	56
4.7	Das zweidimensionale Dotierprofil des Dotiergitters	57
4.8	Numerische Berechnung der Elektrostatik des Dotier-Liniengitters .	58
4.9	Topografie und elektrische Oberflächeneigenschaften des Dotier-Liniengitters	59
4.10	Korrelation zwischen Oberflächenpotential und Zeta-Potential . . .	61
4.11	Korrelation zwischen Oberflächenpotential und Kontaktwinkeln für verschieden Testflüssigkeiten	62
4.12	Abhängigkeit der Oberflächenenergie vom Oberflächenpotential . .	63
4.13	Exemplarische Kraft-Abstands-Kurven	64
4.14	Kräfte zwischen Cantilever-Spitze und den Substratmodifikationen .	65
4.15	Mittels Kraftspektroskopie gemessene Topografie und Kraftkarte des Dotier-Liniengitters	66
4.16	Lokal variierende Adhäsionskraft zwischen Cantilever-Spitze und Substrat auf dem Dotier-Liniengitter	66

4.17	Boxplot der adsorbierten Menge Fibronectin auf den Substraten aus verschiedenen Lösungen nach 60 min Inkubation	71
4.18	LSM-Aufnahmen von PKH26-gefärbten MG-63-Osteoblasten auf den elektronisch modifizierten Substraten nach 60 min Kultur in DMEM ohne Zusätze und in DMEM unter Zugabe von FKS	72
4.19	Boxplots der Zelladhäsion auf den Substratmodifikationen nach 60 min Kultivierung in serumfreiem Medium und Medium unter Zugabe von fetalem Kälberserum	72
4.20	Boxplots der Zelladhäsion nach 60 min Kultivierung in serumfreiem Medium auf mit Fibronectin und FKS präinkubierten Substraten .	73
4.21	Boxplot der Zelladhäsion auf den Substraten nach 60 min Kultivierung in DMEM unter Zugabe von Serumalbumin	74
4.22	Morphologie der MG-63-Osteoblasten auf den Substraten nach 24 h Kultivierung in DMEM ohne Zusatz von FKS	75
4.23	Histogramm der Zellorientierung auf dem Dotier-Liniengitter und dem Wafer-Ausgangsmaterial nach der Kultivierung in serumfreiem Medium	75
4.24	Morphologie der MG-63-Osteoblasten auf dem Dotier-Liniengitter nach 24 h Kultivierung in DMEM ohne Zusatz von FKS (vorherige Inkubation mit einer Fibronectinlösung)	76
4.25	Histogramm der Zellorientierung auf dem Dotier-Liniengitter nach 24 h Kultivierung und vorheriger Inkubation des Substrats mit einer Fibronectinlösung	76
4.26	Vergleich der Topografien des unbeschichteten und des mit einer 2 nm dicken Platinschicht versehenen Dotiergitters	77
4.27	Histogramm der Zellorientierung auf einem platinbeschichteten Dotier-Liniengitter nach 24 h Kultivierung in serumfreiem Medium .	77

Tabellenverzeichnis

3.1	Verwendete Parameter für die FEM-Elektrostatikberechnungen einer nanostrukturierten Titan-Elektrolyt-Grenzfläche.	39
4.1	Oberflächenspannungen der Testflüssigkeiten für die Kontaktwinkel-messung.	50
4.2	Chemische Charakterisierung der Modellsubstratoberflächen.	52
4.3	Topografische und elektrische Oberflächeneigenschaften der Modell-substrate.	59
4.4	Kontaktwinkel auf den Modellsubstraten und die daraus berechneten Oberflächenenergien.	62

Literaturverzeichnis

- [1] LANGE, R. ; LÜTHEN, F. ; BECK, U. ; RYCHLY, J. ; BAUMANN, A. ; NEBE, B.: Cell-extracellular matrix interaction and physico-chemical characteristics of titanium surfaces depend on the roughness of the material. In: *Biomolecular Engineering* 19 (2002), Nr. 2–6, S. 255–261
- [2] LORD, M. S. ; FOSS, M. ; BESENBACHER, F.: Influence of nanoscale surface topography on protein adsorption and cellular response. In: *Nano Today* 5 (2010), Nr. 1, S. 66–78
- [3] THULL, R.: Physicochemical principles of tissue material interactions. In: *Biomolecular Engineering* 19 (2002), Nr. 2, S. 43–50
- [4] EWALD, A. ; ELTER, P. ; THULL, R.: Protein and Cell Adhesion Mechanisms. In: BREME, J. (Hrsg.) ; THULL, R. (Hrsg.) ; KIRKPATRICK, C. J. (Hrsg.): *Metallic biomaterial interfaces*. Weinheim, Germany : Wiley-VCH, 2008, S. 173–178
- [5] THEVENOT, P. ; HU, W. ; TANG, L.: Surface Chemistry Influences Implant Biocompatibility. In: *Current Topics in Medicinal Chemistry* 8 (2008), Nr. 4, S. 270–280
- [6] SCHLIEPHAKE, H. ; SCHARNWEBER, D.: Chemical and biological functionalization of titanium for dental implants. In: *Journal of Materials Chemistry* 18 (2008), Nr. 21, S. 2404
- [7] BRUNETTE, D. M. ; CHEHROUDI, B.: The Effects of the Surface Topography of Micromachined Titanium Substrata on Cell Behavior in Vitro and in Vivo. In: *Journal of Biomechanical Engineering* 121 (1999), Nr. 1, S. 49
- [8] BETTINGER, C. J. ; LANGER, R. ; BORENSTEIN, J. T.: Engineering Substrate Topography at the Micro- and Nanoscale to Control Cell Function. In: *Angewandte Chemie International Edition* 48 (2009), Nr. 30, S. 5406–5415
- [9] GRADINGER, R. ; GOLLWITZER, H.: *Ossäre Integration*. Heidelberg : Springer Medizin Verlag, 2006

- [10] HAYES, J. S. ; VOS, D. I. ; HAHN, J. ; PEARCE, S. G. ; RICHARDS, R. G.: An in vivo evaluation of surface polishing of TAN intermedullary nails for ease of removal. In: *Eur Cell Mater* 18 (2009), S. 15–26
- [11] ELTER, P.: *Mikro- und nanostrukturierte Biomaterial-Grenzflächen: Über den Einfluss der Topographie auf das angrenzende Biosystem*. Rostock, Universität Rostock, Habilitationsschrift, 2012
- [12] WEISS, P.: Cell Contact. In: *International Review of Cytology* 7 (1958), S. 391–423
- [13] MARTINEZ, E. ; ENGEL, E. ; PLANELL, J. A. ; SAMITIER, J.: Effects of artificial micro- and nano-structured surfaces on cell behaviour. In: *Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger* 191 (2009), Nr. 1, S. 126–135
- [14] ELTER, P. ; WEIHE, T. ; LANGE, R. ; GIMSA, J. ; BECK, U.: The influence of topographic microstructures on the initial adhesion of L929 fibroblasts studied by single-cell force spectroscopy. In: *European Biophysics Journal* 40 (2011), Nr. 3, S. 317–327
- [15] FLEMMING, R. G. ; MURPHY, C. J. ; ABRAMS, G. A. ; GOODMAN, S. L. ; NEALEY, P. F.: Effects of synthetic micro- and nano-structured surfaces on cell behavior. In: *Biomaterials* 20 (1999), Nr. 6, S. 573–588
- [16] DALBY, M. J. ; CHILDS, S. ; RIEHLE, M. O. ; JOHNSTONE ; H.J.H. ; AFFROSSMAN, S. ; CURTIS, A. S. G.: Fibroblast reaction to island topography: changes in cytoskeleton and morphology with time. In: *Biomaterials* 24 (2003), Nr. 6, S. 927–935
- [17] MATSCHEGEWSKI, C. ; STAEHLKE, S. ; LOEFFLER, R. ; LANGE, R. ; CHAI, F. ; KERN, D. P. ; BECK, U. ; NEBE, B. J.: Cell architecture–cell function dependencies on titanium arrays with regular geometry. In: *Biomaterials* 31 (2010), Nr. 22, S. 5729–5740
- [18] STAEHLKE, S. ; KOERTGE, A. ; NEBE, B.: Intracellular calcium dynamics dependent on defined microtopographical features of titanium. In: *Biomaterials* 46 (2015), S. 48–57
- [19] GALLI, C. ; COEN, M. C. ; HAUERT, R. ; KATANAEV, V. L. ; WYMANN, M. P. ; GRÖNING, P. ; SCHLAPBACH, L.: Protein adsorption on topographically

- nanostructured titanium. In: *Surface Science* 474 (2001), Nr. 1-3, S. L180–L184
- [20] DENIS, F. A. ; HANARP, P. ; SUTHERLAND, D. S. ; GOLD, J. ; MUSTIN, C. ; ROUXHET, P. G. ; DUFRÊNE, Y. F.: Protein Adsorption on Model Surfaces with Controlled Nanotopography and Chemistry. In: *Langmuir* 18 (2002), Nr. 3, S. 819–828
- [21] GONZÁLEZ-GARCÍA, C. ; SOUSA, S. R. ; MORATAL, D. ; RICO, P. ; SALMERÓN-SÁNCHEZ, M.: Effect of nanoscale topography on fibronectin adsorption, focal adhesion size and matrix organisation. In: *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 77 (2010), Nr. 2, S. 181–190
- [22] ELTER, P. ; LANGE, R. ; BECK, U.: Atomic force microscopy studies of the influence of convex and concave nanostructures on the adsorption of fibronectin. In: *Colloids and surfaces* 89 (2012), Nr. 1, S. 139–146
- [23] KHANG, D. ; LU, J. ; YAO, C. ; HABERSTROH, K.M. ; WEBSTER, T.J.: The role of nanometer and sub-micron surface features on vascular and bone cell adhesion on titanium. In: *Biomaterials* 29 (2008), Nr. 8, S. 970–983
- [24] ELTER, P. ; WEIHE, T. ; BÜHLER, S. ; GIMSA, J. ; BECK, U.: Low fibronectin concentration overcompensates for reduced initial fibroblasts adhesion to a nanoscale topography: Single-cell force spectroscopy. In: *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 95 (2012), S. 82–89
- [25] PETRIE, T. A. ; GARCIA, A. J.: Extracellular Matrix-Derived Ligands for Selective Integrin Bindung to Control Cell Function. In: PULEO, D. A. (Hrsg.) ; BIZIOS, R. (Hrsg.): *Biological interactions on materials surfaces*. Dordrecht and New York : Springer, 2009, S. 133–156
- [26] A. BARROUG AU J. LEMAITRE ; ROUXHET, P. G.: Lysozyme on apatites: A model of protein adsorption controlled by electrostatic interactions. In: *Colloids and surfaces* 37 (1989), S. 339–355
- [27] NORDE, W.: Driving forces for protein adsorption at solid surfaces. In: *Macromolecular Symposia* 103 (1996), Nr. 1, S. 5–18
- [28] PATIL, S. ; SANDBERG, A. ; HECKERT, E. ; SELF, W. ; SEAL, S.: Protein adsorption and cellular uptake of cerium oxide nanoparticles as a function of zeta potential. In: *Biomaterials* 28 (2007), Nr. 31, S. 4600–4607

- [29] CAI, K. ; FRANT, M. ; BOSSERT, J. ; HILDEBRAND, G. ; LIEFEITH, K. ; JANDT, K. D.: Surface functionalized titanium thin films: Zeta-potential, protein adsorption and cell proliferation. In: *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 50 (2006), Nr. 1, S. 1–8
- [30] HODA, N. ; KUMAR, S.: Brownian dynamics simulations of polyelectrolyte adsorption onto topographically patterned surfaces. In: *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* 23 (2007), Nr. 23, S. 11747–11760
- [31] ELTER, P. ; THULL, R.: Computer Simulations: Modeling of Protein Adsorption on Nanostructured Metallic Surfaces. In: BREME, J. (Hrsg.) ; THULL, R. (Hrsg.) ; KIRKPATRICK, C. J. (Hrsg.): *Metallic biomaterial interfaces*. Weinheim, Germany : Wiley-VCH, 2008, S. 163–169
- [32] ELTER, P. ; LANGE, R. ; THULL, R. ; BECK, U.: Protein Adsorption on Topographically Structured Surfaces: A Mesoscopic Computer Simulation for the Prediction of Preferred Adsorption Sites. In: *Materials Science Forum* 638-642 (2010), S. 542–547
- [33] GONGADZE, E. ; KABASO, D. ; BAUER, S. ; SLIVNIK, T. ; SCHMUKI, P. ; VAN RIENEN, U. ; IGLIČ, A.: Adhesion of osteoblasts to a nanorough titanium implant surface. In: *International Journal of Nanomedicine* 6 (2011), S. 1801–1816
- [34] ELTER, P. ; LANGE, R. ; BECK, U.: Electrostatic and dispersion interactions during protein adsorption on topographic nanostructures. In: *Langmuir* 27 (2011), Nr. 14, S. 8767–8775
- [35] WILLIAMS, D. F.: On the nature of biomaterials. In: *Biomaterials* 30 (2009), Nr. 30, S. 5897–5909
- [36] WINTERMANTEL, E. ; SHAH-DERLER, B. ; BRUININK, A. ; PETITMERMET, M. ; BLUM, J. ; HA, S. W.: Biokompatibilität. In: WINTERMANTEL, E. (Hrsg.) ; HA, S. W. (Hrsg.): *Medizintechnik*. Berlin, Heidelberg : Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2009, S. 67–104
- [37] WILLIAMS, D. F.: On the mechanisms of biocompatibility. In: *Biomaterials* 29 (2008), Nr. 20, S. 2941–2953
- [38] ISRAELACHVILI, J. N.: *Intermolecular and surface forces*. 3. Burlington, MA : Academic Press, 2011

- [39] WERNER, C. ; KÖRBER, H. ; ZIMMERMANN, R. ; DUKHIN, S. ; JACOBASCH, H.-J.: Extended Electrokinetic Characterization of Flat Solid Surfaces. In: *Journal of Colloid and Interface Science* 208 (1998), Nr. 1, S. 329–346
- [40] STERN, O.: Zur Theorie der elektrolytischen Doppelschicht. In: *Zeitschrift für Elektrochemie und angewandte physikalische Chemie* 30 (1924), Nr. 21-22, S. 508–516
- [41] GOUY, M.: *Sur la constitution de la charge électrique à la surface d'un électrolyte*. 1910
- [42] CHAPMAN, D. L.: LI. A contribution to the theory of electrocapillarity. In: *Philosophical Magazine Series 6* 25 (1913), Nr. 148, S. 475–481
- [43] FOGOLARI, F. ; BRIGO, A. ; MOLINARI, H.: The Poisson-Boltzmann equation for biomolecular electrostatics: a tool for structural biology. In: *Journal of molecular recognition : JMR* 15 (2002), Nr. 6, S. 377–392
- [44] SCHMICKLER, W.: *Grundlagen der Elektrochemie*. Braunschweig and Wiesbaden : Vieweg, 1996
- [45] VAN OSS, C. J. ; CHAUDHURY, M. K. ; GOOD, R. J.: Interfacial Lifshitz-van der Waals and polar interactions in macroscopic systems. In: *Chemical Reviews* 88 (1988), Nr. 6, S. 927–941
- [46] DERJAGUIN, B. V. ; LANDAU, L.: The theory of stability of highly charged lyophobic sols and coalescence of highly charged particles in electrolyte solutions. In: *Acta Physicochim. URSS* 14 (1941), S. 633–652
- [47] VERWEY, E. J. W ; OVERBEEK, J. T. G: *Theory of the stability of lyophobic colloids*. New York : Elsevier, 1948
- [48] TENGVALL, P. ; LUNDSTRÖM, I.: Physico-chemical considerations of titanium as a biomaterial. In: *Clinical Materials* 9 (1992), Nr. 2, S. 115–134
- [49] SCHMIDT, D. R. ; WALDECK, H. ; KAO, W. J.: Protein Adsorption to Biomaterials. In: PULEO, D. A. (Hrsg.) ; BIZIOS, R. (Hrsg.): *Biological interactions on materials surfaces*. Dordrecht and New York : Springer, 2009, S. 1–18
- [50] NORDE, W. ; LYKLEMA, J.: Why proteins prefer interfaces. In: *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* 2 (1991), Nr. 3, S. 183–202

- [51] ANDRADE, J. D. ; HLADY, V.: Plasma Protein Adsorption: The Big Twelve. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 516 (1987), Nr. 1 Blood in Cont, S. 158–172
- [52] LEONARD, E. F. ; VROMAN, L.: Is the Vroman effect of importance in the interaction of blood with artificial materials? In: *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* 3 (1992), Nr. 1, S. 95–107
- [53] AYAD, S. ; BOOT-HANDFORD, R. ; HUMPHRIES, M. ; KADLER, K. E. ; SHUTTLEWORTH, C. A.: *The Extracellular Matrix Factsbook*. 2. Burlington, MA : Elsevier, 1998
- [54] JOHANSSON, S. ; SVINENG, G. ; WENNERBERG, K. ; ARMULIK, A. ; LOHIKANGAS, L.: Fibronectin-integrin interactions. In: *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 2 (1997), S. 126–146
- [55] AOTA, S. ; NOMIZU, M. ; YAMADA, K. M.: The short amino acid sequence Pro-His-Ser-Arg-Asn in human fibronectin enhances cell-adhesive function. In: *The Journal of biological chemistry* 269 (1994), Nr. 40, S. 24756–24761
- [56] POTTS, J. R. ; CAMPBELL, I. D.: Fibronectin structure and assembly. In: *Current Opinion in Cell Biology* 6 (1994), Nr. 5, S. 648–655
- [57] LU, H. H. ; POLLACK, S. R. ; DUCHEYNE, P.: 45S5 Bioactive glass surface charge variations and the formation of a surface calcium phosphate layer in a solution containing fibronectin. In: *Journal of biomedical materials research* 54 (2001), Nr. 3, S. 454–461
- [58] BODHAK, S. ; BOSE, S. ; BANDYOPADHYAY, A.: Influence of electro-thermal polarization on surface properties of hydroxyapatite. In: NARAYAN, R. (Hrsg.) ; BANDYOPADHYAY, A. (Hrsg.) ; BOSE, S. (Hrsg.): *Biomaterials Science: Processing, Properties, and Applications* Bd. 228. New York, NY : John Wiley & Sons, 2011, S. 125–134
- [59] RAO, S. S. ; WINTER, J. O.: Adhesion molecule-modified biomaterials for neural tissue engineering. In: *Frontiers in neuroengineering* 2 (2009)
- [60] STÄHLKE, S.: *Interaktionen von humanen Osteoblasten mit geometrisch strukturierten Implantatoberflächen: Zellarchitektur und Signaltransduktion*. Rostock, Universität Rostock, Diss., 2014

- [61] VAN ZEGHBROECK, B.: *Principles of semiconductor devices and heterojunctions*. Upper Saddle River, N.J. : Pearson Education, 2010
- [62] NICOLLIAN, E. H. ; BREWS, J. R.: *MOS (metal oxide semiconductor) physics and technology*. New York : Wiley, 1982
- [63] WATTS, J. F. ; WOLSTENHOLME, J.: *An introduction to surface analysis by XPS and AES*. Hoboken, NJ : Wiley-Interscience, 2005
- [64] ROSENWAKS, Y. ; SHIKLER, R.: Nanoscale Electronic Measurements of Semiconductors Using Kelvin Probe Force Microscopy. In: VILARINHO, Paula M. (Hrsg.) ; ROSENWAKS, Yossi (Hrsg.) ; KINGON, Angus (Hrsg.): *Scanning Probe Microscopy: Characterization, Nanofabrication and Device Application of Functional Materials* Bd. 186. Dordrecht : Kluwer Academic Publishers, 2005, S. 119–151
- [65] SHIKLER, R. ; MEODED, T. ; FRIED, N. ; MISHORI, B. ; ROSENWAKS, Y.: Two-dimensional surface band structure of operating light emitting devices. In: *Journal of Applied Physics* 86 (1999), Nr. 1, S. 107
- [66] MORRIS, V. J. ; KIRBY, A. R. ; GUNNING, A. P.: *Atomic force microscopy for biologists*. 2. London : Imperial College Press, 2010
- [67] BUTT, H-J ; JASCHKE, M.: Calculation of thermal noise in atomic force microscopy. In: *Nanotechnology* 6 (1995), Nr. 1, S. 1–7
- [68] JPK INSTRUMENTS ; JPK INSTRUMENTS (Hrsg.): *Summary Notes - Force spectroscopy measurements and processing*. Version: 2009. www.jpk.com
- [69] ALTANKOV, G. ; RICHAU, K. ; GROTH, Th.: The role of surface zeta potential and substratum chemistry for regulation of dermal fibroblasts interaction. In: *Materialwissenschaft und Werkstofftechnik* 34 (2003), Nr. 12, S. 1120–1128
- [70] ZIMMERMANN, R. ; DUKHIN, S. ; WERNER, C.: Electrokinetic Measurements Reveal Interfacial Charge at Polymer Films Caused by Simple Electrolyte Ions. In: *The Journal of Physical Chemistry B* 105 (2001), Nr. 36, S. 8544–8549
- [71] GENNES, P.-G. d. ; BROCHARD-WYART, F. ; QUÉRÉ, D.: *Capillarity and wetting phenomena: Drops, bubbles, pearls, waves*. New York : Springer, 2004

- [72] WENZEL, R. N.: RESISTANCE OF SOLID SURFACES TO WETTING BY WATER. In: *Industrial & Engineering Chemistry* 28 (1936), Nr. 8, S. 988–994
- [73] OWENS, D. K. ; WENDT, R. C.: Estimation of the surface free energy of polymers. In: *Journal of Applied Polymer Science* 13 (1969), Nr. 8, S. 1741–1747
- [74] KAELBLE, D. H.: Dispersion-Polar Surface Tension Properties of Organic Solids. In: *The Journal of Adhesion* 2 (1970), Nr. 2, S. 66–81
- [75] RABEL, W.: Einige Aspekte der Benetzungstheorie und ihre Anwendung auf die Untersuchung und Veränderung der Oberflächeneigenschaften von Polymeren. In: *Farbe und Lack* 77 (1971), Nr. 10, S. 997–1006
- [76] FOWKES, F. M.: Attractive Forces at Interfaces. In: *Ind. Eng. Chem.* 56 (1964), Nr. 12, S. 40–52
- [77] STORCH, W.: *Immunofluorescence in clinical immunology: A primer and atlas*. Basel : Birkhäuser Verlag, 2000
- [78] ACKERMANN, M. ; KAMPRAD, M.: Qualitätskontrolle der AC133-Depletion aus kryokonservierten mononukleären Zellen des Nabelschnurbluts. In: SACK, U. (Hrsg.): *Zelluläre Diagnostik*. Basel : Karger, 2007, S. 867–886
- [79] KILIC, M. ; BAZANT, M. ; AJDARI, A.: Steric effects in the dynamics of electrolytes at large applied voltages. I. Double-layer charging. In: *Physical Review E* 75 (2007), Nr. 2
- [80] HURLEN, T. ; HORNKJØL, S.: Anodic growth of passive films on titanium. In: *Electrochimica Acta* 36 (1991), Nr. 1, S. 189–195
- [81] TEXTOR, M. ; SITTIG, C. ; FRAUCHIGER, V. M. ; TOSATTI, S. ; BRUNETTE, D. M.: Properties and Biological Significance of Natural Oxide Films on Titanium and Its Alloys. In: BRUNETTE, D. M. (Hrsg.) ; TENGVALL, P. (Hrsg.) ; TEXTOR, M. (Hrsg.) ; THOMSEN, P. (Hrsg.): *Titanium in Medicine*. Berlin : Springer, 2001, S. 171–230
- [82] SCHARNWEBER, D. ; BEUTNER, R. ; RÖSSLER, S. ; WORCH, H.: Electrochemical behaviour of titanium based materials - are there relations to biocompatibility? In: *J. Mat. Sci.: Materials in Medicine* 13 (2002), S. 1215–1220

-
- [83] RÖSSLER, S. ; ZIMMERMANN, R. ; SCHARNWEBER, D. ; WERNER ; C. ; WORCH, H.: Characterization of oxide layers on Ti6Al4V and titanium by streaming potential and streaming current measurements. In: *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 26 (2002), Nr. 4, S. 387–395
- [84] GERISCHER, H.: The impact of semiconductors on the concepts of electrochemistry. In: *Electrochim. Acta* 35 (1990), Nr. 11/12, S. 1677–1699
- [85] KÖRTGE, A. ; ELTER, P. ; LANGE, R. ; BECK, U.: Simulation of the Electric Field Distribution Near a Topographically Nanostructured Titanium-Electrolyte Interface: Influence of the Passivation Layer. In: *Journal of Nanomaterials* 2013 (2013), Nr. 1, S. 1–9
- [86] YANG, Y. ; CAVIN, R. ; ONG, J. L.: Protein adsorption on titanium surfaces and their effect on osteoblast attachment. In: *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 67 (2003), Nr. 1, S. 344–349
- [87] EISENBARTH, E. ; VELTEN, D. ; MÜLLER, M. ; THULL, R. ; BREME, J.: Biocompatibility of β -stabilizing elements of titanium alloys. In: *Biomaterials* 25 (2004), Nr. 26, S. 5705–5713
- [88] HANAWA, T.: In vivo metallic biomaterials and surface modification. In: *Materials Science and Engineering: A* 267 (1999), Nr. 2, S. 260–266
- [89] RIDLEY, M. K. ; HACKLEY, V. A. ; MACHESKY, M. L.: Characterization and Surface-Reactivity of Nanocrystalline Anatase in Aqueous Solutions. In: *Langmuir* 22 (2006), Nr. 26, S. 10972–10982
- [90] FEHLNER, F.P ; MOTT, N.F: Low-temperature oxidation. In: *Oxidation of Metals* 2 (1970), Nr. 1, S. 59–99
- [91] STEINEMANN, S. G.: Titanium - the material of choice? In: *Periodontology* 2000 17 (1998), Nr. 1, S. 7–21
- [92] STOGRYN, A.: Equations for Calculating the Dielectric Constant of Saline Water (Correspondence). In: *IEEE Transactions on Microwave Theory and Techniques* 19 (1971), Nr. 8, S. 733–736
- [93] NIGHTINGALE, E. R.: Phenomenological theory of ion solvation. Effective radii of hydratbutlered ions. In: *Journal of Physical Chemistry* 63 (1959), Nr. 9, S. 1381–1387

- [94] TRASATTI, S.: Work function, electronegativity, and electrochemical behaviour of metals: III. Electrolytic hydrogen evolution in acid solutions. In: *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry* 39 (1972), Nr. 1, S. 163–184
- [95] BUTLER, M. A. ; GINLEY, D. S.: Prediction of Flatband Potentials at Semiconductor-Electrolyte Interfaces from Atomic Electronegativities. In: *Journal of The Electrochemical Society* 125 (1978), Nr. 2, S. 228
- [96] TANAKA, S.: Performance Simulation for Dye-Sensitized Solar Cells: Toward High Efficiency and Solid State. In: *Japanese Journal of Applied Physics* 40 (2001), Nr. Part 1, No. 1, S. 97–107
- [97] OBERHOLZER, M. R. ; WAGNER, N. J. ; LENHOFF, A. M.: Grand canonical Brownian dynamics simulation of colloidal adsorption. In: *The Journal of chemical physics* 107 (1997), S. 9157
- [98] BIRKHOLZ, M. ; ZAUMSEIL, P. ; BAUER, J. ; BOLZE, D. ; WEIDNER, G.: Small-angle reciprocal space mapping of surface relief gratings. In: *Materials science & engineering* 27 (2007), Nr. 5, S. 1154–1157
- [99] SCHMIDT, S. ; HORCH, K. ; NORMANN, R.: Biocompatibility of silicon-based electrode arrays implanted in feline cortical tissue. In: *Journal of biomedical materials research* 27 (1993), Nr. 11, S. 1393–1399
- [100] SANTOS, H. A.: *Porous silicon for biomedical applications*. Burlington, MA : Elsevier, 2014
- [101] LEE, T. C. ; HO, I. C.: Differential cytotoxic effects of arsenic on human and animal cells. In: *Environmental Health Perspectives* 102 (1994), Nr. 3, S. 101–105
- [102] ISO-NORM: *Implants for surgery -Hydroxyapatite- Part 2: Coatings for hydroxyapatite*. 2. 10/2008
- [103] BAUER, J. ; FURSENKO, O. ; VIRKO, S. ; KUCK, B. ; GRABOLLA, Th. ; MELNIK, V. ; MEHR, W. ; BEHRINGER, Uwe F. W.: Optimization of anti-reflective coatings for lithography applications. In: *Proc. SPIE 5835*, SPIE, 2005 (SPIE Proceedings), S. 263–272

- [104] STRÖM, G. ; FREDRIKSSON, M. ; STENIUS, P.: Contact angles, work of adhesion, and interfacial tensions at a dissolving Hydrocarbon surface. In: *Journal of Colloid and Interface Science* 119 (1987), Nr. 2, S. 352–361
- [105] SELL, P.-J.: Bestimmung des Benetzungsverhaltens von Pigmenten. In: *Angewandte Chemie* 83 (1971), Nr. 22, S. 932
- [106] SALOMAN, E. B. ; HUBBELL, J. H. ; SCOFIELD, J. H.: X-ray attenuation cross sections for energies 100 eV to 100 keV and elements $Z = 1$ to $Z = 92$. In: *Atomic Data and Nuclear Data Tables* 38 (1988), Nr. 1, S. 1–196
- [107] MOFFAT, T. P. ; LATANISION, R. M. ; RUF, R. R.: An X-ray photoelectron spectroscopy study of chromium-metalloid alloys—III. In: *Electrochimica Acta* 40 (1995), Nr. 11, S. 1723–1734
- [108] TANIGUCHI, M. ; SUGA, S. ; SEKI, M. ; SAKAMOTO, H. ; KANZAKI, H. ; AKAHAMA, Y. ; TERADA, S. ; ENDO, S. ; NARITA, S.: Valence band and core-level photoemission spectra of black phosphorus single crystals. In: *Solid State Communications* 45 (1983), Nr. 2, S. 59–61
- [109] DONLEY, M. S. ; BAER, D. R. ; STOEBE, T. G.: Nitrogen 1s charge referencing for Si₃N₄ and related compounds. In: *Surface and Interface Analysis* 11 (1988), Nr. 6-7, S. 335–340
- [110] EDGELL, M. J. ; BAER, D. R. ; CASTLE, J. E.: Biased referencing experiments for the XPS analysis of non-conducting materials. In: *Applied Surface Science* 26 (1986), Nr. 2, S. 129–149
- [111] BREITENSTEIN, O. ; RAKOTONIAINA, J. P. ; AL RIFAI, M. H. ; WERNER, M.: Shunt types in crystalline silicon solar cells. In: *Progress in Photovoltaics: Research and Applications* 12 (2004), Nr. 7, S. 529–538
- [112] ZIEGLER, J. F.: *SRIM*. <http://www.srim.org>. Version: 2013
- [113] RIMINI, E.: *Ion Implantation: Basics to Device Fabrication: Basics to Device Fabrication*. Springer US, 1995
- [114] RATZKE, M.: *Kraftmikroskopie als Werkzeug zur Charakterisierung elektrischer Oberflächeneigenschaften*. Cottbus, Brandenburgische Technische Universität Cottbus, Diss., 2012. <http://opus.kobv.de/btu/volltexte/2012/2444/>

- [115] BOUSSE, L. J. ; MOSTARSHED, S. ; HAFEMAN, D.: Combined measurement of surface potential and zeta potential at insulator/electrolyte interfaces. In: *Sensors and Actuators B: Chemical* 10 (1992), Nr. 1, S. 67–71
- [116] SPENCER, S. J. ; ANDREWS, G. T. ; DEACON, C. G.: Contact angle of ethanol–water solutions on crystalline and mesoporous silicon. In: *Semiconductor Science and Technology* 28 (2013), Nr. 5, S. 055011
- [117] BILLIAU, A. ; EDY, V. G. ; HEREMANS, H. ; VAN DAMME, J. ; DESMYTER, J. ; GEORGIADES, J. A. ; SOMER, P. d.: Human Interferon: Mass Production in a Newly Established Cell Line, MG-63. In: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 12 (1977), Nr. 1, S. 11–15
- [118] CZEKANSKA, E. M. ; STODDART, M. J. ; RALPHS, J. R. ; RICHARDS, R. G. ; HAYES, J. S.: A phenotypic comparison of osteoblast cell lines versus human primary osteoblasts for biomaterials testing. In: *Journal of biomedical materials research. Part A* 102 (2014), Nr. 8, S. 2636–2643
- [119] LINCKS, J. ; BOYAN, B. D. ; BLANCHARD, C. R. ; LOHMANN ; C.H. ; LIU, Y. ; COCHRAN, D. L. ; DEAN, D. D. ; SCHWARTZ, Z.: Response of MG63 osteoblast-like cells to titanium and titanium alloy is dependent on surface roughness and composition. In: *Biomaterials* 19 (1998), Nr. 23, S. 2219–2232
- [120] NEBE, J.G B. ; LUETHEN, Frank ; LANGE, Regina ; BECK, Ulrich: Cellular Activity and Biomaterial's Surface Topography. In: *Materials Science Forum* 539-543 (2007), S. 517–522
- [121] NEBE, J. G. B. ; LUETHEN, F. ; LANGE, R. ; BECK, U.: Interface interactions of osteoblasts with structured titanium and the correlation between physicochemical characteristics and cell biological parameters. In: *Macromolecular bioscience* 7 (2007), Nr. 5, S. 567–578
- [122] BURGESS, A. ; VIGNERON, S. ; BRIOUDES, E. ; LABBÉ, J.-C. ; LORCA, T. ; CASTRO, A.: Loss of human Greatwall results in G2 arrest and multiple mitotic defects due to deregulation of the cyclin B-Cdc2/PP2A balance. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (2010), Nr. 28, S. 12564–12569

- [123] FINKE, B. ; LUETHEN, F. ; SCHROEDER, K. ; MUELLER, P. D. ; BERGEMANN, C. ; FRANT, M. ; OHL, A. ; NEBE, J. B.: The effect of positively charged plasma polymerization on initial osteoblastic focal adhesion on titanium surfaces. In: *Biomaterials* 28 (2007), Nr. 30, S. 4521–4534
- [124] SADEWASSER, S. ; GLATZEL, Th. ; SHIKLER, R. ; ROSENWAKS, Y. ; LUX-STEINER, M. C.: Resolution of Kelvin probe force microscopy in ultrahigh vacuum: comparison of experiment and simulation. In: *5th International Conference on non-contact AFM in Montreal, Canada* 210 (2003), Nr. 1–2, S. 32–36
- [125] MAGONOV, S., ALEXANDER, J.: *Advanced Atomic Force Microscopy: Exploring Measurements of Local Electric Properties: Application Note*. 2008
- [126] KIKUKAWA, A. ; HOSAKA, S. ; IMURA, R.: Silicon pn junction imaging and characterizations using sensitivity enhanced Kelvin probe force microscopy. In: *Applied Physics Letters* 66 (1995), Nr. 25, S. 3510–3512
- [127] HODA, N. ; KUMAR, S.: Brownian Dynamics Simulations of Polyelectrolyte Adsorption onto Charged Patterned Surfaces. In: *Langmuir* 23 (2007), Nr. 4, S. 1741–1751
- [128] LEOPOLD, A.: *Neue Konzepte zur Reinigung von Siliciumoberflächen*. München, Technische Universität München, Diss., 2003
- [129] GOOD, R. J.: Contact angle, wetting, and adhesion: a critical review. In: *Journal of Adhesion Science and Technology* 6 (1992), Nr. 12, S. 1269–1302
- [130] COULSON, G. A.: *Valence*. London : Oxford University Press, 1961
- [131] UMEYAMA, H. ; MOROKUMA, K.: The origin of hydrogen bonding. An energy decomposition study. In: *Journal of the American Chemical Society* 99 (1977), Nr. 5, S. 1316–1332
- [132] ARONOV, D. ; ROSEN, R. ; RON, E. Z. ; ROSENMAN, G.: Tunable hydroxyapatite wettability: Effect on adhesion of biological molecules. In: *Process Biochemistry* 41 (2006), Nr. 12, S. 2367–2372
- [133] ARONOV, D. ; MOLOTSKII, M. ; ROSENMAN, G.: Charge-induced wettability modification. In: *Applied Physics Letters* 90 (2007), Nr. 10, S. 104104

- [134] ARONOV, D. ; MOLOTSKII, M. ; ROSENMAN, G.: Electron-induced wettability modification. In: *Physical Review B* 76 (2007), Nr. 3
- [135] NAKAO, A. ; SUZUKI, Y. ; IWAKI, M.: Water Wettability and Zeta-Potential of Polystyrene Surface Modified by Ne or Na Implantation. In: *Journal of Colloid and Interface Science* 197 (1998), Nr. 2, S. 257–262
- [136] HURWITZ, G. ; GUILLEN, G. R. ; HOEK, E. M. V.: Probing polyamide membrane surface charge, zeta potential, wettability, and hydrophilicity with contact angle measurements. In: *Journal of Membrane Science* 349 (2010), Nr. 1–2, S. 349–357
- [137] ISRAELACHVILI, J. N. ; ADAMS, G. E.: Measurement of forces between two mica surfaces in aqueous electrolyte solutions in the range 0–100 nm. In: *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 1: Physical Chemistry in Condensed Phases* 74 (1978), S. 975
- [138] LEE, M. H. ; BRASS, D. A. ; MORRIS, R. ; COMPOSTO, R. J. ; DUCHEYNE, P.: The effect of non-specific interactions on cellular adhesion using model surfaces. In: *Biomaterials* 26 (2005), Nr. 14, S. 1721–1730
- [139] FAUCHEUX, N. ; SCHWEISS, R. ; LÜTZOW, K. ; WERNER, C. ; GROTH, T.: Self-assembled monolayers with different terminating groups as model substrates for cell adhesion studies. In: *Biomaterials* 25 (2004), Nr. 14, S. 2721–2730
- [140] VAN KOOTEN, T. G. ; SCHAKENRAAD, J. M. ; H.C. VAN DER MEI ; BUSCHER, H. J.: Influence of substratum wettability on the strength of adhesion of human fibroblasts. In: *Biomaterials* 13 (1992), Nr. 13, S. 897–904
- [141] OHGAKI, M. ; KIZUKI, T. ; KATSURA, M. ; YAMASHITA, K.: Manipulation of selective cell adhesion and growth by surface charges of electrically polarized hydroxyapatite. In: *Journal of biomedical materials research* 57 (2001), Nr. 3, S. 366–373
- [142] BET, M. R. ; GOISSIS, G. ; VARGAS, S. ; ARAUJO, H. S.: Cell adhesion and cytotoxicity studies over polyanionic collagen surfaces with variable negative charge and wettability. In: *Biomaterials* 24 (2003), Nr. 1, S. 131–137

- [143] KIRBY, B. J. ; WHEELER, A. R. ; ZARE, R. N. ; FRUETEL, J. A. ; SHEPODD, T. J.: Programmable modification of cell adhesion and zeta potential in silica microchips. In: *Lab on a Chip* 3 (2003), Nr. 1, S. 5
- [144] BODHAK, S. ; BOSE, S. ; BANDYOPADHYAY, A.: Role of surface charge and wettability on early stage mineralization and bone cell–materials interactions of polarized hydroxyapatite. In: *Acta Biomaterialia* 5 (2009), Nr. 6, S. 2178–2188
- [145] DARGAHI, M. ; NELEA, V. ; MOUSA, A. ; OMANOVIC, S. ; KAARTINEN, M. T.: Electrochemical modulation of plasma fibronectin surface conformation enables filament formation and control of endothelial cell–surface interactions. In: *RSC Adv.* 4 (2014), Nr. 88, S. 47769–47780
- [146] MEADOWS, P. Y. ; BEMIS, J. E. ; WALKER, G. C.: Single-Molecule Force Spectroscopy of Isolated and Aggregated Fibronectin Proteins on Negatively Charged Surfaces in Aqueous Liquids. In: *Langmuir* 19 (2003), Nr. 23, S. 9566–9572
- [147] ARIMA, Y. ; IWATA, H.: Effect of wettability and surface functional groups on protein adsorption and cell adhesion using well-defined mixed self-assembled monolayers. In: *Biomaterials* 28 (2007), Nr. 20, S. 3074–3082
- [148] GRINNELL, F. ; FELD, M. K.: Fibronectin adsorption on hydrophilic and hydrophobic surfaces detected by antibody binding and analyzed during cell adhesion in serum-containing medium. In: *Journal of Biological Chemistry* 257 (1982), Nr. 9, S. 4888–4893
- [149] KRAJEWSKI, A. ; MALAVOLTI, R. ; PIANCASTELLI, A.: Albumin adhesion on some biological and non-biological glasses and connection with their Z-potentials. In: *Biomaterials* 17 (1996), Nr. 1, S. 53–60
- [150] FUKUZAKI, S. ; URANO, H. ; NAGATA, K.: Adsorption of bovine serum albumin onto metal oxide surfaces. In: *Journal of Fermentation and Bioengineering* 81 (1996), Nr. 2, S. 163–167
- [151] REZWAN, K. ; MEIER, L. P. ; GAUCKLER, L. J.: Lysozyme and bovine serum albumin adsorption on uncoated silica and AlOOH-coated silica particles: the influence of positively and negatively charged oxide surface coatings. In: *Biomaterials* 26 (2005), Nr. 21, S. 4351–4357

- [152] WERTZ, C. F. ; SANTORE, M. M.: Effect of Surface Hydrophobicity on Adsorption and Relaxation Kinetics of Albumin and Fibrinogen: Single-Species and Competitive Behavior. In: *Langmuir* 17 (2001), Nr. 10, S. 3006–3016
- [153] LOESBERG, W. A. ; TE RIET, J. ; VAN DELFT, F. C. M. J. M. ; SCHÖN, P. ; FIGDOR, C. G. ; SPELLER, S. ; VAN LOON, J. J. W. A. ; WALBOOMERS, X. F. ; JANSEN, J. A.: The threshold at which substrate nanogroove dimensions may influence broblast alignment and adhesion. In: *ScienceDirect* (2007), Nr. 28, S. 3944–3951
- [154] LAMERS, E. ; WALBOOMERS, X. F. ; DOMANSKI, M. ; TE RIET, J. ; VAN DELFT, F. C. M. J. M. ; LUTTGE, R. ; WINNUBST, L. A. J. A. ; GARDENIERS, H. J. G. E. ; JANSEN, J. A.: The influence of nanoscale grooved substrates on osteoblast behavior and extracellular matrix deposition. In: *Biomaterials* 31 (2010), Nr. 12, S. 3307–3316
- [155] RIDLEY, A. J. ; SCHWARTZ, M. A. ; BURRIDGE, K. ; FIRTEL, R. A. ; GINSBERG, M. H. ; BORISY, G. ; PARSONS, J. T. ; HORWITZ, A. R.: Cell migration: integrating signals from front to back. In: *Science (New York, N.Y.)* 302 (2003), Nr. 5651, S. 1704–1709
- [156] SCHWARZ, U. S. ; GARDEL, M. L.: United we stand: integrating the actin cytoskeleton and cell-matrix adhesions in cellular mechanotransduction. In: *Journal of cell science* 125 (2012), Nr. Pt 13, S. 3051–3060
- [157] ZHAO, M. ; AGIUS-FERNANDEZ, A. ; FORRESTER, J. V. ; MCCAIG, C. D.: Orientation and directed migration of cultured corneal epithelial cells in small electric fields are serum dependent. In: *Journal of cell science* 109 (1996), Nr. 6, S. 1405–1414
- [158] ONUMA, E. K. ; HUI, S.-W.: Electric field-directed cell shape changes, displacement, and cytoskeletal reorganization are calcium dependent. In: *The Journal of Cell Biology* 106 (1988), Nr. 6, S. 2067–2075
- [159] COOPER, M. S. ; KELLER, R. E.: Perpendicular orientation and directional migration of amphibian neural crest cells in dc electrical fields. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 81 (1984), Nr. 1, S. 160–164

- [160] McCAIG, C. D. ; DOVER, P. J.: Factors influencing perpendicular elongation of embryonic frog muscle cells in a small applied electric field. In: *Journal of cell science* 98 (1991), Nr. 4, S. 497–506
- [161] ZHAO, M.: Electrical fields in wound healing—An overriding signal that directs cell migration. In: *Seminars in Cell & Developmental Biology* 20 (2009), Nr. 6, S. 674–682
- [162] MESSERLI, M. A. ; GRAHAM, D. M.: Extracellular electrical fields direct wound healing and regeneration. In: *The Biological Bulletin* 221 (2011), Nr. 1, S. 79–92

Thesen zur Dissertation

1. Wird ein Implantat in Kontakt mit Körperflüssigkeiten und -gewebe gebracht, bildet sich eine Fest-Flüssig-Grenzfläche aus. Die aus der Flüssigkeit adsorbierte Proteinschicht vermittelt die Wechselwirkung zwischen Implantatoberfläche und Zellen. Die Biokompatibilität eines Implantats wird durch die Beschaffenheit dieser komplexen Grenzfläche aus biologischem Gewebe/Flüssigkeit und Festkörper bestimmt und entscheidet maßgeblich über Erfolg oder Misserfolg der Implantation.
2. Topografische Funktionalisierungen werden eingesetzt, um die Biokompatibilität von Implantaten zu regulieren. Es wird vermutet, dass topografische Nanostrukturen vorrangig auf die Proteinadsorption wirken, indem sie die Zusammensetzung und Struktur der adsorbierten Proteinschicht beeinflussen. Der genaue Wirkungsmechanismus der Topografie auf den Adsorptionsprozess ist weitgehend unbekannt. Es wird spekuliert, dass lokal erhöhte elektrische Feldstärken nahe Spitzen und Kanten eine modulierte Proteinadsorption zur Folge haben.
3. Entgegen der einfachen Modellannahme einer rein metallischen Oberfläche, die im direkten Kontakt mit dem Biosystem steht, bilden viele metallische Biomaterialien eine Passivierungsschicht aus, die die Verteilung des elektrischen Feldes nahe der Grenzfläche potentiell beeinflusst. Am Beispiel einer nanostrukturierten Titan-Elektrolyt-Grenzfläche wurde daher der Einfluss einer dünnen Passivierungsschicht auf das elektrische Feld mit Hilfe von FEM-Elektrostatikberechnungen überprüft. Die berechnete elektrische Feldstärke nahe dem konkav gewölbten Bereich der gewählten Modellstruktur ist im Vergleich zum konvexen Bereich erhöht. Diese lokal erhöhte elektrische Feldstärke liefert eine mögliche Erklärung für die in der Literatur diskutierten erhöhten Proteinmengen in den konkav gewölbten Bereichen topografischer Nanostrukturen.
4. Nahe topografisch strukturierten Biomaterialoberflächen treten neben lokal variierenden elektrischen Feldern ebenfalls lokal variierende Dispersionswechselwirkungen und geometrische Effekte auf. Um die Wirkung einer im Nanometerbereich variierenden elektrischen Feldstärke auf das Biosystem separat, ohne diese überlagerten Einflüsse, zu untersuchen, wurde ein Modellsubstrat aus Bor-dotiertem p-leitendem Silizium verwendet, in dessen Oberfläche 130 nm breite n^+ -leitende Streifen (Periode 260 nm) durch selektive Ionenimplantation von Phosphor eingebracht wurden.

5. Mittels Raster-Kelvin-Mikroskopie wurde gezeigt, dass durch die selektive Dotierung eine lokale Variation des Oberflächenpotentials von einigen 100 mV an Luft erzielt wurde. Aus Kraftspektroskopiemessungen in einer Elektrolytlösung mit physiologischer Salzkonzentration ging hervor, dass die Oberflächenpotentialvariation eine ebenso lokal variierende elektrostatische Kraft in Flüssigkeit zur Folge hatte.
6. FEM-Elektrostatikberechnungen der Dotier-Linienstruktur ergaben eine Variation der elektrischen Feldstärke, die in derselben Größenordnung lag wie jene an der topografischen Nanostruktur aus Titan. Zudem enthielt das elektrische Feld an den Übergängen zwischen den unterschiedlich geladenen p- und n⁺-dotierten Bereichen eine laterale Komponente, die senkrecht zur Richtung der Linienstruktur gerichtet war.
7. Zellen orientieren sich auf Oberflächen unter Einwirkung eines elektrischen Feldes senkrecht zur Richtung der Feldlinien. Die beobachtete bevorzugte Ausrichtung humaner MG-63-Osteoblasten entlang der unterschiedlich dotierten Linien nach 24-stündiger Kultivierung in serumfreiem Medium wurde auf dieses Phänomen zurückgeführt.
8. Neben der lokalen Variation des Oberflächenpotentials wurde im Vergleich zu zwei elektronisch homogenen Substratmodifikationen (das unbehandelte Wafer-Ausgangsmaterial und ein an der Oberfläche durchgängig mit Phosphor ionenimplantierter Wafer) eine starke Verschiebung des mittleren Oberflächenpotentials in negativer Richtung auf der elektronischen Nanostruktur beobachtet. Kapazitäts-Spannungs-Messungen deuteten darauf hin, dass die Potentialverschiebung durch eine an der Grenzfläche der nativen SiO₂-Schicht zum Silizium befindliche Oberflächenladung hervorgerufen wurde. Mit Hilfe von Kontaktwinkelmessungen wurde gezeigt, dass das stärker negative mittlere Oberflächenpotential des Dotier-Liniengitters zudem eine Erhöhung des polaren Anteils der Oberflächenenergie bewirkte, wohingegen deren dispersiver Anteil konstant blieb.
9. Nach einstündiger Kultivierung unter Anwesenheit von Serumproteinen im Kulturmedium (DMEM + 10% Fetales Kälberserum) war die Zelladhäsion auf der elektronischen nanostrukturierten Oberfläche im Vergleich zu den zwei elektronisch homogenen Substratmodifikationen erhöht. Ein ähnliches Ergebnis konnte durch Zugabe von Serumalbumin anstelle des fetalen Kälberserums in das Kulturmedium erzielt werden. Daher wird vermutet, dass die durch die Modellsubstrate modulierte Adsorption von Serumalbumin der unter den verwendeten Versuchsbedingungen dominante Faktor war, der die Zelladhäsion beeinflusste. Die modulierte Adsorption des Serumalbumins wurde auf die mittleren elektrischen/energetischen Oberflächeneigenschaften zurückgeführt.

Publikationsliste

1. Staehlke, S., **Koertge A.**, Nebe, B., *Intracellular calcium dynamics dependent on defined microtopographical features of titanium* (2015) *Biomaterials* 46, S.48-57.
2. Nebe, J. B., Finke, B., **Körtge, A.**, Rebl, H., Stähle, S., *Geometrical Micropillars Combined with Chemical Surface Modifications – Independency of Actin Filament Spatial Distribution in Primary Osteoblasts* (2014) *Material Science Forum* 783-786, S.1320-1325.
3. **Körtge, A.**, Elter, P., Lange, R., Beck, U., *Simulation of the Electric Field Distribution Near a Topographically Nanostructured Titanium-Electrolyte Interface: Influence of the Passivation Layer* (2013) *Journal of Nanomaterials* 2013, Article No. 50.
4. **Körtge, A.**, Stähle, S., Lange, R., Birkholz, M., Fraschke, M., Schulz, K., Nebe, B., Elter, P., *Alignment of MG-63 Osteoblasts on Fibronectin-coated Phosphorous Doping Lattices in Silicon* (2013) *World Academy of Science, Engineering and Technology* 73, S.801-804.
5. Stähle, S., Kunz, F., **Körtge, A.**, Matschegewski, C., Nebe, J. B., *Analyse der intrazellulären Kalzium-Mobilisierung in Osteoblasten auf definierter Mikrostruktur* (2013) *BioNanoMaterials* 14, S.81.
6. Lange, R., Löffler, R., Stähle, S., Elter, P., **Körtge, A.**, Nebe, J. B., Kern, D., Beck, U., *Electrochemical and scanning electron microscopic characterization of biomaterial surfaces with regular geometry dry etched in Titanium* (2012) 4th International Symposium Interface Biology of Implants (IBI), Rostock-Warnemünde, S.51.
7. **Körtge, A.**, Lembke, U., Lange, R., Stähle, S., Nebe, B., Neumann, H.-G., Beck, U., *Surface Analysis of Ti and TiO₂ Coatings Made by Gas Flow Sputtering* (2011) 24th European Conference on Biomaterials – Annual Conference of the European Society for Biomaterials, Dublin.

8. Lembke, U., **Körtge, A.**, Neumann, H.-G., Ortner, K., Jung, T., Lange, R., Beck, U., *Ti and TiO₂ Coatings for Implants with Defined Roughness*. In: Processing and Fabrication of Advanced Materials XIX; pp. 1464-1472; Ed.: D. Bhattacharyya, R.J.T. Lin, T.S. Srivatsan; Auckland, 2011; ISBN 978-0-473-18178-9.
9. Lembke, U., **Körtge, A.**, Neumann, H.-G., Ortner, K., Jung, T., Lange, R., Beck, U., *Coatings of Ti and TiO₂ with Defined Roughness for Implants by Gas Flow Sputtering* (2011) Material Science Forum 706-709, S. 443-448.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die mich unterstützt und direkt oder indirekt zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Patrick Elter und Herrn PD Dr. Ulrich Beck für die überaus interessante Aufgabenstellung, für die sehr gute fachliche Betreuung sowie für die stets konstruktive Begleitung während der Promotion.

Großer Dank gebührt Herrn Dr. Ulrich Lembke und Herrn Prof. Dr. Hans-Georg Neumann sowie Herrn Prof. Dr. Lienhard Pagel und Frau Dipl.-Ing. Regina Lange für ihre Unterstützung. Insbesondere danke ich ihnen dafür, dass sie mir in der entscheidenden Phase des Zusammenschreibens als engagierte Diskussionspartner zur Seite standen.

Der Firma IHP und ihren Mitarbeitern Herrn PD Dr. Mario Birkholz und Herrn Dipl.-Ing. Mirko Fraschke danke ich für die Bereitstellung der Modellsubstrate im Rahmen der Kooperation sowie für die stets kompetente und umfassende Unterstützung bei allen auftretenden Fragen.

Frau Prof. Dr. Barbara Nebe, Frau Prof. Dr. Ursula van Rienen und Herrn Prof. Dr. Jan Gimsa danke ich für die produktive Zusammenarbeit im Rahmen von *welisa* und Frau Dr. Susanne Stählke für die Zellkultivierungsarbeiten sowie für die Hilfe bei biologischen Untersuchungen.

Weiter bedanke ich mich bei

- Herrn Prof. Dr. Mathias Nowottnick und Herrn Prof. Dr. Dennis Hohlfeld dafür, dass ich meine Arbeit in Ruhe in gewohntem Arbeitsumfeld fertigstellen konnte,
- der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Finanzierung meiner Promotion im Rahmen eines Stipendiums,
- den ehemaligen Stipendiaten des Graduiertenkollegs *welisa* Herrn Dr. Christian Schmidt und Herrn Dr. Thomas Weihe für die Hilfe bei numerischen bzw. biologischen Fragestellungen,

- Frau Petra Gefken für die Hilfe bei der Verlängerung des Stipendiums,
- Herrn Dr. Markus Ratzke für die geduldige und kompetente Beantwortung meiner zahlreichen E-Mails,
- Herrn Dr. Gerald Kada von Keysight Technologies für die ergänzenden KPFM-Messungen,
- Herrn Patrick Gauthier von der Anton-Paar GmbH für die Zeta-Potential-Messungen,
- Herrn Dr. Achim Salamon aus dem Arbeitsbereich Zellbiologie der Universitätsmedizin Rostock für die hilfreichen Hinweise hinsichtlich der biologischen Statistik,
- den Mitarbeitern des Instituts für Gerätesysteme und Schaltungstechnik für die kollegiale Arbeitsatmosphäre.

Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die eingereichte Dissertation selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht genutzt und die den benutzten Werken entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Rostock, den 12. Mai 2015

Andreas Körtge