

Elektronenstrahlmodifizierung von diamantähnlichen  
Kohlenstoffschichten zur biofunktionalen  
Beschichtung von Implantatmaterialien

Von der Fakultät Maschinenwesen  
der  
Technischen Universität Dresden  
zur  
Erlangung des akademischen Grades  
Doktoringenieur (Dr.-Ing.)  
angenommene Dissertation

M. Sc. Gotzmann, Gaby

geb.am: 10. Juni 1985 in Zittau

Tag der Einreichung: 08.10.2017

Tag der Verteidigung: 16.01.2018

Gutachter: Prof. Dr.rer.medic. H. P. Wiesmann  
Prof. Dr.med. R. H. W. Funk

Vorsitzender der Promotionskommission: Prof. Dr.rer.nat.habil. C. Breitkopf

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	1
<b>2. Zielstellung</b> .....	2
<b>3. Grundlagen</b> .....	5
3.1. Diamantähnlicher Kohlenstoff – DLC .....	5
3.1.1. Abscheidung.....	6
3.1.2. Anwendungen .....	9
3.1.3. Modifizierung mittels ionisierender Strahlung.....	10
3.2. Elektronenstrahltechnologie.....	12
3.2.1. Strahlerzeugung und wichtige Prozessparameter.....	13
3.2.2. Strahlwirkung bei nicht-thermischer Anwendung.....	15
3.2.3. Anwendungen in der Medizintechnik .....	16
3.3. Wechselwirkung von Zellen mit Oberflächen.....	16
3.4. Implantate – Anwendungsbeispiel Hüftendoprothese.....	18
3.5. Formgedächtnislegierungen auf Nickel-Titan-Basis.....	20
3.5.1. Als Implantatmaterial.....	20
3.5.2. Beschichtung mit DLC.....	22
<b>4. Material und experimentelle Methoden</b> .....	24
4.1. Vorgehensweise und Probendefinition.....	24
4.2. Beschichtungssubstrate und Probengeometrie .....	26
4.3. Beschichtungsverfahren .....	27
4.4. Elektronenstrahlmodifizierung.....	28
4.5. Charakterisierung der Oberflächenmorphologie und mechanischer Parameter .....	29
4.5.1. Rasterelektronenmikroskopie.....	29
4.5.2. Weißlichtinterferometrie .....	29
4.5.3. Kalottenschliff.....	30
4.5.4. Rockwelltest.....	31
4.5.5. Tribometermessung.....	31
4.6. Chemisch/energetische Oberflächencharakterisierung .....	32
4.6.1. Raman-Spektroskopie .....	32
4.6.2. Photoelektronenspektroskopie.....	33
4.6.3. Kontaktwinkelmessung und Bestimmung der Oberflächenenergie .....	34
4.7. Stabilität der Beschichtung und der Modifizierung .....	35

4.7.1. Sterilisationsfestigkeit der DLC-Beschichtungen .....	36
4.7.2. Langzeitstabilität der Elektronenstrahl-Modifizierung .....	37
4.7.3. Widerstandsfähigkeit der Elektronenstrahl-Modifizierung.....	37
4.8. Strukturierung durch partielle Elektronenstrahl-Modifizierung.....	38
4.8.1. Grobstrukturierung und Nachweis über Benetzungsverhalten.....	38
4.8.2. Feinstrukturierung und Nachweis über Dosimetrie und Tropfenabrolltest.....	39
4.9. Biologische Analytik.....	40
4.9.1. Zellen und Zelllinien .....	41
4.9.2. Fluoreszenzfärbung .....	43
4.9.3. Resazurintest .....	44
4.9.4. Vitalfärbung mit Propidiumiodid .....	45
4.9.5. ELISA-Assay .....	46
4.9.6. Zellzyklusanalyse mit Propidiumiodid.....	46
4.9.7. Untersuchungen zur Proteinadhäsion.....	47
4.9.8. Bewertung der osteogenen Differenzierung.....	48
4.9.9. Untersuchungen zur Barrierewirkung .....	49
4.10. Statistik.....	49
<b>5. Ergebnisse</b> .....	<b>51</b>
5.1. Vergleich der Abscheidemethoden für DLC-Beschichtungen .....	51
5.1.1. Charakterisierung der verschiedenen DLC-Beschichtungen.....	51
5.1.2. Biokompatibilität der verschiedenen DLC-Beschichtungen.....	57
5.1.3. Elektronenstrahl-Modifizierung der verschiedenen DLC-Beschichtungen .....	61
5.2. Charakterisierung der Elektronenstrahl-Modifizierung von DLC-Beschichtungen.....	71
5.2.1. Dosisabhängigkeit.....	72
5.2.2. Variation der Expositionszeit und Elektronenmenge .....	75
5.2.3. Variation der Prozessatmosphäre .....	76
5.2.4. Strukturierung mittels Elektronenstrahl .....	79
5.2.5. Stabilität der Elektronenstrahlmodifizierung .....	84
5.3. Untersuchungen zur Biokompatibilität der modifizierten DLC-Beschichtungen .....	89
5.3.1. Zellzahl bei Modifizierung mit variierender Dosis .....	89
5.3.2. Zellvitalität, Apoptose und Nekrose.....	91
5.3.3. Interleukinausschüttung .....	92
5.3.4. Analyse der Zellzyklusphasen.....	93
5.3.5. Proteinadhäsion .....	95
5.4. Anwendungsbeispiel Hüftimplantat.....	97

5.4.1. Osteogene Differenzierung .....	97
5.4.2. Barrierewirkung bei indirektem und direktem Kontakt .....	99
<b>6. Diskussion .....</b>	<b>104</b>
6.1. Auswahl einer Methode zur DLC-Abscheidung .....	104
6.2. Elektronenstrahl-Modifizierung von DLC-Beschichtungen .....	113
6.2.1. Kenngrößen und Wirkmechanismen .....	113
6.2.2. Partielle Modifizierung und Strukturierung .....	120
6.2.3. Stabilität der Elektronenstrahl-Modifizierung.....	122
6.3. DLC-Beschichtungen im Kontakt mit Zellen .....	125
6.3.1. Einfluss der Elektronenstrahl-Modifizierung auf die Zelladhäsion .....	125
6.3.2. Osteogene Differenzierung auf DLC-Beschichtungen.....	136
6.4. Barriereigenschaften der DLC-Beschichtung.....	138
<b>7. Zusammenfassung und Reflexion der Ergebnisse auf das Anwendungsbeispiel Hüftendo- prothese mit FGL-Aktor .....</b>	<b>142</b>
<b>8. Ausblick .....</b>	<b>147</b>
Danksagung.....	149
Eigenständigkeitserklärung .....	151
Abbildungsverzeichnis .....	152
Tabellenverzeichnis.....	154
Abkürzungen und Symbole.....	155
Einheiten .....	157
Literatur.....	158



## 1. Einleitung

Die Funktionalisierung von Oberflächen für medizinische Anwendungen steht seit Langem im Fokus zahlreicher Forschungsarbeiten [1,2]. Grundlegend wird dabei in zwei Kategorien unterschieden: chemische Funktionalisierungen und morphologische Funktionalisierungen. Morphologische Veränderungen zielen dabei meist auf eine Verbesserung hinsichtlich Reib-Gleiteigenschaften oder beispielsweise einer besseren Kraftübertragung zwischen Implantat und Gewebe ab [3,4]. Auch eine richtungsdirektionierende Funktion kann damit realisiert werden [3,5,6]. Hingegen dienen die Funktionalisierungen auf chemischer Ebene vor allem einer gezielten Beeinflussung der Zell-Material-Interaktion, um zum Beispiel die Einheilung eines Implantates zu fördern oder Entzündungsreaktionen zu unterbinden [7]. Sowohl die Verbesserung der Zelladhäsion als auch das Unterbinden der Zellanhaftung können dafür gewünschte Eigenschaften darstellen [8–10]. Neben dem Beschichten von Oberflächen wird beispielsweise das Immobilisieren von Biomolekülen genutzt, um die Zell-Material-Interaktion zu beeinflussen [1,2,7,11]. Zur Veränderung von Oberflächenfunktionalitäten kommen unter anderem auch plasmabasierte Verfahren oder die Behandlung mit ionisierender Strahlung zum Einsatz [12–14]. Eine nachträgliche Oberflächenmodifizierung von Beschichtungen dient oft dem Erhalt der Bulkigenschaften wie Härte oder Elastizität. Veränderungen hinsichtlich der biologischen Interaktion beschränken sich dann ausschließlich auf den Randschichtbereich [14,15]. Komplexe Anwendungen mit unterschiedlichen Funktionsansprüchen können beispielsweise über die mehrstufige Modifizierung einer Oberfläche realisiert werden [16].

Neben zahlreichen Polymeren gehört auch diamantähnlicher Kohlenstoff (DLC) zu den Materialien, die intensiv für die Medizintechnik erforscht werden [17–20]. Aufgrund der sehr guten Reib-Gleiteigenschaften und der nachgewiesenen Biokompatibilität sind DLC-Schichten und deren Modifizierung in den letzten Jahren verstärkt in den Interessenfokus für biomedizinische Anwendungen gerückt [15,21,22].

## 2. Zielstellung

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Biofunktionalisierung von Schichten aus diamantähnlichem Kohlenstoff (DLC) durch die Behandlung mittels nicht-thermischem Elektronenstrahl (eBeam). Es stehen zunächst vier Abscheideverfahren für DLC-Beschichtungen zur Verfügung, welche in Kapitel 3.1.1 näher erläutert werden. Die Abscheideverfahren werden anhand der Kriterien Schichtstabilität und Biokompatibilität vergleichend untersucht. Als weiteres Bewertungskriterium wird die Möglichkeit zur Modifizierung mittels eBeam hinzugezogen. Basierend auf diesen Ergebnissen erfolgt die Eingrenzung auf eine Abscheidemethode. Anhand dieser Abscheidemethode soll die eBeam-Modifizierung der DLC-Beschichtungen charakterisiert, sowie der Einfluss verschiedener Prozessparameter untersucht werden. Erkenntnisse über das Zusammenspiel von direkter und indirekter Strahlwirkung sowie zur Veränderung der chemischen und morphologischen Oberflächeneigenschaften sind dabei zentrale Fragestellungen. Auch die partielle eBeam-Behandlung der Oberflächen soll untersucht werden, um die Möglichkeiten für eine Oberflächenstrukturierung abzuschätzen. Anschließend wird anhand ausgewählter zellbiologischer Methoden bewertet, welches Anwendungspotential sich für die eBeam-modifizierten DLC-Beschichtungen im Bereich der Medizintechnik eröffnet. Besonderer Fokus liegt dabei auf der gezielten Steuerung der Zelladhäsion durch die eBeam-Modifizierung sowie auf Aussagen zu den Ursachen der veränderten Zelladhäsion auf den modifizierten Schichten. Mit Hinblick auf das avisierte Einsatzfeld sollen weiterhin Erkenntnisse hinsichtlich möglicher zytotoxischer Effekte und Veränderungen in den Phasen des Zellzyklus sowie dem Inflammationspotential gewonnen werden.

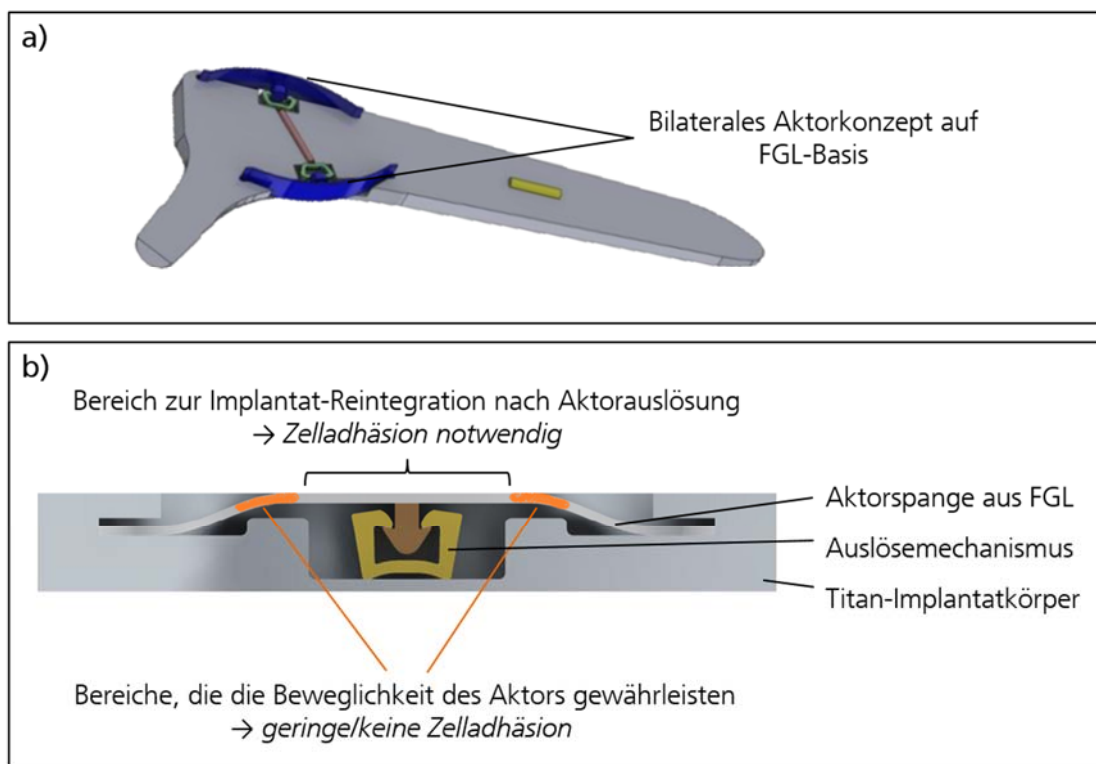
Für das Anwendungsgebiet der Medizintechnik sollen beispielhaft Aktoren aus einer Formgedächtnislegierung (FGL) herangezogen werden. Das Einsatzgebiet der Aktoren sind *intelligente*<sup>1</sup> Hüftendoprothesen, welche in der Lage sind sich bei einer Implantatlockerung durch die Verformung der Aktoren selbstständig im Knochen

---

<sup>1</sup> Die Thematik der intelligenten Implantate und das Anwendungsbeispiel werden in Kapitel 3.4 näher erläutert.

wieder zu verankern. Grundlage dafür ist die Formgedächtnisfunktion des verwendeten Aktormaterials. Da dieses Material aufgrund des hohen Nickelgehaltes ein beachtliches Risiko hinsichtlich allergischer und zytotoxischer Gewebsreaktionen birgt, besteht ein Ziel darin, durch die DLC-Beschichtung der Aktoren eine biokompatible Barriere aufzubringen. Anhand humaner mesenchymaler Stammzellen soll die Übertragbarkeit für den Bereich der Hüftimplantate bewertet werde. Die aus der Literatur bekannte Flexibilität der DLC-Beschichtungen ist dabei die Grundlage für eine uneingeschränkte Verformung der FGL-Aktoren bei gleichzeitig zuverlässiger Barrierewirkung.

In Abbildung 1 ist der funktionelle Aufbau der Hüftendoprothese mit bilateralem Aktorkonzept einschließlich der resultierenden Funktionsansprüche für den Aktor dargestellt.



**Abbildung 1: Funktioneller Aufbau des Hüftschafes einer intelligenten Hüftendoprothese**

Dargestellt ist der funktionelle Aufbau des Hüftschafes einer intelligenten Hüftendoprothese mit bilateralem Aktorkonzept [23]. a) Integrationsbereiche für die Aktoren mit bilateraler Anordnung im oberen Bereich des Hüftschafes. b) Darstellung eines Aktors im Querschnitt. Die Oberseite stellt die Körper-zugewandte Seite dar. Im unteren Bereich ist der Auslösemechanismus abgebildet. Orange gekennzeichnet sind die Bereiche, welche zur Wiederverankerung eines gelockerten Implantates die Beweglichkeit des Aktors gewährleisten müssen.



Im Anwendungsbeispiel ist das Aktorkonzept bilateral ausgelegt, um einen gleichmäßigen Lasteintrag im Falle einer Wiederverankerung zu gewährleisten (Abbildung 1 a). Grundlage für die Wiederverankerung stellen die Aktoren aus FGL dar (Abbildung 1 b). Auf den Aktoren ist die Steuerung der Zelladhäsion für eine uneingeschränkte Funktion des Aktors von besonderer Bedeutung. Daher gibt es Bereiche, in denen eine Zellbesiedlung möglichst gering gehalten werden sollen (orange). Es soll untersucht werden, inwiefern durch die Behandlung der DLC-Beschichtungen mittels eBeam eine partielle Modifizierung möglich ist, um darüber die Zelladhäsion gezielt zu beeinflussen.

Weiterhin sollen Aussagen getroffen werden, ob die Limitierungen derzeit genutzter Verfahren zur Steuerung der Zelladhäsion durch die Anwendung der eBeam-Technologie überwunden werden können. Eine zentrale Rolle spielen dabei die Schichtintegrität hinsichtlich Morphologie und Hybridisierungszustand sowie die Langzeitstabilität der Modifizierung.

### 3. Grundlagen

#### 3.1. Diamantähnlicher Kohlenstoff – DLC

Kohlenstoff ist eine Allotrop. Das bedeutet, dass die Anordnung der Kohlenstoffatome im festen Aggregatzustand in mehreren Modifikationen möglich ist. Dadurch können sich physikalische und chemische Eigenschaften des Materials grundlegend unterscheiden. Ursache dafür sind die möglichen Hybridisierungen des Kohlenstoffatoms. Die vier Außenelektronen des Kohlenstoffes sind in einem Elektronenpaar und zwei freien Elektronen organisiert, wodurch nur zwei Elektronen für Bindungen zur Verfügung stehen. Um die Oktett-Regel zu erfüllen, werden die Valenzelektronen reorganisiert. Das 2s- und die 2p-Orbitale verbinden sich zu Hybridorbitalen. Somit stehen insgesamt vier  $sp^3$ -Hybridorbitale für Bindungen zur Verfügung. Die räumliche Anordnung dieser Orbitale ist tetraedrisch und entspricht der Diamantkonfiguration. Die Graphitkonfiguration basiert im Gegensatz dazu auf reinen  $sp^2$ -hybridisierten Kohlenstoffatomen. Bei einer  $sp^2$ -Hybridisierung verbindet sich das s-Orbital mit zwei p-Orbitalen, es bleibt also ein p-Orbital im Ursprungszustand. Diese Konfiguration ist die Grundlage für Doppelbindungen. Eine Bindung wird durch die Überlappung der  $sp^2$ -Hybridorbitale (Sigma-Bindung) realisiert und die zweite durch die Überlappung der p-Orbitale (Pi-Bindung). Zusätzlich kann nach gleichem Prinzip auch eine  $sp$ -Hybridisierung des Kohlenstoffs vorliegen. Diese stellt die Grundlage für Dreifachbindungen dar, wobei die erste Bindung durch  $sp$ -Überlappung realisiert wird, die zweite und dritte Bindung hingegen durch die Überlappung der p-Orbitale. Ein ausführlicher Überblick zu Kohlenstoff und den verschiedenen Hybridisierungen findet sich in [24] und [25].

Die bekanntesten Allotrope des Kohlenstoffes sind Graphit und Diamant. Während Graphit ein dunkelgraues bis schwarzes Material mit guter elektrischer Leitfähigkeit und geringer Härte darstellt, gehört Diamant zu den härtesten natürlich vorkommenden Materialien und weist isolierende als auch Halbleitereigenschaften auf [26]. Seine hohe optische Transparenz macht ihn zu einem der wertvollsten und begehrtesten

Schmucksteine. Neben Diamant und Graphit kommen Kohlenstoffnanoröhren und Graphen eine hohe Bedeutung als Modifikationen des Kohlenstoffes zu [27–31]. Die vorliegende Arbeit befasst sich mit diamantähnlichen Kohlenstoffbeschichtungen (englisch: *Diamond Like Carbon*, DLC).

DLC-Beschichtungen vereinen die Eigenschaften von Graphit und Diamant, da die Kohlenstoffatome in mehreren Hybridisierungszuständen vorliegen. Die wichtigsten sind dabei  $sp^2$  und  $sp^3$ . Durch diese bilden sich verschiedene Bindungen zwischen den Kohlenstoffatomen aus und tragen durch ihre jeweiligen Charakteristika wie z. B. Bindungsstärke maßgeblich zu den Materialeigenschaften bei. Zusätzlich ist auch der Wasserstoffgehalt der Schichten ein wichtiger Parameter dafür. Dies führt zu einer Vielzahl von Eigenschaften, die je nach Stöchiometrie stark variieren können. Die Möglichkeit verschiedene Materialeigenschaften einzustellen begründet die Vielzahl der Anwendungsgebiete für DLC-Beschichtungen. Angefangen von der Raumfahrttechnik über die Mikroelektronik und Automobilindustrie bis hin zur Medizintechnik finden sich Anwendungen für DLC-Beschichtungen [22,32–35]. Auch zur Veredlung von Oberflächen in Form von Schmuckschichten werden DLC-Beschichtungen aufgrund ihrer guten Verschleißbeständigkeit genutzt [22]. Eine einheitliche Definition für DLC-Beschichtungen sowie deren zahlreiche Unterarten findet sich in der VDI-Richtlinie 2840: *Kohlenstoffschichten Grundlagen, Schichttypen und Eigenschaften* [24].

### 3.1.1. Abscheidung

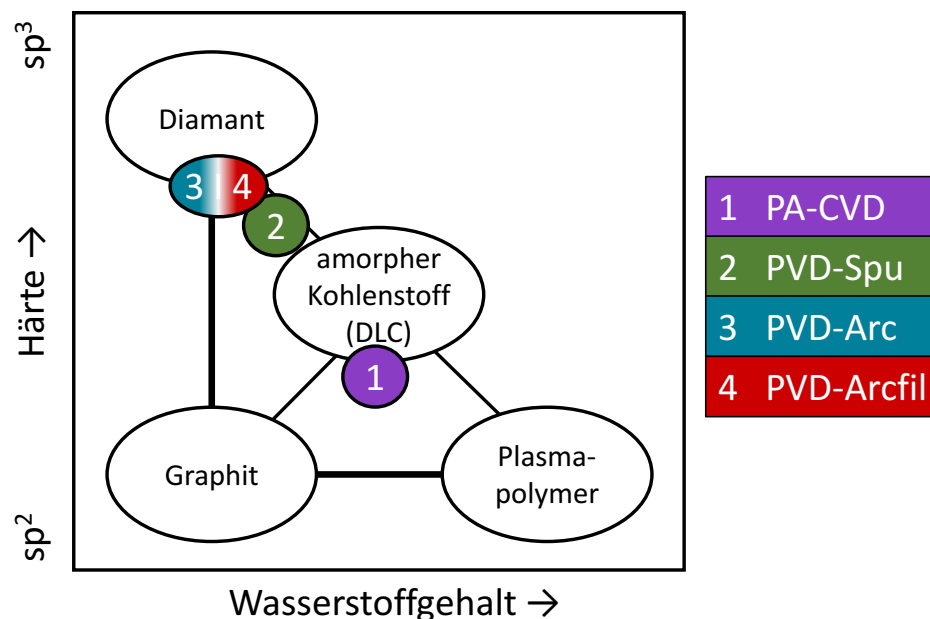
Bereits in den 1950er Jahren gelang es diamantartige Strukturen zu synthetisieren, was jedoch mit einem enormen Prozessaufwand (Temperatur, Druck) verbunden war [36]. In den 1980er Jahren war es erstmal möglich diamantartige Filme mit einer Abscheiderate von 1 nm/h abzuscheiden, da Prozessdruck und Temperaturen deutlich verringert werden konnten [36]. Heute stellen die plasmaaktivierte chemische Gasphasenabscheidung (PA-CVD), das Magnetronputtern und die Lichtbogenverdampfung die bedeutendsten Abscheideverfahren für DLC-Beschichtungen dar [37].

Der meistgenutzte Prozess zur Abscheidung dünner Schichten ist die vakuumbasierte Gasphasenabscheidung. Dabei wird das schichtbildende Material aus der Fest- oder Flüssigphase durch Energieeintrag in die Gasphase überführt und so auf einem Substrat kondensiert [38]. Alternativ liegt eine Ausgangsverbindung im gasförmigen Zustand vor und wird durch chemische Reaktion als Feststoff auf der Substratoberfläche abgeschieden. Daher wird prinzipiell zwischen physikalischer und chemischer Gasphasenabscheidung (PVD bzw. CVD) unterschieden.

Für die vorliegende Arbeit wurden zunächst vier verschiedene Abscheidemethoden zur Deposition von DLC-Beschichtungen genutzt. Zum einen wurden Verfahren der Sputterabscheidung genutzt. Dabei wird aus einem Festkörpertarget durch Teilchenbeschuss (Plasma) das abzuscheidende Schichtmaterial in die Gasphase überführt und kondensiert auf dem als Anode gepolten Beschichtungssubstrat. Eine Unterart des Sputterns ist das Magnetronsputtern (PVD-Spu). Hinter dem Target befindet sich ein Magnetfeld, wodurch hohe Ionisationsraten des Plasmas erreicht werden können. Eine andere Art des Sputterns ist das Lichtbogenverdampfen (PVD-Arc). Dabei wird das Targetmaterial mittels energiereichem Lichtbogen geschmolzen und verdampft. Da es bei dieser Abscheidemethode zu starker Partikelbildung kommt („Droplets“) kann das entstehende Plasma nochmals gefiltert werden (PVD-Arcfil) [39,40]. Neben den physikalischen Gasphasenverfahren wurde zum anderen auch die plasmaaktivierte CVD (PA-CVD) genutzt. Dieser Prozess findet *nicht* im Vakuum statt, da reaktionsträge Moleküle verwendet werden müssen, die durch Plasmaausbildung und chemische Reaktion an der Substratoberfläche die Schicht ausbilden. Dieses Verfahren eignet sich zur Beschichtung temperatursensibler Substrate [40].

Die mit den beschriebenen Verfahren abgeschiedenen DLC-Beschichtungen unterscheiden sich hinsichtlich ihrer  $sp^2$ - und  $sp^3$ -Bindungsanteile sowie des Wasserstoffgehalts. Eine Einteilung nach VDI 2840 [24] kann entsprechend der nachstehend Übersicht erfolgen (Abbildung 2). Dabei wird den mittels PA-CVD abgeschiedenen DLC-Beschichtungen ein verhältnismäßig hoher Wasserstoffgehalt zugeschrieben sowie im Vergleich zu den anderen Abscheidemethoden der geringste  $sp^3$ -Gehalt. DLC-Beschichtungen welche mittels PVD-Spu abgeschieden werden, weisen einen deutlich höheren  $sp^3$ -Gehalt auf, wohingegen ein geringerer

Wasserstoffgehalt vorliegt. Durch PVD-Arc und PVD-Arcfil Beschichtungen kann ein noch höherer  $sp^3$ -Gehalt erzielt werden, wobei die DLC-Beschichtungen dann wasserstofffrei vorliegen. PVD-Arc und PVD-Arcfil weisen hinsichtlich Wasserstoffgehalt und  $sp^2/sp^3$ -Verhältnis keine Unterschiede auf, da die Abscheidemethoden sich lediglich durch die Filterung des verdampften Targetmaterials unterscheiden.



**Abbildung 2: Einordnung der genutzten Abscheidungsverfahren für DLC-Beschichtungen**

Dargestellt ist die Einordnung der genutzten Abscheidungsverfahren für die verschiedenen DLC-Beschichtungen [41] in Anlehnung an die VDI-Richtlinie 2840 [23]. Mittels PA-CVD abgeschiedene Schichten (violett) weisen den höchsten Wasserstoffgehalt und den geringsten  $sp^3$ -Gehalt auf. Mittels PVD-Spu abgeschiedene DLC-Schichten (grün) weisen im Vergleich einen höheren  $sp^3$ -Gehalt bei verringertem Wasserstoffanteil auf. DLC-Schichten, die mittels PVD-Arc-Verfahren abgeschieden werden (blau und rot), weisen den höchsten  $sp^3$ -Gehalt sowie nahezu Wasserstofffreiheit auf. Diese beiden Verfahren (PVD-Arc und PVD-Arcfil) unterscheiden sich lediglich durch eine Filterung während der Abscheidung.

Die DLC-Beschichtung auf zahlreichen Substratmaterialien wird oft über die Integration einer haftvermittelnden Zwischenschicht realisiert [42,43]. Meist kommt dafür Si zum Einsatz [43–45], auch die Vorbehandlung der Oberfläche mittels Ionenimplantation [46] oder die Dotierung mit anderen Elementen kann dafür genutzt werden [47].

### 3.1.2. Anwendungen

Da DLC-Beschichtungen isolierende Eigenschaften wie Diamant aber auch Eigenschaften von metallischem Graphit aufweisen können, ist die Anwendung im Bereich der Mikroelektronik von steigendem Interesse [48]. Die negative Elektronenaffinität sowie das breite elektrochemische Potential tragen zur vermehrten Nutzung im elektrochemischen Bereich bei [33]. Durch die piezoresistiven Eigenschaften steigt dabei auch die Nutzung von DLC-Beschichtungen für die Mikrosensorik [49,50], wobei die temperaturabhängigen Eigenschaftsänderungen zu beachten sind [51]. Sowohl Beschichtungen von textilen Substraten zur Minderung der bakteriellen Kontamination als auch Anwendungen für medizintechnische Applikationen werden derzeit untersucht [52]. Neben den medizintechnischen Anwendungen werden DLC-Beschichtungen häufig zur Verbesserung der Reib-Gleiteigenschaften mechanischer Bauteile [53–59] sowie als Korrosionsschutzschicht eingesetzt [44,60].

Die vorzüglichen Reib-Gleiteigenschaften, sowie chemische Inertheit und gute Biokompatibilität stellen auch die Grundlage für den Einsatz von DLC-Beschichtungen in der Medizintechnik dar [61–64]. Instrumente der Minimalinvasiv-Chirurgie und auch Implantate werden immer häufiger mit DLC-Beschichtungen ausgestattet [15,65–67]. Im Vordergrund stehen dabei die Erhöhung der Lebensdauer sowie die Nutzung als biokompatible Barrierschicht, wodurch das Austreten unverträglicher Materialbestandteile sowie Korrosion unterbunden werden sollen [21,63,68–71]. Die Verbesserung der Hämokompatibilität wurde ebenfalls weitreichend untersucht und begründet den Einsatz von DLC-Beschichtungen im Bereich blutführender Systeme und Bauteile [15,21,72,73]. In diesem Zusammenhang gewinnt die Modifizierung und Funktionalisierung von DLC-Beschichtungen für biomedizinische Zwecke zunehmend an Bedeutung. Neben der Inkorporation verschiedener Dotierungselemente [15,47,67,70,74–77] wird beispielsweise die Oberflächenmodifizierung durch UV- oder Plasmabehandlung mit Hinblick auf eine gesteigerte Zelladhäsion meist durch Hydrophilierung der Oberflächen untersucht [13,75,78,79]. Auch die Anlagerung funktioneller Oberflächengruppen dient diesem Zweck [13,78,80,81]. Des Weiteren

werden Einsatzgebiete für antimikrobielle Anwendungen erforscht [15]. Dies erfolgt zum einen über die Dotierung mit antimikrobiell wirksamen Elementen wie Silber und Kupfer [82–86] und zum anderen über die antiadhäsiven Eigenschaften der DLC-Beschichtungen [79,87–89]. Da sowohl Instrumente als auch Implantate mit DLC-Schichten ausgestattet werden, variieren die Substratmaterialien von Polymeren über Textilien bis hin zu Metallen und Legierungen [69,72,90–94].

### 3.1.3. Modifizierung mittels ionisierender Strahlung

In Kapitel 3.1.2 wurde bereits auf die Modifizierung von DLC-Beschichtungen durch Dotierung und Anlagerung bestimmter Oberflächenfunktionalitäten eingegangen. In diesem Kapitel soll nun die Modifizierung mittels ionisierender Strahlung, zu der auch die niederenergetische Elektronenstrahltechnologie gehört, genauer betrachtet werden.

Avashti et al. untersuchten die Verringerung des Wasserstoffgehaltes durch Hochenergiebestrahlung (keV – MeV) von DLC-Schichten mittels Ionenstrahlen. Sie stellten fest, dass die Intensität der Bestrahlung in direktem Zusammenhang mit dem  $sp^2$ -Gehalt der behandelten DLC-Beschichtungen stand. Ziel dabei war eine Ionenimplantation in die Schichten. Vor allem die Behandlung mit Strahlung im keV-Bereich führte zur Ionenimplantation innerhalb der DLC-Beschichtung, wohingegen Strahlung im MeV-Bereich das unterliegende Substrat beeinflusste [36]. Auch Oates et al. untersuchten die Ionenimplantation auf DLC-Beschichtungen und belegten, dass es dabei zur  $sp^2$ -Umwandlung in der Schicht kommt [95]. Bereits zuvor wurde belegt, dass durch die Ionenimplantation entstehende Schichtdefekte eine kritische Dichte annehmen können, bei deren Überschreiten ebenfalls ein Graphitisierung der DLC-Schichten einsetzt, was primär vom Gesamtenergieeintrag abhängig ist [96].

Grigonis et al. untersuchten den Einfluss von Ionen- und Elektronenbestrahlung auf DLC-Beschichtungen. Sie zeigten, dass es durch Ionenbehandlung zu einer Graphitisierung der Schichten kommt. Bei Elektronenbehandlung wurden aufgrund der Materialaufheizung Spannungsdurchschläge beobachtet und der  $sp^3$ -Anteil wurde gesteigert. Die Behandlungen fanden unter Vakuum statt und die Beschichtungen wurden teilweise mit einer Deckschicht aus Siliziumdioxid versehen [97].

Aizawa et al. zeigten die Auswirkung von Elektronenstrahlen im „niedrigen Energiebereich“ auf DLC-Beschichtungen bei Behandlung im Vakuum. Dabei stellten sie fest, dass sich durch Elektronenbehandlung eine nanokolumnare Struktur in den DLC-Beschichtungen ausbildet. Weiterhin wurde die elastische Verformbarkeit der Schichten auf bis zu 10% gesteigert, wobei der Wasserstoffgehalt unverändert blieb [98].

Die Bestrahlung mit Elektronen im MeV-Bereich wurde ebenfalls im Zusammenhang mit der Veränderung interner Schichtspannungen von DLC-Beschichtungen untersucht [99]. Im Gegensatz zur oben genannten Behandlung von Aizawa et al. im „niedrigen Energiebereich“ nahm die Schichtspannung dabei durch Elektronenbestrahlung zu. Gleichzeitig wurde eine  $sp^2$ -Umwandlung und Veränderungen im Wasserstoffgehalt beobachtet, was in direktem Zusammenhang mit der inneren Schichtspannung zu stehen schien [99]. Auch Liu et al. und Chen et al. belegten die Graphitisierung von DLC-Beschichtungen bei Elektronenstrahlbehandlung unter Vakuum [100,101].

Die Graphitisierung von DLC-Beschichtungen in den o.g. Untersuchungen wird hauptsächlich auf einen thermischen Energieeintrag zurückgeführt. Die Umwandlungstemperatur für DLC-Schichten, bei der eine Graphitisierung einsetzt liegt zwischen 200 °C bis 300 °C [102]. Dabei ist der Wasserstoffgehalt einer DLC-Beschichtung hauptverantwortlich für die Intensität Umwandlung [103].

Auch die Röntgenstrahlen, welche während der Elektronenbehandlung emittiert werden [104] können zu Veränderungen der DLC-Beschichtung führen. So wurde beispielsweise die Umwandlung von  $sp^3$  zu  $sp^2$ -Bindungen beobachtet [105], was ebenfalls in direkten Zusammenhang mit dem Wasserstoffgehalt der Schichten gebracht wurde, damit ging eine Steigerung der optischen Transparenz einher [106].

Mikhailov et al. untersuchten die durch Beschuss mit  $\alpha$ -Teilchen verursachten Veränderungen an polykristallinen Diamantschichten. Auch dabei wurde mit Spannungen im MeV-Bereich gearbeitet. Es kam zur Ausbildung von DLC-artigen Strukturen im Hauptwirkungsbereich des Ionenstrahls. Im Randbereich des Einwirkungsfeldes kam es lediglich zu Veränderungen der C-C Bindungen. Als Ursache wird vor allem die Dislokation von Kohlenstoffatomen aufgrund des Energieeintrages diskutiert [107].



Wie beschrieben, finden die meisten Anwendungen zur Materialmodifizierung von DLC-Schichten mit Hochenergiestrahler (im MeV-Bereich) statt [36,107,108]. Anwendungen mit geringeren Beschleunigungsspannungen beschränken sich auf die Modifizierung unter Vakuum [109–113]. Im Rahmen der durchgeführten Literaturrecherche fanden sich keine Ergebnisse zur Modifizierung von DLC-Beschichtungen mit niederenergetischer Elektronenstrahlung an Atmosphäre. Somit stellt die in der vorliegenden Arbeit behandelte Thematik mit Hinblick auf die medizintechnisch orientierte Fragestellung einen Neuheitswert dar.

### 3.2. Elektronenstrahltechnologie

Elektronenstrahlen besitzen wie UV- und Röntgenstrahlung die Fähigkeit Elektronen aus Atomen und Molekülen zu entfernen, was zu einer Ionisation führt. Der Oberbegriff für diese Strahlungsarten ist daher ionisierende Strahlung. Ionisierende Strahlung kann natürlichen Ursprungs sein, so beispielsweise die radioaktive Strahlung. Natürlich vorkommende Elektronenstrahlung hingegen weist hinsichtlich ihrer charakteristischen Parameter keine praktische Relevanz auf. Daher muss sie für technische Anwendungen in Teilchenbeschleunigern künstlich erzeugt werden.

Zum Schmelzen und Verdampfen fand die eBeam-Technologie bereits zu Beginn des 20. Jahrhunderts erste technische Anwendungen. Jedoch war die Vakuumtechnik zu diesem Zeitpunkt noch nicht ausreichend entwickelt, um großtechnische Umsetzungen anzugehen. Erst die Entwicklung der Kern- und Raumfahrttechnik bildeten Mitte des 20. Jahrhunderts die nötigen Grundlagen, wodurch es zu einer intensiven Technologieentwicklung kam. Das Hauptaugenmerk lag zu dieser Zeit auf den thermischen Anwendungen, beispielsweise dem Schweißen, Schmelzen und Verdampfen. Die nicht-thermischen Anwendungen wie Mikrostrukturierung und chemische Kunststoffbearbeitung etablierten sich erst in den folgenden Jahrzehnten. Heute erstrecken sich die nicht-thermischen Anwendungen in viele Bereiche der Technik und Forschung bis in den Alltag. Vor allem die Vernetzung sowie die Oberflächenmodifizierung stehen im Fokus der aktuellen Forschungsarbeiten [114–116].

In der vorliegenden Arbeit soll für die Oberflächenmodifizierung die nicht-thermische Elektronenstrahltechnologie genutzt werden. In den folgenden Kapiteln wird diese näher betrachtet.

### 3.2.1. Strahlerzeugung und wichtige Prozessparameter

Die Erzeugung des Elektronenstrahls (eBeam) findet in sogenannten Elektronenkanonen statt. Dabei wird der Strahl im Vakuum beschleunigt und formiert. Die nicht-thermischen eBeam-Prozesse finden zumeist an Atmosphäre statt. Daher muss der Strahl durch ein Austrittsfenster an atmosphärische Umgebung überführt werden. Die Elektronen selbst werden in den meisten Fällen durch Glühemission aus einer Heizwendel (z. B. Wolfram oder Tantal) emittiert. Dabei kann ein Punktstrahl gebildet werden, welcher durch ein Scannersystem zum flächigen Strahl formiert wird. Alternativ erfolgt eine Bandemission, wodurch eine flächige Form des eBeams bereits gegeben ist. Umlenkung, Formierung und Beschleunigung des Strahls erfolgen über magnetische Linsen und Ablenssysteme.

Ein wichtiger Prozessparameter der eBeam-Technik ist die in Volt bemessene Beschleunigungsspannung. Sie ist maßgebend dafür, mit welcher Energie die Elektronen auf das Behandlungsgut auftreffen. Die Energie der Elektronen wird in Elektronenvolt angegeben. Erfährt ein Elektron im elektrischen Feld eine Beschleunigung, dann ändert sich seine kinetische Energie. Ein Volt Beschleunigungsspannung führt dabei zu einer Energiezunahme um ein Elektronenvolt. Das Elektronenvolt gehört nicht zu den SI-Einheiten, der Gebrauch ist jedoch zugelassen und die Umrechnung in Joule erfolgt mit dem Faktor  $1,6 \cdot 10^{-19}$ . Durch die kinetische Energie der Elektronen werden Intensität und Auswirkung der strahlenchemischen Effekte bestimmt. Bis zu einer Beschleunigungsspannung von 200 kV handelt es sich um eBeam-Anlagen des Niederspannungstyps. Eine Beschleunigungsspannung von 200 bis 600 kV entspricht dem Mittelspannungstyp und ab 600 kV wird von Hochspannungstypen gesprochen, wobei Spannungen bis zu 6 MV genutzt werden können. In der vorliegenden Arbeit wird mit einer Beschleunigungsspannung von 150 keV gearbeitet. Dadurch ergibt sich ein wesentlicher Vorteil der nicht-thermischen Elektronenstrahltechnologie im Vergleich zu

Elektronenstrahlprozessen, die im MeV-Bereich arbeiten, da der Temperatureintrag in das Probematerial in den meisten Anwendungsfällen vernachlässigbar gering gehalten werden kann.

Elektronenstrahlen können sich nur im Vakuum ungehindert ausbreiten. Für die nicht-thermischen Anwendungen unter Atmosphärendruck werden die erzeugten Elektronenstrahlen durch das sogenannte Lenard-Fenster in atmosphärische Umgebung überführt. Dort trifft der eBeam auf das Behandlungsgut. Tritt der Strahl durch das Lenard-Fenster und durchdringt bis zur Probenoberfläche eine gewisse Distanz an Luft, so kommt es zu Verlusten an Strahlenergie. Die Passage des Luftweges führt zudem zu einer leichten Streuung der Strahlen. Die Strahlausbreitung ist somit nicht mehr direkt linear sondern als gerichtete Elektronenwolke zu verstehen. Trifft der Elektronenstrahl auf die Probe, so wird die noch verbleibende Energie teilweise oder vollständig abgegeben. Die eingebrachte Energie wird als Dosis bezeichnet und in Gray (Gy) bzw. Kilogray (kGy) angegeben. Die Oberflächendosis kann mittels Pararosanilin-Film dosimeter gemessen werden. Dieses Dosimeter verfärbt sich dosisabhängig und wird photometrisch ausgewertet. Weitere Möglichkeiten sind die Auswertung von Alanintabletten mittels Elektronenspinresonanz oder die photometrische Quantifizierung durch andere strahlungssensitive Farbstoffe.

Die auf das Behandlungsgut eingebrachte Dosis lässt sich hauptsächlich durch die Expositionszeit im Strahl, den Abstand zum Strahlaustrittsfenster sowie die Elektronenmenge beeinflussen. Die pro Zeiteinheit eingetragene Dosis entspricht der Dosisrate. Entscheidend für die Eindringtiefe der Elektronenstrahlung in das Behandlungsgut ist die Beschleunigungsspannung. Strahlerzeuger des Niederspannungstyps können bei einer Materialdichte von  $1 \text{ g/cm}^3$  eine Eindringtiefe bis  $200 \mu\text{m}$  erreichen. Somit ist diese Art der eBeam-Behandlung eine Randschicht- bzw. Oberflächentechnologie. Sofern die Expositionszeit im Strahl nicht mehrere Minuten überschreitet, kommt es zu keiner signifikanten Erwärmung der Proben. Typische Expositionszeiten für diese Anwendung bewegen sich in der Größenordnung weniger Sekunden.

Weiterhin stellt die Prozessatmosphäre einen wesentlichen Behandlungsparameter dar. Wie bereits erwähnt findet die Behandlung an Atmosphärendruck statt. Die Atmosphäre selbst kann dabei aus Umgebungsluft, aber auch diversen anderen Gasen bestehen. Wichtig ist dieser Aspekt, da es während der Elektronenbehandlung zur Ionisation bzw. Radikalbildung in der umgebenden Atmosphäre kommt. Durch diesen reaktiven Prozess werden weitere chemische Prozesse, beispielsweise Bindungsbrüche oder die Neuausbildung von Bindungen an der Probenoberfläche hervorgerufen. In Abhängigkeit der Prozessparameter können durch reaktive Spezies auch ätzende Wirkungen erzielt werden. Einen detaillierten Überblick zu diesen und weiteren Möglichkeiten der Prozesssteuerung bietet das Standardwerk von Schiller, Heisig und Panzer. [104].

### 3.2.2. Strahlwirkung bei nicht-thermischer Anwendung

Wie bereits in Kapitel 3.2.1 erwähnt kommt es beim Auftreffen des eBeam auf Materie zu Wechselwirkungen. Die Elektronen geben ihre kinetische Energie sukzessive über Stoßprozesse ab. Atome und Moleküle werden in ihren Elektronenhüllen angeregt oder ionisiert, wodurch Folgeprozesse ausgelöst werden. Die Spaltung von bestehenden Bindungen kann dabei erst ab Elektronenenergien von wenigen Elektronenvolt erfolgen. Die Energie der auftreffenden Elektronen wird bis zum Erreichen dieser Energie durch elastische Stöße etc. sukzessive reduziert. Somit können dann Bindungen umstrukturiert, gebrochen oder neu ausgebildet werden. Findet dieser Vorgang direkt auf und in dem behandelten Material statt, so wird er als direkte Strahlwirkung bezeichnet. Zusätzlich werden auch durch die indirekte Strahlwirkung Veränderungen auf der Oberfläche des Behandlungsgutes hervorgerufen. Durchdringen die Elektronen den Luftweg zwischen Strahlaustrittsfenster und Behandlungsgut, so kommt es je nach umgebender Atmosphäre zur Bildung reaktiver Spezies. Vor allem Ionen und Radikale kommt dabei eine wichtige Bedeutung zu [104,117]. Die angeregten Spezies wechselwirken dann ebenfalls mit der Oberfläche des Behandlungsgutes und können zu Umstrukturierung, Bruch oder Neuausbildung von chemischen Bindungen führen. Zu den verschiedenen Arten der Strahlwirkung findet sich ein detaillierter Überblick im Übersichtswerk von Schiller, Heisig und Panzer [104].

### 3.2.3. Anwendungen in der Medizintechnik

Ionisierende Strahlung ist im Hinblick auf medizinische Aspekte hauptsächlich aufgrund ihrer mutagenen Wirkung bekannt. Diese Wirkung kann auch positiv, z.B. in Form der Strahlentherapie genutzt werden. Hauptsächlich wird der eBeam jedoch derzeit zu Zwecken der Sterilisation und der Modifizierung medizintechnischer Oberflächen eingesetzt [118,119]. Die sterilisierende Wirkung beruht auf der Tatsache, dass dosisabhängig verschiedenartige Zellschädigungen stattfinden, was bis zur vollständigen Abtötung von Mikroorganismen führen kann. Die gesetzlich vorgeschriebene Sterilisationsdosis ist in der DIN EN ISO 11137-1:2013-12 festgehalten und beträgt im Regelfall 25 kGy. Die Sterilisation mittels nicht-thermischem eBeam ist aufgrund der begrenzten Eindringtiefe ein Verfahren zur Oberflächensterilisation [117,120,121]. Neben der Sterilisation ist auch die Oberflächenmodifizierung mittels eBeam von Interesse für die Medizintechnik. Sowohl die Verbesserung der Biokompatibilität von Polymermaterialien, als auch die Anwendung zur Behandlung biologischer Materialien sind derzeit Gegenstand zahlreicher Forschungsarbeiten [122–126]. Dabei birgt die sterilisierende Wirkung als Begleiteffekt der eBeam-Behandlung zusätzlichen Nutzen.

### 3.3. Wechselwirkung von Zellen mit Oberflächen

Die Adhäsion und das Anwachsen von Zellen auf der Oberfläche bilden die Grundlage für die ordnungsgemäße Integration von Implantaten [3,127]. Die Zelladhäsion basiert auf der zeitlich vorgeschalteten Ausbildung einer Proteinschicht (*protein adsorption layer*, PAL) [128]. Dem PAL wiederum geht die Adsorption von Ionen und Molekülen voraus [1]. Die Proteinadsorption erfolgt zunächst durch Proteine mit geringem Molekulargewicht. Diese werden dann partiell oder vollständig durch Proteine mit höherem Molekulargewicht und stärkerer Oberflächenaffinität ersetzt. Dieser Vorgang wird als Vroman-Effekt bezeichnet [129]. Proteine unterscheiden sich hinsichtlich ihres Adsorptionsverhaltens. Dabei gibt es verschiedene Ansichten, ob die Adsorption auf hydrophoben [3,4,10,128,130] oder hydrophilen [128,131] Oberflächen bevorzugt stattfindet. Um eine ordnungsgemäße Zelladhäsion und Spreitung zu unterstützen, ist die Proteinadhäsion im aktiven Zustand grundlegend. Dafür wiederum sind

Oberflächenpolarität und -ladung entscheidend [128,132]. Doch auch das Substratmaterial selbst hat bei gleicher Polarität und Ladung Einfluss auf die Adsorption [132,133]. Durch hydrophobe Wechselwirkungen kann es zu Konformationsänderung und Denaturierung der Proteine kommen, da hydrophobe Gruppen und Bereiche zumeist im Proteinkern eingeschlossen sind [128,134].

Auch die *Härte*<sup>2</sup> eines Proteins trägt maßgeblich zu Art und Umfang der Adsorption bei. Die sogenannten weichen Proteine adsorbieren prinzipiell häufiger und auch schneller, vollziehen dabei aber oft strukturelle Änderungen, die bis zum Funktionsverlust führen können. Wohingegen die sogenannten harten Proteine meist im nativen Zustand, dafür aber seltener adsorbieren [135,136]. Treibende Kraft der Proteinadsorption ist die Zunahme der Entropie des Gesamtsystems [128,129,137], wobei nicht nur die chemische funktionelle Beschaffenheit der Oberfläche von maßgebender Bedeutung ist, denn auch Materialeigenschaften und Oberflächenstrukturen können die Adhäsion gezielt beeinflussen [4,128,138–142]. Dabei überwiegen die oberflächenchemischen Eigenschaften gegenüber den topographischen in ihrer Wirkung auf die Protein- und Zelladhäsion [78]. Die Proteinadsorption erfolgt über Substratwechselwirkungen in Form von Wasserstoffbrücken, ionischen und hydrophoben Wechselwirkungen sowie Van-der-Waals-Wechselwirkungen. Somit handelt es sich um einen reversiblen Prozess und keine kovalente Anbindung der Moleküle [134]. Die nachfolgende Zelladhäsion hängt maßgeblich von Qualität und Quantität des PAL ab [4,127,128], doch auch die räumliche Anordnung der bindungsvermittelnden Proteine stellt dabei einen wichtigen Faktor dar [131,143,144].

Die Adhäsion von Zellen auf dem PAL wird über Membranproteine realisiert. Zu den wichtigsten Membranproteinen gehören unter anderem die Integrine. Diese bilden eine allosterische Verbindung zwischen extrazellulärem Raum und Zellinnerem aus. Im

---

<sup>2</sup> Proteine können hinsichtlich ihrer Strukturstabilität in harte und weiche Proteine unterteilt werden. Harte Proteine weisen durch ihre molekulare Struktur eine starke Konformationsentropie auf und sind damit nur eingeschränkt in der Lage strukturelle Veränderungen zu vollziehen, wodurch auch die Adsorption auf festen Oberflächen erschwert wird. Im Gegensatz dazu können weiche Proteine auf zahlreichen Oberflächen adhären, da sie in der Lage sind sich den gegebenen Oberflächeneigenschaften durch strukturelle Veränderungen anzupassen [135].

extrazellulären Raum interagieren sie hauptsächlich mit dem RGD-Bindungsmotiv<sup>3</sup> von z. B. Typ-III Fibronectin oder Vitronectin [127,145–148]. Doch auch das Zusammenspiel mit weiteren Faktoren ist auf zahlreichen Materialien (z.B. Titan) grundlegend für die RGD-gekoppelte Zelladhäsion [142,149]. Ein Überangebot an RGD-Motiven kann negative Folgen haben und z. B. die Zellproliferation einschränken [128]. Für eine natürliche Proliferation durchlaufen die Zellen den aus G1-, S- und G2/M-Phase bestehenden Zellzyklus, an dessen Ende die Zellteilung vollzogen wird. Dabei lösen sich die Zellen in der G2/M-Phase von der Oberfläche ab, um die endgültige physiologische Teilung durchzuführen [127,147]. Kann das Ablösen aufgrund zu starker Wechselwirkung mit der Oberfläche nicht erfolgen, so wird eine weitere Proliferation unterbunden. Im Zellzyklus erfolgt ein sogenannter G2/M-Arrest [150].

Eine Veränderung der Zelladhäsion kann auch durch Konformationsänderung der adsorbierten Proteine verursacht werden. Dies kann beispielsweise geschehen, wenn Wasserstoffbrücken zwischen Protein und Oberfläche ausgebildet werden, wodurch die Sekundärstruktur des Proteins verändert werden kann. Auch dann kommt es zur Proteinentfaltung bzw. -denaturierung. Die Folgen unzureichender Zelladhäsion resultieren für die meisten Zellarten im apoptotischen Zelltod [128,128,151]. Auch die Differenzierung von Stammzellen ist maßgeblich von Adhäsion und Zellspreitung abhängig [10], somit kann über Oberflächenchemie und -topographie auch die Zelldifferenzierung gezielt beeinflusst werden [152].

### 3.4. Implantate – Anwendungsbeispiel Hüftendoprothese

Eines der am häufigsten eingesetzten Implantate ist die Hüftendoprothese. Im Jahr 2012 wurden deutschlandweit knapp 212.000 Hüftprothesen-Operationen durchgeführt. Der alterungsbedingte Austausch erfolgt oft bereits nach 10 bis 15 Jahren, wodurch heute bereits jährlich über 35.000 Revisionsoperationen durchgeführt werden müssen. Die

---

<sup>3</sup> Das RGD-Bindungsmotiv besteht aus drei Aminosäuren: Arginin, Glycin und Asparaginsäure. Im Einbuchstabencode: R-G-D. Diese Sequenz kommt in zahlreichen extrazellulären Matrixproteinen (z.B. Fibronectin) vor. Über Zellmembranproteine (z.B. Integrine) erkennen Zellen dieses Motiv und binden darüber an das entsprechende extrazelluläre Protein, wodurch eine Zelladhäsion vermittelt wird [127].

Wahrscheinlichkeit sich bereits innerhalb der ersten zwei Jahre nach Implantation einer Revisionsoperation unterziehen zu müssen, liegt bei über 3% [153,154].

Die Hüftendoprothese gehört zu den lasttragenden orthopädischen Implantaten und muss daher enormen materialtechnischen Ansprüchen gerecht werden [3]. Neben der optimalen Kraftübertragung zwischen Knochenmaterial und Implantat sind hohe Verschleißfestigkeit im Gelenkbereich sowie die Langzeitstabilität der verwendeten Materialien von großer Bedeutung. Zahlreiche Forschungsarbeiten beschäftigen sich daher mit der Verbesserung der Reib-Gleiteigenschaften des Kugelgelenks, wobei bereits verschiedene Gleitpaarungen und Beschichtungstechnologien zum Einsatz kommen [155–161].

Der Einfluss des Kraftübertrages zwischen Implantat und Knochengewebe zeigt sich besonders deutlich bei Komplikationen in Zusammenhang mit dem sogenannten *stress shielding* von zementfrei eingesetzten Prothesen [162]. Findet dabei aufgrund unterschiedlicher mechanischer Eigenschaften von Knochen und Implantatmaterial ein unphysiologischer Kraftübertrag statt, so kommt es zur Knochen Degeneration und -umstrukturierung, was in der Folge zur aseptischen Lockerung des Implantates führen kann [163].

Mit Lösungsansätzen für das Problem der aseptischen Implantatlockerung beschäftigt sich die Fraunhofer Gesellschaft in dem Leitprojekt *Theranostische Implantate* [23]. Darin soll unter anderem ein Konzept für Hüftendoprothesen entwickelt werden, bei dem nach Lockerung eine Wiederverankerung des Implantates im Knochen ohne operativen Eingriff erfolgt. Für die Wiederverankerung sollen Aktoren auf Basis von Formgedächtnislegierungen (FGL) genutzt werden. An diese Bauteile werden neben der Biokompatibilität hohe Funktionsansprüche gestellt. Um die Funktionsweise des Aktors optimal zu unterstützen, muss auf dessen Oberfläche das Anwachsverhalten von Zellen gezielt beeinflusst werden. Das bedeutet, dass auf der Oberfläche Bereiche generiert werden müssen, die die Zelladhäsion fördern wohingegen in direkter Nachbarschaft die Zelladhäsion verringert oder vollständig unterbunden werden muss. Eine weitere Herausforderung stellt das Material des Aktors dar. Die Formgedächtniseigenschaften dieses Materials basieren auf einem hohen Anteil an Nickel, welches eines der



bekanntesten Allergene darstellt [164]. Aus diesem Grund sollte ein direkter Gewebkontakt vermieden werden. Auf die Verwendung von FGL im medizintechnischen Bereich und die Problematik Nickel wird im folgenden Kapitel eingegangen.

### 3.5. Formgedächtnislegierungen auf Nickel-Titan-Basis

Als Formgedächtniseffekt wird die Eigenschaft eines Materials bezeichnet, eine *antrainierte* Grundform nach mechanischer Deformation durch einen energetischen Stimulus wieder anzunehmen. Zu Materialien mit diesen Eigenschaften zählen zahlreiche Legierungen, wie zum Beispiel AuCd, CuZnAl, CuAlNi, FeMnSi, NiTi oder NiMnGa [165]. In der industriellen und auch der medizintechnischen Anwendung sind vor allem Nickel-Titan-Legierungen zahlreich vertreten [166].

#### 3.5.1. Als Implantatmaterial

Die wichtigste Eigenschaft der Nickel-Titan-Legierungen, welche auch als Formgedächtnislegierungen (FGL) bekannt sind, ist die Fähigkeit eine *antrainierte* Ausgangsform wieder anzunehmen, wenn sie einer bestimmten Temperatur oder einem magnetischen Stimulus ausgesetzt werden. Dieser Prozess wird als Formgedächtniseffekt bezeichnet und verleiht der FGL eine scheinbare Dehnbarkeit, die die Verformbarkeit vergleichbarer Legierungen um bis zu eine Größenordnung übertrifft [3]. Eine detaillierte Übersicht zu den dabei stattfindenden Phasenumwandlungen sowie der Veränderungen der Kristallstrukturen wird in der Review von Jani et al. gegeben [167]. Je nach Elastizitätsverhalten wird in drei Untergruppen der FGL unterschieden: 1) Legierungen mit Ein-Weg-Effekt, 2.) Legierungen mit Zwei-Weg-Effekt, 3.) Legierungen mit pseudo- bzw. superelastischem Verhalten. Entscheidend für das Elastizitätsverhalten ist das Mischungsverhältnis von Nickel und Titan [165].

Haupt Einsatzgebiet für FGL ist die Nutzung als Aktor. Das Applikationsfeld erstreckt sich über Robotik und die Automobilindustrie bis hin zur Medizintechnik [168]. Im Medizintechnik-Sektor werden FGL bereits erfolgreich als Stentmaterial genutzt [71].

Dabei wird der Stent im schmal gefalteten Zustand in das Blutgefäß eingeführt. Das Entfalten des Stents am Endpunkt wird dann über die Formgedächtnisfunktion und durch Aktivierung über die Körperwärme realisiert [169,170]. Auch Knochenfixateure werden auf FGL-Basis gefertigt. Die Formgedächtnisfunktion erleichtert dabei das präzise Andocken von Knochenbruchstellen. Ebenso werden FGL für Cochlea-Implantate genutzt [171]. Die Aktivierung der FGL-Verformung erfolgt meist über die Körperwärme [166]. Trotz der diversen medizintechnischen Einsatzgebiete wird zunehmend über Komplikationen in Zusammenhang mit dem enthaltenen Nickel berichtet [3,172].

In der vorliegenden Arbeit sollen Aktoren auf FGL-Basis für *intelligente Hüftendoprothesen* als Anwendungsbeispiel für modifizierte DLC-Beschichtungen herangezogen werden. Dabei soll vor allem der Austritt von Nickelionen durch die Barrierewirkung der DLC-Beschichtung verringert werden. Zusätzliche sollen durch die Modifizierung mittels eBeam verschiedene Oberflächenfunktionen geschaffen werden. Wie bereits erwähnt, ist die Barrierewirkung gegenüber dem Austritt von Nickelionen dabei von hohem Interesse, da Nickel als Element mit dem höchsten allergenen Potential gilt und zudem im Verdacht steht krebserregend zu wirken [164]. Über starke toxische Wirkungen bei direktem Gewebekontakt und Thrombozytenaktivierung wird ebenfalls berichtet [3,173]. Sogar die Verengung von Blutgefäßen und die damit einhergehende Gefahr für Gefäßverschlüsse wurde in direktem Zusammenhang mit Nickelexposition beobachtet [174].

Bei FGL-Bauteilen wird der Austritt von Nickelionen meist durch die Struktur der oberflächlich gebildeten Oxidschicht bestimmt. Da diese Oxidschicht einem ständigen Zyklus der Umstrukturierung unterliegt, kann die Intensität der Ionenfreisetzung zeitlichen Schwankungen unterliegen [175]. Es wird bereits versucht in Nachbehandlungsprozessen wie z. B. Elektropolieren diese Oxidschicht weiter zu verstärken und so die Biokompatibilität durch Verringerung der Thrombozytenaktivierung sowie des allergenen Potentials zu verbessern [176,177]. Weiterhin konnte bereits gezeigt werden, dass die Nickelionenfreisetzung maßgeblich von der verwendeten Geometrie des Bauteils, dem genutzten Oberflächenbearbeitungsverfahren und dem im Einsatzgebiet umgebenden Medium

abhängig ist [175]. Daher ist zu beachten, dass nach Operationen eventuell auftretende Entzündungsreaktionen zu einer pH-Absenkung im umgebenden Gewebe führen [142]. Auch dies kann eine stärkere Freisetzung von Nickelionen hervorrufen [175,178]. Der Ionenaustritt ist unter statischen Bedingungen (keine Verformung der FGL) aufgrund der schützenden Oxidschicht gering. Es entwickelt sich schnell eine konstante, relativ geringe Nickelkonzentration im Umgebungsmedium. Hingegen steigt bei Verformung oder Bewegungen im Mikrobereich die Konzentration kontinuierlich an und es können lokal zytotoxische Werte erreicht werden [165]. Diese Tatsache zeigt, dass eine schützende Barrierschicht unerlässlich ist, da die Aufgabe der FGL-Aktoren im Anwendungsbeispiel auf deren Verformung basiert.

### 3.5.2. Beschichtung mit DLC

Mit der vermehrten Nutzung FGL-basierter medizintechnischer Anwendungen wird auch eine Zunahme der Nickelsensitivität und allergischer Reaktionen beobachtet [179]. Dies verdeutlicht den Vorteil dehnungstoleranter und zugleich biokompatibler Schutzschichten. Die Nutzung von DLC-Beschichtungen auf FGL für medizinische Anwendungen dient daher zunächst der Verbesserung des Korrosionsverhaltens sowie der Verringerung des Austritts toxischer Bestandteile wie Nickelionen [42,180–183]. Da sich ein großes Einsatzgebiet der FGL auf die Nutzung als intravaskuläre Stents bezieht (Vergl. Kapitel 3.5.1), spielt auch die Verbesserung der Hämokompatibilität eine wichtige Rolle [15,21,168,184,185]. Jones et al. beschäftigten sich in gleichem Zusammenhang mit den Barriereigenschaften von DLC-Schichten und einer Steigerung der Barrierefunktion durch die Inkorporation von Silicium [70].

Aufgrund der hohen Flexibilität von DLC-Beschichtungen ist auch bei Verformung der FGL eine Barrierewirkung gesichert. Beispielsweise konnte durch Dotierung eine Schichtdeformation bis zu 10 % unter Dehnungsbeanspruchung toleriert werden [186]. Wichtig ist dabei die unveränderte Funktion der FGL hinsichtlich der durch den Aktor wirkenden Kraft bei Verformung. Auch hier konnte bereits belegt werden, dass diese Eigenschaften durch eine DLC-Beschichtung nicht beeinträchtigt werden [168]. Aufgrund der guten Reib-Gleiteigenschaften führten DLC-Beschichtungen auf Stents zu

einer Verbesserung der Performance während der intrakorporalen Entfaltung, was sich zusätzlich positiv auf deren Langzeitstabilität auswirkte [187].

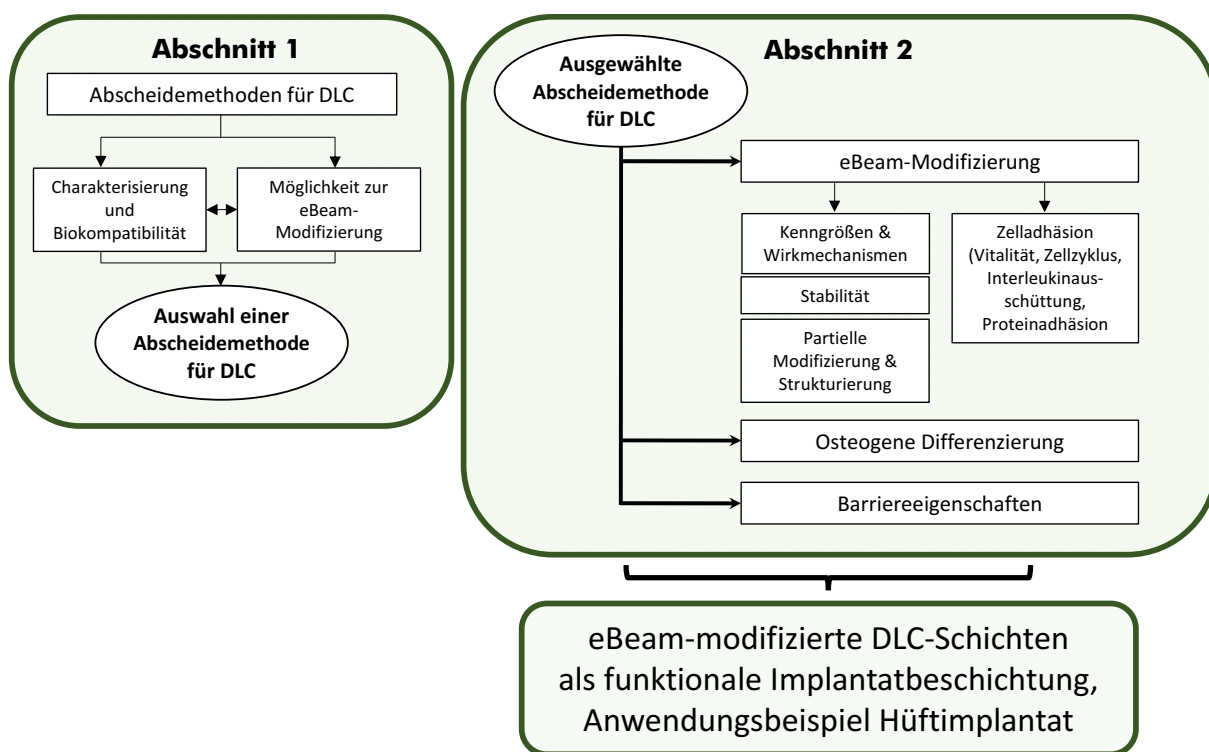
## 4. Material und experimentelle Methoden

### 4.1. Vorgehensweise und Probendefinition

Die vorliegende Arbeit ist in zwei Abschnitte untergliedert. Ziel ist die Auswahl einer Abscheidemethode für Beschichtungen aus diamantähnlichem Kohlenstoff (DLC) für das medizintechnische Einsatzgebiet. Die Beschichtungen sollen als biokompatible Barrierschichten dienen, wobei deren Modifizierung mittels Elektronenstrahl (eBeam) eine gezielte Steuerung der Zelladhäsion ermöglichen soll.

Der erste Abschnitt dieser Arbeit beschäftigt sich mit dem Vergleich verschiedener Abscheidemethoden für DLC-Beschichtungen und führt zur Auswahl der für das medizintechnische Anwendungsgebiet geeignetsten Abscheidemethode. Im zweiten Abschnitt werden die ausgewählten DLC-Beschichtungen mittels eBeam modifiziert. Die Mechanismen und Grenzen der Modifizierung sowie deren Stabilität werden bewertet. Die Biokompatibilität und -funktionalität der modifizierten Schichten wird anhand ausgewählter zellbiologischer Methoden sowie humaner Zellen und Zelllinien untersucht. Anhand des Anwendungsbeispiels der Hüftendoprothese mit integrierten Aktoren auf Basis von Formgedächtnislegierungen (FGL) wird der praktische Bezug hergestellt. Auf den FGL sollen die DLC-Schichten als biokompatible Barriere fungieren, um den Austritt von Nickelionen zu verringern. Um die Übertragbarkeit auf das Einsatzgebiet der Hüftimplantate zu gewährleisten, wird die osteogene Differenzierung mit mesenchymalen Stammzellen überprüft.

In Abbildung 3 ist die beschriebene Vorgehensweise in schematischer Form dargestellt. Aufgrund der verschiedenen Abscheidemethoden für die DLC-Schichten sowie die Modifizierung dieser verschiedenen Schichten ergibt sich eine Probenmatrix, für deren Bezeichnung in der vorliegenden Arbeit die in Tabelle 1 aufgeführten Abkürzungen und Farbcodierungen genutzt werden.



**Abbildung 3: Methodische Vorgehensweise der vorliegenden Arbeit**

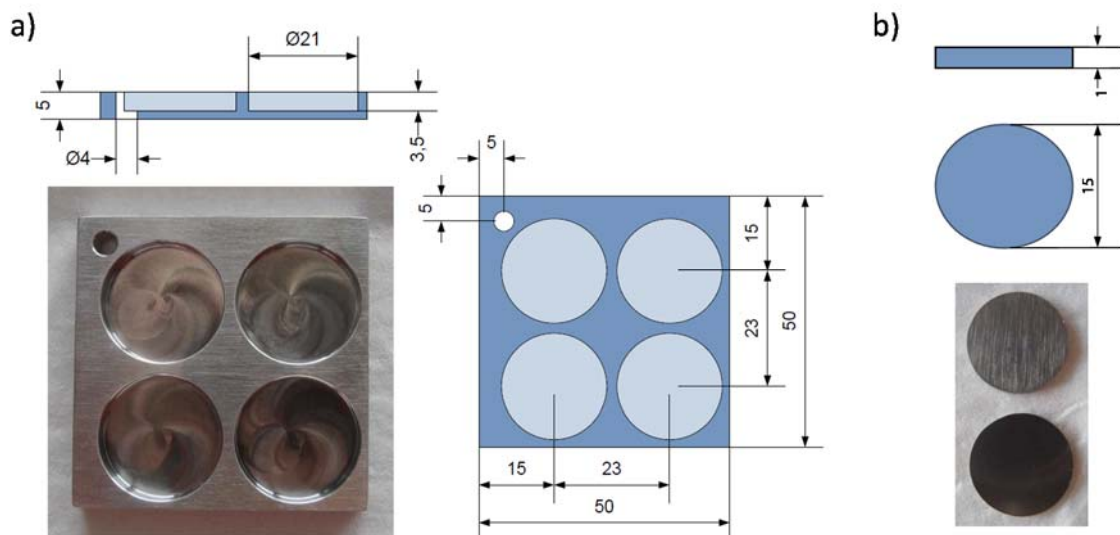
Dargestellt ist der schematische Ablauf zur Vorgehensweise. Ziel ist die Auswahl einer Abscheidemethode für diamantähnlichen Kohlenstoff (DLC) und deren Modifizierung mittels Elektronenstrahl (eBeam), um variierende Funktionsansprüche hinsichtlich Zelladhäsion auf dem Anwendungsbeispiel Formgedächtnislegierung (FGL) zu bedienen.

**Tabelle 1: Probenbezeichnung und Farbcodierung**

Abscheidemethode	eBeam-Modifizierung	Abkürzung	Farbcode
Plasma Assisted Chemical Vapor Deposition	-	PA-CVD	
	100 kGy	PA-CVD_100	
	500 kGy	PA-CVD_500	
Physical Vapor Deposition-Magnetron-Sputterverfahren	-	PVD-Spu	
	100 kGy	PVD-Spu_100	
	500 kGy	PVD-Spu_500	
	1000 kGy	PVD-Spu_1000	
Physical Vapor Deposition-Lichtbogenverdampfen	-	PVD-Arc	
	100 kGy	PVD-Arc_100	
	500 kGy	PVD-Arc_500	
	1000 kGy	PVD-Arc_1000	
Physical Vapor Deposition-gefiltertes Lichtbogenverdampfen	-	PVD-Arcfil	
	100 kGy	PVD-Arcfil_100	
	500 kGy	PVD-Arcfil_500	

## 4.2. Beschichtungssubstrate und Probengeometrie

Als Beschichtungssubstrat wurde chirurgischer Edelstahl mit der Werkstoff-Nr.: 1.4301 (entsprechend DIN EN 10088-3) gewählt. Zwei unterschiedliche Probengeometrien wurden hergestellt und anschließend über die in Kapitel 4.3 genannten Abscheidungsverfahren mit DLC-Beschichtungen ausgestattet. Die Probengeometrie für die Versuche der Zellkultur wurde als Wellplatte konzipiert. Dazu wurden auf einer Edelstahl-Grundplatte (50x50 mm) vier zylindrische Vertiefungen mit einem Durchmesser von 21 mm und einer Höhe von 3,5 mm eingearbeitet (Abbildung 4 a). Die Zellen kamen somit ausschließlich mit der zu untersuchenden Beschichtung in Kontakt, da durch die komplette Beschichtung dieser Substrate die Zellkulturversuche unter Ausschluss von Fremdkontakt durchgeführt werden konnten. Die 4-Wellplatten-Proben wurden für die Untersuchungen in Kapitel 5.1.2, 5.1.3, 5.3 und 5.4.1 verwendet. Für oberflächenanalytische Tests wurden runde Flachproben mit einem Durchmesser von 15 mm verwendet (Abbildung 4 b). Diese Proben wurden in Kapitel 5.1.1, 5.1.3 und 5.2 genutzt.



**Abbildung 4: Beschichtungssubstrate aus chirurgischem Edelstahl und Probengeometrie**

Dargestellt sind Beschichtungssubstrate aus chirurgischem Edelstahl mit entsprechender Probengeometrie (Längenangaben in mm); a) 4-Wellplatte, Formgebung adaptiert von Standard Zellkulturplatten (12-Well) werden für zellbiologische Untersuchungen genutzt. Die komplette Beschichtung der 4-Wellplatten ermöglicht den ausschließlichen Kontakt der Zellen mit der Beschichtung. Das Loch an der linken oberen Ecke dient zur Probenhalterung während des Beschichtungsvorganges. b) Flachproben für oberflächenanalytische Untersuchungen, die Proben wurden einseitig beschichtet.

Für die Untersuchungen zur Barrierewirkung mit dem Anwendungsbezug der FGL-Aktoren wurden FGL-Proben mit der basierend auf den Ergebnissen des ersten Abschnittes ausgewählten Abscheidemethode (PVD-Spu) beschichtet. Die Abscheideparameter blieben dafür unverändert. Es wurden rechteckige Flachproben (57x23 mm) verwendet. Die Proben wurden für die Untersuchungen in Kapitel 5.4.2 verwendet. Die FGL (Memry GmbH, Mat.Nr.: CX-2369) besitzen Formgedächtniseigenschaften, wodurch sie für den Einsatz in sogenannten *intelligenten Implantaten* prädestiniert ist. An dieser Stelle ist die DLC-Beschichtung sinnvoll, da aus der Literatur bekannt ist, dass diese Schichten bis zu 10 % an Verformung tolerieren (siehe Kapitel 3.5.2), eine biokompatible Oberfläche darstellen und zudem eine Verringerung des Austritts von allergen wirkenden Nickelionen bewirken können.

### 4.3. Beschichtungsverfahren

Für die Abscheidung von DLC-Beschichtungen mit unterschiedlichen Schichteigenschaften wurden die in Kapitel 3.1.1 beschriebenen Abscheidungsverfahren genutzt: PA-CVD, PVD-Spu, PVD-Arc und PVD-Arcfil. Die Schichten unterschieden sich hinsichtlich ihrer  $sp^2$ - und  $sp^3$ -Bindungsanteile sowie des Wasserstoffgehaltes, wobei zwei der Abscheidemethoden wasserstoffhaltige Beschichtungen erzeugten und die zwei anderen Abscheidemethoden wasserstofffreie Schichten. Eine grobe Einteilung der Beschichtungen kann anhand von Abbildung 2 erfolgen.

Die Abscheidung der DLC-Beschichtungen für die vorliegende Arbeit erfolgte durch die Europ Coating GmbH im Rahmen des SMWK-geförderten Kooperationsprojektes *DLC-Bio-MIC* [41], dafür wurden die in Abbildung 2 beschriebenen Abscheidungsverfahren genutzt. Die folgende Tabelle 2 gibt zusammenfassend eine Übersicht zu den Parametern der genutzten Abscheidungsverfahren. Die aufgetragenen Schichtdicken wurden über die jeweiligen Abscheideraten und -zeiten auf mindestens 1  $\mu\text{m}$  festgelegt.



**Tabelle 2: Abscheidungsverfahren und -parameter für die DLC-Schichten der vorliegenden Arbeit**

Abscheidungsverfahren	Abkürzung für die vorliegende Arbeit	Hergestellt durch	Schicht-typ	Quelle	Prozessdruck [mbar]	Prozessgas	Abscheiderate [ $\mu\text{m}/\text{min}$ ]
Plasmaunterstützte CVD	PA-CVD	EC	a-C:H	C <sub>2</sub> H <sub>2</sub>	ca. 0,5	Ar/C <sub>2</sub> H <sub>2</sub>	ca. 0,1
Magnetronspütern	PVD-Spu	EC	a-C:H	C-Target	ca. 10 <sup>-2</sup>	Ar	ca. 0,02
Lichtbogenverdampfen	PVD-Arc	EC	ta-C	C-Target	ca. 10 <sup>-5</sup>	ohne	ca. 0,1
Lichtbogenverdampfen gefiltert	PVD-Arcfil	EC	ta-C	C-Target	ca. 10 <sup>-5</sup>	ohne	ca. 0,01

#### 4.4. Elektronenstrahlmodifizierung

Für die eBeam-Modifizierung wurde die Technikumsanlage *REAMODE* des Fraunhofer FEP genutzt. Diese zählt mit einer Beschleunigungsspannung von 150 bis 200 kV zum Typ der Niederspannungsbeschleuniger [104]. Zur Bestimmung der eingebrachten Dosis wurden Pararosanilin-Filmdosimeter verwendet, die mit der Software *Risö Scan* von Risö (Technical University of Denmark, Center for Nuclear Technologies) ausgewertet wurden. Dem Auswertesystem liegt die ISO/ASTM 51275:2013 zugrunde.

Die DLC-Beschichtungen wurden mit Zieldosen von 25 bis 1000 kGy behandelt. Alle Zieldosen über 25 kGy wurden durch Einzelbestrahlungen mit jeweils 50 kGy kumuliert. Für die Applikation von 50 kGy wurden die in Tabelle 3 aufgeführten Prozessparameter genutzt. Für die Applikation von 25 kGy wurde die Verfahrgeschwindigkeit halbiert. Neben Luft kamen auch Stickstoff, 21 %iger Sauerstoff und 10 %iger Wasserstoff (Varigon H10) als Prozessgase zum Einsatz.

**Tabelle 3: Übersicht der Prozessparameter zur eBeam-Behandlung der DLC-Schichten**

Beschleunigungsspannung	150 kV
Strahlstrom	5 mA
Verfahrgeschwindigkeit unter dem eBeam	130 mm/s
Abstand zum Strahlaustrittsfenster	45 mm
Prozessdruck	ca. 100 kPa (Umgebungsdruck)
Prozessgas	Luft, Stickstoff, Sauerstoff-Argon-Gemisch (20:80), Varigon H10

Entsprechend der theoretischen Betrachtung zur Eindringtiefe des eBeam (s. Kapitel 3.2), wird die ca. 1  $\mu\text{m}$  dicke DLC-Beschichtung mit den gewählten Prozessparametern vollständig durchstrahlt.

#### 4.5. Charakterisierung der Oberflächenmorphologie und mechanischer Parameter

Ziel bei der eBeam-Modifizierung der DLC-Beschichtungen ist die definierte Veränderung der biologischen Reaktion auf diesen Oberflächen. Dies soll über die Beeinflussung der Zelladhäsion erfolgen. Da sowohl chemisch/energetische als auch morphologische Eigenschaften diesen Vorgang beeinflussen, wurde die Oberflächenanalytik basierend auf diesen ausgewählten Schwerpunkten durchgeführt.

##### 4.5.1. Rasterelektronenmikroskopie

Für die Dokumentation der Schichtstruktur wurde das Rasterelektronenmikroskop DSM 962 der Firma Zeiss Germany mit einer Beschleunigungsspannung von 15 kV verwendet. Alle Proben wurden im Winkel von  $45^\circ$  zum Strahl platziert, zur Bilderzeugung wurden die Sekundärelektronen genutzt.

Die Aufnahmen entstanden mit freundlicher Unterstützung durch Lysann Kenner, Mitarbeiterin des Fraunhofer FEP, Medizinische Applikationen.

##### 4.5.2. Weißlichtinterferometrie

Die Bestimmung des Mittenrauwertes  $R_a$  erfolgte mittels Weißlichtinterferometrie (WLI). Die WLI ist eine optische Methode zur dreidimensionalen Abbildung von Oberflächen sowie der Bestimmung von Rauheitskenngrößen. Die Höhenauflösung der Methoden beträgt einige Nanometer. Eine detaillierte Beschreibung der Methode findet sich in der Publikation von Naganuma et al. [188]. Die Datenerfassung erfolgt über sogenannte Korrelogramme. Das Oberflächenprofil der Proben wird softwaregesteuert analysiert und verschiedene statistische Daten werden extrahiert. Ein Beispiel ist der Mittenrauwert  $R_a$ . Zur Ermittlung dieses Wertes wird durch das Profil der Probenoberfläche eine Mittelebene errechnet, deren Abstand zu darüber oder darunter

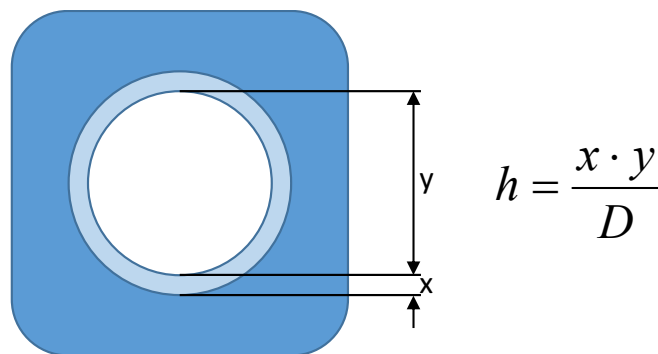
befindlichen Unebenheiten minimal sein soll. Der Mittenrauwert ergibt sich dann als arithmetischer Mittelwert der Abweichungen (Unebenheiten) zu dieser Mittellinie.

Für die WLI-Messung wurde das Gerät *smart WLI extended* der Firma Schaefer Technologie GmbH (Langen) mit der Software *smart WLI* (Version 2.1.1) genutzt. Auf den Proben wurden jeweils drei unabhängige Messungen durchgeführt. Zur Auswertung stand die Software *MountainsMap® Impaging Topography* (Version 6.2.6561) zur Verfügung.

#### 4.5.3. Kalottenschliff

Die Dicke der abgeschiedenen DLC-Beschichtungen wurde mittels Kalottenschliff entsprechend DIN EN 1071 Teil 2 ermittelt. Dabei wird in die beschichtete Probe durch eine rotierende Stahlkugel eine kalottenförmige Kontur bis auf das beschichtete Substrat geschliffen. Dadurch entsteht in der Projektion eine Verbreiterung der Beschichtung, die dann mikroskopisch ausgemessen werden kann, um die Schichtdicke zu berechnen.

Es wurde mit dem Gerät Calotest (CSEM) gearbeitet, die Auswertung erfolgte mikroskopisch (Metallux 3, Leitz; DHS-Bilddatenbank). Die Schichtdicke wurde aus den Abmessungen der Kugel sowie der geschliffenen Kalotte berechnet. Dabei entspricht die Schichtdicke ( $h$ ) dem Produkt aus  $x$  (Schliffbreite) und  $y$  (Innendurchmesser des Schliffs) dividiert durch den Durchmesser  $D$  der schleifenden Kugel (Abbildung 5).

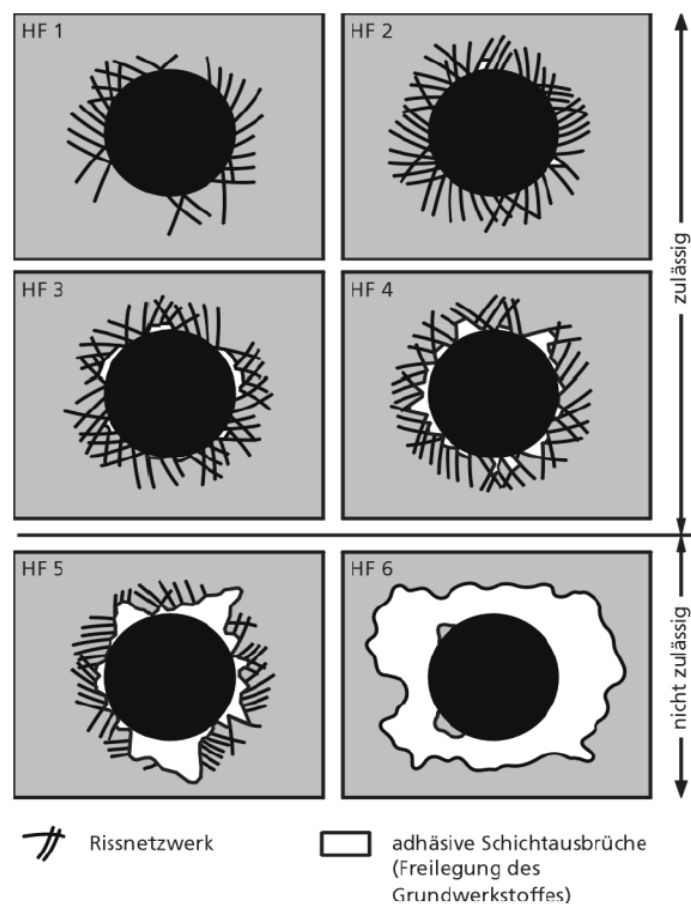


**Abbildung 5: Prinzip der Schichtdickenberechnung mittels Kalottenschliff**

Dargestellt ist das Prinzip zur Berechnung der Schichtdicke über das Kalottenschliff-Verfahren. Die schleifende Kugel verursacht das dargestellte Schliffbild, welches mit den angegebenen Parametern Schliffbreite ( $x$ ) und Schliffinnendurchmesser ( $y$ ) mikroskopisch vermessen werden kann, um daraus unter Einbezug des Kugeldurchmessers ( $D$ ) die Schichtdicke zu ermitteln.

#### 4.5.4. Rockwelltest

Zur Bestimmung der Haftfestigkeit wurde der Rockwelltest genutzt, wodurch die Beschichtungen in Anlehnung an die VDI-Richtlinie 3824 in sechs verschiedene Haftfestigkeitsklassen eingeteilt werden können. Für die Haftfestigkeitsmessung kam ein Rockwell C Indentor mit Diamantprüfkörper zum Einsatz. Die anschließende Bewertung erfolgte durch Lichtmikroskopie und Einteilung in Haftfestigkeitsklassen (HF) entsprechend Abbildung 6.



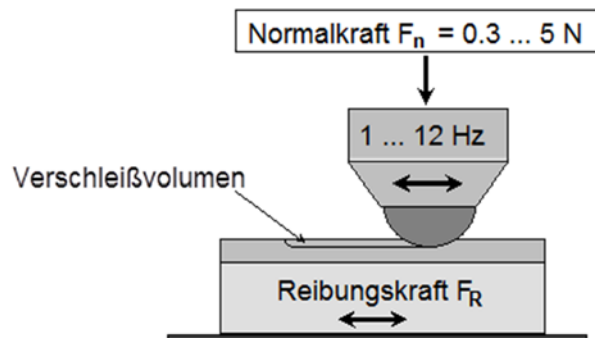
**Abbildung 6: Beurteilung der Schichthaftung nach Haftfestigkeitsklassen**

Dargestellt sind die möglichen Riss- und Delaminationsbilder, welche sich nach Anwendung des Rockwelltests auf der Beschichtung ergeben können. Entsprechend wird die Haftfestigkeit einer Beschichtung auf dem jeweiligen Substrat zugeordnet [189].

#### 4.5.5. Tribometermessung

Die Reibung wurden mittels oszillierendem Tribometer (Fh-AIS Erlangen) mit einem Gegenkörper aus 100 Cr6 bzw. einer WC-Kugel mit 5 mm Durchmesser untersucht

(Abbildung 7). Die Normalkraft ( $F_N$ ) betrug 2 N bei einer Frequenz von 2,5 Hz und einer Amplitude von 2 mm. Es wurden 10.000 Zyklen gefahren.



**Abbildung 7: Prinzip der Tribometermessung [41]**

Dargestellt ist das Prinzip der Tribometermessung zur Ermittlung der Reibungszahl. Die Messkugel mit 5 mm Durchmesser oszilliert mit einer Normalkraft von 2 N und einer Frequenz von 2,5 Hz auf der zu prüfenden Oberfläche. Die Amplitude beträgt dabei 2 mm und der gesamte Messvorgang umfasst 10.000 Zyklen. Die Reibungskraft kann über einen Sensor detektiert werden und dient mit der Normalkraft zur Ermittlung der dimensionslosen Reibungszahl.

Die Reibungskraft  $F_R$  wird mit einem Sensor gemessen. Die Reibungszahl berechnet sich aus dem Verhältnis der Reibungskraft ( $F_R$ ) zur Normalkraft ( $F_N$ ).

Die Untersuchungen mittels Kalottenschliff, Rockwelltest und Tribometer wurden im Rahmen eines SMWK-geförderten Kooperationsprojektes zwischen Fraunhofer FEP und der Europ Coating GmbH beim Projektpartner Europ Coating durchgeführt (Fördernummer 100106122; [41]).

#### 4.6. Chemisch/energetische Oberflächencharakterisierung

Ziel bei der eBeam-Modifizierung der DLC-Beschichtungen ist die definierte Veränderung der biologischen Reaktion auf diesen Oberflächen. Dies soll über die Beeinflussung der Zelladhäsion erfolgen. Da sowohl chemisch/energetische als auch morphologische Eigenschaften diesen Vorgang beeinflussen, wurde die Oberflächenanalytik basierend auf diesen ausgewählten Schwerpunkten durchgeführt.

##### 4.6.1. Raman-Spektroskopie

Mittels Ramanspektroskopie können Aussagen über die chemische Zusammensetzung der DLC-Beschichtungen getroffen werden. Von besonderem Interesse war die

Entwicklung der  $sp^2$ -Bindungsanteile nach eBeam-Behandlung, da es laut Aizawa et al. und Liu et al. zu einer Graphitisierung der DLC-Schichten kommen kann [98,100]. Eine umfangreiche Übersicht zur Ramananalytik von DLC-Schichten findet sich in den Veröffentlichungen von Ferrari & Robertson sowie Gradowski et al. [190–193].

Die Ramananalytik erfolgte mit freundlicher Unterstützung durch Herrn Hagen Grüttner, Laserinstitut der Hochschule Mittweida. Die Messungen wurden an einem *iRaman* der Firma B&W Tek durchgeführt. Die Laseranregung erfolgte mit einem Schmalbandlaser bei 532 nm. Die Datenverarbeitung erfolgte mit *Origin Pro 9.1G*. durch eine lineare Basislinienkorrektur und zweifache Glättung, anschließend wurden die Spektren normiert und es erfolgte eine Peakentfaltung mittels Gauß-Fit in G- und D-Peak-Position

#### 4.6.2. Photoelektronenspektroskopie

Mittels Photoelektronenspektroskopie (XPS) können Aussagen zur chemischen Zusammensetzung der DLC-Beschichtungen generiert werden. Neben der Ramanspektroskopie stellt die XPS eine weitere Möglichkeit zur Ermittlung der Stöchiometrie von  $sp^2$ -,  $sp^3$ - und CO-Bindungsanteilen dar. Für die Messungen wurde das Oberflächenanalyzesystem *HVD 2000* (Hochvakuum Dresden GmbH, 1990) genutzt. Die generierten Daten wurden mit dem Programm *XPSPEAK* (Kwok, R. W. M. "XPS Peak Fitting Program for WIN95/98 XPSPEAK Version 4.1." Department of Chemistry, The Chinese University of Hong Kong (2000)) gefittet. Die Anpassung der Linienform erfolgte mit einer Gauß-Lorentz-Mischfunktion. Zur Darstellung der Anteile von  $sp^2$ -,  $sp^3$ - und CO-Bindungen wurden die entsprechenden Flächenanteile der entfalteten und gefitteten Peaks herangezogen.

Die XPS-Analytik zur Charakterisierung der verschiedenen DLC-Beschichtungen im unbehandelten Zustand (Kapitel 5.1.1) fand im Rahmen des SMWK-geförderten Kooperationsprojektes zwischen Fraunhofer FEP und der Europ Coating GmbH beim Projektpartner Europ Coating statt (Fördernummer 100106122; [41]).

Weiterhin wurde eine XPS-Analyse zur Charakterisierung der eBeam-Modifizierung auf den DLC-Beschichtungen durchgeführt (Kapitel 5.2). Dafür wurde die chemische

Zusammensetzung der DLC-Beschichtungen hinsichtlich Sauerstoff-, Stickstoff- und Kohlenstoffgehalt untersucht. Die Messungen sowie die Auswertung erfolgten an einem ESCA der Firma *Kratos* (Ultra DLD; Software: *Kratos Vision2*). An den Proben wurden Übersichtsspektren und Detailspektren aufgenommen. Aus den Detailspektren wurden die entsprechenden Elementzusammensetzungen in Atomprozent (at%) berechnet.

Die Ergebnisse entstanden mit freundlicher Unterstützung von Herrn Joachim Mayer und Frau Dr. Michaela Müller vom Fraunhofer IGB.

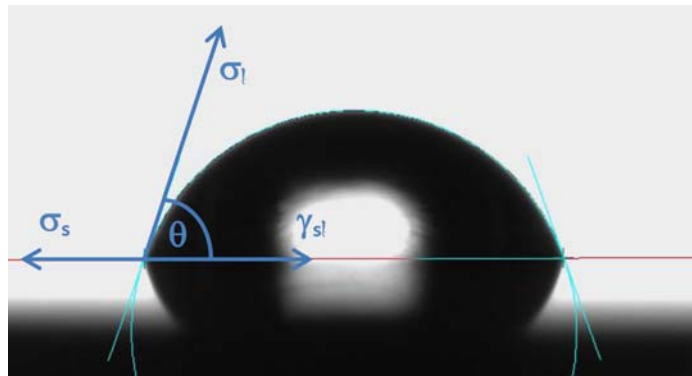
#### 4.6.3. Kontaktwinkelmessung und Bestimmung der Oberflächenenergie

Die Kontaktwinkelmessung gibt Auskunft über die Benetzbarkeit einer Oberfläche. Findet die Messung mit Wasser statt, so kann eine Aussage zur Hydrophilie bzw. Hydrophobie getroffen werden. Benetzt ein Wassertropfen die Substratoberfläche mit einem Kontaktwinkel  $>90^\circ$  so wird die Oberfläche als hydrophob eingestuft, bei unter  $90^\circ$  als hydrophil. Die Messung des Kontaktwinkels ist beispielhaft in Abbildung 8 dargestellt. Der resultierende Kontaktwinkel ( $\Theta$ ) ergibt sich aus dem Kräftegleichgewicht zwischen der Oberflächenspannung des Feststoffes ( $\sigma_s$ ), der Messflüssigkeit ( $\sigma_l$ ) und der Grenzflächenspannung zwischen Flüssigkeit und Feststoff ( $\gamma_{sl}$ ), wobei die Beziehung über die YOUNG'sche Gleichung hergestellt wird:

$$\sigma_s = \gamma_{sl} + \sigma_l \cdot \cos \Theta$$

Wird der Kontaktwinkel mit mindestens drei Messflüssigkeiten bekannter Oberflächenspannung bestimmt, so kann mit der Methode nach Owens, Wendt, Rable und Kaelbel (OWRK) die Oberflächenenergie berechnet werden. Diese lässt sich zudem in polaren und dispersen Anteil aufteilen [194].

Die Kontaktwinkelmessung erfolgte am *OCA 20* der Firma DataPhysics mittels *Sessile Drop*-Methode. Jedem Messpunkt liegen 5 - 10 Einzelmessungen zugrunde. Alle Proben wurden vor der Messung mit Ethanol gereinigt. Als Messflüssigkeiten wurden Wasser, Diiodmethan und Ethylenglykol mit einem Tropfenvolumen von je  $1 \mu\text{L}$  verwendet (Tabelle 4).



**Abbildung 8: Kräfteverhältnisse bei der Kontaktwinkelmessung (Bildquelle: [189])**

Dargestellt ist das Kräfteverhältnis bei der Kontaktwinkelmessung am Beispiel einer untersuchten DLC-Probe. Nach Applikation der Messflüssigkeit (hier Wasser) stellt sich zwischen der Oberflächenspannung der untersuchten Oberfläche ( $\sigma_s$ ), der Oberflächenspannung der Messflüssigkeit ( $\sigma_l$ ) im Umgebungsmedium (Luft) sowie der Grenzflächenspannung zwischen Flüssigkeit und Feststoff ( $\gamma_{sl}$ ) ein Kräftegleichgewicht ein, mit dem der Kontaktwinkel ( $\theta$ ) über die YOUNG'sche Gleichung im Verhältnis steht.

Die Berechnung der Oberflächenenergie (SFT) erfolgte nach OWRK mit der zugehörigen Gerätesoftware, in welcher die in Tabelle 4 angegebenen Datensätze für die Testflüssigkeiten hinterlegt waren (SCA 20 in der Version 3.12.11). Die Bestimmung der dispersen und polaren Anteile der Oberflächenenergie (SFT (d) bzw. SFT (p)) erfolgte ebenfalls über diese Berechnungsvorschrift.

**Tabelle 4: Datensätze der Testflüssigkeiten für Kontaktwinkelmessung**

Flüssigkeit und Autor	SFT	SFT (d)	SFT (p)
Wasser (Buscher et al.)	72,1	19,9	52,2
Diiodmethan (Buscher et al.)	50,0	47,4	2,6
Ethylenglykol (Gebhardt)	47,7	26,4	21,3

#### 4.7. Stabilität der Beschichtung und der Modifizierung

Für den medizintechnischen Einsatz der DLC-Beschichtungen im Implantatbereich ist neben der Haftfestigkeit auch die Beständigkeit gegenüber herkömmlichen Sterilisationsverfahren von wesentlicher Bedeutung. Weiterhin muss daher auch die Modifizierung auf der DLC-Beschichtung Langzeitstabilität aufweisen und gegenüber chemischen und mechanischen Aufbereitungsverfahren beständig sein.



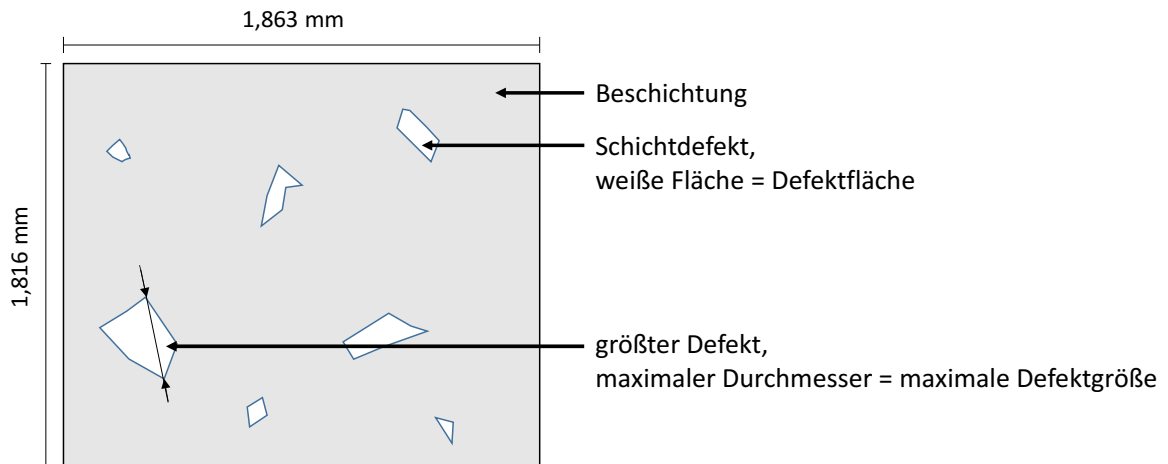
#### 4.7.1. Sterilisationsfestigkeit der DLC-Beschichtungen

Die DLC-Beschichtungen sollen für medizintechnische Anwendungen durch die eBeam-Modifizierung weiter entwickelt werden, wobei in der vorliegenden Arbeit eine Hüftendoprothese als Anwendungsbeispiel diente. Medizintechnische Instrumente und Implantate sind vor ihrem Einsatz zu sterilisieren [3], aus diesem Grund ist die Prüfung der Sterilisationsfestigkeit der DLC-Beschichtungen von grundlegender Bedeutung für das spätere Anwendungsfeld. Die DLC-Beschichtung mit dem entsprechenden Anwendungsbeispiel ist für den Bereich von glatten Hartstoffoberflächen, hauptsächlich Metallen, vorgesehen. Derartige Oberflächen, die mit Blut, Wunden und inneren Organen oder Geweben in Kontakt kommen, sind nach KRINKO/BfArM<sup>4</sup>-Empfehlung als kritisch A eingestuft und sollten daher einer Desinfektion gefolgt von Dampfsterilisation unterzogen werden.

Um die Sterilisationsfestigkeit zu beurteilen wurde ein Reinigungs- und Sterilisationsregime entwickelt, welchem die DLC-Beschichtungen 80fach ausgesetzt wurden. Im ersten Schritt wurden die Beschichtungen einem Desinfektionsbad mit 1M Natronlauge für jeweils eine Stunde unterzogen, der zweite Schritt bestand in einer Dampfsterilisation bei 134°C für 18 min. mittels Autoklav. Die Schichtbeschaffenheit wurde in Intervallen nach 5, 10, 20, 30, 55 und 80 Zyklen lichtmikroskopisch in einem Bereich von 1,863 x 1,816 mm mit dem Auflichtmikroskop *Typ BX61* der Firma Olympus auf Defekte überprüft (Vergl. [189]). Die Defektfläche und maximale Defektgröße wurden mit der Olympus-Software *xcellence rt* (Version 2.0) ermittelt. Die Defektfläche wurde als Summe der Einzelflächen aller auf der betrachteten Oberfläche nachweisbaren Defekte bzw. Summe derer Flächen definiert. Die maximale Defektgröße wurde wie in Abbildung 9 dargestellt als Durchmesser des größten Defektes auf der betrachteten Oberfläche definiert.

---

<sup>4</sup> KRINKO-Kommission für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention; BfArM- Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte



**Abbildung 9: Bestimmung von Defektfläche und maximaler Defektgröße**

*Dargestellt ist der betrachtete Ausschnitt der Oberfläche einer DLC-Beschichtung mit Defekten. Die Fläche aller Einzeldefekte ergibt in Summe die Defektfläche. Der größte Durchmesser des größten Defektes wurde als maximale Defektgröße definiert.*

#### 4.7.2. Langzeitstabilität der Elektronenstrahl-Modifizierung

Zur Bewertung der eBeam-Modifizierung auf den DLC-Beschichtungen wurde die Veränderung des Kontaktwinkels herangezogen. Auch die Langzeitstabilität der Modifizierung wurde damit untersucht. Nach der Modifizierung fand eine zweimonatige Lagerung der DLC-Beschichtungen bei Raumtemperatur und an Luft statt. Parallel wurde die Langzeitstabilität bei Lagerung in Kochsalzlösung untersucht. Dafür wurde phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) genutzt, in welcher die Proben nach der Modifizierung für zwei Monate in denen unter Kapitel 4.9 genannten Zellkulturbedingungen gelagert wurden. Anschließend wurden die Proben zweifach mit bidestilliertem Wasser gespült und an Luft getrocknet. Das Spülen erfolgte durch zweifaches Eintauchen in destilliertes Wasser. Nach der Langzeitlagerung wurde der Kontaktwinkel, wie in Kapitel 4.6 beschrieben, erneut bestimmt.

#### 4.7.3. Widerstandsfähigkeit der Elektronenstrahl-Modifizierung

Neben der Langzeitlagerung wurden die eBeam-modifizierten DLC-Beschichtungen einer mechanischen Reinigung mit 70 %igem EtOH unterzogen. Dafür wurden die Proben händisch mit einem EtOH-getränkten, fusselreien Tuch unter starkem Druck abgewischt. Anschließend wurden sie bei 134 °C für 20 min. im Autoklav dampfsterilisiert. Auch hier wurde der Kontaktwinkel wie in Kapitel 4.6 beschrieben

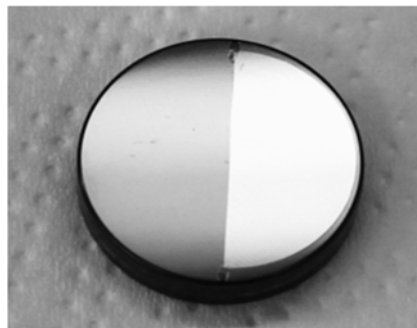
erneut bestimmt und als Bewertungsmaßstab für die Stabilität der Modifizierung vor und nach Reinigung samt Sterilisation herangezogen.

#### 4.8. Strukturierung durch partielle Elektronenstrahl-Modifizierung

Durch die Modifizierung der Beschichtungen sollten biofunktionale Oberflächen generiert werden. Eine Herausforderung dabei besteht darin, unterschiedliche Oberflächeneigenschaften auf einer geschlossenen Beschichtung in aneinander angrenzenden Bereichen zu schaffen. Damit könnten beispielsweise variierende Funktionsansprüche hinsichtlich Zelladhäsion bedient werden. Die Möglichkeiten einer partiellen eBeam-Modifizierung wurden anhand von Untersuchungen zur Grob- und Feinstrukturierung bewertet.

##### 4.8.1. Grobstrukturierung und Nachweis über Benetzungsverhalten

Um zu untersuchen, inwiefern mittels eBeam-Behandlung angrenzende Bereiche mit unterschiedlichen Oberflächenfunktionalitäten geschaffen werden können, wurde zunächst anhand von DLC-beschichteten Flachproben eine grobe eBeam-Strukturierung durchgeführt. Dafür wurde die Oberfläche halbseitig mit einem handelsüblichen Deckgläschen abgedeckt (siehe Abbildung 10). Anschließend erfolgte die eBeam-Modifizierung mit 500 kGy. Für eine qualitative Bewertung wurde auf die halbseitig modifizierte Probe kontinuierlich destilliertes Wasser auf der modifizierten Seite aufgegeben und beobachtet, wie sich das Tropfenvolumen auf der Oberfläche ausbreitet. Die Dokumentation erfolgte fotografisch.

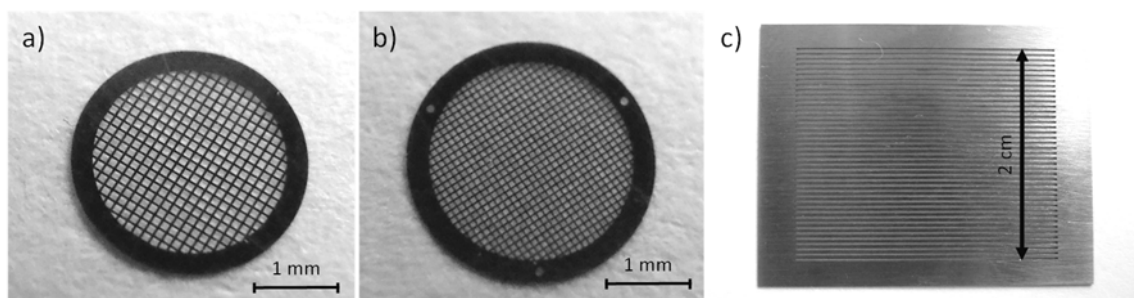


**Abbildung 10: Probenpräparation zur halbseitigen eBeam-Modifizierung (Grobstrukturierung)**  
*Dargestellt ist eine mittels PVD-Spu beschichtete, runde Flachprobe, welche halbseitig abgedeckt wurde (rechte Hälfte), um eine partielle eBeam-Modifizierung zu erzielen. Der abgedeckte Teil soll vor der eBeam-Einwirkung abgeschattet werden. Zur Abdeckung wurde ein Standard-Deckgläschen mittels Glasschneider halbiert.*

#### 4.8.2. Feinstrukturierung und Nachweis über Dosimetrie und Tropfenabrolltest

Strukturen im Mikrobereich können für die Zelladhäsion von großem Interesse sein [75]. Daher wurde untersucht, inwiefern durch eBeam-Behandlung auch Strukturen im Bereich einiger Mikrometer modifiziert werden können. Dazu wurden Kupfernetzchen der Transmissionselektronenmikroskopie (TEM-Grids) als Masken zur eBeam-Abschirmung genutzt. Die TEM-Netzchen bestanden aus Gitterstrukturen mit einer Maschenweite von 70 und 100  $\mu\text{m}$  (Plano, Art. Nr.: G202 (100  $\mu\text{m}$ ) und G203 (70  $\mu\text{m}$ )) siehe Abbildung 11 a und b). Anhand der Belichtung eines Dosimeterstreifens sollte geklärt werden, ob diese Strukturen auch mittels eBeam abbildbar sind. Die Proben wurden dafür auf Dosimeterstreifen angebracht und mit 50 kGy behandelt (50 kGy entspricht, der Einfachdosis, mit der auch alle weitere Dosen kumulativ appliziert wurden). Die Auswertung des Dosimeters erfolgte wie in Kapitel 4.4 angegeben.

Zusätzlich wurde ein Tropfenabrolltest zum Nachweis einer feinstrukturierten Modifizierung auf den Schichten durchgeführt. Dafür wurde eine speziell angefertigte Maske aus V2A-Edelstahl zur eBeam-Abschirmung genutzt. Mit dieser Maske aus Stegen mit einer Breite von 300  $\mu\text{m}$  und einem Abstand von 200  $\mu\text{m}$  (Abbildung 11 c) konnte eine große Probenoberfläche mit 500 kGy modifiziert werden.

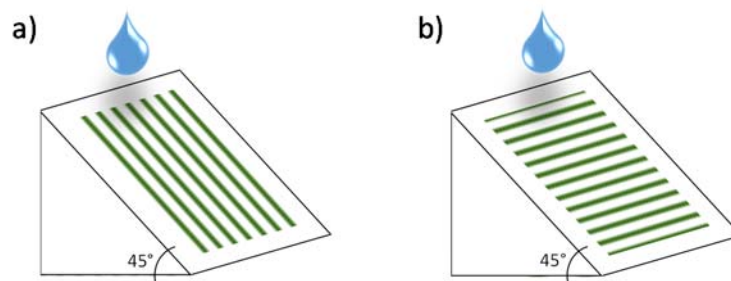


**Abbildung 11: Masken zur Feinstrukturierung**

Dargestellt sind die Masken zur Abschirmung der eBeam-Einwirkung auf den Proben, um feine Strukturen bei der eBeam-Modifizierung zu erzielen. Für die dosimetrische Bewertung wurden TEM-Netzchen aus Kupfer mit einer Maschenweite von 100  $\mu\text{m}$  und 70  $\mu\text{m}$  genutzt (a bzw. b). Um eine Feinstrukturierung über das Benetzungsverhalten nachzuweisen, wurde eine Edelstahl-Maske aus Stegen mit einer Breite von 300  $\mu\text{m}$  und einem Abstand von 200  $\mu\text{m}$  genutzt (c).

Die Auswertung erfolgte über den sogenannten Tropfenabrolltest. Dafür wurden die strukturierten Proben in einem Winkel von 45 ° positioniert. Anschließend wurde ein

Tropfen bidestilliertes Wasser auf die Probe appliziert, das Tropfenvolumen betrug 25  $\mu\text{l}$ . Der Tropfen rollte durch die schräge Positionierung über die Probe. Dabei wurde die Zeit gemessen, welche der Tropfen für das Zurücklegen einer definierten Distanz benötigte. Die Dokumentation erfolgte mittels Videoanalyse. Als Beginn der Messstrecke wurde das Eintreten der Tropfenfront in den Bildbereich definiert, als Ende der Messstrecke wurde der untere Bildrand definiert, die Messung wurde gestoppt, sobald die Tropfenfront diesen erreichte. Für den Tropfenabrolltest wurden die linienartig strukturierten Proben zum einen parallel zur Abrollrichtung des Tropfens positioniert und zum anderen senkrecht zu dieser (Abbildung 12).



**Abbildung 12: Vorgehensweise beim Tropfenabrolltest**

*Dargestellt ist die Probenpositionierung für den Tropfenabrolltest. Die linienartig strukturierten Proben (grün) wurden parallel zur Abrollrichtung des Tropfens (a) bzw. senkrecht dazu (b) positioniert. Dabei wurden die Proben in einem Winkel von 45 ° zum Untergrund positioniert. Ein Tropfenvolumen von 25  $\mu\text{L}$  wurde an der Oberseite auf die Probe appliziert und per Videoanalyse wurde die Zeit, die der Tropfen für das Zurücklegen einer definierten Strecke benötigt, ermittelt.*

#### 4.9. Biologische Analytik

Die biologischen Untersuchungen dienten zunächst der vergleichenden Bewertung der unterschiedlichen DLC-Beschichtungen hinsichtlich Biokompatibilität. Ein weiteres wichtiges Kriterium war die Bewertung des eBeam-Effektes und den damit verbundenen biologischen Wechselwirkungen auf den eBeam-modifizierten DLC-Beschichtungen. Bei der direkten Beeinflussung der biologischen Reaktion ist es wichtig sicher zu stellen, dass durch die modifizierten Oberflächen keine toxischen Begleiterscheinungen oder eine Beeinträchtigung der Vorgänge auf zellulärer Ebene hervorgerufen werden. Für das Anwendungsbeispiel der Hüftendoprothese mit FGL-Bauteil waren zudem die Barrierewirkung der DLC-Beschichtung sowie die osteogene Differenzierung von Stammzellen auf dieser Oberfläche von zentralem Interesse.

#### 4.9.1. Zellen und Zelllinien

Für die Bewertung der Zellverträglichkeit der DLC-Beschichtungen wurden verschiedene humane Zellen und Zelllinien genutzt (Tabelle 5). Zunächst kamen humane Fibroblasten (Primärzellen) zum Einsatz, da diese den größten Anteil der an Wundheilungsvorgängen beteiligten Zellen darstellen. Für Untersuchungen mit direktem Bezug zum Anwendungsbeispiel des FGL-Bauteiles kam zum einen eine humane Osteoblasten-Zelllinie zum Einsatz, zum anderen wurden humane mesenchymale Stammzellen genutzt, um die osteogene Differenzierung auf den DLC-Beschichtungen zu bewerten.

**Tabelle 5: Übersicht der genutzten Zellen und Zelllinien**

<b>Zellen</b>	<b>Bezogen über</b>	<b>Weitere Prozessierung/Lagerung</b>
Humane Fibroblasten, primär (AG 01522 D)	Coriell; Art.Nr.: AG01522	Kryokonserviert, Verwendung in Passage 19 bis 24
Humane mesenchymale Stammzellen, primär (hMSC)	Unprocessed bone marrow aspirate (Fa Lonza, Walkersville, # 1M-125)	Gewinnung über Dichtegradientenzentrifugation, und Plastikadhärenz; kryokonserviert
Humane Osteoblasten, Osteosarcoma-Zelllinie (Saos-2)	CLS Cell Lines Service Dtl. GmbH; Art.Nr.:300331	Kryokonserviert, Verwendung in Passage 87 bis 122

Die humanen mesenchymalen Stammzellen wurden wie in Kapitel 4.9.8 beschrieben aus dem Knochenmarkaspirat von folgenden zwei Spendern gewonnen (Tabelle 6).

**Tabelle 6: Übersicht zu Spendern für die Gewinnung von hMSC**

<b>Donor</b>	<b>Isolation</b>	<b>Alter</b>	<b>Geschlecht</b>	<b>Abstammung</b>
6	19.11.2009	24	m	kaukasisch
10	20.05.2015	23	f	black

Die Zellkulturen wurden regelmäßig auf Mykoplasmenfreiheit überprüft (*Venor GeM PCR Kit für Mykoplasmenachweis*, Merck Millipore, Art. Nr.: W 11-1025). Im Rahmen der Untersuchungen wurden in den jeweils genutzten Passagen keine Anzeichen für zelluläre Seneszenz beobachtet.

Die Zellkultivierung erfolgte standardmäßig bei 37 °C unter 5 %iger CO<sub>2</sub>-Atmosphäre und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95 %, sowie in den im Nachfolgenden aufgelisteten Kulturmedien. Die Zellernte erfolgte durch Trypsinieren für 5 min. und anschließende Zentrifugation. Danach wurde die Zellkonzentration mittels Neubauer Zählkammer bestimmt und die Zellen auf die gewünschte Zielkonzentration im jeweiligen Medium verdünnt.

**Tabelle 7: Kulturmedien für humane Fibroblasten**

<b>AG 01522 D – Fibroblasten</b>	<b>Lieferant, Art.Nr.</b>	<b>Kulturmedium</b>	<b>Puffer</b>	<b>Trypsin</b>
Eagle's MEM	Biochrom, F 0325	88%	-	-
FCS	PAN, Charge P121707	10%	-	-
L-Glutamin	Biochrom, K 0283	1%	-	-
NEA	Biochrom K 0293	1%	-	-
HBSS	Biochrom, L 2055	-	98%	82%
EDTA	Biochrom, L 2113	-	2%	2%
Trypsin (1:250)	Biochrom, L 2123	-	-	16%

**Tabelle 8: Kulturmedien für humane mesenchymale Stammzellen**

<b>hMSC - Stammzellen</b>	<b>Lieferant, Art.Nr.</b>	<b>Kulturmedium</b>	<b>Puffer</b>	<b>Trypsin</b>
MSCGM-CD Bullet Kit	Lonza, 190632	97%	-	-
Penicillin/Streptomycin (5000 U/mL)	Life-technologies, 15070-063	1%	-	-
FCS	Lonza, 14-801F	2%	-	-
DPBS	Sigma Aldrich, D8537	-	100%	-
Versene	Life-Technologies,1540-033	-	-	99%
Trypsin/EDTA (0,5%)	Life-Technologies,15400-054	-	-	1%

**Tabelle 9: Kontrollmedien für osteogene Differenzierung von humanen mesenchymalen Stammzellen**

<b>hMSC - Stammzellen</b>	<b>Lieferant, Art.Nr.</b>	<b>Kontrollmedium osteogene Differenzierung</b>
DMEM, high Glucose/ stabiles Glutamin	Biochrom, FG-0435	89%
Penicillin/Streptomycin (5000 U/mL)	Life-technologies, 15070-063	1%
FCS	Lonza, 14-801F	10%

**Tabelle 10: Osteogenes Differenzierungsmedium für humanen mesenchymalen Stammzellen**

hMSC - Stammzellen	Lieferant, Art.Nr.	Osteogenes Differenzierungsmedium
hMSC osteogenic Bulletkit	Lonza, PT-3002	100%

**Tabelle 11: Kulturmedien für humane Osteoblasten**

Saos-2 – Osteoblasten	Lieferant, Art.Nr.	Kulturmedium	Puffer	Trypsin
McCoy's 5a	Biochrom, F 1015	84,25%	-	-
FCS	PAN, Charge P121707	15%	-	-
L-Glutamin	Biochrom, K 0283	0,75%	-	-
DPBS	Biochrom, L 1835	-	100%	95%
EDTA	Biochrom, L 2113	-	-	3%
Trypsin (1:250)	Biochrom, L 2133	-	-	2%

Hinweis: der Lieferant *Biochrom* ist aktuell *Merck Millipore*.

Als Referenz für die zellbiologischen Methoden dienten Standards. Für die Standards wurden, sofern nicht anders deklariert, Zellen auf Glasdeckgläschen (VWR, Art. Nr.: 631-1582) gleicher Größe wie die Proben und unter gleichen Bedingungen inkubiert und ausgewertet. Als Standardkulturbedingungen wurden die in Kapitel 4.9 festgelegten Parameter genutzt. Die Zellen wurden in den für sie entsprechenden Zellkulturmedien, sofern nicht anders angegeben, jeweils für drei Tage kultiviert (s. 4.9.1). Sofern nicht anders angegeben betrug die Startzellendichte für Fibroblasten  $6,0$  bis  $6,5 \cdot 10^3$  Zellen/cm<sup>2</sup>, für Osteoblasten  $2,2$  bis  $2,6 \cdot 10^3$  Zellen/cm<sup>2</sup> und für hMSC  $3,2$  bis  $3,3 \cdot 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup>. Bei eBeam-modifizierten Proben wurden die Versuche, sofern nicht anders angegeben, direkt nach der Modifizierung angesetzt.

#### 4.9.2. Fluoreszenzfärbung

Die Fluoreszenzfärbung wurde zur Anfärbung der zellulären Hauptbestandteile genutzt. Damit wurde die Zellmorphologie bewertet. Weiterhin wurde die Kernfärbung genutzt, um die Zellzahl zu bestimmen. Die Zellzahl wurde auf eine Flächeneinheit von 1 mm<sup>2</sup> bezogen. Nach Inkubation der Zellen auf den zu untersuchenden Oberflächen wurden diese mit PBS gewaschen und für 10 min. mit 4 %igem Formaldehyd (in PBS) fixiert.



Anschließend wurde erneut dreifach mit PBS gewaschen und es erfolgte die Permeabilisierung für 5 min. mit eiskaltem Triton-X (0,5 % in PBS), um die Zellen den Fluoreszenzfarbstoffen zugänglich zu machen. Nach erneutem dreifachen Waschen mit PBS wurden die unspezifischen Bindungen für 10 min. mit serumhaltigem PBS (2 %; FCS: PAN Charge P121707) blockiert. Dieser Schritt wurde dreimal wiederholt. Die Markierung des Zytoskeletts erfolgte mit TRITC-konjugiertem Phalloidin (1:100 in 2 % serumhaltigem PBS; Phalloidin-TRITC: Sigma Aldrich: P1951-1MG) für eine Stunde im Dunkeln. Danach wurde erneut dreifach mit PBS gewaschen. Die Zellkerne wurden für 5 min. im Dunkeln mit DAPI angefärbt (1:50 in PBS; DAPI: VWR A4099.0005). Für die Zellkernfärbung zur Bestimmung der Zellzahl wurde das Zytoskelett nicht angefärbt.

Für die Dokumentation von Zellmorphologie bzw. Zellzahl wurde das Fluoreszenzmikroskop *BX61* von Olympus mit der Kamera *XM10* sowie der Anregungseinheit *MT20* genutzt. Die DAPI-Anregung fand bei 350 nm statt und die TRITC-Anregung bei 494 nm, detektiert wurde entsprechend bei 470 nm und 576 nm.

#### 4.9.3. Resazurintest

Zur Bestimmung der Stoffwechselaktivität wurde der Resazurintest herangezogen. Resazurin wird durch metabolisch aktive Zellen umgesetzt, wobei durch die Reduktion des Farbstoffes eine Farbänderung von blau zu pink stattfindet. Dabei wird Resorufin gebildet. Dieses kann photometrisch quantifiziert werden, wodurch die Stoffwechselaktivität in Relation zu einem mitgeführten Standard bestimmt werden kann.

Für die Untersuchungen wurden dem Zellkulturmedium nach der Inkubationszeit 10 % vol. Resazurininlösung (Gebrauchslösung von VWR, Art. Nr.: BTIU30025-2) zugegeben und vorsichtig durchmischt. Die Inkubationszeit mit Resazurin betrug zwei Stunden unter Standardkulturbedingungen. Danach wurden je 100 µL pro Probenansatz in eine 96-Wellplatte überführt und mit dem Multititerplatten-Reader (MTP-Reader) *infinite 200* der Firma Tecan mit der Auswertesoftware *Tecan i-control 1.8.50.0* ausgewertet. Die Anregung erfolgte bei 560 nm, die Emission wurde bei 590 nm

gemessen. Als Blank wurde das jeweilige Zellkulturmedium gleichermaßen mit Resazurin versetzt, inkubiert und gemessen.

Zur Bestimmung einer zellbezogenen Aussage (Resazurinumsatz pro Zelle) wurde anschließend eine Zellzählung durch Fluoreszenzfärbung wie in Kapitel 4.9.2 beschrieben durchgeführt und die Gesamtzellzahl pro Probe bestimmt. Die bestimmte Gesamt-Stoffwechselaktivität wurde darauf bezogen und als zelluläre Stoffwechselaktivität definiert. Für eine vereinfachte Darstellung wurden die Standards jeweils auf 100 % normiert und die Proben dazu in Relation gesetzt.

#### 4.9.4. Vitalfärbung mit Propidiumiodid

Die Färbung mittels Propidiumiodid (PI) diente der Bestimmung der vitalen und apoptotisch/nekrotischen Anteile an der Gesamtzellzahl. Sowohl in nekrotische als auch apoptotische Zellen kann der Farbstoff aufgrund der zunehmenden Permeabilität der Zellmembran eindringen. Demnach weisen solche Zellen eine größere PI-Intensität bei optischer Anregung auf. Damit können aus einem Zellgemisch mittels Fluoreszenzanregung durch die Intensität der PI-Aufnahme die Anteile vitaler, apoptotischer und nekrotischer Zellen bestimmt werden. Grundlage dieser Analyseverfahren bilden die Untersuchungen von Zamai et al. [195].

Für die Untersuchungen wurden die Zellen für drei Tage auf den DLC-Beschichtungen inkubiert. Anschließend wurden 50 µg/mL PI (Sigma Aldrich, Art. Nr.: 81845-25MG) zugegeben und die Proben unter gleich bleibenden Bedingungen für 30 min. inkubiert. Die Zellen wurden dann von den Oberflächen abgelöst (Trypsinieren, Zentrifugieren), vom Überstand getrennt und in PBS für die Messung am Durchflusszytometer resuspendiert. Für die Auswertung wurde das Durchflusszytometer *FACScan* der Firma Becton Dickinson genutzt. Die Anregung erfolgte bei 488 nm, detektiert wurde bei  $585 \pm 42$  nm. Pro Probe wurden 5.000 bis 10.000 Zellen gemessen.

Für die Einordnung der vitalen Zellen wurde entsprechend der Definition zu Beginn dieses Kapitels ein Standard mitgeführt. Für die Einordnung der apoptotisch/nekrotischen Zellen wurde eine Negativkontrolle mitgeführt. Diese wurde

zunächst wie der Standard behandelt, jedoch wurde 5 min. vor der PI-Zugabe eiskalter Ethanol (25 % vol.; VWR, Art. Nr.: 20.827.365) zugegeben, um apoptotisch/nekrotische Veränderungen zu induzieren.

#### 4.9.5. ELISA-Assay

Zur Untersuchung des Entzündungspotentials wurde die Interleukinausschüttung für Interleukin-6 (IL-6) und Interleukin-8 (IL-8) mittels Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) untersucht. Dafür wurden die Testkits *Human IL-6 ELISA Set (RUO)* (Art. Nr.: 555220) und *Human IL-8 ELISA Set (RUO)* (Art. Nr.: 555244) von BD Bioscience Germany entsprechend der Herstellerangaben genutzt. Als Negativkontrolle dienten mit Lipopolysaccharid (LPS) stimulierte Zellen (1 µg LPS/mL Medium), die unter gleichen Bedingungen inkubiert und ausgewertet wurden. Die Messung erfolgte photometrisch über die Bestimmung der Absorption bei 450 nm, die Wellenlängenkorrektur erfolgte bei 570 nm. Zur Kalibrierung wurde jeweils ein Standard entsprechend der Angaben im Testkit mitgeführt.

#### 4.9.6. Zellzyklusanalyse mit Propidiumiodid

Für die Zellvermehrung ist es nötig, dass eukaryotische Zellen eine Teilung durchführen. Der Zeitraum von einer Zellteilung bis zur nächsten wird als mitotischer Zellzyklus bezeichnet. Der Zellzyklus besteht im Allgemeinen aus vier Hauptphasen und dient der Verdopplung sämtlicher zellulärer Bestandteile. Der Zellzyklus einer Tochterzelle beginnt nach der Teilung mit der G1-Phase, in welcher Zellorganelle und Plasma synthetisiert werden. Weiterhin werden in dieser Phase die äußeren Bedingungen überprüft, bevor der Zellzyklus weiter durchlaufen wird. Bei ungünstigen Umgebungsbedingungen könne Zellen an dieser Stelle auch in die G0-Phase übergehen und so einen Zeitraum von wenigen Tagen bis zu einigen Jahren überdauern. Der G1-Phase schließt sich die S-Phase an, in welcher die Verdopplung der DNA realisiert wird, anschließend liegt wieder ein diploider Chromosomensatz vor. In der folgenden G2-Phase wird die Mitose durch Proteinsynthese vorbereitet. G1- bis G2-Phase werden auch als Interphase bezeichnet. Es schließt sich die M-Phase an, in der die Kern- und

Zellteilung realisiert werden. Eine ausführliche Übersicht zu den intrazellulären Vorgängen während der einzelnen Phasen des Zellzyklus finden sich im Werk von Alberts et al. [127].

Aufgrund des unterschiedlichen DNA-Gehaltes einer Zelle in G1-, S- und G2/M-Phase kann die Zellzyklusphase einer Zelle durch DNA-Quantifizierung bestimmt werden, wobei G2- und M-Phase zusammengefasst betrachtet werden. Zur Anfärbung der DNA wurde PI (Sigma Aldrich, Art. Nr.: 81845-25MG) genutzt. Die Zellen wurden zunächst nach Standardbedingungen kultiviert. Anschließend wurden die Zellen durch Trypsinieren abgelöst, zentrifugiert und in kaltem PBS resuspendiert. Zur Permeabilisierung wurde tiefgekühlter (-20°C) Ethanol bis zu einer Endkonzentration von 70 % zugegeben und die Zellen bei 4 °C für mindestens 4 h inkubiert. Der Verdau von RNA erfolgte durch Zugabe von RNase (50 µg/mL) für 30 min. bei 37 °C. Anschließend wurden zur DNA-Färbung PI bis zu einer Endkonzentration von 50 µg/mL zugegeben und 5 min. bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Die Analyse der Zellsuspension erfolgte am Durchflusszytometer. Pro Probe wurden mindestens 5.000 Events aufgenommen. Die Anregung erfolgte bei 488 nm und die Detektion bei 585 nm. Die Auswertung erfolgte im Histogramm über die Definition von Gates für G1-, S- und G2/M-Phase, in denen die prozentualen Anteile der jeweiligen Events ermittelt wurden.

#### 4.9.7. Untersuchungen zur Proteinadhäsion

Für die Versuche wurden runde DLC-Flachproben genutzt. Als Negativ- und Positivreferenzen dienten formgleiche, antiadhäsive Plastikoberflächen (VWR: 734-1707) bzw. adhäsionsfördernde Plastikoberflächen (VWR: 734-0070) aus der Zellkultur. Es wurden 20 µg fluoreszenzmarkiertes Fibronectin (Cytoskeleton: green fluorescent, HiLyte 488; Art.Nr.: FNR02-A) in 1 mL PBS gelöst. Die Probenoberfläche (346 mm<sup>2</sup>) wurde mit 90 µL der Fibronectinlösung in Kontakt gebracht und für eine Stunde bei 37 °C und 96 % relativer Luftfeuchte im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Proben durch zweifaches Eintauchen in frisches PBS gewaschen. Mittels MTP-Reader (*infinite 200*, Firma Tecan, Auswertesoftware *Tecan i-control 1.8.50.0*) wurde dann die Fluoreszenzintensität als Maß für die Fibronectinadhäsion gemessen.

Die Anregung erfolgte bei 492 nm und die Emission wurde bei 527 nm aufgenommen. Es wurden fünf Messpunkte pro Probe gemessen. Als Blank wurden die jeweiligen Probensubstrate gleichermaßen behandelt, jedoch ohne Fibronectin inkubiert. Für die Auswertung wurde der Blank des jeweiligen Probensubstrates auf 100 % normiert und die Proben jeweils in Relation dazu abgebildet.

#### 4.9.8. Bewertung der osteogenen Differenzierung

Für die Untersuchungen wurden humane mesenchymale Stammzellen (hMSC) genutzt, welche aus dem Knochenmarkspirat von zwei gesunden Spendern (Donor 6 und 10, Tabelle 6) mittels Dichtegradientenzentrifugation und Plastikadhärenz gewonnen wurden. Die hMSC wurden kryokonserviert in flüssigem Stickstoff gelagert. Für die Versuche wurden die Zellen aufgetaut und in Stammzellmedium bis zu 80 %iger Konfluenz kultiviert. Der Mediumwechsel erfolgte zweimal pro Woche. Anschließend wurden die Zellen nach Ablösen und Waschen in frischem Stammzellmedium auf den DLC-Beschichtungen ausgesät. Eine Zelldichte von  $3,2$  bis  $3,3 \cdot 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup> wurde dafür eingestellt. Die osteogene Differenzierung wurde nach 24 h induziert, indem das Medium durch Differenzierungsmedium ausgetauscht wurde (Tabelle 10). Als Negativkontrolle wurden hMSC in Kontrollmedium mitgeführt. Die Differenzierung erfolgte für 14 Tage. Danach wurden der Alkalische Phosphatase- (ALP), DNA- und Calciumgehalt bestimmt. Die ALP-Bestimmung erfolgte mit dem Testkit *Sensolyte® pNPP Alkaline Phosphatase Assay Kit Colorimetric* (AnaSpec, 72146) entsprechend der Herstellerangaben. Die DNA-Bestimmung erfolgte mit dem Testkit *Quant-IT™ PicoGreen® dsDNA Assay Kit* (Invitrogen, P11496) entsprechend der Herstellerangaben. Die Calcium-Bestimmung erfolgte mit dem Testkit *CALCIUM (Ca) Colorimetric Method RX SERIES Kit* (Randox, Ca3871) entsprechend der Herstellerangaben. ALP- und Calciumgehalt wurden dann auf die detektierte DNA-Menge referenziert. Als Standards wurden herkömmliche Zellkulturoberflächen (TCP (Tissue Culture Plate-Oberflächen)) genutzt.

#### 4.9.9. Untersuchungen zur Barrierewirkung

Die biologische Bewertung der Barrierewirkung von DLC-Schichten auf FGL wurde durch zweimonatige Extraktion der Proben in PBS bzw. in Zellkulturmedium für Osteoblasten (Vergl. Kapitel 4.9) unter Standardkulturbedingungen untersucht. Da das im Osteoblastenmedium enthaltene Glutamin über diesen Zeitraum bei 37 °C nicht stabil ist, wurde auf den Glutaminzusatz für das Medium zur Extraktion verzichtet. Die Extrakte wurden nach der Inkubationszeit auf drei Tage zuvor kultivierte Osteoblasten gegeben. Diese wurden für 72 h mit einer Startzelldichte von  $2,5 \cdot 10^4$  Zellen/mL unter Standardkulturbedingungen in 96-Wellplatten (100 µL pro Well) vorkultiviert. Die Extrakte wurden für 16 h (PBS) und 24 h (Medium) auf den Zellen belassen. Anschließend erfolgte die Messung der Stoffwechselaktivität mittels Resazurintest. Die Einordnung der Ergebnisse erfolgte über eine Standardreihe, für welche die Zellen unter gleichen Bedingungen vorbereitet wurden und anschließend mit Medium bzw. PBS inkubiert wurden, welches mit verschiedenen Nickelkonzentration versetzt war. Als Nickelquelle diente dabei  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (Sigma Aldrich, Art. Nr.: N6136-100g). Es wurden Nickelkonzentrationen von 1, 10, 50 und 100 ppm genutzt. Zusätzlich wurde die Zellmorphologie von Osteoblasten nach eintägigem Direktkontakt auf unbeschichteten und DLC-beschichteten FGL bewertet. Dafür wurde die in Kapitel 4.9.2 beschriebene Vorgehensweise zur Fluoreszenzfärbung der Zellen genutzt.

#### 4.10. Statistik

Alle Untersuchungen wurden, sofern nicht anders angegeben, in mindestens drei unabhängigen Versuchen durchgeführt. Mittelwerte und deren Standardabweichungen wurden mittels *Excel 2013* (Microsoft Office 2013) berechnet. Die ermittelten Daten wurden mit dem Programm *GraphPad Prism* (Version 6.01) auf statistische Signifikanz geprüft. Dafür wurde zunächst auf Ausreißer untersucht (ROUT, Q = 5%) und diese ggf. entfernt. Bei ausreichender Datengrundlage ( $n > 4$ ) wurde mittels Kolmogorov-Smirnov-Test (Dallal-Wilkinson-Lilliefors P-Wert; Konfidenzlevel 95%) auf Normalverteilung der Daten geprüft. Bestätigte sich eine Normalverteilung, wurde ein T-Test (ungepaart, zweiseitig, Konfidenzlevel 95%, mit *Welch's Correction*) durchgeführt. Lag keine Normalverteilung vor bzw. konnte diese nicht geprüft werden,

so wurde ein Mann-Whitney-Test (ungepaart, zweiseitig, Konfidenzlevel 95%) zur Signifikanzprüfung durchgeführt. Ergebnisse mit signifikanten Unterschieden wurden mit \* gekennzeichnet.

## 5. Ergebnisse

### 5.1. Vergleich der Abscheidemethoden für DLC-Beschichtungen

Die vorliegende Arbeit ist in zwei Abschnitte gegliedert. Im ersten Abschnitt werden verschiedene Abscheidemethoden für diamantähnlichen Kohlenstoff (DLC) untersucht. Dabei steht der Vergleich der verschiedenen DLC-Beschichtungen hinsichtlich biologischer Verträglichkeit, Sterilisationsfestigkeit sowie der Möglichkeit zur Modifizierung mittels Elektronenstrahl (eBeam) im Mittelpunkt. Die Ergebnisse von Abschnitt 1 sind die Grundlage für die Auswahl einer Abscheidemethode. Die ausgewählte Abscheidemethode wird dann zur Abscheidung von DLC-Beschichtungen für die vertiefenden Fragestellungen zur eBeam-Modifizierung, der Biokompatibilität und dem Anwendungsbeispiel in Abschnitt 2 genutzt.

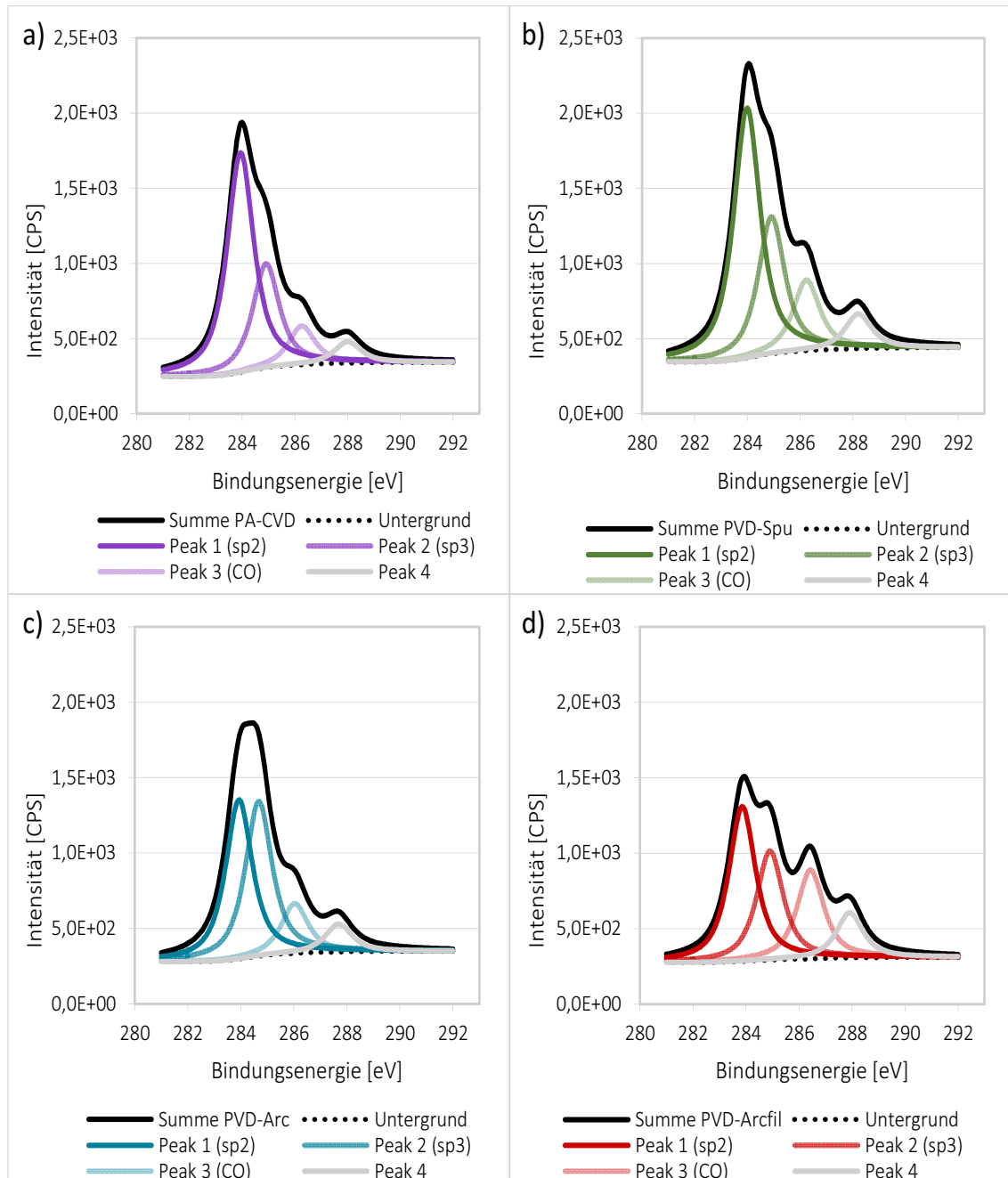
#### 5.1.1. Charakterisierung der verschiedenen DLC-Beschichtungen

##### **Zusammensetzung der abgeschiedenen DLC-Schichten**

Die Schichtzusammensetzung wurde hinsichtlich der Stöchiometrie von  $sp^2$ - und  $sp^3$ -hybridisiertem Kohlenstoff untersucht. Dafür wurde mittels XPS-Analytik die Zusammensetzung des C1s Peaks analysiert. Aus den gefitteten und entfaltenen Peaks (Abbildung 13) ergibt sich durch die Auftragung der Flächenanteile der jeweiligen Peaks die Stöchiometrie der  $sp^2$ - und  $sp^3$ -hybridisierten Kohlenstoffatome sowie CO-Bindungen (Abbildung 14). Es zeigt sich, dass die mittels PA-CVD abgeschiedenen DLC-Beschichtungen mit 56 % den höchsten  $sp^2$ -Gehalt aufweisen. Der  $sp^3$ -Gehalt dieser Schichten liegt bei 29 % und der CO-Gehalt ist mit 10 % am geringsten im Vergleich zu den Beschichtungen der weiteren Abscheidemethoden. Die mittels PVD-Spu abgeschiedenen DLC-Beschichtungen zeigen mit 49 % einen geringeren  $sp^2$ -Gehalt. Der  $sp^3$ -Gehalt liegt mit 28 % im gleichen Bereich wie bei den PA-CVD-Beschichtungen. Der CO-Gehalt liegt bei 16 %. Die mittels PVD-Arc abgeschiedenen DLC-Beschichtungen weisen mit 30 % bzw. 29 % nahezu identische  $sp^2$ - und  $sp^3$ -Anteile auf und bewegen sich damit zwischen PA-CVD und PVD-Spu. Der CO-Gehalt

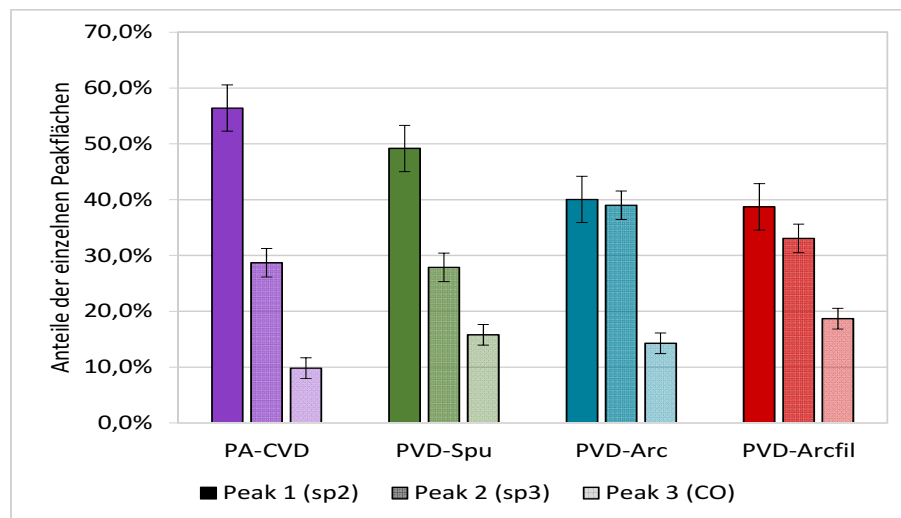


liegt hier ähnlich wie bei PVD-Spu bei 14 %. DLC-Beschichtungen, die mittels PVD-Arcfil abgeschieden wurden zeigen mit 39 % den geringsten  $sp^2$ -Gehalt, der  $sp^3$ -Gehalt liegt mit 33 % knapp darunter. Der CO-Gehalt dieser Schichten liegt bei 19 %.



**Abbildung 13: Spektren der XPS-Analyse der verschiedenen DLC-Beschichtungen**

Dargestellt sind die Spektren der XPS-Analyse der DLC-Beschichtungen im Bereich des C1s Peaks nach der Abscheidung mittels folgender Verfahren: PA-CVD (a), PVD-Spu (b), PVD-Arc (c), PVD-Arcfil (d). Nach Anpassung der Linienform über eine Gauß-Lorentz-Mischfunktion wurden die Flächenanteile der gefitteten Peaks ermittelt (Abbildung 14). Den gefundenen Peaks konnten  $sp^2$ -,  $sp^3$ - und CO-Bindungsanteile zugeordnet werden. Zudem wurde ein vierter, nicht näher definierter Peak ermittelt.



**Abbildung 14: Sp<sup>2</sup>-, sp<sup>3</sup>- und CO-Bindungsanteile der verschiedenen DLC-Beschichtungen**

Dargestellt sind die sp<sup>2</sup>-, sp<sup>3</sup>- und CO-Bindungsanteile der verschiedenen DLC-Beschichtungen, die durch die Auswertung der in Abbildung 13 gefitteten Spektren ermittelt wurden. Die farbliche Abstufung in Grautönen entspricht dabei den jeweiligen Peaks. Am Beispiel der PA-CVD-Beschichtungen bedeutet das: dunkles Lila entspricht Dunkelgrau und damit Peak 1. Mittleres Lila entspricht dem mittleren Grau und damit Peak 2. Helles Lila entspricht Hellgrau und damit Peak 3.

Der sp<sup>2</sup>-Gehalt für die verschiedenen Schichten nimmt folgendermaßen ab: PA-CVD, PVD-Spu, PVD-Arc und PVD-Arcfil, gleichermaßen nimmt der CO-Gehalt zu, wobei PVD-Spu und PVD-Arc einen vergleichbaren Werte aufweisen. Der sp<sup>3</sup>-Gehalt ist für PA-CVD und PVD-Spu im Vergleich am geringsten, PVD-Arcfil und PVD-Arc zeigen einen höheren sp<sup>3</sup>-Gehalt, wobei PVD-Arc den höchsten aufweist.

### Schichtdicke

Die Schichtdicke wurde mit dem Kalottenschliff-Verfahren ermittelt. PA-CVD-, PVD-Arc- und PVD-Arcfil-Schichten weisen mit 1,48 µm, 1,35 µm und 1,45 µm Schichtdicken im gleichen Größenbereich auf (Tabelle 12). Mittels PVD-Spu abgeschiedene DLC-Beschichtungen zeigen eine Dicke von 1,14 µm und sind damit 0,2 µm bis 0,3 µm dünner im Vergleich zu den anderen Beschichtungen. Alle genutzten Abscheidemethoden erfüllten die Zielvorgabe einer Schichtdicke von mindestens 1 µm.

**Tabelle 12: Schichtdicke der verschiedenen DLC-Beschichtungen**

Abscheidemethode	Mittelwert [µm]
PA-CVD	1,48 ± 0,19
PVD-Spu	1,14 ± 0,23
PVD-Arc	1,35 ± 0,15
PVD-Arcfil	1,45 ± 0,44

## Haftfestigkeit

Die Haftfestigkeit der verschiedenen DLC-Beschichtungen auf dem Substrat wurde über den Rockwelltest bestimmt. Es ist zu beachten, dass die weichen Edelstahlsubstrate die Anforderungen der VDI 3198 zur Haftfestigkeitsbestimmung nicht hinreichend erfüllen und die Messungen somit nur eingeschränkt aussagefähig sind. Die Haftfestigkeit wurde sowohl vor als auch nach durchgeführter eBeam-Modifizierung untersucht und in allen Fällen mit Haftfestigkeitsklasse 1 (HF 1) entsprechend der VDI 3198 bewertet. Abbildung 15 zeigt beispielhaft die lichtmikroskopischen Bilder zur Auswertung des Rockwelltests an den verschiedenen DLC-Beschichtungen im unbehandelten Zustand.

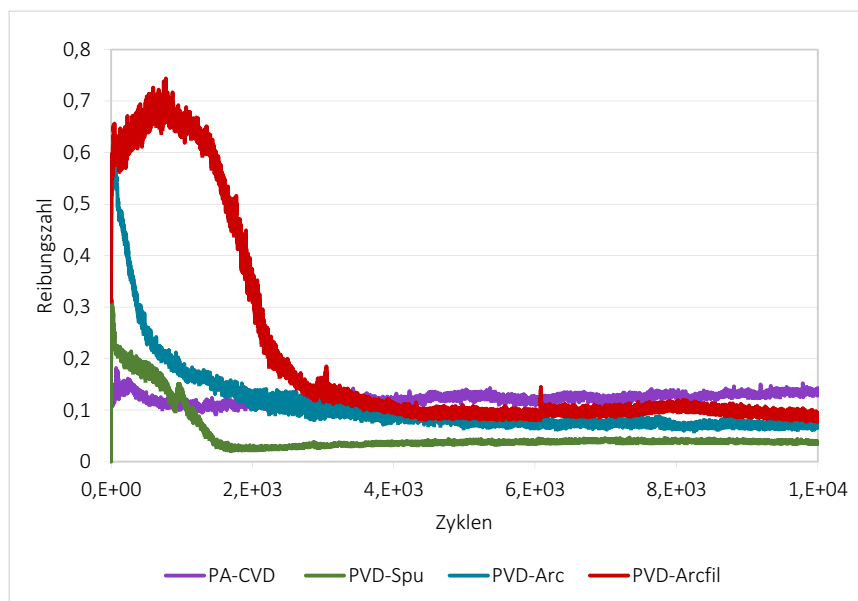


**Abbildung 15: Haftfestigkeitsbestimmung der verschiedenen DLC-Beschichtungen**

Dargestellt sind die Ergebnisse des Rockwelltests an den DLC-Beschichtungen, welche mit folgenden Abscheidungsverfahren hergestellt wurden: PA-CVD (a), PVD-Spu (b), PVD-Arc (c), PVD-Arcfil (d). Die Bewertung der Ergebnisse entsprechend VDI 3198 ergab für alle Beschichtungen eine Haftfestigkeit von HF1 (Vergl. [Abbildung 6](#)).

## Reibungszahl

Die Reibeigenschaften der DLC-Beschichtungen wurden mittels oszillierender Tribometermessung bewertet. Dafür wurden 10.000 Zyklen gefahren, währenddessen wurde die Reibungszahl kontinuierlich aufgezeichnet. Nach einer Einlaufphase von etwa 2.000 Zyklen ist die tatsächliche Reibungszahl in Abbildung 16 am konstanten Plateau abzulesen. Die Reibungszahlen nehmen in der Einlaufphase kontinuierlich ab. Bei den mittels PVD-Arcfil abgeschiedenen DLC-Beschichtungen hingegen kommt es zunächst zu einem Anstieg der Reibungszahl. Zudem weisen diese Beschichtungen mit ca. 3.000 Zyklen die längste Einlaufphase auf. Nach Überwinden der Einlaufphase zeigen alle Beschichtungen Reibungszahlen zwischen 0,05 bis 0,15 wobei PVD-Spu-Schichten mit 0,05 die geringste Reibungszahl aufweisen.



**Abbildung 16: Reibungszahl der verschiedenen DLC-Beschichtungen**

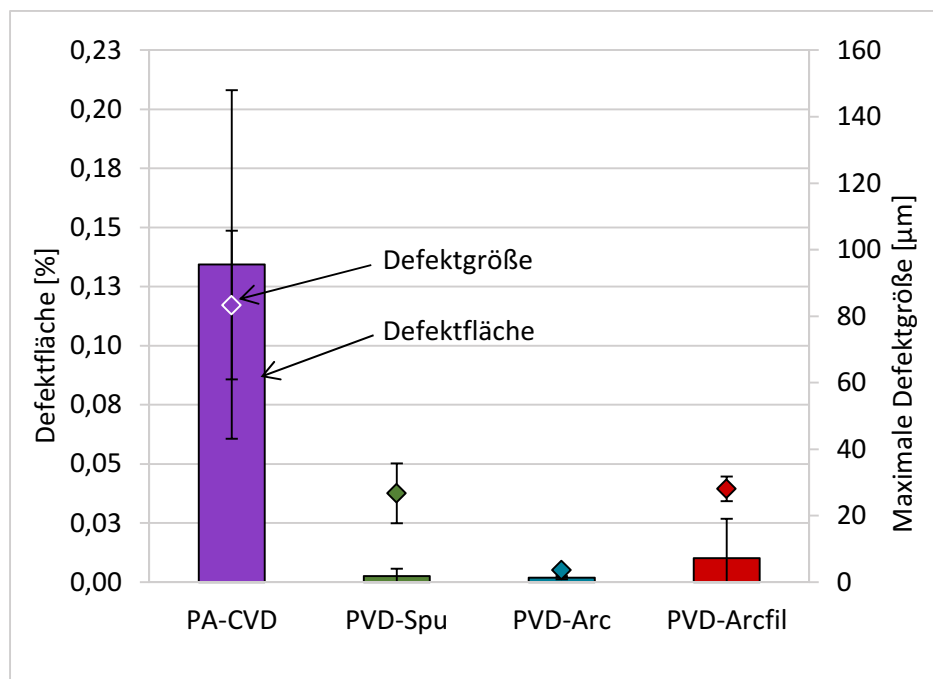
*Dargestellt ist die Reibungszahl im Verlauf der untersuchten Zyklen. Die oszillierende Tribometermessung wurde mit insgesamt 10.000 Zyklen durchgeführt. Innerhalb der Einlaufphase, welche 2.000 bis 3.000 Zyklen beträgt, verändert sich die Reibungszahl. Anschließend bildet sich ein konstantes Plateau aus, an dem die tatsächliche Reibungszahl abgelesen werden kann.*

## Sterilisationsfestigkeit

Zur Untersuchung der Sterilisationsfestigkeit wurde ein Sterilisationsregime aus insgesamt 80 Zyklen nachempfunden (Vergl. 4.7). Zur Bewertung wurde die Veränderung der Defektfläche herangezogen. Diese wurde nach 10, 30, und 80 Sterilisationszyklen mikroskopisch ermittelt. Im Ausgangszustand wurde neben der

Defektfläche auch die maximal ermittelte Defektgröße dokumentiert (Abbildung 17). Die Defektfläche wurde wie in Kapitel 4.7 beschrieben als Summe der Einzelflächen aller auf der betrachteten Oberfläche nachweisbaren Defekte bzw. Summe derer Flächen definiert. Die maximale Defektgröße wurde als Durchmesser des größten detektierten Defektes auf der betrachteten Oberfläche definiert.

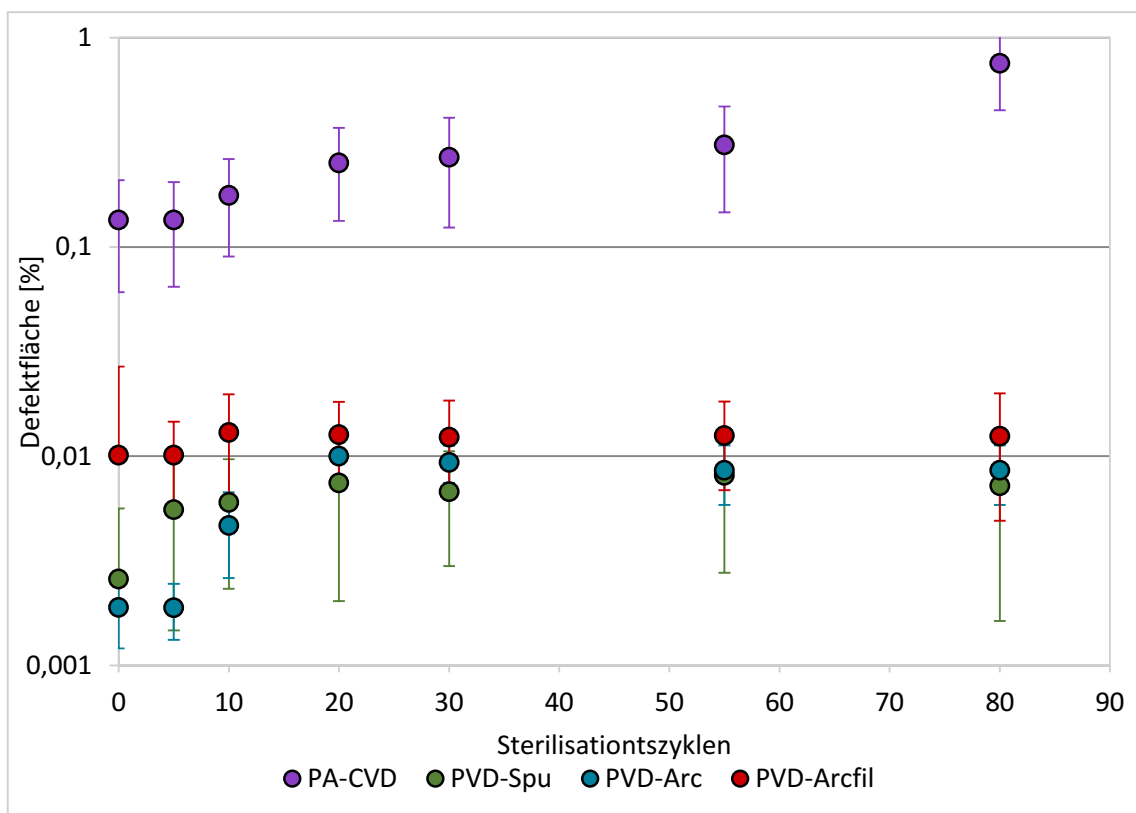
Bereits im Ausgangszustand (Abbildung 17) weisen die mittels PA-CVD abgeschiedenen DLC-Beschichtungen mit 0,14 % eine ca. 10-fach größere Defektfläche auf als die Beschichtungen der restlichen Abscheidemethoden, welche sich im Bereich von 0,01 % bis 0,02 % bewegen. Auch die maximal detektierte Defektgröße ist mit knapp 90  $\mu\text{m}$  bei PA-CVD-Schichten im Vergleich deutlich höher. Die Defekte auf mittels PVD-Spu und PVD-Arcfil abgeschiedenen DLC-Beschichtungen bewegen sich im Bereich von 30  $\mu\text{m}$  und PVD-Arc-Beschichtungen zeigen mit 5  $\mu\text{m}$  im Vergleich die kleinsten Defekte.



**Abbildung 17: Defektfläche und -größe der verschiedenen DLC-Schichten im Ausgangszustand**

Dargestellt sind die Defektfläche und die maximale Defektgröße der verschiedenen DLC-Beschichtungen im Ausgangszustand (direkt nach der Beschichtung). Die Defektfläche wurde als Summe der Einzelflächen aller auf der betrachteten Oberfläche nachweisbaren Defekte bzw. Summe deren Fläche definiert. Die maximale Defektgröße wurde als Durchmesser des größten detektierten Defektes auf der betrachteten Oberfläche definiert.

Im Verlauf der Sterilisationszyklen zeigt sich ein vergleichbares Bild hinsichtlich der Veränderung der Defektfläche (Abbildung 18). Für PA-CVD liegt diese nach 80 Sterilisationszyklen mit 0,76 % knapp zwei log-Stufen höher als die Defektflächen der anderen Beschichtungen. PVD-Spu und PVD-Arc zeigen innerhalb der ersten 20 Zyklen einen geringen Anstieg von ursprünglich 0,003 % bzw. 0,002 % auf Werte im Bereich zwischen 0,007 % und 0,010 %, diese Werte bleiben bis zum 80sten Sterilisationszyklus konstant. PVD-Arcfil-Beschichtungen zeigen durchgehend einen konstanten Wert von 0,01 %. In Abbildung 18 ist die logarithmische Auftragung der Daten zu beachten.



**Abbildung 18: Entwicklung der Defektflächen während der Sterilisationszyklen**

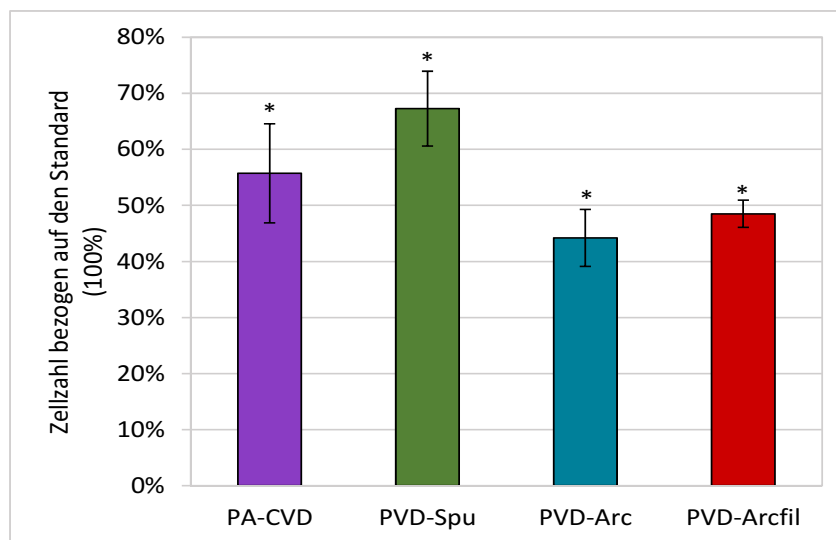
Dargestellt ist die Entwicklung der Defektfläche auf den verschiedenen DLC-Beschichtungen während des Durchlaufens der insgesamt 80 Sterilisationszyklen. Zu beachten ist die logarithmische Darstellung der Ergebnisse. Die Defektfläche wurde als Summe der Einzelflächen aller auf der betrachteten Oberfläche nachweisbaren Defekte bzw. Summe deren Fläche definiert.

### 5.1.2. Biokompatibilität der verschiedenen DLC-Beschichtungen

Die hier dargestellten Untersuchungen wurden mit Fibroblasten durchgeführt (s. Kapitel 4.9.1). Sofern nicht anders angegeben wurden die Zellen für drei Tage unter den beschriebenen Kulturbedingungen auf den jeweiligen DLC-Beschichtungen kultiviert.

### Zellzahl humaner Fibroblasten auf den verschiedenen DLC-Schichten

Die Zellzahl pro Flächeneinheit wurde bestimmt, um die im folgenden Abschnitt untersuchte Stoffwechselaktivität darauf zu normieren und gleichzeitig eine Aussage über die Bioverträglichkeit der verschiedenen DLC-Beschichtungen zu erhalten. Die Zellzahl wurde nach dreitägiger Inkubation von humanen Fibroblasten auf den Proben bestimmt und wie in Kapitel 4.9.3 auf eine definierte Flächeneinheit bezogen. Um die verschiedenen DLC-Beschichtungen zu vergleichen, wurde der mitgeführte Standard auf 100 % normiert und die Messwerte der Proben entsprechend in Relation dargestellt. DLC-Beschichtungen, welche mittels PA-CVD abgeschieden wurden, weisen mit 56 % die zweithöchste Zellzahl auf (Abbildung 19). In Referenz zum Standard weisen PVD-Spu-Beschichtungen 68 % auf und zeigen damit die höchste Zellzahl. PVD-Arc und PVD-Arcfil-Schichten zeigen mit 45 % bzw. 49 % im Vergleich die niedrigste Zellzahl.



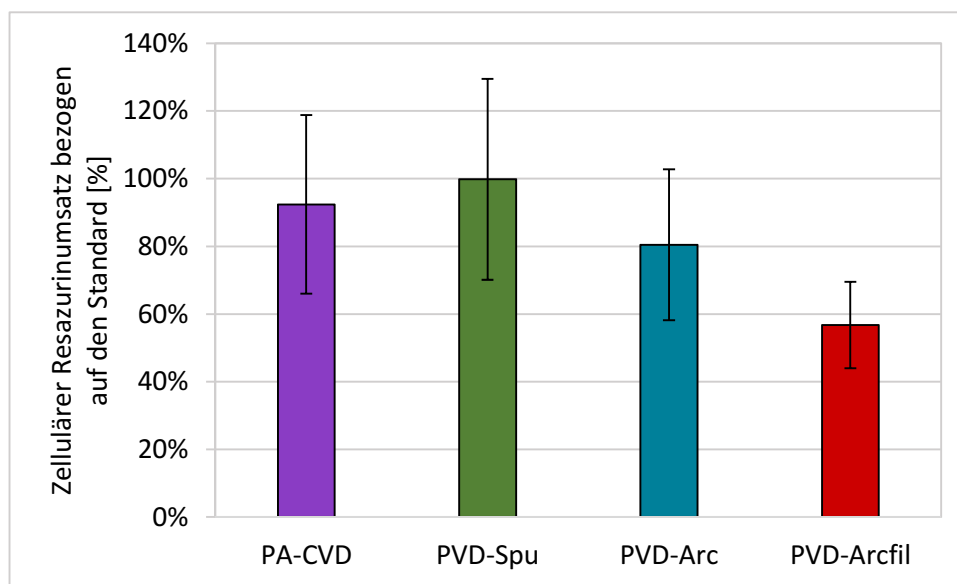
**Abbildung 19: Zellzahl humaner Fibroblasten auf den DLC-Beschichtungen**

Dargestellt ist die Zellzahl von humanen Fibroblasten pro Flächeneinheit nach dreitägiger Inkubation auf den Proben. Die über verschiedene Abscheidungsverfahren generierten DLC-Schichten sind im Vergleich und mit Bezug auf den Standard abgebildet. Dieser wurde auf 100 % normiert. Die Zellzahl wurde durch fluoreszenzmikroskopische Auszählung der Zellkerne in definierten Probenbereichen bestimmt, dafür wurden die Zellkerne mittels DAPI angefärbt.

### Stoffwechselaktivität humaner Fibroblasten auf den verschiedenen DLC-Schichten

Die Bestimmung der Stoffwechselaktivität diente zur vergleichenden Bewertung der Bioverträglichkeit der verschiedenen DLC-Beschichtungen und wurde über die Bestimmung des Resazurinumsatzes mit Bezug auf die Zellzahl ermittelt. Dafür wurden humane Fibroblasten für drei Tage auf den Proben inkubiert. Um die verschiedenen

DLC-Beschichtungen zu vergleichen, wurde der mitgeführte Standard auf 100 % normiert und die Messwerte der Proben entsprechend in Relation dargestellt. Abbildung 20 zeigt, dass die zelluläre Stoffwechselaktivität auf PA-CVD-Schichten bei 92 % liegt und damit den zweithöchsten Wert aufweist. Mit 100 % weisen Zellen auf PVD-Spu-Schichten die gleiche zelluläre Stoffwechselaktivität wie der Standard auf und im Vergleich der Beschichtungen den höchsten Wert. Zellen auf PVD-Arc-Schichten zeigen mit 80 % den dritthöchsten Wert und auf PVD-Arcfil-Schichten wird mit 58 % der geringste Wert erreicht.



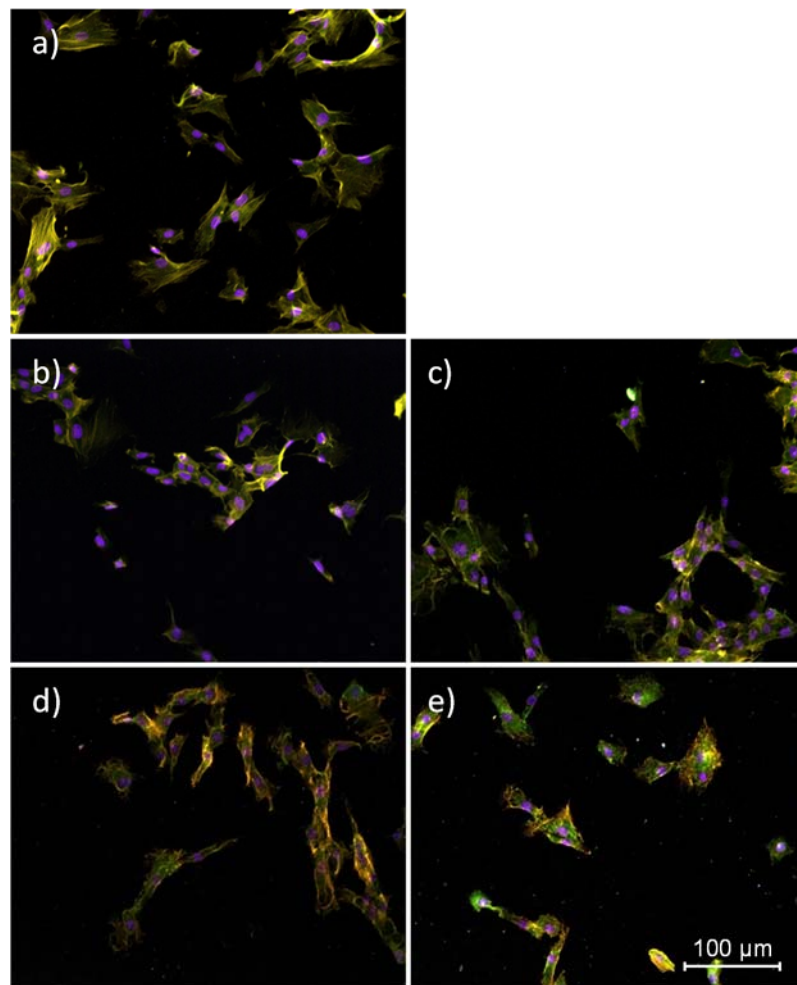
**Abbildung 20: Zelluläre Stoffwechselaktivität humaner Fibroblasten auf den DLC-Beschichtungen**  
 Dargestellt ist der zelluläre Resazurinumsatz als Maß für die zelluläre Stoffwechselaktivität von humanen Fibroblasten nach dreitägiger Inkubation auf den Proben. Die über verschiedene Abscheidungsverfahren generierten DLC-Beschichtungen sind im Vergleich abgebildet. Alle Proben sind mit Bezug auf den Standard dargestellt, welcher auf 100 % normiert wurde. Die zelluläre Stoffwechselaktivität ist durch den zellulären Resazurinumsatz bestimmt worden. Dafür wurde die Stoffwechselaktivität pro Probe auf die ermittelte Zellzahl pro Probe bezogen.

### Zellmorphologie humaner Fibroblasten auf den verschiedenen DLC-Schichten

Die Zellmorphologie wurde zur Bewertung der Bioverträglichkeit der verschiedenen DLC-Beschichtungen untersucht. Die Kultivierungszeit der humanen Fibroblasten auf den Proben betrug dabei einen Tag. Anschließend wurden das Zytoskelett und die Zellkerne angefärbt und fluoreszenzmikroskopisch begutachtet. Im Folgenden sind repräsentative Beispiele dargestellt. In Abbildung 21 wurden die Zellkerne mit DAPI (blau-violett) angefärbt und das Zytoskelett mit TRITC (gelb-rot). Die Zellen auf dem Standard (a) zeigen eine typische Zellmorphologie. Die Zellkerne sind intakt und zeigen



eine natürlich runde Form. Die Zellspreitung ist durch eine ovale Grundform gekennzeichnet. Auf PA-CVD-Schichten (b) zeigt sich eine leicht veränderte Zellmorphologie. Die Spreitung in ihrer ovalen Form ist im Vergleich zum Standard weniger dominant ausgeprägt. Die Zellen sind im Vergleich zum Standard komprimiert mit Tendenz zu einer runden Grundform und geringerer Spreitung. Auf PVD-Spu- und PVD-Arc-Beschichtungen (c bzw. d) ist die Zellmorphologie natürlich ausgeprägt und vergleichbar mit dem Standard. Zellen auf PVD-Arcfil-Schichten (e) weisen ebenfalls eine weniger ovale Form der Spreitung auf. Verglichen mit Zellen auf PA-CVD-Schichten tendiert auf diesen Beschichtungen die Zellform noch stärker zu einer komprimierten, runden Form.



**Abbildung 21: Morphologie humaner Fibroblasten auf den DLC-Beschichtungen**

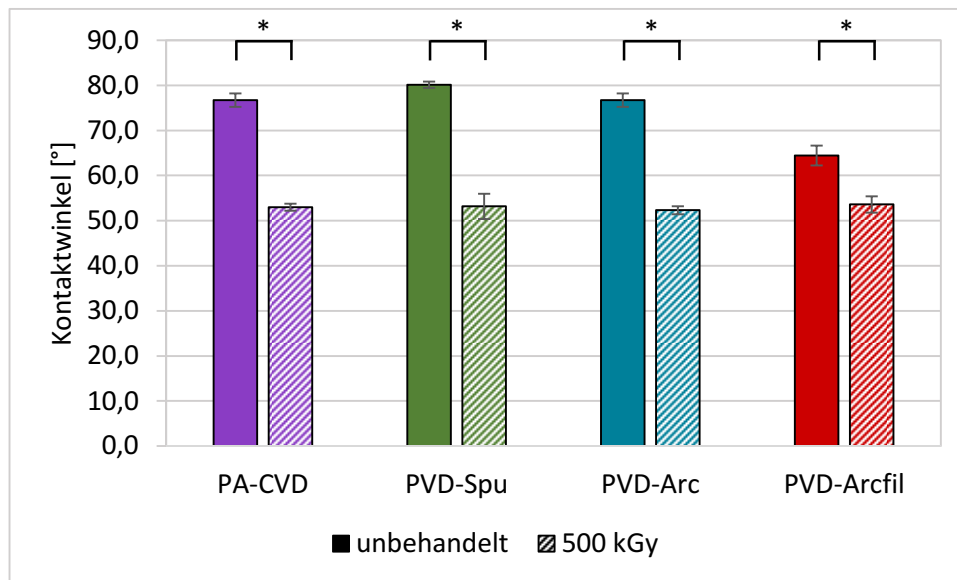
Dargestellt sind fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von humanen Fibroblasten auf den verschiedenen Probenoberflächen sowie dem Standard nach eintägiger Inkubation: a) Standard, b) PA-CVD, c) PVD-Spu, d) PVD-Arc, e) PVD-Arcfil. Angefärbt wurden das Zytoskelett (TRITC) und die Zellkerne (DAPI). Die Aufnahmen erfolgten bei 100facher Vergrößerung.

### 5.1.3. Elektronenstrahl-Modifizierung der verschiedenen DLC-Beschichtungen

Im Folgenden wird die Modifizierung der verschiedenen DLC-Beschichtungen mittels eBeam betrachtet. Dabei werden oberflächenanalytische Analysen zur Bewertung chemisch-energetischer Veränderungen der Beschichtungen genutzt. Zellbiologische Methoden dienen wiederum zur Abschätzung einer veränderten biologischen Reaktion auf die modifizierten Oberflächen.

#### **Kontaktwinkel und Oberflächenenergie**

Der Kontaktwinkel wurde mit destilliertem Wasser bestimmt. Zusätzlich kamen zwei weitere Messflüssigkeiten (Diiodmethan, Ethylenglykol) zum Einsatz, um anschließend die Oberflächenenergie der verschiedenen Proben zu berechnen. Die Messungen erfolgten vor und nach der eBeam-Modifizierung. Abbildung 22 zeigt, dass der Kontaktwinkel auf allen DLC-Schichten mit steigender eBeam-Dosis signifikant abnimmt. Die Verringerung liegt bei  $10^\circ$  bis  $20^\circ$ . Die DLC-Beschichtungen, welche mittels PA-CVD abgeschieden wurden, zeigen bei einem Ausgangswert von  $77^\circ$  nach einer Behandlung mit 500 kGy einen Kontaktwinkel von  $52^\circ$ . PVD-Spu-Schichten zeigen einen höheren Ausgangswert von  $80^\circ$  und eine Behandlung mit 500 kGy führt zu einer Abnahme auf ebenfalls  $52^\circ$ . PVD-Arc-schichten zeigen den gleichen Ausgangswert wie PA-CVD und auch die eBeam-Behandlung mit 500 kGy führt zu einem Wert von  $52^\circ$ . Lediglich PVD-Arcfil zeigt einen vergleichsweise geringen Ausgangswert von  $65^\circ$ , welcher nach Behandlung mit 500 kGy ebenfalls auf  $52^\circ$  reduziert wird. Insgesamt zeigt sich, dass die eBeam-Modifizierung von DLC-Beschichtungen in einer Hydrophilierung der Oberflächen resultiert. Daher kann die Kontaktwinkelmessung als Bewertungsmaß für weitere Untersuchungen herangezogen werden.

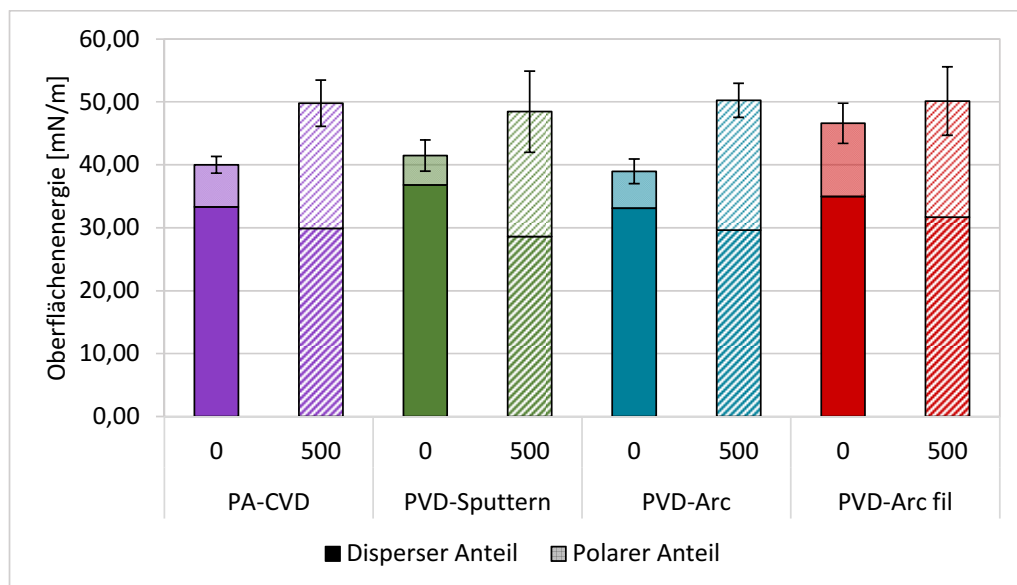


**Abbildung 22: Kontaktwinkel der unbehandelten und modifizierten DLC-Beschichtungen**

Dargestellt ist der Kontaktwinkel auf den verschiedenen DLC-Beschichtungen im Vergleich vor und nach eBeam-Modifizierung mit 500 kGy für die einzelnen Beschichtungen. Die eBeam-Modifizierung erfolgte in 50 kGy-Schritten bis zur entsprechenden Zieldosis.

In Abbildung 23 ist die Oberflächenenergie der verschiedenen DLC-Beschichtungen als Aufteilung in polaren und dispersen Anteil dargestellt. Weiterhin zeigt die Abbildung den Vergleich der verschiedenen Beschichtungen sowohl vor als auch nach Modifizierung mittels eBeam. Die Oberflächenenergie der verschiedenen DLC-Beschichtungen liegt im unbehandelten Zustand zwischen 39 mN/m und 47 mN/m. PA-CVD, PVD-Spu- und PVD-Arc-Beschichtungen liegen im Ausgangszustand mit 40 mN/m, 41 mN/m und 39 mN/m auf gleichem Niveau. PVD-Arcfil-Beschichtungen zeigen mit 47 mN/m einen höheren Ausgangswert. Nach einer Modifizierung mit 500 kGy steigt der Wert für PA-CVD-Schichten um 10 mN/m, für PVD-Spu-Schichten um 8 mN/m und für PVD-Arc-Schichten um 11 mN/m an. Die mittels PVD-Arcfil abgeschiedenen Beschichtungen zeigen nach 500 kGy eine geringere Zunahme von lediglich 3 mN/m. Bei Betrachtung der polaren und dispersen Anteile zeigt sich, dass bei allen Beschichtungen mit steigender eBeam-Dosis der polare Anteil zunimmt und der disperse sinkt. Die stärksten Veränderungen ergeben sich dabei wie bereits in der Betrachtung der gesamten Oberflächenenergie festgestellt für PA-CVD-, PVD-Spu- und PVD-Arc-Schichten. Diese DLC-Beschichtungen zeigen eine Zunahme der polaren Anteile um 14 mN/m bis 16 mN/m nach Modifizierung mit 500 kGy und erreichen damit im modifizierten Zustand einen vergleichbaren Wert für den polaren Anteil der

Oberflächenenergie von 20 mN/m. Für PVD-Arcfil-Schichten liegt der Ausgangswert der polaren Anteile bereits bei 12 mN/m. Die Modifizierung mit 500 kGy erhöht diesen um 6 mN/m auf 18 mN/m. Damit zeigen auch hier die PVD-Arcfil-Schichten die geringsten Veränderungen. Alle DLC-Beschichtungen zeigen nach Modifizierung mit 500 kGy einen vergleichbaren Wert der gesamten Oberflächenenergie und auch für deren polare Anteile.

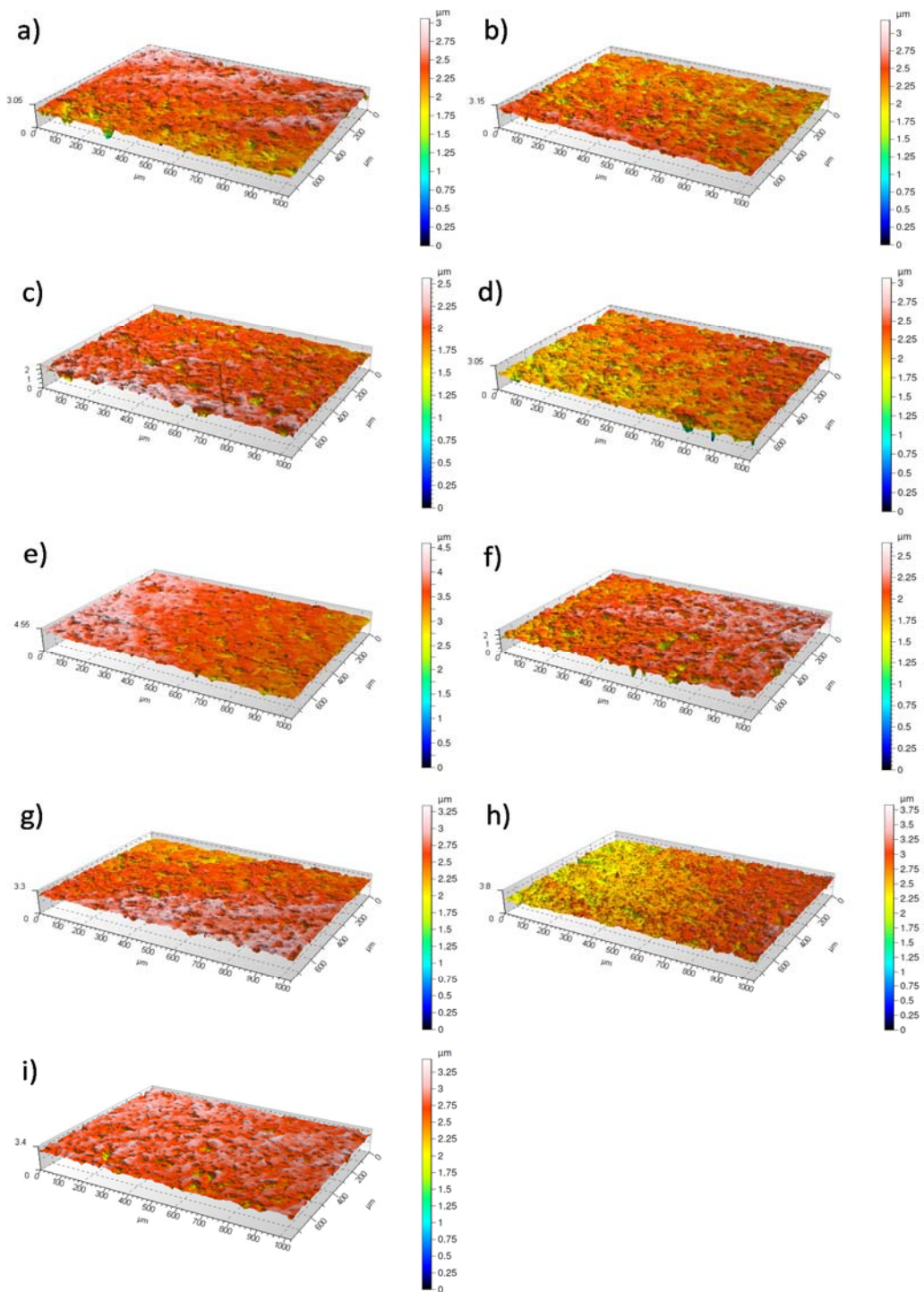


**Abbildung 23: Oberflächenenergie der unbehandelten und modifizierten DLC-Beschichtungen**

Dargestellt ist die Oberflächenenergie auf den verschiedenen DLC-Beschichtungen im Vergleich, die dispersen und polaren Anteile sind kumulativ dargestellt. Die Veränderung der Oberflächenenergie nach eBeam-Modifizierung ist für eine Dosis von 500 kGy dargestellt. Die eBeam-Modifizierung erfolgte in 50 kGy-Schritten bis zur Zieldosis.

## Rauigkeit

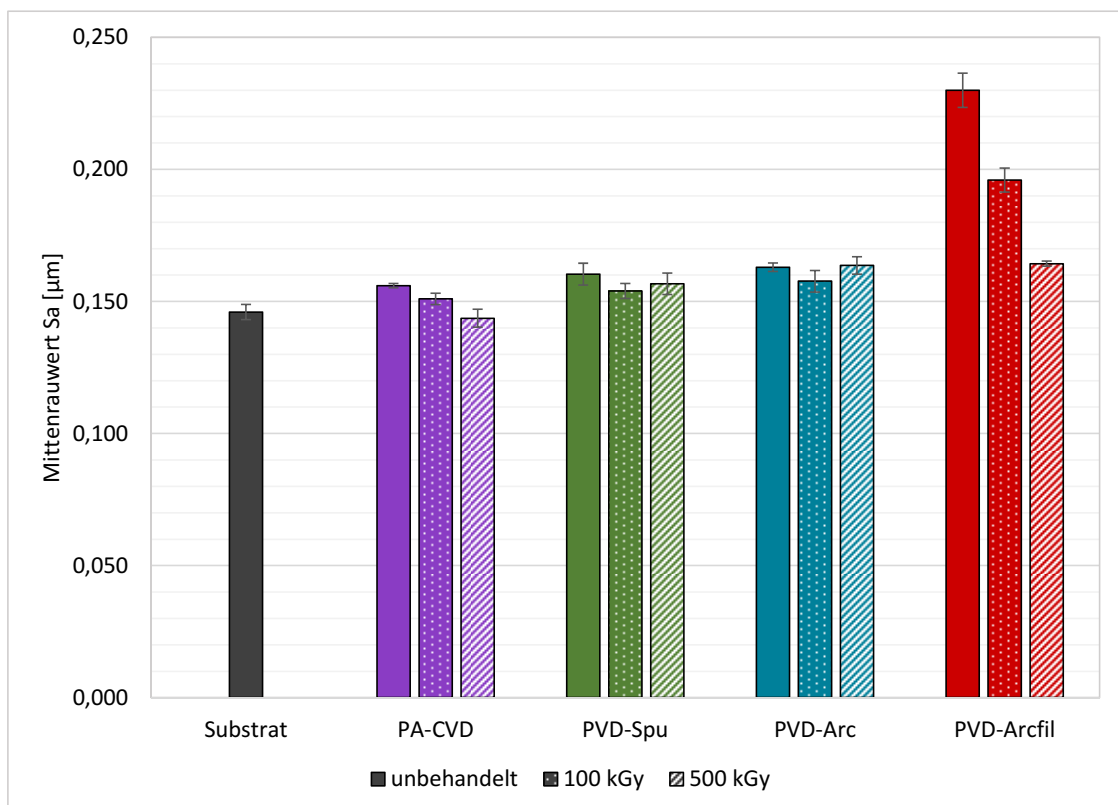
Zur Bewertung der Rauigkeit wurde die Weißlichtinterferometrie (WLI) genutzt. Auch hier wurden die Proben im unbehandelten und modifizierten Zustand untersucht. Zusätzlich kann über die 3D-Darstellung, auf welcher der Algorithmus zur Auswertung basiert, ein visueller Eindruck der verschiedenen Beschichtungen gewonnen werden (Abbildung 24). Die Farbzunordnung erfolgt entsprechend der Höhenzunordnung in der Farbskala am rechten Bildrand. Erscheint die betrachtete Probenoberfläche mit einem Farbverlauf von Rot über Gelb bis Grün, so ist dies in einer nicht 100 % waagrecht ausgerichteten Probe während des Messvorganges begründet. Dieser Umstand hat jedoch keinen Einfluss auf das Messergebnis des Mittenrauwertes.



**Abbildung 24: Morphologie von Substrat, unbehandelten und modifizierten DLC-Schichten**

Dargestellt ist die Probenoberfläche des Substrates sowie der über verschiedenen Abscheideverfahren generierten DLC-Beschichtungen als Ergebnis der WLI-Messung zur Bestimmung der Oberflächenrauigkeit. Die DLC-Beschichtungen wurden vor und nach eBeam-Modifizierung untersucht. Die Regenbogen-Skala am rechten Bildrand dient der Zuordnung entsprechender Höhenwerte. Folgende Proben sind dargestellt: Substrat (a), PA-CVD (b), PA-CVD\_500 (c), PVD-Spu (d), PVD-Spu\_500 (e), PVD-Arc (f), PVD-Arc\_500 (g), PVD-Arcfil (h), PVD-Arcfil\_500 (i).

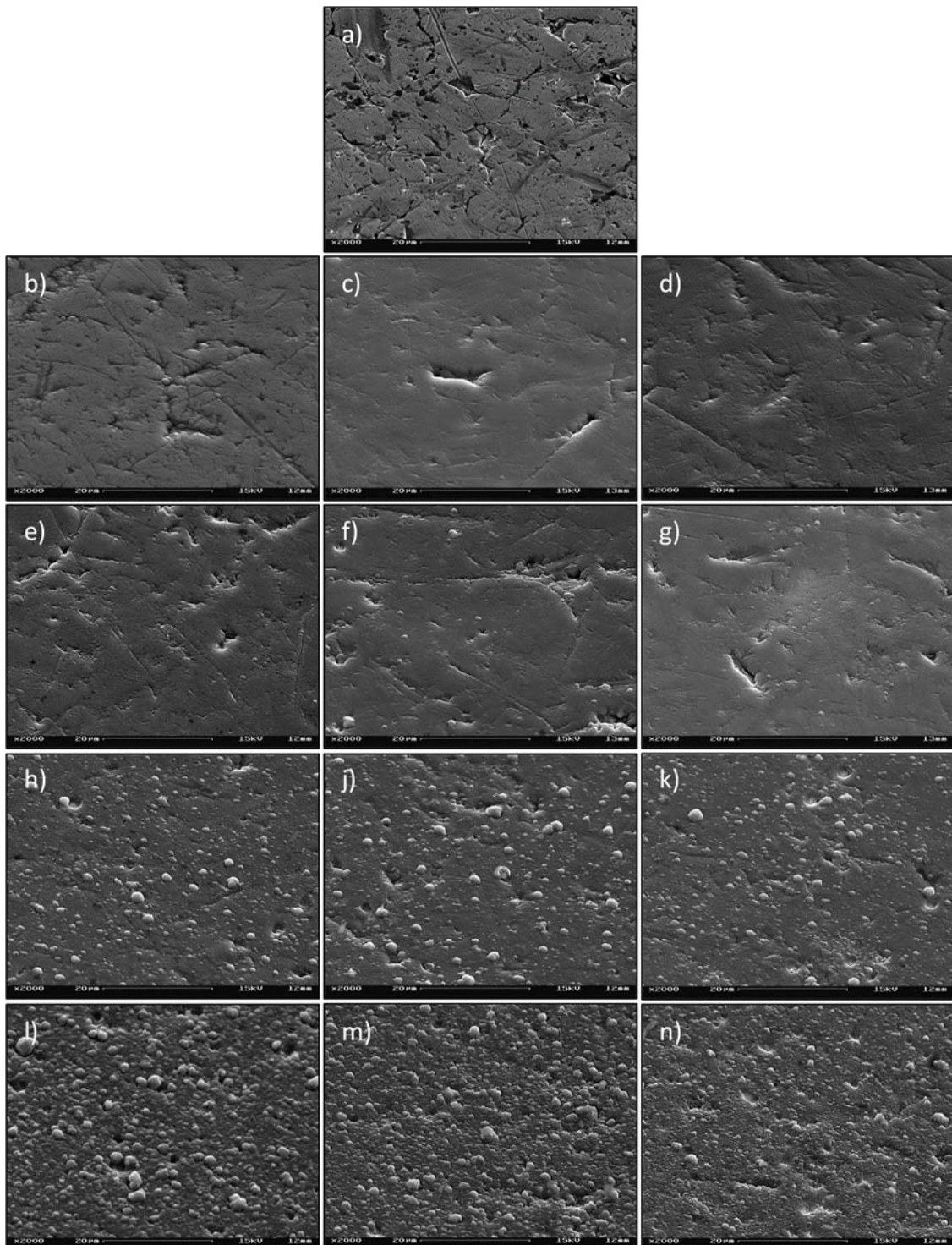
Abbildung 25 zeigt, dass das Beschichtungssubstrat einen durchschnittlichen Mittenrauwert von  $0,146 \mu\text{m}$  aufwies. Die Beschichtungen PA-CVD, PVD-Spu und PVD-Arc zeigten einen Mittenrauwert von  $0,156 \mu\text{m}$ ,  $0,160 \mu\text{m}$  und  $0,163 \mu\text{m}$  und bewegen sich damit in einem vergleichbaren Bereich, sind jedoch etwas erhöht im Vergleich zum Beschichtungssubstrat. Nach der Modifizierung mit  $100 \text{ kGy}$  und mit  $500 \text{ kGy}$  zeigen sich keine signifikanten Veränderungen der Mittenrauwerte für diese Beschichtungen. PVD-Arcfil-Beschichtungen zeigen mit  $0,230 \mu\text{m}$  gemessen am Beschichtungssubstrat einen deutlich erhöhten Mittenrauwert. Dieser nimmt nach Behandlung mit  $100 \text{ kGy}$  um  $0,034 \mu\text{m}$  ab. Die Behandlung mit  $500 \text{ kGy}$  zeigt eine stärkere Abnahme auf einen Wert von  $0,164 \mu\text{m}$ . Damit liegen die Mittenrauwerte aller DLC-Beschichtungen nach Modifizierung mit  $500 \text{ kGy}$  im gleichen Größenbereich, wobei sich lediglich für PVD-Arcfil-Beschichtungen eine Veränderung des Mittenrauwertes durch eBeam-Behandlung ergibt.



**Abbildung 25: Mittenrauwert von Substrat, unbehandelten und modifizierten DLC-Schichten**  
 Dargestellt ist der Mittenrauwert ( $S_a$ ) der verschiedenen DLC-Beschichtungen im Vergleich zum Beschichtungssubstrat sowie nach eBeam-Modifizierung mit  $100$  und  $500 \text{ kGy}$ .

### **Oberflächenmorphologie**

Da die 3D-Darstellung der WLI zur detaillierten Bewertung der Oberflächenmorphologie keine hinreichend hohe Auflösung liefert, wurde die Rasterelektronenmikroskopie (REM) genutzt, um die Oberflächenbeschaffenheit der Beschichtungen und auch des Beschichtungssubstrates im  $\mu\text{m}$ -Bereich zu untersuchen. Die Beschichtungen wurden vor und nach eBeam-Behandlung mit 500 kGy bewertet und sind in Abbildung 26 dargestellt. Das Beschichtungssubstrat zeigt eine leicht vernarbte Oberfläche, die von schrammenartigen Kerben im Bereich weniger Mikrometer durchzogen ist. Insgesamt ist die Oberfläche flach abgeschliffen, es sind kraterartige Vertiefungen vorhanden, deren Randbereich nicht rund sondern kantig und zerklüftete erscheint. Durch die DLC-Beschichtung mittels PA-CVD und PVD-Spu wird das Oberflächenbild des Beschichtungssubstrates etwas weicher gezeichnet, jedoch ist die Grundstruktur des Substrates mit kleineren Kratern und Kratzern noch erkennbar. Sowohl die eBeam-Behandlung mit 100 kGy als auch mit 500 kGy verändert dieses Bild nicht. Die Probenoberflächen, welche mittels PVD-Arc und PVD-Arcfil beschichtet wurden, lassen die Struktur des Substrates nur schemenhaft bzw. im Fall von PVD-Arcfil überhaupt nicht mehr erkennen. Diese Oberflächen sind durch zahlreiche Droplets geprägt. Die Droplets weisen eine Größe im Bereich von 0,5 bis 3,0  $\mu\text{m}$  auf. PVD-Arcfil-Beschichtungen zeigen zusätzlich wenige Droplets mit noch größerem Durchmesser bis ca. 5  $\mu\text{m}$ . Insgesamt zeigen diese Beschichtungen auch eine höhere Droplettdichte im Vergleich zu PVD-Arc. Durch die eBeam-Behandlung dieser Beschichtungen kommt es zu einer Dosis-abhängigen Verringerung der Dropletzahl und -größe. Dieser Effekt ist besonders auf den Droplet-reichen PVD-Arcfil-Beschichtungen ausgeprägt. Die Dropletgröße verringert sich nach 500 kGy auf ca. 1 bis 2  $\mu\text{m}$  und auch die Dichte der Droplets erscheint im betrachteten Bereich etwa halbiert.



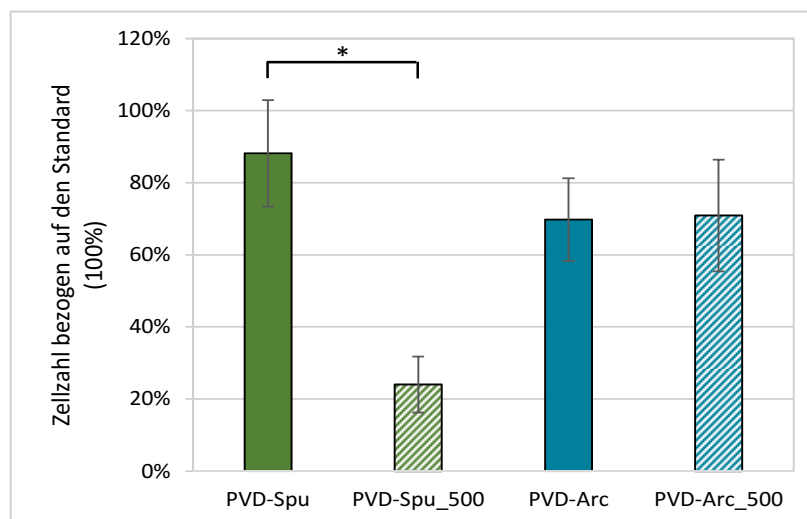
**Abbildung 26: REM-Aufnahme vom Substrat, unbehandelten und modifizierten DLC-Schichten**  
Dargestellt sind REM-Aufnahmen der Oberflächen des Beschichtungssubstrates (a) sowie nach Beschichtung mit den verschiedenen Abscheidemethoden: PA-CVD (b-d), PVD-Spu (e-g), PVD-Arc (h-k), PVD-Arcfil (l-n). Die Aufnahmen erfolgten mit 15 kV Beschleunigungsspannung und Probenpositionierung in einem Winkel von 45°, 2.000fache Vergrößerung. Die verschiedenen DLC-Beschichtungen wurden vor (b, e, h, l) und nach eBeam-Behandlung mit 100 kGy (c, f, j, m) bzw. 500 kGy (d, g, k, n) abgebildet.



### Zellzahl humaner Fibroblasten auf den modifizierten DLC-Beschichtungen

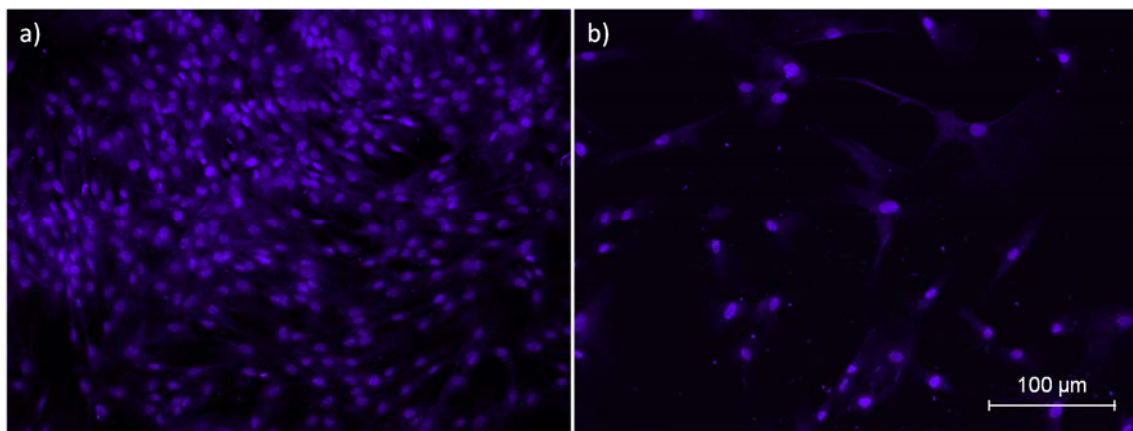
Die Ergebnisse zur Sterilisationsfestigkeit und Biokompatibilität der verschiedenen DLC-Beschichtungen (Kapitel 5.1.1 und 5.1.2) führten zur Eingrenzung der Abscheideverfahren auf PVD-Spu und PVD-Arc für die folgenden Untersuchungen.

Die Zellzahl wurde bestimmt, um anschließend die Stoffwechselaktivität darauf zu normieren und eine Aussage über die Bioverträglichkeit der modifizierten Schichten zu erhalten. Die Bestimmung erfolgte wie in Kapitel 4.9.3 beschrieben nach dreitägiger Inkubation der Fibroblasten auf den Proben. Um die Beschichtungen im unbehandelten und im modifizierten Zustand zu vergleichen, wurde der Standard auf 100 % normiert und die Proben entsprechend in Relation dargestellt. Modifiziert wurde mit 500 kGy. Abbildung 27 zeigt, dass die Zellzahl gemessen am Standard auf den unbehandelten PVD-Spu- und PVD-Arc-Schichten auf 89 % bzw. 70 % leicht reduziert ist. Auf der mit 500 kGy modifizierten PVD-Spu-Beschichtung ist die Zellzahl hingegen signifikant auf 25 % reduziert. Bei PVD-Arc wiederum zeigt sich eine solche Veränderung nach der Modifizierung nicht. Die Zellzahl liegt für diese Beschichtungen bei 70 % und ist damit unverändert im Vergleich zur unbehandelten PVD-Arc-Oberfläche.



**Abbildung 27: Zellzahl humaner Fibroblasten auf unbehandelten und modifizierten DLC-Schichten**  
 Dargestellt ist die Zellzahl pro Flächeneinheit von humanen Fibroblasten nach Inkubation (3d) auf DLC-Schichten. Im Vergleich stehen unbehandelte und mit 500 kGy modifizierte PVD-Spu- und PVD-Arc-Schichten. Die Ergebnisse sind in Relation zum Standard dargestellt, dieser ist auf 100% normiert. Die Zellzahl wurde durch fluoreszenzmikroskopische Auszählung der Zellkerne in definierten Probenbereichen bestimmt, dafür wurden die Zellkerne mittels DAPI angefärbt.

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte durch Anfärben der Zellkerne mittels DAPI (s. Kapitel 4.9.2) und anschließende Auszählung von vordefinierten Probenbereichen unter dem Fluoreszenzmikroskop. Abbildung 28 zeigt beispielhaft die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen von Zellen nach dreitägiger Inkubation auf unbehandelten PVD-Spu-Schichten (a) und eBeam-modifizierten PVD-Spu-Schichten (b). Es wird deutlich, dass auf der modifizierten Probe wesentlich weniger Zellkerne vorhanden sind.



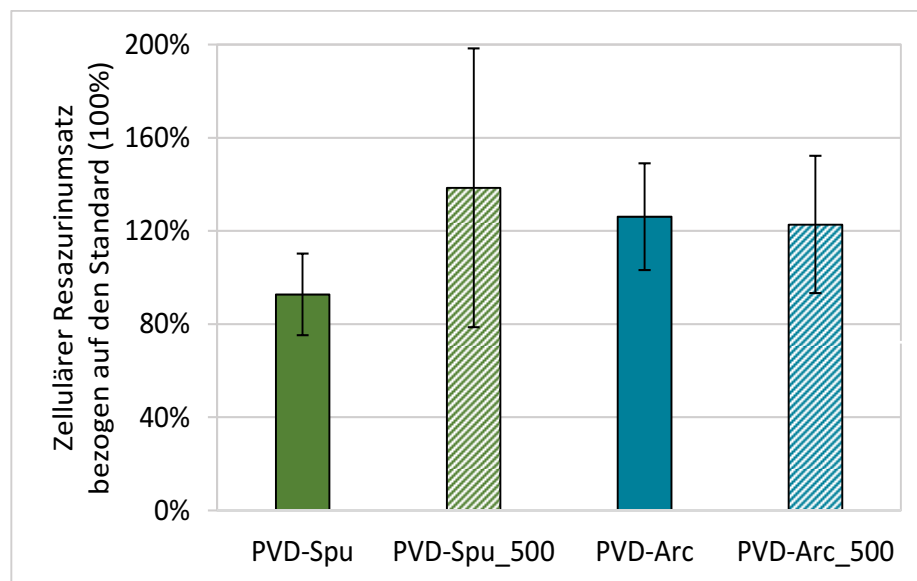
**Abbildung 28: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme zur Bestimmung der Zellzahl auf unbehandelten und modifizierten PVD-Spu-Schichten**

*Abgebildet sind fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen zur Bestimmung der Zellzahl humaner Fibroblasten nach dreitägiger Inkubation auf unbehandelten (a) und eBeam-modifizierten PVD-Spu-Schichten (b). Für die Zellzählung wurden die Zellkerne (blau) mittels DAPI angefärbt. Die Aufnahmen erfolgten bei 100facher Vergrößerung.*

### **Stoffwechselaktivität humaner Fibroblasten auf den modifizierten DLC-Beschichtungen**

Die Stoffwechselaktivität diente zur vergleichenden Bewertung der Bioverträglichkeit der eBeam-modifizierten DLC-Beschichtungen und wurde über die Bestimmung des Resazurinumsatzes ermittelt. Dafür wurden humane Fibroblasten für drei Tage auf den Proben inkubiert. Die Stoffwechselaktivität wurde sowohl auf unbehandelten als auch eBeam-modifizierten Beschichtungen bestimmt. Für die Modifizierung wurden 500 kGy appliziert. Um die verschiedenen DLC-Beschichtungen zu vergleichen, wurde die Stoffwechselaktivität auf die zuvor ermittelte Zellzahl normiert, um eine zellbezogene Aussage zu generieren. Der mitgeführte Standard ist auf 100 % normiert und die Messwerte der Proben entsprechend in Relation dargestellt.

Abbildung 29 zeigt, dass die zelluläre Stoffwechselaktivität auf PVD-Spu-Schichten bei 98 % liegt. Auf modifizierten PVD-Spu-Schichten liegt die Stoffwechselaktivität bei 140 % gemessen am Standard. Die Zellen auf den unbehandelten bzw. modifizierten PVD-Arc-Schichten zeigen eine zelluläre Stoffwechselaktivität von 126 % bzw. 123 % im Vergleich zum Standard. Für die verschiedenen Proben ergeben sich dabei gemessen am Standard keine signifikanten Abweichungen.



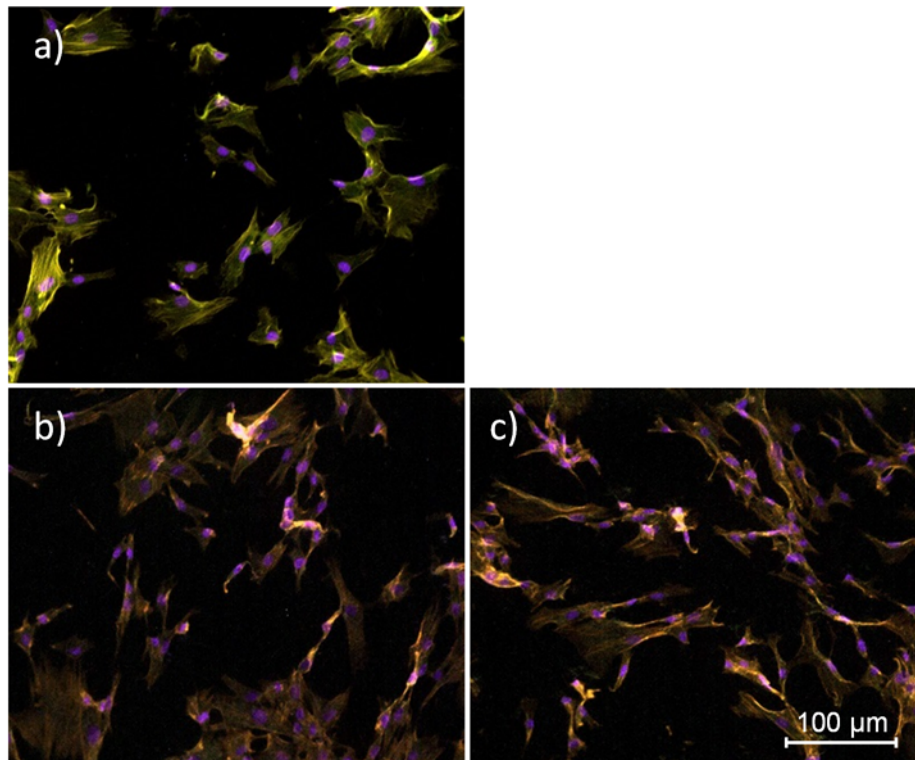
**Abbildung 29: Zelluläre Stoffwechselaktivität humaner Fibroblasten auf unbehandelten und eBeam-modifizierten DLC-Beschichtungen**

Dargestellt ist der zelluläre Resazurinumsatz als Maß für die zelluläre Stoffwechselaktivität von humanen Fibroblasten nach dreitägiger Inkubation auf den Proben. Im Vergleich stehen PVD-Spu- und PVD-Arc-Schichten, welche unbehandelt sowie nach Modifizierung mit 500 kGy untersucht wurden. Die Ergebnisse sind in Relation zum Standard dargestellt, dieser ist auf 100% normiert. Die zelluläre Stoffwechselaktivität ist durch den zellulären Resazurinumsatz bestimmt worden. Dafür wurde die Gesamt-Stoffwechselaktivität pro Probe auf die ermittelte Zellzahl pro Probe bezogen.

### **Zellmorphologie humaner Fibroblasten auf den modifizierten DLC-Beschichtungen**

Die Zellmorphologie wurde zur Bewertung der Bioverträglichkeit der eBeam-modifizierten DLC-Beschichtungen untersucht. Dafür wurden die Beschichtungen mit 500 kGy modifiziert. Die Kultivierungszeit der humanen Fibroblasten auf den Proben betrug dabei einen Tag. Anschließend wurden das Zytoskelett und die Zellkerne angefärbt und fluoreszenzmikroskopisch begutachtet. Im Folgenden sind repräsentative Beispiele dargestellt. Abbildung 30 zeigt, dass die Zellen auf dem Standard (a) eine

typische Zellmorphologie zeigen. Die Zellkerne sind intakt und zeigen eine natürlich runde Form. Die Zellspreitung ist durch eine länglich ovale Grundform gekennzeichnet. Auf den modifizierten PVD-Spu- und PVD-Arc-Beschichtungen (b bzw. c) ist die Zellmorphologie vergleichbar mit dem Standard. Die Zellkerne sind intakt und die Zellspreitung ist ebenfalls durch eine länglich ovale Grundform gekennzeichnet.



**Abbildung 30: Zellmorphologie humaner Fibroblasten auf dem Standard und modifizierten DLC-Beschichtungen**

*Dargestellt sind fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von humanen Fibroblasten nach eintägiger Inkubation auf dem Standard (a) sowie PVD-Spu- und PVD-Arc-Schichten (b bzw. c). Die Beschichtungen wurden mit 500 kGy modifiziert. Angefärbt wurden das Zytoskelett (TRITC) und die Zellkerne (DAPI). Die Aufnahmen erfolgten bei 100facher Vergrößerung.*

## 5.2. Charakterisierung der Elektronenstrahl-Modifizierung von DLC-Beschichtungen

Auf Basis der bisherigen Ergebnisse zum Vergleich der Abscheidemethoden für DLC-Beschichtungen wurde eine Abscheidemethode für die weiteren Untersuchungen ausgewählt. Auf die Kriterien für diese Auswahl wird in der Diskussion eingegangen.

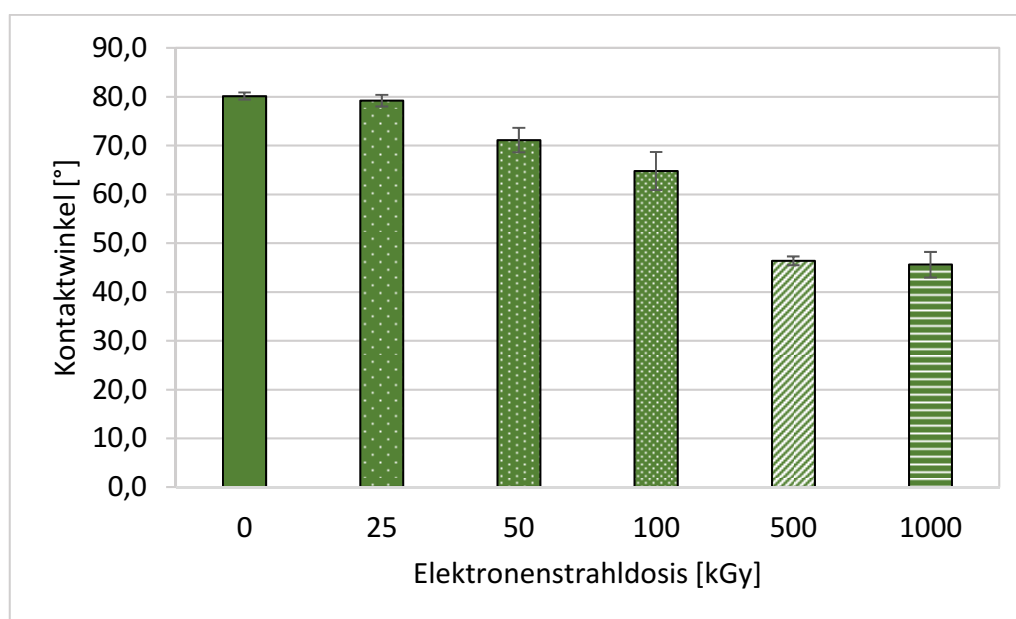
---

Alle im Folgenden dargestellten Untersuchungen wurden an DLC-Beschichtungen durchgeführt, die mittels PVD-Sputterbeschichtung abgeschieden wurden. Daher bezieht sich die Bezeichnung *DLC* nachfolgend ausschließlich auf Schichten dieser Abscheidemethode. Die Abscheideparameter blieben wie in 4.3 beschrieben unverändert. Die eBeam-modifizierten DLC-Beschichtungen wurden, sofern nicht anders angegeben, mit 500 kGy behandelt.

### 5.2.1. Dosisabhängigkeit

Bereits im ersten Abschnitt der vorliegenden Arbeit zeigte sich, dass die eBeam-Modifizierung der DLC-Beschichtungen in einer Hydrophilierung der Oberfläche resultiert (s. Kapitel 5.1.3). Daher wurde die Kontaktwinkelmessung als Bewertungsmaß für weitere Untersuchungen herangezogen. Um eine mögliche Dosisabhängigkeit zu untersuchen, wurde der Kontaktwinkel nach Modifizierung mit verschiedenen Dosen bis 1000 kGy gemessen. Abbildung 31 zeigt einen Ausgangskontaktwinkel für unbehandelte DLC-Beschichtungen von 80°. Bei einer Behandlung mit 25 kGy ist keine signifikante Veränderung zu beobachten. Die Modifizierung der DLC-Beschichtungen mit 50 kGy führt zu einer Verringerung auf 71°, bei Modifizierung mit 100 kGy erfolgt eine weitere Abnahme auf 65°. Nach der Modifizierung mit 500 kGy ist der Kontaktwinkel auf 47° reduziert. Eine weitere Dosiserhöhung bis auf 1000 kGy führt zu keiner weiteren Veränderung des Kontaktwinkels. Zwischen der Modifizierung mit 500 kGy und 1000 kGy sind keine signifikanten Unterschiede im Kontaktwinkel zu beobachten.

Signifikante Unterschiede der Messergebnisse aus Abbildung 31 sind aufgrund vereinfachter Übersichtlichkeit in Tabelle 13 angegeben. Lediglich die Messungen des Kontaktwinkels nach Modifizierung mit 500 kGy bzw. 1000 kGy sowie zwischen Ausgangszustand und Modifizierung mit 25 kGy zeigen keine signifikante Differenz. Alle weiteren Messergebnisse weisen signifikante Unterschiede auf.



**Abbildung 31: Kontaktwinkel auf den DLC-Schichten als Funktion der Modifizierungsdosis**

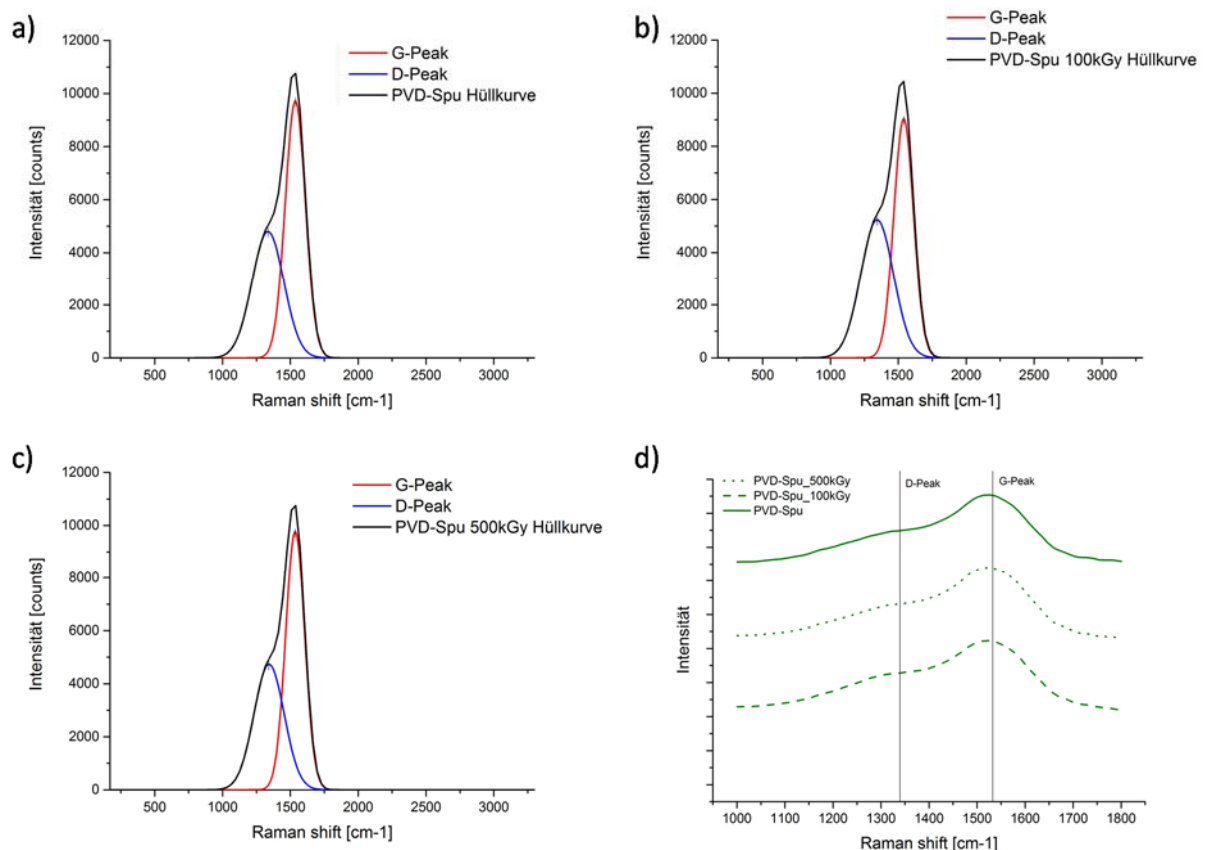
Dargestellt ist der Kontaktwinkel der DLC-Beschichtungen im unbehandelten Zustand sowie nach eBeam-Modifizierung mit verschiedenen Dosen: 25, 50, 100, 500 und 1000 kGy. Die Modifizierung erfolgte durch Applikation von 25 kGy bzw. in 50 kGy-Schritten bis zum Erreichen der vorgegebenen Zieldosis. Der Kontaktwinkel wurde direkt nach der Modifizierung bestimmt. Als Messflüssigkeit wurde Wasser genutzt. Signifikante Unterschiede der Messergebnisse sind in Tabelle 13 angegeben.

**Tabelle 13: Signifikanzen zu Abbildung 31**

eBeam [kGy]	0	25	50	100	500	1000
0		/	*	*	*	*
25	/		*	*	*	*
50	*	*		*	*	*
100	*	*	*		*	*
500	*	*	*	*		/
1000	*	*	*	*	/	

Um die Auswirkung der eBeam-Modifizierung auf die Stöchiometrie der  $sp^2$ - und  $sp^3$ - Bindungsanteile in den DLC-Beschichtungen zu untersuchen, wurden die Schichten mit 100 und 500 kGy modifiziert und anschließend mittels Ramanspektroskopie analysiert. Die Auswertung der Ramanspektren erfolgt im Bereich der für DLC-Beschichtungen typischen Peaks: D-Peak und G-Peak [190]. Diese befinden sich im Bereich von  $1360\text{ cm}^{-1}$  bzw.  $1560\text{ cm}^{-1}$  [196]. In Abbildung 32 sind die Ramanspektren von DLC-Beschichtungen im unbehandelten Zustand (a) sowie nach Modifizierung mit 100 kGy (b) und 500 kGy (c) dargestellt. D- und G-Peak wurden durch Peakentfaltung mittels

Auswertesoftware ermittelt. Zum Vergleich wurden die Hüllkurven der einzelnen Proben als Stapeldarstellung ohne Peakentfaltung, jedoch mit Kennzeichnung der D- und G-Peakposition zusammengefasst (d). Im Bereich von D- und G-Peak sind weder nach durchgeführter eBeam-Modifizierung noch in Abhängigkeit der Dosis keine Veränderungen erkennbar. Die Peakpositionen sind in allen Fällen identisch.



**Abbildung 32: Ramanspektren der unbehandelten und modifizierten DLC-Schichten**

Dargestellt sind Einzelaufnahmen der Ramanspektren samt Peakentfaltung von unbehandelten DLC-Beschichtungen (a) sowie nach Modifizierung mit 100 kGy (b) und 500 kGy (c). Zum Vergleich wurden die Hüllkurven der einzelnen Proben als Stapeldarstellung ohne Peakentfaltung, jedoch mit Kennzeichnung der D- und G-Peakposition zusammengefasst (d). Die Anregung erfolgte mit einem Laser der Wellenlänge 532 nm.

Weiterhin wurde der Einfluss der eBeam-Modifizierung auf die Rauigkeit der DLC-Beschichtungen untersucht. Diese Ergebnisse sind bereits in Kapitel 5.1.3 dargestellt. Für die in Abschnitt 2 genutzten Schichten der PVD-Sputterabscheidung ergaben sich diesbezüglich keine dosisabhängigen Veränderungen. Abbildung 25 zeigt für unbehandelte und modifizierte PVD-Spu-Schichten einen Mittenrauwert im Bereich von 0,155 bis 0,160  $\mu\text{m}$ . Auch die detaillierte Betrachtung der Oberflächenmorphologie

---

mittels REM-Analytik (Abbildung 26 e-g) zeigt, dass sich diesbezüglich für PVD-Spüschichten keine Veränderungen durch die Modifizierung ergeben.

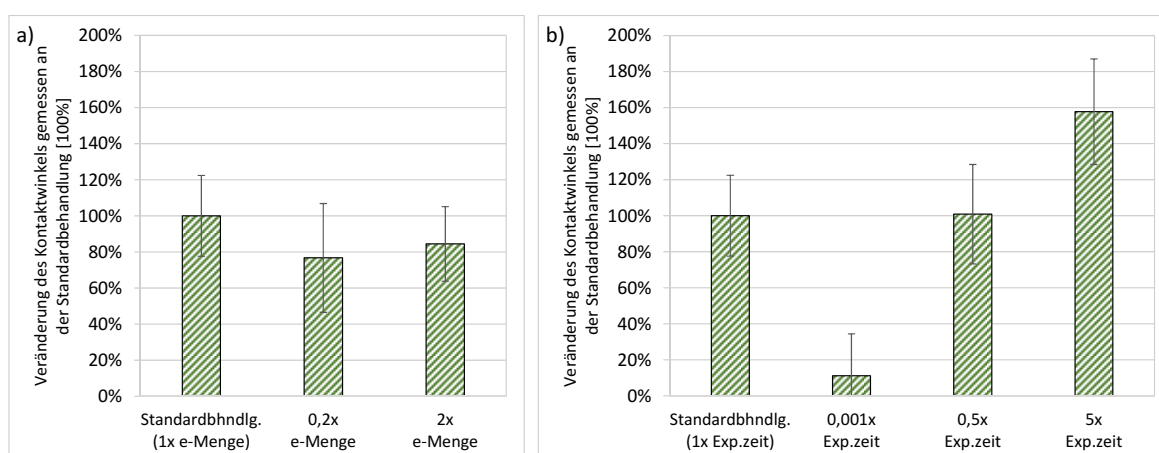
### 5.2.2. Variation der Expositionszeit und Elektronenmenge

Um die Wirkmechanismen der eBeam-Modifizierung zu untersuchen, wurden Expositionszeit und Elektronenmenge variiert. Dabei wurde jeweils ein Parameter konstant gehalten. Die Elektronenmenge wurde durch die Dosisrate definiert. Aus vorangegangenen Ergebnissen ist bekannt, dass sich die eBeam-Modifizierung in einer Abnahme des Kontaktwinkels äußert. Daher wurde im Folgenden die Abnahme des Kontaktwinkels bei Standardbehandlung (einfache Elektronenmenge und einfache Expositionszeit) auf „100 % Veränderung“ gesetzt und die Veränderung des Kontaktwinkels bei variierender Expositionszeit und Elektronenmenge im Verhältnis dazu dargestellt. Abbildung 33 a verdeutlicht, dass die Variation der Elektronenmenge über die Dosisrate zu keiner signifikanten Veränderung gemessen an der Standardbehandlung führt. Bei der Variation der Expositionszeit hingegen (Abbildung 33 b) kam es bei extremer Verkürzung der Expositionszeit (0,001x) mit 11 % zu einer signifikant geringeren Veränderung des Kontaktwinkels. Die Halbierung der Expositionszeit führt zu keinem erkennbaren Unterschied im Vergleich zur Standardbehandlung. Wird die Expositionszeit jedoch verfünffacht, so führt dies mit 158 % zu einer signifikant stärkeren Veränderung des Kontaktwinkels im Vergleich zur Standardbehandlung.

Signifikante Unterschiede der Messergebnisse aus Abbildung 33 sind aufgrund vereinfachter Übersichtlichkeit in Tabelle 14 angegeben.

Durch die Variation der Expositionszeit ist ein Einfluss auf die Intensität der Kontaktwinkelveränderung deutlich erkennbar. Die Variation der Elektronenmenge hingegen zeigt keinen Einfluss.





**Abbildung 33: Veränderung des Kontaktwinkels auf den modifizierten DLC-Schichten bei variierender Expositionszeit und Elektronenmenge**

Dargestellt ist die Veränderung des Kontaktwinkels gemessen an der Standardbehandlung, welche eine 100%ige Veränderung verursacht. Eine Veränderung bedeutet die Differenz des Kontaktwinkels zwischen Ausgangszustand und nach eBeam-Modifizierung. Im Vergleich zur Standardbehandlung (entspricht der einfachen Expositionszeit sowie der einfachen Elektronenmenge) wurden Expositionszeit sowie Elektronenmenge mit folgenden Faktoren variiert: Elektronenmenge: 0,2fach und 2fach; Expositionszeit: 0,001fach, 0,5fach und 5fach. Der Kontaktwinkel wurde direkt nach der Modifizierung bestimmt. Als Messflüssigkeit wurde Wasser genutzt. Signifikante Unterschiede der Messergebnisse sind in Tabelle 14 angegeben.

**Tabelle 14: Signifikanzen zu Abbildung 33**

Behandlungsparameter	Standardbhndlg.	0,2x e-Menge	2x e-Menge	0,001x Exp.zeit	0,5x Exp.zeit	5x Exp.zeit
Standardbhndlg.		/	/	*	*	*
0,2x e-Menge	/		/	*	*	*
2x e-Menge	/	/		*	*	*
0,001x Exp.zeit	*	*	*		*	*
0,5x Exp.zeit	*	*	*	*		*
5x Exp.zeit	*	*	*	*	*	

### 5.2.3. Variation der Prozessatmosphäre

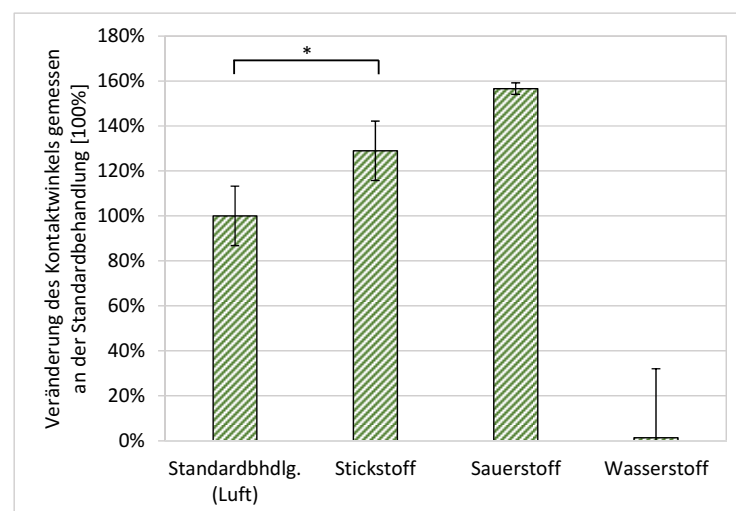
Um Aussagen über die an der eBeam-Modifizierung beteiligten Spezies<sup>5</sup> aus der umgebenden Prozessatmosphäre zu erhalten wurde diese variiert. Standardmäßig findet

<sup>5</sup> Die eBeam-Modifizierung an Atmosphärendruck führt zur Ionisierung bzw. Radikalbildung in der umgebenden Prozessatmosphäre. Reaktivität und Konzentration dieser Spezies sind abhängig von der Zusammensetzung der Prozessatmosphäre.

die Modifizierung an Luft statt. Da in Luft Stickstoff und Sauerstoff als Hauptbestandteile vorliegen, wurde die Modifizierung zusätzlich unter reinem Stickstoff und 21 %igem Sauerstoff durchgeführt. Weiterhin wurde unter 10 %igem Wasserstoff behandelt. Als Kenngröße für die eBeam-Modifizierung der DLC-Beschichtungen wird die Kontaktwinkelmessung herangezogen. Aus vorangegangenen Ergebnissen ist bekannt, dass sich die eBeam-Modifizierung in einer Abnahme des Kontaktwinkels äußert. Daher wurde im Folgenden die Abnahme des Kontaktwinkels bei Standardbehandlung an Luft auf „100 % Veränderung“ gesetzt und die Veränderung des Kontaktwinkels bei Behandlung unter Stickstoff-, Sauerstoff- und Wasserstoffatmosphäre im Verhältnis dazu dargestellt.

Abbildung 34 zeigt, dass bei Stickstoff als Prozessatmosphäre die Veränderung des Kontaktwinkels mit 129 % signifikant ansteigt. Sauerstoff als Prozessatmosphäre führt mit 157 % ebenfalls zu einer stärkeren Veränderung. Bei Behandlung unter Wasserstoffatmosphäre kommt es hingegen zu gar keiner Veränderung des Kontaktwinkels.

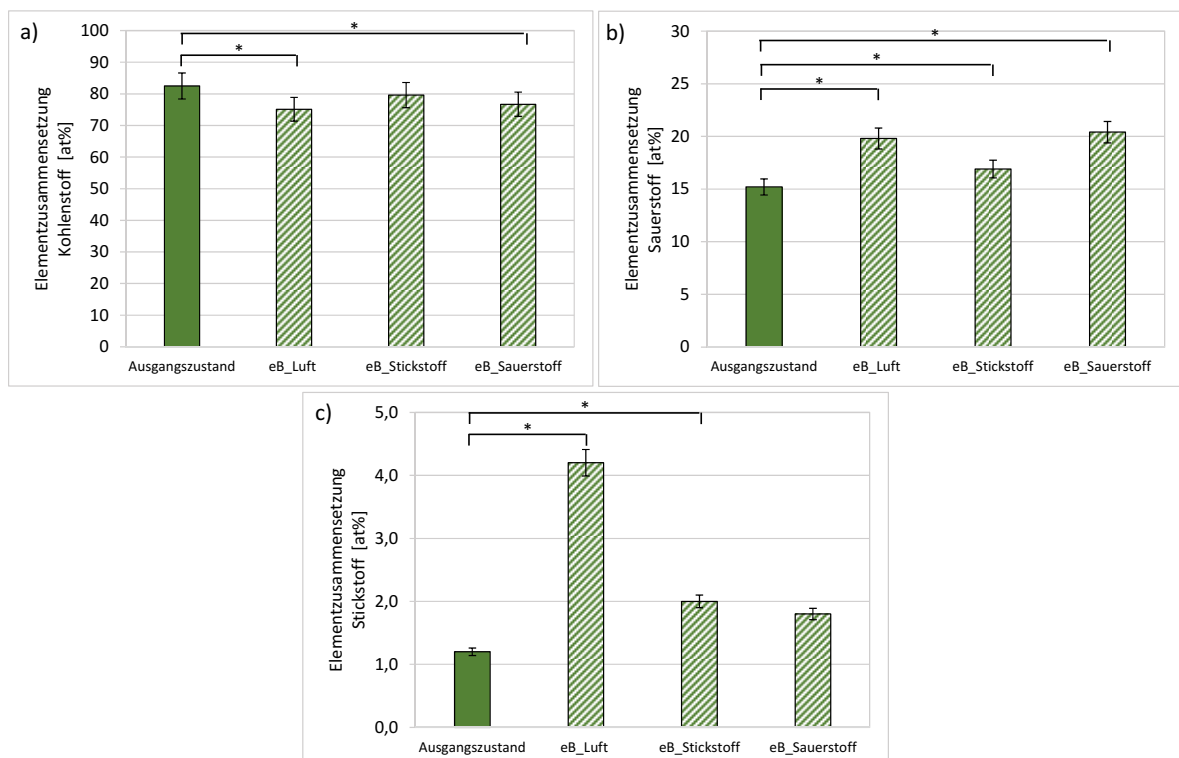
Die Ergebnisse belegen, dass die Bestandteile der Prozessatmosphäre einen Einfluss auf die Veränderung des Kontaktwinkels haben, wobei Stickstoff und Sauerstoff im Vordergrund stehen, dahingegen hat Wasserstoff überhaupt keinen Einfluss.



**Abbildung 34: Veränderung des Kontaktwinkels auf den modifizierten DLC-Schichten bei variierender Prozessatmosphäre**

Dargestellt ist die Veränderung des Kontaktwinkels als Differenz zwischen Ausgangszustand und nach eBeam-Modifizierung im Vergleich zur Standardbehandlung („Luft“). Die Prozessatmosphäre bestand aus reinem Stickstoff („Stickstoff“), einem 21 %igem Sauerstoffgemisch („Sauerstoff“) oder 10 %igem Wasserstoff („Wasserstoff“). Der Kontaktwinkel wurde direkt nach der Modifizierung bestimmt. Als Messflüssigkeit wurde Wasser genutzt.

Die unter verschiedenen Prozessatmosphären modifizierten DLC-Beschichtungen wurden nach der Kontaktwinkelmessung auch einer XPS-Analytik unterzogen. Dadurch sollten Aussagen über die Elementverteilung auf den Oberflächen getroffen werden. Die unter Wasserstoffatmosphäre modifizierten DLC-Beschichtungen wurden dabei nicht analysiert, da sich bereits bei der Kontaktwinkelmessung zeigte, dass keine Veränderungen auftreten (s. Abbildung 34). Die XP-Spektren wurden hinsichtlich C-, O-, und N-Gehalt quantitativ analysiert.



**Abbildung 35: Elementzusammensetzung der unbehandelten und modifizierten DLC-Schichten**

Dargestellt ist die mittels XPS ermittelte Elementzusammensetzung auf der Oberfläche der unbehandelten („Ausgangszustand“) und modifizierten DLC-Beschichtungen. Die Modifizierung wurde mit variierender Prozessatmosphäre durchgeführt (Luft, Stickstoff, Sauerstoff). Untersucht wurden der Kohlenstoffanteil (a), der Sauerstoffanteil (b) und der Stickstoffanteil (c). Die Prozessatmosphäre bestand aus Luft („eB\_Luft“; entspricht der Standardbehandlung), reinem Stickstoff („eB\_Stickstoff“) oder einem 21%igem Sauerstoffgemisch („eB\_Sauerstoff“).

Abbildung 35 verdeutlicht, dass sich nach durchgeführter eBeam-Modifizierung der messbare Kohlenstoffanteil auf den DLC-Beschichtungen verringert. Gleichzeitig kommt es zu einer Zunahme von Sauerstoff und Stickstoff. Im Ausgangszustand liegt der Kohlenstoffanteil bei 82 at% (Abbildung 35 a). Die Modifizierung an Luft führt zu einer Verringerung des Kohlenstoffanteiles auf 75 at%. Wird unter

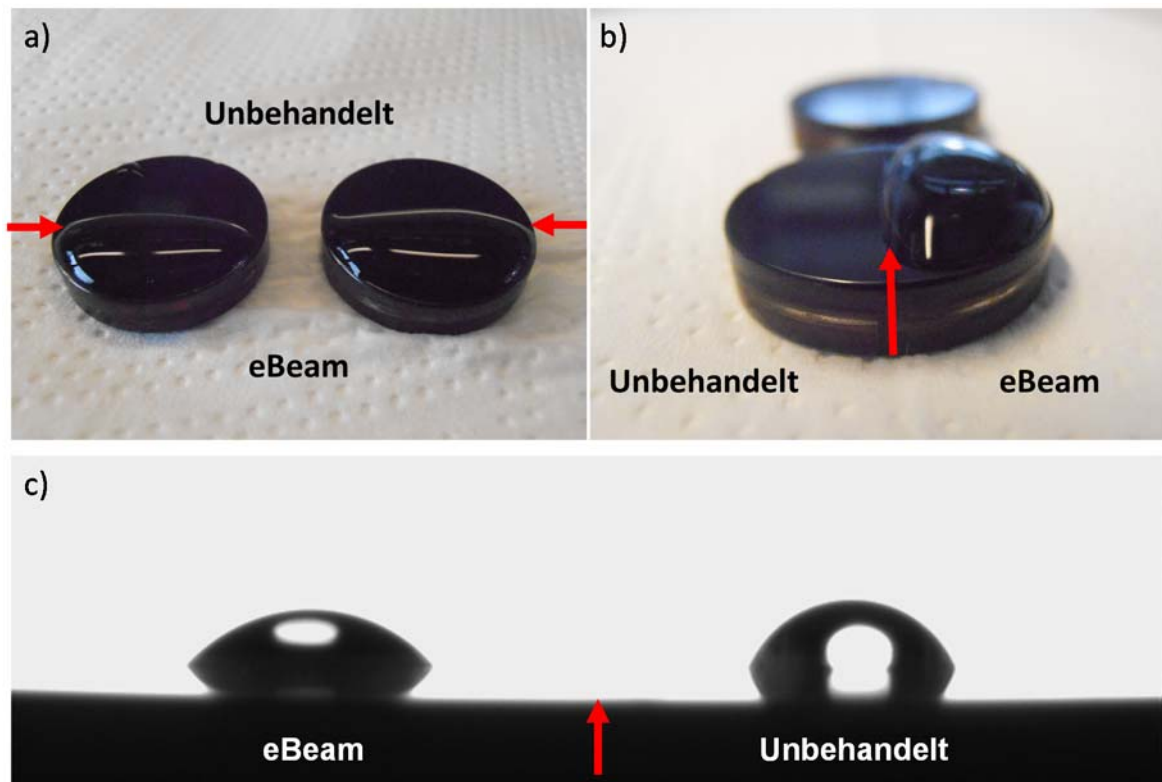
Stickstoffatmosphäre modifiziert, führt dies zu einer Abnahme auf knapp 80 at%. Die Modifizierung unter Sauerstoff führt zu einer Abnahme des Kohlenstoffanteiles auf 77 at% und ist damit vergleichbar mit der Modifizierung unter Luft. Im Ausgangszustand liegt der Sauerstoffanteil bei 15 at% (Abbildung 35 b). Die Modifizierung an Luft führt zu einer Zunahme auf 20 at%. Wird unter Stickstoffatmosphäre modifiziert, führt dies zu einer geringeren Zunahme des Sauerstoffanteiles auf 17 at%. Die Modifizierung unter Sauerstoff führt zu einer Zunahme des Sauerstoffanteiles auf knapp 21 at% und ist damit erneut vergleichbar mit der Modifizierung unter Luft. Der Stickstoffanteil liegt im Ausgangszustand bei 1,2 at% (Abbildung 35 c). Die Modifizierung an Luft führt zu einer Zunahme auf 4,2 at%. Wird unter Stickstoffatmosphäre modifiziert, führt dies zu einer Zunahme auf knapp 2,0 at%. Die Modifizierung unter Sauerstoff führt zu einer Zunahme des Stickstoffanteiles auf 1,9 at% und ist damit vergleichbar mit der Modifizierung unter Stickstoff.

#### 5.2.4. Strukturierung mittels Elektronenstrahl

##### **Grobstrukturierung**

Ein Bestandteil der Zielstellung ist die Biofunktionalisierung der DLC-Beschichtungen durch Modifizierung mittels eBeam. Die Funktionalisierung soll dazu führen, dass auf den DLC-Oberflächen das Anwachsverhalten von Zellen gezielt beeinflusst werden kann. Dies bedeutet auf der Oberfläche Bereiche zu generieren, die die Zelladhäsion zulassen oder sogar fördern in direkter Nachbarschaft zu Bereichen, die eine reduzierte bis gar keine Zelladhäsion aufweisen. In Kapitel 5.1.3 wurde dargestellt, dass durch die eBeam-Modifizierung die Zellzahl prinzipiell verringert werden kann. Die im Folgenden zu prüfende Fragestellung besteht darin, ob es durch die Modifizierung der DLC-Beschichtungen möglich ist, aneinander angrenzende Bereiche zu modifizieren und inwiefern die Grenze zwischen unbehandelter und modifizierter Oberfläche deutlich nachvollziehbar ist, d.h. wie exakt und formtreu eine eBeam-Modifizierung umgesetzt werden kann. Dazu wurde eine DLC-beschichtete runde Flachprobe mit einem halbierten Glasdeckgläßchen halbseitig abgedeckt und mit 500 kGy modifiziert. Anschließend erfolgte eine Bewertung der Modifizierung durch die Benetzbarkeit der halbseitig modifizierten Probe mit destilliertem Wasser. Die Dokumentation erfolgte

fotografisch. In Abbildung 36 a und b zeigt sich, dass das aufgegebene Wasser auf der eBeam-modifizierten Seite bei Volumenzugabe bis zur Grenzlinie der Modifizierung fortschreitet und dort sehr exakt diese Linie zwischen unbehandeltem und modifiziertem Bereich abbildet und diese Grenze nicht überschreitet. Auch die gleichzeitige Aufgabe sehr kleiner Wassermengen ( $1 \mu\text{L}$ ) auf beiden Probenseiten zeigt den Unterschied der Benetzbarkeit zwischen unbehandelter und modifizierter Probenseite (Abbildung 36 c). Insgesamt zeigt sich, dass durch die hier genutzte Vorgehensweise eine sehr klare Abgrenzung der unbehandelten von den modifizierten Oberflächenbereich möglich ist bzw. dass die eBeam-Modifizierung zur Ausbildung einer exakt definierten Grenzlinie führt.

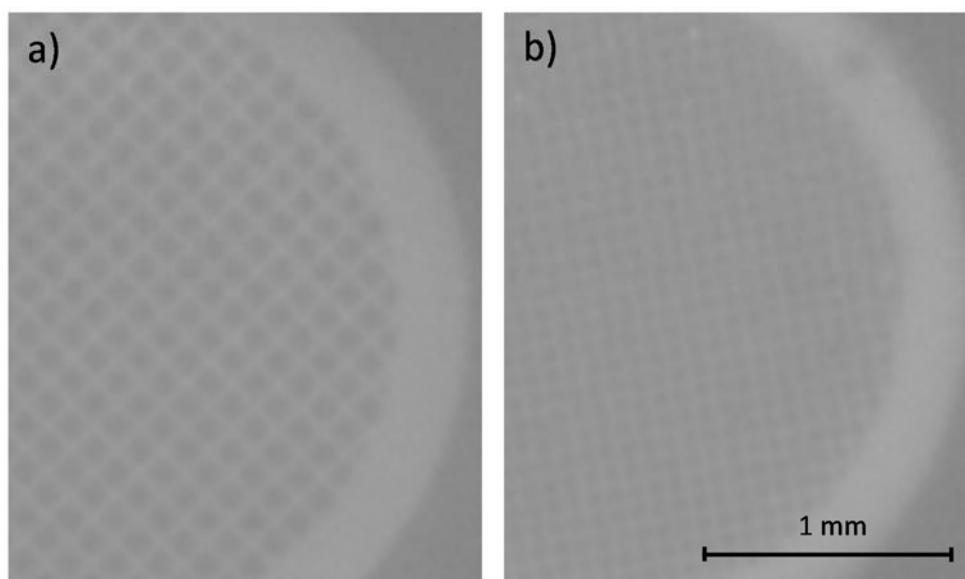


**Abbildung 36: Benetzungsverhalten von halbseitig modifizierten DLC-Proben**

Dargestellt ist das Benetzungsverhalten von halbseitig modifizierten DLC-Beschichtungen. Die Modifizierung erfolgte mit  $500 \text{ kGy}$  wobei eine Hälfte der Probe mit einem halbierten Glasdeckgläschen abgedeckt wurde. Die roten Pfeile markieren die Grenzlinie zwischen unbehandelter (abgedeckter) und eBeam-modifizierter Oberfläche. Das Vorschreiten eines Wassertropfens bei Aufgabe auf die modifizierte Probenhälfte und weiterer Volumenerhöhung findet bis zur Grenzlinie zwischen unbehandelter und modifizierter Oberfläche statt. Der Wassertropfen bildet dort sehr exakt die Grenzlinie ab (a + b). Die Aufgabe sehr kleiner Volumina ( $1 \mu\text{L}$ ) auf beiden Probenseiten zeigt die Unterschiede der Hydrophilie von unbehandelter und modifizierter Oberfläche anhand der Tropfenform(c).

### Feinstrukturierung

Weiterhin wurde untersucht, in welchem Größenbereich durch die Modifizierung alternierende Strukturen von unbehandelten und modifizierten Oberflächen abbildbar sind. Dazu wurde zunächst über die Dosimetrie geprüft, welche Strukturgrößen bei eBeam-Behandlung durch Abschattung realisiert werden können. Zur Abschattung wurden TEM-Netzchen mit verschiedenen Maschenweiten genutzt. Diese wurden auf einem Dosimeterstreifen platziert. Für diesen Versuch war eine Behandlung mit 50 kGy ausreichend. Der Dosimeterstreifen verfärbt sich durch die eBeam-Einwirkung. Die Auswertung der Dosimeterstreifen erfolgte fotografisch. Abbildung 37 dokumentiert die Belichtung des Dosimeters. Die dunklen Bereiche wurden durch den eBeam belichtet. In den hellen Bereichen fand keine eBeam-Einwirkung statt. Es zeigt sich, dass sowohl für die Maschenweite von 100  $\mu\text{m}$  als auch für 70  $\mu\text{m}$  die eBeam-Einwirkung gut und klar definiert abgebildet wird.



**Abbildung 37: Belichtung eBeam-behandelter Dosimeter bei Abschattung mit TEM-Netzchen**

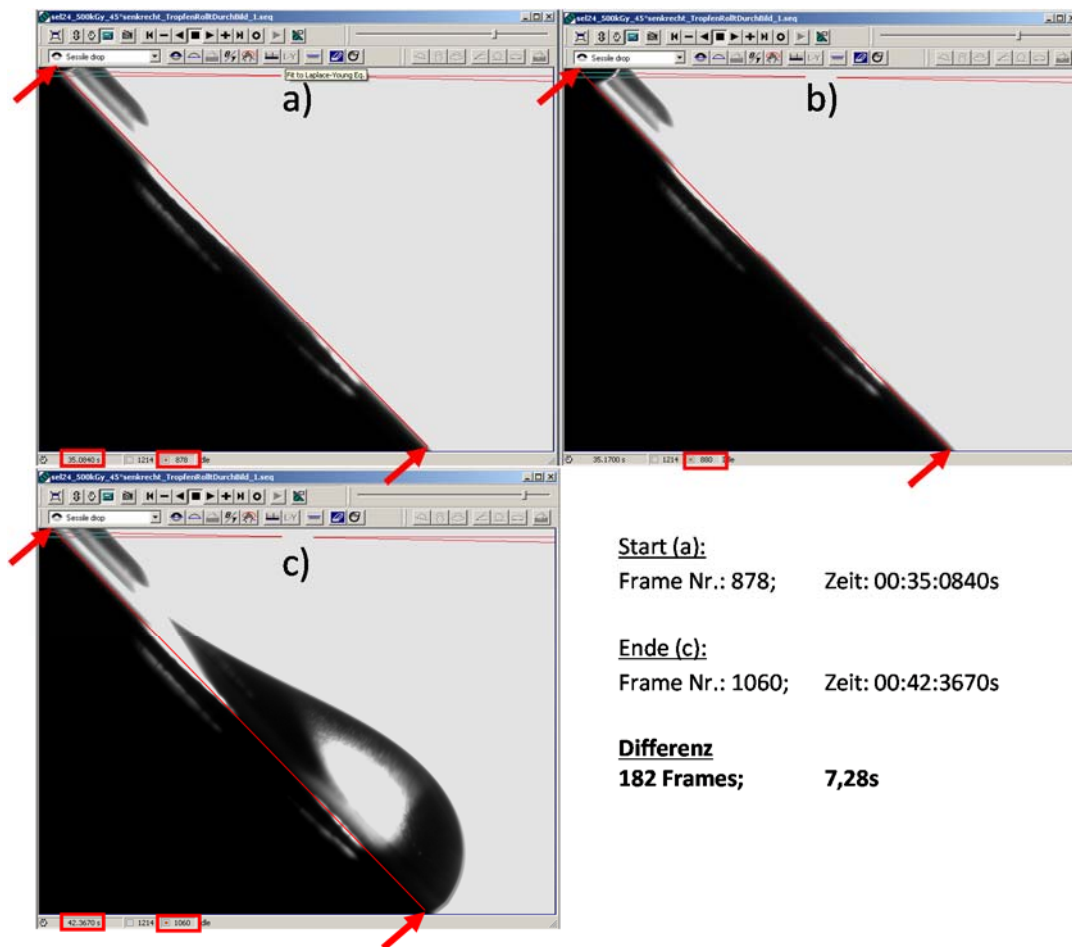
*Dargestellt ist die Belichtung eBeam-behandelter Dosimeter (50 kGy) bei Abschattung mit TEM-Netzchen von 100  $\mu\text{m}$  (a) und 70  $\mu\text{m}$  Maschenweite (b). Die dunklen Bereiche wurden durch den eBeam belichtet. In den hellen Bereichen fand keine eBeam-Einwirkung statt.*

Um die feine Strukturierung auch direkt auf den DLC-Oberflächen zu untersuchen wurde eine Maske mit Linienstruktur zur Abschattung des eBeams während der Modifizierung genutzt. Anschließend wurden die so modifizierten Proben mittels

---

Tropfenabrolltest analysiert. Dafür wurden die Proben in einem  $45^\circ$ -Winkel positioniert. Anschließend wurden auf der Probenoberseite  $25\ \mu\text{L}$  bidestilliertes Wasser appliziert, durch die schräge Position rollte der Wassertropfen über die modifizierte Oberfläche. Es wurde per Videoanalyse die Zeit bestimmt, die der Tropfen für das Zurücklegen einer definierten Distanz benötigt. Die Messung wurde bei Eintreten der Tropfenfront in den Bildbereich gestartet, gestoppt wurde, sobald die Tropfenfront das untere Ende des Bildbereiches erreichte. Für den Tropfenabrolltest wurden die Proben mit der linienartigen Strukturierung sowohl parallel als auch senkrecht zur Abrollrichtung des Tropfens positioniert (Vergleich Abbildung 12). Als Bewertungsgrundlage zum Vergleich der Messungen wurden die Messzeiten herangezogen.

Rollt der Tropfen über die senkrecht zur Abrollrichtung ausgerichtete Strukturierung, sind dafür  $7,28\ \text{s}$  nötig (Abbildung 38). Bei paralleler Ausrichtung der Strukturierung wird für die gleiche Distanz eine Zeit von  $1,28\ \text{s}$  benötigt (Abbildung 39). Damit ist die Abrollzeit über eine senkrecht angeordnete Strukturierung knapp 6-fach länger als bei paralleler Anordnung. Weiterhin ergibt sich bei paralleler Anordnung eine etwas längere und dafür flachere Tropfenform (Abbildung 39 c) im Vergleich zur senkrechten Anordnung, bei der der Tropfen kompakter, d.h. kürzer und dafür höher erscheint (Abbildung 38 c).

**Start (a):**

Frame Nr.: 878;    Zeit: 00:35:0840s

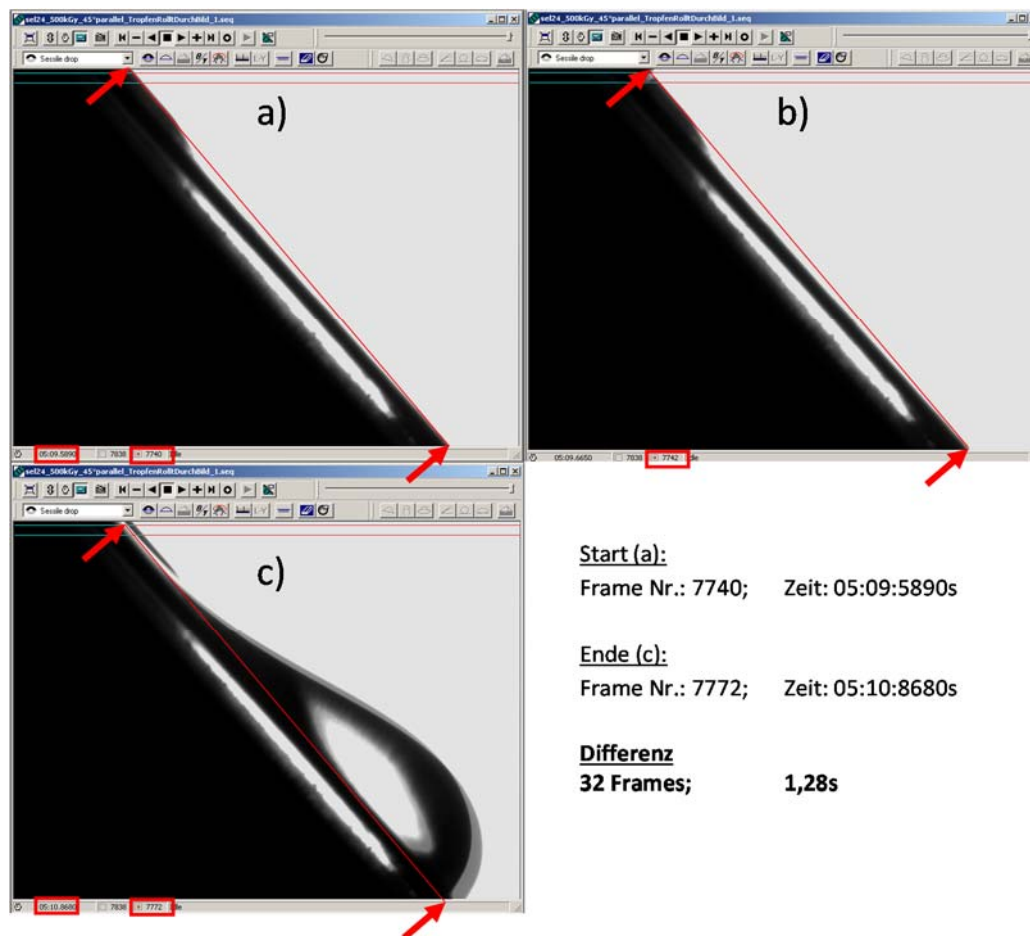
**Ende (c):**

Frame Nr.: 1060;    Zeit: 00:42:3670s

**Differenz****182 Frames;    7,28s****Abbildung 38: Videoanalyse zum Tropfenabrolltest, Linienstruktur senkrecht zur Abrollrichtung**

Dargestellt sind verschiedene Bildausschnitte (Frames) aus der Videoanalyse des Tropfenabrolltests. Die Probe wurde im  $45^\circ$  Winkel positioniert, die linienartige Strukturierung wurde senkrecht zur Abrollrichtung des Tropfens ausgerichtet (Vergleich Abbildung 12 b). Der erste Frame (a) stellt den Beginn der Messung dar, Frame-Nummer und Beginn der Messzeit sind im unteren Bildrand (rote Markierung) abzulesen. Das Voranschreiten der Tropfenfront ist in (b) dargestellt. Die Messzeit wurde gestoppt, wenn die Tropfenfront den unteren Bildrand erreichte (c), auch hier sind Frame-Nummer und Messzeit im unteren Bildrand (rote Markierung) abzulesen. Die Messstrecke wird durch die rote Linie und deren Start- und Endpunkte durch rote Pfeile markiert. Zur Auswertung wurde die zeitliche Differenz zwischen Messbeginn und Ende berechnet. Diese Werte dienen zum Vergleich verschiedener Messungen bzw. Probenoberflächen.





**Abbildung 39: Videoanalyse zum Tropfenabrolltest, Linienstruktur parallel zur Abrollrichtung**

Dargestellt sind verschiedene Bildausschnitte (Frames) aus der Videoanalyse des Tropfenabrolltests. Die Probe wurde im  $45^\circ$  Winkel positioniert, die linienartige Strukturierung wurde parallel zur Abrollrichtung des Tropfens ausgerichtet (Vergleich Abbildung 12 a). Der erste Frame (a) stellt den Beginn der Messung dar, Frame-Nummer und Beginn der Messzeit sind im unteren Bildrand (rote Markierung) abzulesen. Das Voranschreiten der Tropfenfront ist in (b) dargestellt. Die Messzeit wurde gestoppt, wenn die Tropfenfront den unteren Bildrand erreichte (c), auch hier sind Frame-Nummer und Messzeit im unteren Bildrand (rote Markierung) abzulesen. Die Messstrecke wird durch die rote Linie und deren Start- und Endpunkte durch rote Pfeile markiert. Zur Auswertung wurde die zeitliche Differenz zwischen Messbeginn und Ende berechnet. Diese Werte dienen zum Vergleich verschiedener Messungen bzw. Probenoberflächen.

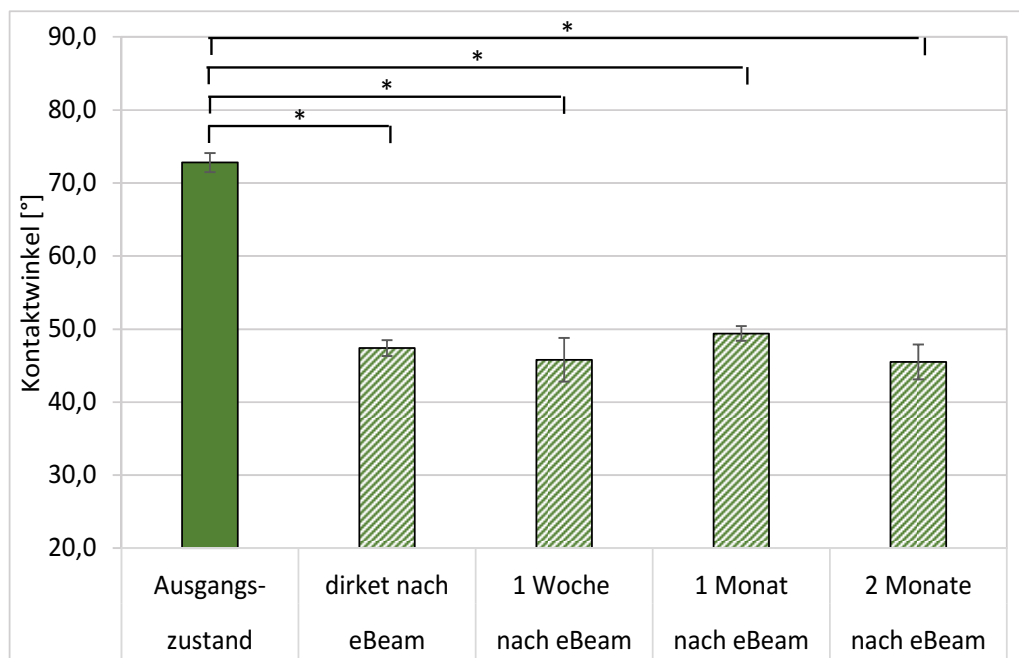
### 5.2.5. Stabilität der Elektronenstrahlmodifizierung

Für den Einsatz im medizintechnischen Bereich ist es wichtig Erkenntnisse über die Stabilität der modifizierten DLC-Beschichtungen zu erhalten. Zum einen ist die Langzeitstabilität in verschiedenen Umgebungsmedien von Bedeutung zum anderen muss die Widerstandsfähigkeit gegenüber definierten Reinigungs- und Sterilisationsverfahren untersucht werden.

### Langzeitstabilität

Bereits im ersten Abschnitt der vorliegenden Arbeit zeigte sich, dass die eBeam-Modifizierung der DLC-Beschichtungen in einer Verringerung des Kontaktwinkels resultiert (s. Kapitel 5.1.3). Daher wurde der Kontaktwinkel auch als Kenngröße für die Untersuchungen zur Stabilität herangezogen.

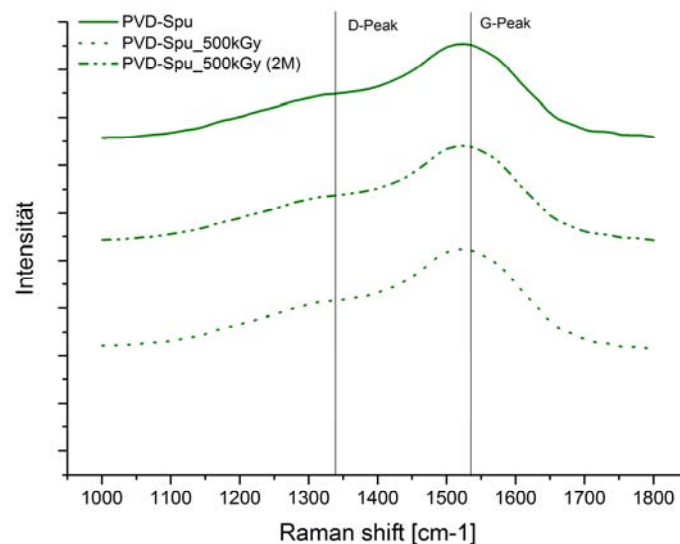
In Abbildung 40 ist der Kontaktwinkel im Ausgangszustand und nach Modifizierung der DLC-Beschichtungen sowie anschließender Langzeitlagerung abgebildet. Durch die Modifizierung wird der Kontaktwinkel von ursprünglich  $73^\circ$  auf  $48^\circ$  reduziert. Die modifizierten Proben wurden an Luft gelagert und nach einer Woche, einem Monat sowie zwei Monaten erneut gemessen. Die Messungen ergaben Kontaktwinkelwerte im Bereich von  $46$  bis  $49^\circ$  und zeigten damit keine signifikanten Veränderungen vergleichen mit dem Wert direkt nach der Modifizierung. Damit zeigt die Verringerung des Kontaktwinkels nach der eBeam-Modifizierung einen konstanten Wert bis zu zwei Monate nach der Modifizierung und die zweimonatige Lagerung an Luft hat keinen Einfluss auf den Kontaktwinkel der modifizierten DLC-Beschichtungen.



**Abbildung 40: Kontaktwinkel der modifizierten Schichten während Langzeitlagerung an Luft**

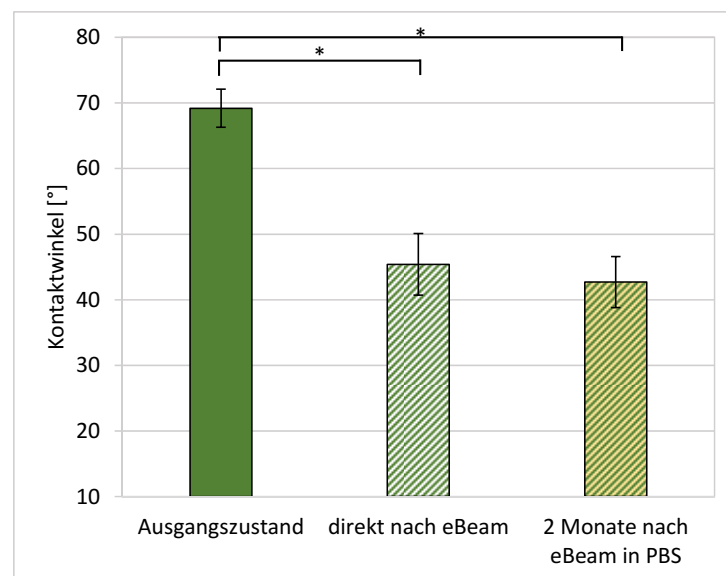
Dargestellt ist der Kontaktwinkel der unbehandelten und modifizierten DLC-Beschichtungen (Modifizierung mit 500 kGy). Direkt nach der Modifizierung wurde der Kontaktwinkel mit Wasser bestimmt, anschließend wurden die Proben zwei Monate an Luft gelagert und es erfolgte nach einer Woche, einem Monat sowie zwei Monaten eine erneute Bestimmung des Kontaktwinkels.

Um die Auswirkung einer Langzeitlagerung auf eine Veränderung der Stöchiometrie von  $sp^2$ - und  $sp^3$ -Bindungsanteile der modifizierten DLC-Beschichtungen zu untersuchen, wurden die Schichten mit 500 kGy modifiziert und anschließend mittels Ramanspektroskopie analysiert, eine weitere ramanspektroskopische Analyse erfolgte zwei Monate nach der Modifizierung bei Lagerung an Luft. Die Auswertung der Ramanspektren erfolgt im Bereich der für DLC-Beschichtungen typischen Peaks: D-Peak und G-Peak [190]. Diese befinden sich im Bereich von  $1360\text{ cm}^{-1}$  bzw.  $1560\text{ cm}^{-1}$  [196]. In Abbildung 41 sind die Ramanspektren von DLC-Beschichtungen im unbehandelten Zustand („PVD-Spu“) sowie direkt nach der Modifizierung („PVD-Spu\_500kGy“) und zwei Monate nach der Modifizierung („PVD-Spu\_500kGy (2M)“) dargestellt. D- und G-Peak wurden durch Peakentfaltung mittels Auswertesoftware ermittelt. Zum Vergleich wurden die Hüllkurven der einzelnen Proben als Stapeldarstellung ohne Peakentfaltung, jedoch mit Kennzeichnung der D- und G-Peakposition zusammengefasst. Es zeigt sich, dass sich im Bereich von D- und G-Peak weder direkt nach durchgeführter eBeam-Modifizierung noch zwei Monate nach der Modifizierung Veränderungen ergeben, die Peakpositionen sind in allen Fällen identisch.



**Abbildung 41: Ramanspektren der modifizierten DLC-Schichten vor und nach Langzeitlagerung an Luft**  
 Dargestellt sind die Ramanspektren von unbehandelten DLC-Beschichtungen („PVD-Spu“) sowie direkt nach Modifizierung mit 500 kGy („PVD-Spu\_500kGy“) bzw. nach zweimonatiger Lagerung an Luft („PVD-Spu\_500kGy (2M)“). Zum Vergleich wurden die Hüllkurven der einzelnen Proben als Stapeldarstellung mit Kennzeichnung der D- und G-Peakposition zusammengefasst. Die Anregung erfolgte mit einem Laser der Wellenlänge 532 nm.

Neben der Langzeitlagerung an Luft erfolgte eine zweimonatige Lagerung bei 37 °C in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) unter den in Kapitel 4.9.1 angegebenen Bedingungen. Als Kenngröße zur Bewertung möglicher Veränderungen durch die Lagerung diente aus o.g. Gründen auch hier der Kontaktwinkel. Abbildung 42 stellt den Kontaktwinkel der DLC-Beschichtungen im Ausgangszustand und direkt nach der eBeam-Modifizierung mit 500 kGy sowie nach zweimonatiger Lagerung in PBS dar. Im Ausgangszustand beträgt der Kontaktwinkel 69 °. Die Modifizierung führt zu einer Abnahme des Kontaktwinkels um 24 ° auf 45 °. Nach zweimonatiger Lagerung in PBS beträgt der Kontaktwinkel 43 ° und zeigt damit keinen signifikanten Unterschied zum Wert direkt nach der durchgeführten Modifizierung. Die zweimonatige Lagerung in PBS hat keinen Einfluss auf den Kontaktwinkel der modifizierten DLC-Beschichtungen.



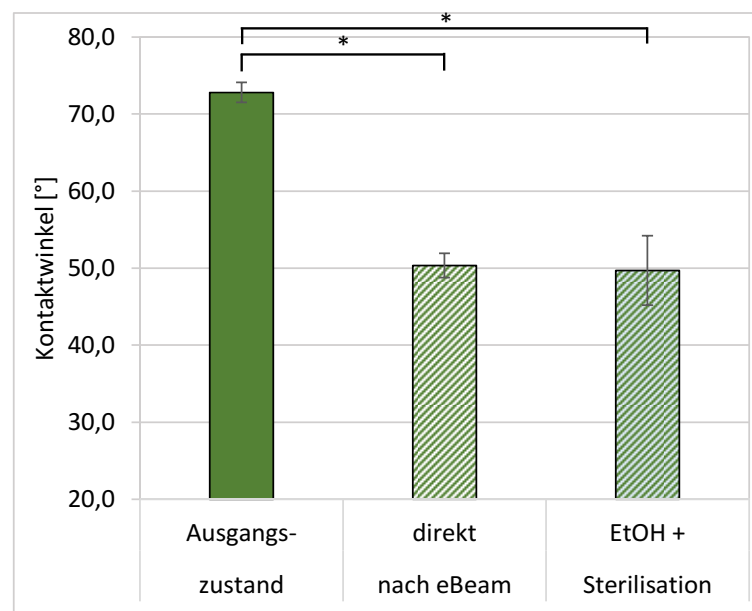
**Abbildung 42: Kontaktwinkel der modifizierten Schichten nach Langzeitlagerung in PBS**

Dargestellt ist der Kontaktwinkel der unbehandelten und modifizierten DLC-Beschichtungen (Modifizierung mit 500 kGy). Direkt nach der Modifizierung wurde der Kontaktwinkel mit Wasser bestimmt, anschließend wurden die Proben zwei Monate bei 37 °C in PBS gelagert danach erfolgte eine erneute Bestimmung des Kontaktwinkels („2 Monate nach eBeam in PBS“).

### Widerstandsfähigkeit bei chemisch-mechanischer Belastung

Die Stabilität der mittels PVD-Spu abgeschiedenen DLC-Beschichtungen gegenüber wiederholten Desinfektions- und Sterilisationszyklen wurde bereits in Kapitel 5.1.1 durch die Dokumentation der Schichtdefekte gezeigt. Dabei ergab sich im Rahmen von 80 Sterilisationszyklen keine signifikante Veränderung der betrachteten Defektfläche

auf den Proben (Abbildung 18, Ergebnisse für PVD-Spu). Für diese Untersuchungen wurden unbehandelte DLC-Beschichtungen genutzt. Die Stabilität der eBeam-Modifizierung auf diesen DLC-Beschichtungen soll im Folgenden in Zusammenhang mit chemischer und mechanischer Belastung bewertet werden. Dazu wurde eine Reinigungsprozedur bestehend aus mechanischer Belastung sowie dem Einsatz von 70 %igem Ethanol und anschließender Dampfsterilisation angewendet. Zur Bewertung diente aus o.g. Gründen erneut der Kontaktwinkel. In Abbildung 43 ist der Kontaktwinkel der DLC-Beschichtungen im Ausgangszustand und direkt nach der durchgeführten eBeam-Modifizierung mit 500 kGy sowie nach anschließender mechanischer Reinigung mit Ethanol und Sterilisation dargestellt. Im Ausgangszustand beträgt der Kontaktwinkel  $73^\circ$ . Die Modifizierung führt zu einer Abnahme des Kontaktwinkels um  $21^\circ$  auf  $51^\circ$ . Nach mechanischer Reinigung mit Ethanol und Sterilisation beträgt der Kontaktwinkel  $50^\circ$  und zeigt damit keinen signifikanten Unterschied zum Wert direkt nach der Modifizierung. Mechanische Belastung und Sterilisation haben keinen Einfluss auf den Kontaktwinkel der modifizierten DLC-Beschichtungen.



**Abbildung 43: Kontaktwinkel der modifizierten Schichten nach Desinfektion und Sterilisation**

Dargestellt ist der Kontaktwinkel der unbehandelten und modifizierten DLC-Beschichtungen (Modifizierung mit 500 kGy). Direkt nach der Modifizierung wurde der Kontaktwinkel mit Wasser bestimmt. Anschließend wurden die Proben einer mechanischen Reinigung mit 70 %igem Ethanol (Desinfektion) sowie anschließender Dampfsterilisation unterzogen, danach wurde der Kontaktwinkel erneut bestimmt („EtOH + Sterilisation“).

### 5.3. Untersuchungen zur Biokompatibilität der modifizierten DLC-Beschichtungen

Der Vergleich der Abscheidemethoden für die DLC-Beschichtungen in Kapitel 5.1 führte zur Auswahl der Abscheidemethode PVD-Sputtern. Alle im Kapitel 5.3 dargestellten Untersuchungen wurden mit Beschichtungen dieser Abscheidemethode durchgeführt. Demnach bezieht sich im Folgenden die Bezeichnung *DLC* ausschließlich auf diese Beschichtungen.

Durch die eBeam-Modifizierung wird eine Verringerung der Zellzahl auf den DLC-Beschichtungen erzielt (s. Kapitel 5.1.3). Im Folgenden wurde zunächst untersucht, inwiefern auch dabei eine Dosisabhängigkeit zu beobachten ist, um darauf basierend mögliche Parallelen zu den in der Oberflächenanalytik beobachteten Ergebnissen herstellen zu können. Um einen uneingeschränkten Einsatz der modifizierten Schichten im medizintechnischen Bereich gewährleisten zu können, wurden Zellvitalität, Inflammationspotential und die Phasen des Zellzyklus untersucht, um Veränderungen dieser Parameter als mögliche Ursachen der veränderten Zellzahl auszuschließen. Anschließend wurde die Proteinadhäsion am Beispiel von Fibronectin als mögliche Ursache der verringerten Zellzahl auf den modifizierten DLC-Schichten untersucht.

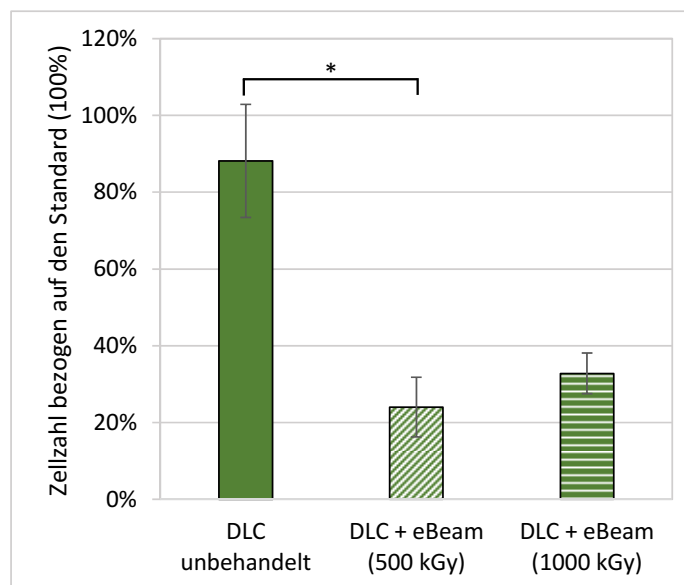
#### 5.3.1. Zellzahl bei Modifizierung mit variierender Dosis

Die Zellzahl pro Flächeneinheit auf modifizierten DLC-Beschichtungen wurde bereits in Kapitel 5.1.3 mit humanen Fibroblasten bestimmt, um eine Aussage über die Bioverträglichkeit zu erhalten. Es zeigte sich eine deutliche Verringerung der Zellzahl (Abbildung 27). Durch die Normierung der Gesamt-Stoffwechselaktivität pro Probe auf die Gesamt-Zellzahl pro Probe konnte gezeigt werden, dass es jedoch zu keiner Veränderung der zellulären Stoffwechselaktivität auf den modifizierten Schichten kommt (Abbildung 29).

Im Folgenden soll untersucht werden, inwiefern die Verringerung der Zellzahl auf den modifizierten DLC-Beschichtungen einen dosisabhängigen Sättigungseffekt zeigt. Grundlage dafür sind die Ergebnisse aus Kapitel 5.2, bei denen mittels Kontaktwinkelmessung ein dosisabhängiger Sättigungseffekt ab 500 kGy beobachtet

wurde (Abbildung 31). Diese Beobachtung soll nun zellbiologisch bewertet werden. Die Zellzahl von humanen Fibroblasten wurde nach dreitägiger Inkubation auf unbehandelten Schichten sowie auf 500 kGy- und 1000 kGy-modifizierten Proben untersucht. In Kapitel 5.1.3 wurde gezeigt, dass die verringerte Zellzahl auf den modifizierten DLC-Beschichtungen nicht durch eine Veränderung der zellulären Stoffwechselaktivität begründet ist (Abbildung 29), daher wurde für die Untersuchungen im Folgenden die Zellzahl ohne parallele Betrachtung der Stoffwechselaktivität bestimmt.

Die Zellzahl wurde wie in Kapitel 4.9.3 beschrieben auf eine definierte Flächeneinheit bezogen. Um die DLC-Beschichtungen im unbehandelten sowie im modifizierten Zustand zu vergleichen, wurde der mitgeführte Standard als Referenz auf 100 % normiert und die Messwerte der Proben entsprechend in Relation dargestellt. Die Zellzahl auf den verschiedenen DLC-Beschichtungen ist in Abbildung 44 dargestellt.



**Abbildung 44: Zellzahl auf modifizierten DLC-Beschichtungen bei variierender eBeam-Dosis**

Dargestellt ist die Zellzahl pro Flächeneinheit von humanen Fibroblasten nach dreitägiger Inkubation auf DLC-Beschichtungen. Im Vergleich stehen DLC-Beschichtungen, welche unbehandelt sowie nach eBeam-Modifizierung mit 500 kGy und 1000 kGy untersucht wurden. Die Ergebnisse sind in Relation zum Standard dargestellt, dieser ist auf 100% normiert. Die Zellzahl wurde durch fluoreszenzmikroskopische Auszählung der Zellkerne in definierten Probenbereichen bestimmt, dafür wurden die Zellkerne mit DAPI angefärbt.

Im Vergleich zum Standard ergibt sich für die Zellzahl auf den unbehandelten DLC-Beschichtungen lediglich eine leichte Verringerung auf 89 %. Auf der mit 500 kGy modifizierten DLC-Beschichtung ist die Zellzahl mit 25 % im Vergleich zum Standard

signifikant reduziert. Auf 1000 kGy-modifizierten Proben ergibt sich eine Zellzahl von 33 % gemessen am Standard. Die Dosiserhöhung führt zu keiner weiteren Veränderung der Zellzahl. Sowohl die Modifizierung mit 500 kGy als auch mit 1000 kGy zeigen hinsichtlich der Zellzahl vergleichbare Ergebnisse.

### 5.3.2. Zellvitalität, Apoptose und Nekrose

Durch die Bewertung der zellulären Stoffwechselaktivität in Kapitel 5.1.3 wurde bereits gezeigt, dass der reduzierten Zellzahl auf den modifizierten DLC-Beschichtungen keine Veränderung der metabolischen Aktivität zugrunde liegt. Eine vertiefende Betrachtung zur Biokompatibilität der eBeam-modifizierten DLC-Beschichtungen soll im Folgenden anhand humaner Fibroblasten durch die Untersuchung der vitalen sowie apoptotisch/nekrotischen Zellanteile erfolgen.

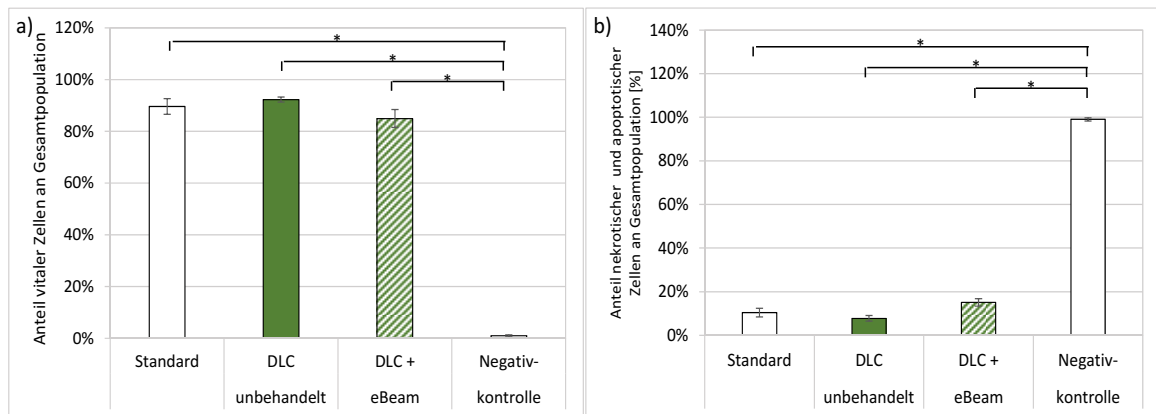
Die Färbung mittels Propidiumiodid (PI) diene zur Bestimmung als Anteil an der Gesamtzellzahl. Für die Einordnung der vitalen Zellen diene entsprechend der Definition in Kapitel 4.9.4 ein Standard. Für die Einordnung der apoptotisch/nekrotischen Zellen wurde eine Negativkontrolle mitgeführt. Die gesamte gemessene Zellpopulation wurde auf 100 % normiert. Entsprechend ergeben sich die vitalen und apoptotisch/nekrotischen Zellanteile als Anteile der Gesamtpopulation. Bei der Negativkontrolle wurden Apoptose und Nekrose induziert.

Abbildung 45 a zeigt, dass sich im Vergleich zum Standard sowohl auf den unbehandelten Schichten als auch auf den eBeam-modifizierten DLC-Schichten keine signifikanten Unterschiede in den Anteilen vitaler Zellen ergeben. Auf dem Standard beträgt der Vitalanteil der Fibroblasten 90 % der Gesamtpopulation. Auf unbehandelten DLC-Beschichtungen und auf eBeam-modifizierten zeigen sich Vitalanteile von 91 % bzw. 85 %. Diese bewegen sich in einem vergleichbaren Größenbereich wie der Standard. Die Negativkontrolle hingegen weist Vitalanteile von lediglich 1 % auf und ist damit gemessen am Standard signifikant reduziert.

Die Anteile der apoptotisch/nekrotischen Zellen sind in Abbildung 45 b dargestellt. Der Standard zeigt einen apoptotisch/nekrotischen Anteil von 10 %. Auf unbehandelten DLC-Beschichtungen und auch auf eBeam-modifizierten zeigen sich die



apoptotisch/nekrotischen Anteile mit 9 % bzw. 15 % im gleichen Größenbereich. Die Negativkontrolle hingegen weist 99 % apoptotisch/nekrotische Anteile auf.



**Abbildung 45: Anteile vitaler und apoptotisch/nekrotischer Fibroblasten auf unbehandelten und modifizierten DLC-Beschichtungen**

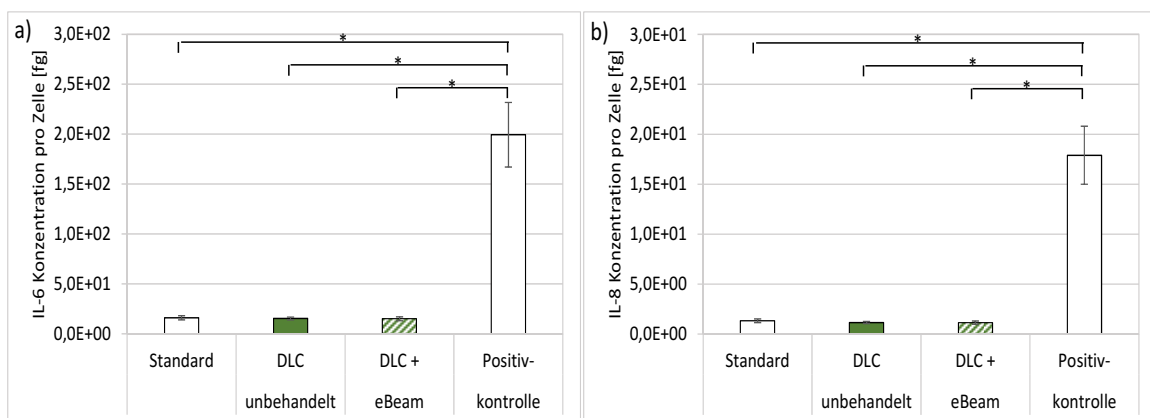
Dargestellt sind die Anteile vitaler (a) sowie apoptotisch/nekrotischer Fibroblasten (b) nach drei-tägiger Inkubation auf unbehandelten und eBeam-modifizierten DLC-Beschichtungen (500 kGy) im Vergleich zum Standard sowie einer Negativkontrolle. Die Analytik erfolgte durch Anfärbung mit Propidiumiodid sowie durchflusszytometrischer Auswertung. Bei den Proben der Negativkontrolle wurde Apoptose und Nekrose induziert.

Die unbehandelten DLC-Beschichtungen sowie die eBeam-modifizierten Proben zeigen keinen Einfluss auf die Verteilung der Gesamtzellpopulation humaner Fibroblasten hinsichtlich Vitalanteile sowie apoptotisch/nekrotische Anteile.

### 5.3.3. Interleukinausschüttung

Durch die Untersuchung der Interleukinausschüttung sollte eine Abschätzung des Inflammationspotentials der modifizierten DLC-Beschichtungen erfolgen. Mittels ELISA wurden die Interleukin-6 (IL-6) und Interleukin-8 (IL-8) -Ausschüttungen von humanen Fibroblasten auf den Proben untersucht. Als Referenzen dienten der Standard sowie eine mit Lipopolysaccharid (LPS) stimulierte Positivkontrolle. Da die Zellzahl auf den Probenoberflächen aufgrund der eBeam-Modifizierung stark variiert, wurden die Ergebnisse der Interleukinmessung auf die jeweils bestimmte Zellzahl normiert. Die Zellzahl wurde entsprechend der Vorgehensweise in Kapitel 4.9.2 bestimmt. In Abbildung 46 ist die zelluläre Interleukinausschüttung für IL-6 und IL-8 von humanen Fibroblasten nach dreitägiger Inkubation auf den Proben dargestellt. Die IL-6 Konzentration des Standards beträgt 16 fg. Zellen, die auf unbehandelten bzw. eBeam-

modifizierten DLC-Beschichtungen inkubiert wurden, zeigten eine IL-6 Ausschüttung von jeweils 15 fg und sind damit vergleichbar mit dem Standard (Abbildung 46 a). Die Positivkontrolle zeigte eine IL-6 Ausschüttung von 200 fg und damit einen signifikanten Unterschied sowohl zum Standard als auch zu den DLC-Proben. Ein vergleichbares Bild ergibt sich bei der Betrachtung der IL-8 Ausschüttung in Abbildung 46 b. Die IL-8 Konzentration beim Standard beträgt 1,3 fg. Zellen, die auf unbehandelten bzw. modifizierten DLC-Schichten inkubiert wurden, zeigen eine IL-8 Ausschüttung von 1,2 fg bzw. 1,1 fg und sind mit dem Standard vergleichbar. Die Positivkontrolle zeigt mit 17,9 fg einen signifikant erhöhten Wert für IL-8. Insgesamt sind die DLC-Proben hinsichtlich beider IL-Werte vergleichbar mit dem Standard, wohingegen die Positivkontrollen einen um Faktor 15 erhöhten Wert aufweisen.



**Abbildung 46: Interleukin-Ausschüttung humaner Fibroblasten auf unbehandelten und modifizierten DLC-Beschichtungen**

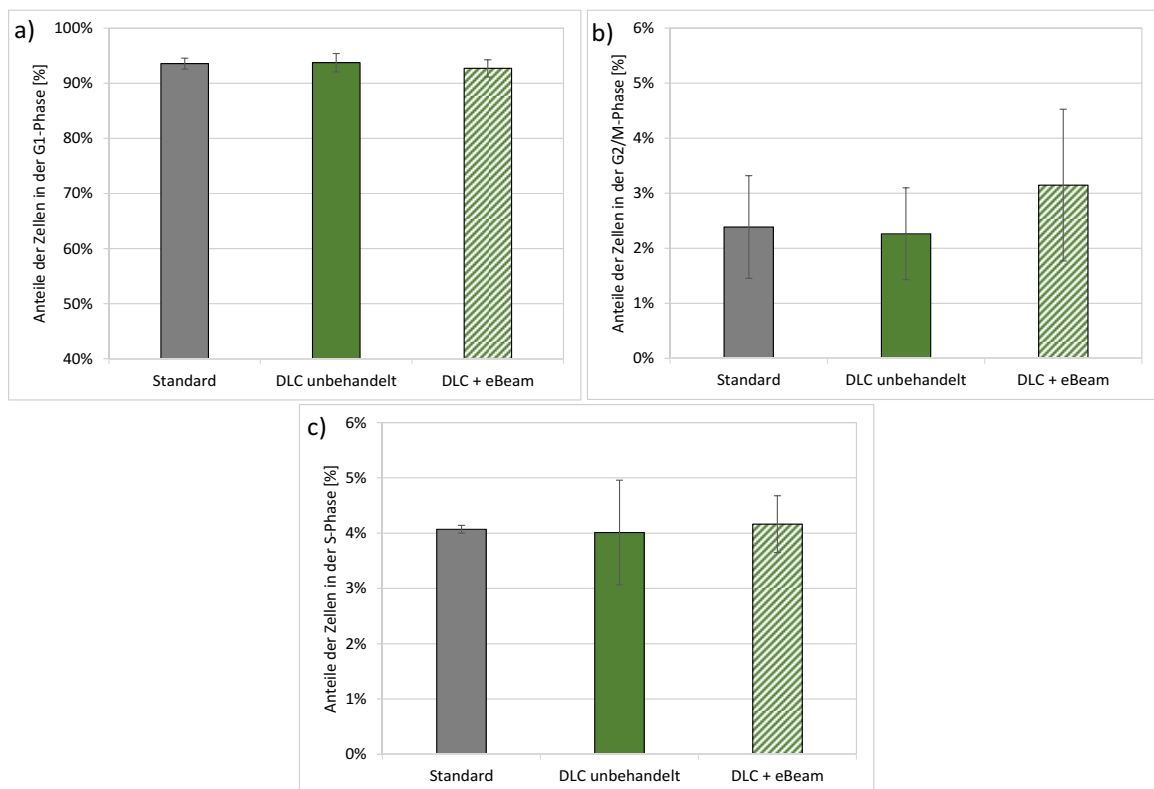
Dargestellt ist die Interleukin-Ausschüttung humaner Fibroblasten nach drei-tägiger Inkubation auf unbehandelten und eBeam-modifizierten DLC-Beschichtungen (500 kGy) für IL-6 (a) und IL-8 (b) im Vergleich zum Standard sowie einer Positivkontrolle. Die Analytik erfolgte mittels ELISA. Die Proben der Positivkontrolle wurden mit LPS stimuliert, um die IL-Ausschüttung zu triggern.

Sowohl die unbehandelten als auch die modifizierten Beschichtungen haben keinen Einfluss auf die Interleukinausschüttung der humanen Fibroblasten.

#### 5.3.4. Analyse der Zellzyklusphasen

Um zu untersuchen, ob durch die Zellinkubation auf den modifizierten Schichten eine Verschiebung der Zellzyklusphasen stattfindet, wurde eine Zellzyklusanalyse durchgeführt. Dazu wurden die Zellen entsprechend der Vorgehensweise in Kapitel

4.9.5 mit Propidiumiodid angefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Die Einteilung der gemessenen Zellpopulationen in G1-, G2/M- und S-Phase erfolgte anhand des mitgeführten Standards. Die gesamte Zellpopulation wurde auf 100 % normiert. Entsprechend ergibt sich die anteilmäßige Verteilung auf G1-, G2/M- und S-Phase. Abbildung 47 zeigt die Verteilung der Zellen auf die einzelnen Zellzyklusphasen.



**Abbildung 47: Zellzyklusphasen humaner Fibroblasten auf unbehandelten und modifizierten DLC-Schichten**  
 Dargestellt sind die Gesamtanteile von humanen Fibroblasten in den folgenden Zellzyklusphasen: G1-Phase (a), G2/M-Phase (b) und S-Phase (c). Die Analyse erfolgte nach Anfärbung mittels Propidiumiodid mittels Durchflusszytometrie nach dreitägiger Inkubation auf unbehandelten sowie eBeam-modifizierten DLC-Beschichtungen (500 kGy) im Vergleich zum Standard. Die Einteilung der gemessenen Zellpopulationen in G1-, G2/M- und S-Phase erfolgte anhand der Grenzwerte des mitgeführten Standards.

Weder für unbehandelte noch für modifizierte DLC-Beschichtungen ergeben sich signifikante Abweichungen im Vergleich zum Standard. Auf dem Standard befinden sich 94 % der Zellen in der G1-Phase (Abbildung 47 a). Nach Inkubation auf unbehandelten bzw. eBeam-modifizierten DLC-Beschichtungen ergibt sich für die G1-Phase ein Anteil von 94 % bzw. 93 %. Beim Standard befinden sich 2,4 % der Zellen in der G2/M-Phase (Abbildung 47 b). Auf unbehandelten bzw. eBeam-modifizierten DLC-

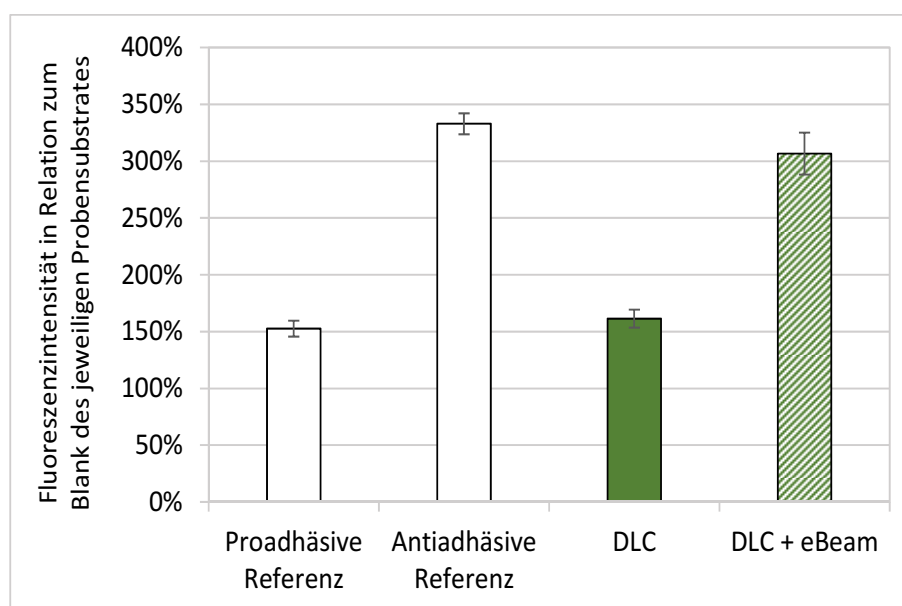
Beschichtungen befinden sich 2,3 % bzw. 3,1 % der Zellen in der G2/M-Phase. Auf die S-Phase entfallen beim Standard 4,1 %, (Abbildung 47 c). Bei Inkubation auf unbehandelten bzw. modifizierten DLC-Beschichtungen ergeben sich 4,0 % bzw. 4,2 %, die auf die S-Phase entfallen.

Insgesamt befindet sich auf allen Proben mit über 90 % der größte Anteil der Zellen in der G1-Phase. Die verbleibenden Anteile verteilen sich mit 2 % bis 4 % auf G2/M- und S-Phase. Sowohl die unbehandelten als auch die eBeam-modifizierten DLC-Beschichtungen zeigen verglichen mit dem Standard keinen Einfluss auf die Verteilung der Zellpopulation auf die einzelnen Zellzyklusphasen.

### 5.3.5. Proteinadhäsion

Eine mögliche Ursache der verringerten Zellzahl auf den modifizierten Beschichtungen kann in der Veränderung der Proteinadhäsion auf diesen Oberflächen begründet sein. Daher wurde anhand des Beispiels Fibronectin die Proteinadhäsion auf unbehandelten und mit 500 kGy modifizierten DLC-Schichten untersucht. Als Referenzen dienten antiadhäsive Plastikoberflächen bzw. adhäsionsfördernde Plastikoberflächen der Zellkultur. Als Blank wurden die jeweiligen Probensubstrate mitgeführt. Gemessen wurde die Fluoreszenzintensität der Proben nach Inkubation mit fluoreszenzmarkiertem Fibronectin. Dabei steht die Fluoreszenzintensität in direktem Verhältnis zur adsorbierten Proreinmenge. Für die Auswertung wurde der Blank des jeweiligen Probensubstrates auf 100 % normiert. Die Messwerte der Proben sind in Abbildung 48 in Relation zu dem jeweiligen Blank dargestellt.

Auf den adhäsionsfördernden Proben („Proadhäsive Referenz“) ist die Fluoreszenzintensität gemessen am zugehörigen Blank auf 150 % erhöht. Die antiadhäsiven Oberflächen („Antiadhäsive Referenz“) weisen mit 330 % eine signifikant höhere Fluoreszenzintensität auf. Die DLC-Beschichtungen zeigen im unbehandelten Zustand eine Fluoreszenzintensität von 160 % gemessen am zugehörigen Blank. Die modifizierten Beschichtungen hingegen weisen eine Fluoreszenzintensität von 310 % auf. Auch dies stellt einen signifikanten Unterschied im Vergleich zur unbehandelten DLC-Oberfläche dar. Signifikante Unterschiede der Messergebnisse aus Abbildung 48 sind aufgrund vereinfachter Übersichtlichkeit in Tabelle 15 angegeben.



**Abbildung 48: Proteinadhäsion auf unbehandelten und modifizierten DLC-Schichten**

Dargestellt ist die Fluoreszenzintensität als Maß für die adsorbierte Proteinmenge an Fibronectin. Die unbehandelten und die modifizierten DLC-Schichten (500 kGy) stehen im Vergleich zu adhäsionsfördernden („proadhäsive Referenz“) und antiadhäsiven Kontrolloberflächen („antiadhäsive Referenz“). Alle Proben wurde für eine Stunde bei 37 °C mit Fibronectin (in PBS gelöst) inkubiert. Die Auswertung erfolgte spektroskopisch (Anregung: 492 nm, Emission: 527 nm). Signifikante Unterschiede der Messergebnisse sind in Tabelle 15 angegeben.

**Tabelle 15: Signifikanzen zu Abbildung 48**

Probe	Proadhäsiv	Antiadhäsiv	DLC	DLC+eBeam
Proadhäsiv		*	/	*
Antiadhäsiv	*		*	*
DLC	/	*		*
DLC+eBeam	*	*	*	

Die Fluoreszenzintensität dient als Maß für die adsorbierte Fibronectinmenge. Demnach wird auf den antiadhäsiven Referenzoberflächen sowie den modifizierten DLC-Beschichtungen eine etwa doppelt so hohe Proteinadsorption beobachtet wie auf den adhäsionsfördernden Referenzen und den unbehandelten Beschichtungen.

## 5.4. Anwendungsbeispiel Hüftimplantat

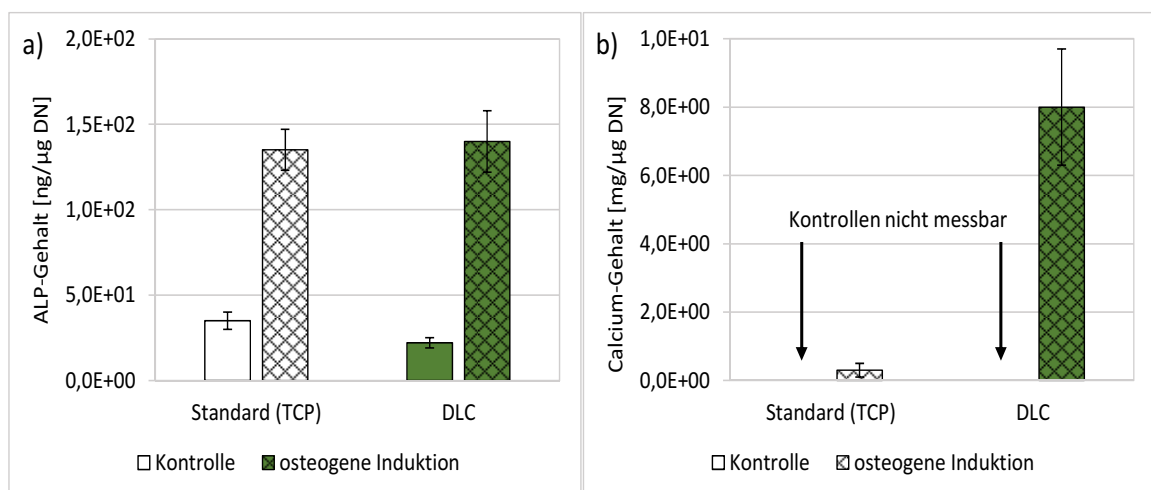
Der Vergleich der Abscheidemethoden für die DLC-Beschichtungen in Kapitel 5.1 führte zur Auswahl der Abscheidemethode PVD-Sputtern. Alle Untersuchungen in Kapitel 5.4 wurden mit Beschichtungen dieser Abscheidemethode durchgeführt. Die Bezeichnung *DLC* bezieht sich daher im Folgenden ausschließlich auf diese Beschichtungen.

Als Anwendungsbeispiel werden wie in Kapitel 3.4 beschrieben Hüftendoprothesen mit Formgedächtnisaktoren herangezogen. Diese sollen im Falle einer Lockerung der Endoprothese eine Wiederverankerung im Knochen ohne äußeren Eingriff ermöglichen. Um dem avisierten Einsatzgebiet hinsichtlich zellbiologischer Untersuchungen zu entsprechen, wurden für die hier dargestellten Versuche Osteoblasten sowie mesenchymale Stammzellen (s. Tabelle 5) genutzt.

### 5.4.1. Osteogene Differenzierung

Um zu bewerten, inwiefern sich die DLC-Beschichtungen auf die osteogene Differenzierung von Stammzellen auswirken, wurde der Gehalt an alkalischer Phosphatase (ALP) und Calcium (Ca) untersucht. Dafür wurden humane mesenchymale Stammzellen auf den DLC-Beschichtungen inkubiert. ALP- und Calciumgehalt sind anerkannte Marker zur Bewertung der osteogenen Differenzierung [10,197]. Die Messung dieser zwei Parameter erfolgte nach 14-tägiger Kultivierung der Zellen auf den Proben. Als Referenz wurden dabei Standard-Zellkulturoberflächen (TCP) genutzt. Die Zellen auf den Proben und der Referenz wurden einerseits ohne osteogene Induktion kultiviert (=Kontrolle) und andererseits mit osteogener Induktion wie in Kapitel 4.9.8 beschrieben. *In vivo* findet die osteogene Induktion im Rahmen der Knochenneubildung durch körpereigene Botenstoffe statt. Innerhalb der Versuchsreihe gibt die vergleichende Bewertung von Zellen ohne und mit Induktion Auskunft darüber, ob von den Proben *in vitro* bereits ein osteoinduktiver Stimulus, selbst ohne von außen getriggerte Induktion, ausgeht. Zur Vereinheitlichung und um eine zellbezogene Aussage zu erhalten, wurden die Ergebnisse auf den jeweiligen DNA-Gehalt pro Probe normiert. Abbildung 49 a zeigt, dass der ALP-Gehalt des Standards ohne osteogene

Induktion bei 35 ng/ $\mu$ g DNA liegt. Bei osteogener Induktion kommt es zu einer Erhöhung auf 135 ng/ $\mu$ g DNA. Auch für die auf den DLC-Beschichtungen inkubierten Zellen ergibt sich ein vergleichbares Bild. Ohne osteogene Induktion liegt der ALP-Gehalt bei 22 ng/ $\mu$ g DNA, die osteogene Induktion führt zu einer Erhöhung auf 140 ng/ $\mu$ g DNA. Die Untersuchung des Calciumgehaltes in Abbildung 49 b ergibt, dass es bei den Kontrollen ohne osteogene Induktion weder auf dem Standard noch auf den DLC-Beschichtungen zu einem nachweisbaren Calciumgehalt kommt. Erfolgt jedoch eine osteogene Induktion, so ergibt sich auf dem Standard ein Calciumgehalt von 0,3 mg/ $\mu$ g DNA. Auf den DLC-Beschichtungen kommt es mit 8,0 mg/ $\mu$ g DNA im Vergleich zum Standard durch die Induktion zur Entwicklung einer wesentlich höheren Calciumkonzentration.



**Abbildung 49: ALP- und Ca-Gehalt mesenchymaler Stammzellen auf DLC-Beschichtungen**

Dargestellt sind der ALP- (a) und Calciumgehalt (b) von humanen mesenchymalen Stammzellen nach 14-tägiger Inkubation auf DLC-Beschichtungen im Vergleich zum Standard. Die Zellen auf den Proben wurden ohne („Kontrolle“) und mit osteogener Induktion kultiviert. Als Standard dienten herkömmliche TCP. Die Ergebnisse wurden zur Vereinheitlichung auf den jeweiligen DNA-Gehalt pro Probe normiert.

Insgesamt wird der ALP-Gehalt der Stammzellen durch die Inkubation auf den DLC-Beschichtungen nicht beeinflusst. Der Calciumgehalt hingegen wird bei gleichzeitiger osteogener Induktion auf den Beschichtungen im Vergleich zum Standard stark erhöht.

#### 5.4.2. Barrierewirkung bei indirektem und direktem Kontakt

##### **Extraktionsversuche zur Bewertung des indirekten Kontaktes**

Die DLC-Beschichtungen sollen auf Formgedächtnislegierungen (FGL) als biokompatible Barrierschicht genutzt werden. Dabei soll der Austritt von Nickelionen reduziert werden. Um die Barrierewirkung zu untersuchen, wurden vergleichende Extraktionsversuche mit unbeschichteten FGL und DLC-beschichteten FGL durchgeführt. Nach einer Extraktionsdauer von zwei Monaten wurden die Extrakte auf vorkultivierte Osteoblasten gegeben und für einen definierten Zeitraum inkubiert. Anschließend wurde die Stoffwechselaktivität der Osteoblasten mittels Resazurinumsatz bewertet. Anhand der Ergebnisse sollten Aussagen getroffen werden, inwiefern es durch die Extrakte zu Veränderungen der Stoffwechselaktivität der Osteoblasten kommt. Zuvor wurde die konzentrationsabhängige Auswirkung von nickelhaltigen Medien auf die Stoffwechselaktivität von Osteoblasten untersucht. Durch Korrelation dieser Ergebnisse mit den Ergebnissen der Extraktionsversuche, könne Rückschlüsse auf den Nickelgehalt der Extrakte gezogen werden. Die Versuche fanden unter statischen Bedingungen, d.h. ohne Verformung oder mechanische Beanspruchung der Proben statt. Daher ist zunächst mit einem geringen Nickelaustritt zu rechnen. *In vivo* hingegen ist ein erhöhter Nickelaustritt zu erwarten, da es durch Mikrobewegungen zwischen Knochen und Implantat zu einer dauerhaften mechanischen Belastung der Oberfläche kommt [165].

Für die Versuche wurde neben dem Standard-Osteoblastenzellkulturmedium auch PBS verwendet. Diese zwei Flüssigkeiten wurden als Extraktionsmedien ausgewählt, da es im PBS aufgrund der einfachen Zusammensetzung zu keiner Komplexbildung<sup>6</sup> der freigesetzten Nickelionen kommen kann und damit auch die Untersuchung der Auswirkung geringer Nickelkonzentrationen möglich ist. Im Zellkulturmedium hingegen kann es aufgrund der zahlreichen Bestandteile wie beispielsweise dem Serum-Supplement zur Komplexbildung von Nickelionen kommen, wodurch die zytotoxische

---

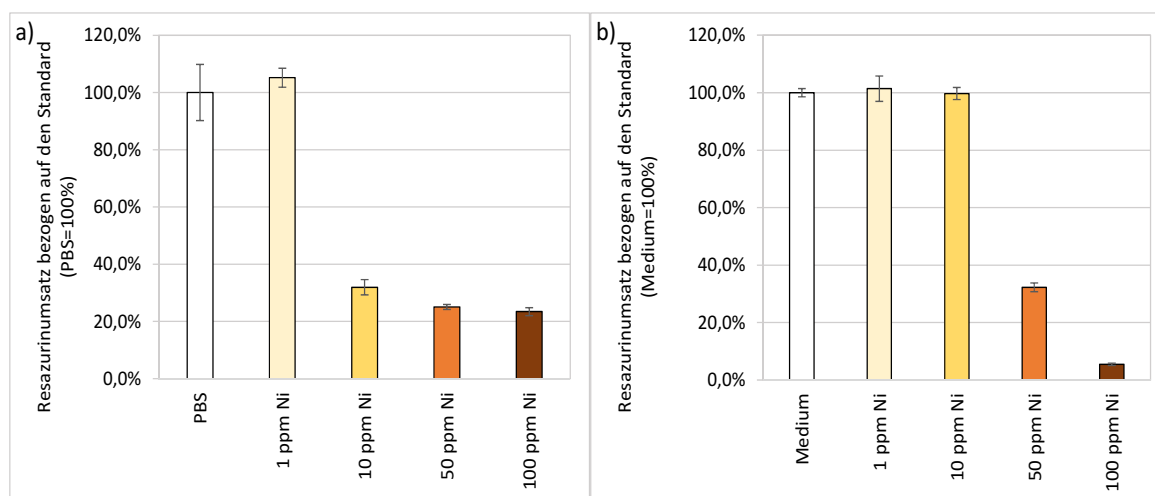
<sup>6</sup> Unter Komplexbildung wird im vorliegenden Fall die Reaktion der Nickelionen mit Serumbestandteilen verstanden. Es ist belegt, dass Nickelionen bevorzugt mit Serumalbumin reagieren, wobei vor allem Histidin als hauptverantwortliche Aminosäure identifiziert ist [198]. Werden die Nickelionen durch diese Reaktion abgefangen, so erfolgt bei geringen Konzentrationen noch keine zellschädigende Wirkung.



Wirkung in einem gewissen Maß gepuffert werden kann. Somit sind bei der Nutzung von Zellkulturmedium als Extraktionsmedium geringe Nickelkonzentrationen weniger sensitiv detektierbar. Dennoch stellt Zellkulturmedium im Vergleich zum PBS eine *in vivo*-nähere Situation dar und wurde aus diesem Grund ebenfalls als Extraktionsmedium gewählt.

Für die Inkubation der vorkultivierten Osteoblasten mit PBS-Extrakten wurde eine Inkubationszeit von 16 h definiert, die Inkubation mit Medium-Extrakten erfolgte für 24 h. Die jeweiligen Inkubationszeiten wurden in Vorversuchen ermittelt. Die mitgeführten Standards wurden für die Versuche mit reinem PBS bzw. reinem Zellkulturmedium inkubiert und anschließend als Referenz auf 100 % normiert. Die Ergebnisse sind entsprechend in Relation zum Standard dargestellt.

Zunächst wurde die Veränderungen der Stoffwechselaktivität der Osteoblasten in Abhängigkeit verschiedener Nickelkonzentration in PBS und Zellkulturmedium untersucht. Abbildung 50 a zeigt, dass sich bei Inkubation der Osteoblasten mit gering nickelhaltigem PBS (1 ppm) keine Veränderungen gemessen am Standard (Inkubation mit reinem PBS) ergeben, die Stoffwechselaktivität liegt bei 105 %. Die Inkubation der Osteoblasten mit 10 ppm nickelhaltigem PBS führt bereits zu einer signifikanten Abnahme des Stoffwechsels der Osteoblasten auf 32 %. Eine weitere Konzentrationserhöhung auf 50 ppm bzw. 100 ppm äußert sich mit 25 % bzw. 23 % ebenfalls in einer signifikant reduzierten Stoffwechselaktivität. Die analoge Betrachtung mit Zellkulturmedium (Abbildung 50 b) zeigt, dass 1 ppm und 10 ppm nickelhaltige Zellkulturmedien im Vergleich zum Standard (Inkubation mit reinem Zellkulturmedium) mit 100 % und 101 % zu keiner signifikanten Veränderung der Stoffwechselaktivität führen. Konzentrationen von 50 ppm Nickel im Zellkulturmedium reduzieren die Stoffwechselaktivität signifikant auf 32 %. Die Konzentrationserhöhung auf 100 ppm Nickel führt zu einer weiteren Verringerung auf 5 % gemessen am Standard. Auch dieses Ergebnis stellt eine signifikante Veränderung dar. Die Nutzung von PBS ermöglicht die Detektion von Nickelkonzentrationen ab 10 ppm durch signifikante Veränderungen der Stoffwechselaktivität. Wird Zellkulturmedium genutzt, ist die Detektion von Nickelkonzentrationen ab 50 ppm möglich.



**Abbildung 50: Stoffwechselaktivität humaner Osteoblasten bei Inkubation mit Ni-haltigem PBS bzw. Ni-haltigem Osteoblastenmedium**

Dargestellt ist der Resazurinumsatz als Maß für die Stoffwechselaktivität von Osteoblasten nach Inkubation mit nickelhaltigem PBS (a) bzw. Zellkulturmedium (b) im Vergleich zum Standard (reines PBS bzw. Zellkulturmedium). Es wurden Nickelkonzentrationen von 1, 10, 50 und 100 ppm in PBS bzw. Zellkulturmedium eingestellt. Die Inkubationsdauer mit den nickelhaltigen Medien auf den vorkultivierten Osteoblasten (3d) wurde vorab ermittelt und betrug 16 h für PBS bzw. 24 h für Zellkulturmedium. Signifikante Unterschiede der Messergebnisse sind in Tabelle 16 angegeben.

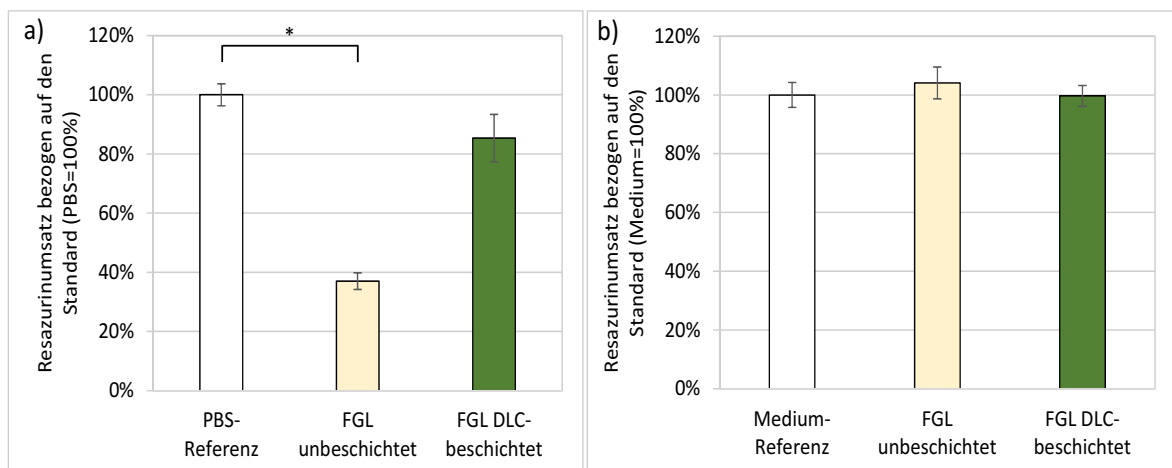
Signifikanten Unterschiede der Ergebnisse aus Abbildung 50 sind aufgrund vereinfachter Übersichtlichkeit in Tabelle 16 angegeben.

**Tabelle 16: Signifikanzen zu Abbildung 50 (links: PBS; rechts: Osteoblastenmedium)**

Probe	PBS	1 ppm Ni	10 ppm Ni	50 ppm Ni	100 ppm Ni	Probe	Medium	1 ppm Ni	10 ppm Ni	50 ppm Ni	100 ppm Ni
<b>PBS</b>		/	*	*	*	<b>Medium</b>		/	/	*	*
<b>1 ppm Ni</b>	/		*	*	*	<b>1 ppm Ni</b>	/		/	*	*
<b>10 ppm Ni</b>	*	*		/	/	<b>10 ppm Ni</b>	/	/		*	*
<b>50 ppm Ni</b>	*	*	/		/	<b>50 ppm Ni</b>	*	*	*		*
<b>100 ppm Ni</b>	*	*	/	/		<b>100 ppm Ni</b>	*	*	*	*	

Im Folgenden wurden die PBS- und Mediumextrakte nach zweimonatiger Extraktion der unbeschichteten und DLC-beschichteten FGL auf drei Tage vorkultivierte Osteoblasten gegeben und für 16 h (PBS) bzw. 24 h (Zellkulturmedium) inkubiert. Anschließend wurde der Resazurinumsatz als Maß für die Stoffwechselaktivität bestimmt. Als Referenz dienten dabei Osteoblasten, welche parallel mit reinem PBS bzw. reinem Medium inkubiert wurden, welches ebenfalls für zwei Monate bei 37 °C

gelagert wurde. Die Referenz wurde auf 100 % normiert und die Messwerte der Proben entsprechend in Relation dargestellt. Die Ergebnisse unter Nutzung von PBS als Extraktionsmedium sind in Abbildung 51 a dargestellt. Die Extrakte der unbeschichteten FGL führen gemessen an der Referenz zu einem signifikanten Rückgang der Stoffwechselaktivität auf 37 %. Die Extrakte der DLC-beschichteten FGL zeigen mit 85 % Stoffwechselaktivität keine von der Referenz signifikant abweichenden Veränderungen. Wird Zellkulturmedium als Extraktionsmedium genutzt (Abbildung 51 b), so zeigen sich nach Inkubation der Extrakte mit den Osteoblasten keine signifikanten Veränderungen. Die Extrakte der unbeschichteten und DLC-beschichteten FGL zeigen eine Stoffwechselaktivität von 104 % bzw. 100 % und sind damit vergleichbar mit der Referenz.



**Abbildung 51: Stoffwechselaktivität humaner Osteoblasten bei Inkubation mit Extrakten**

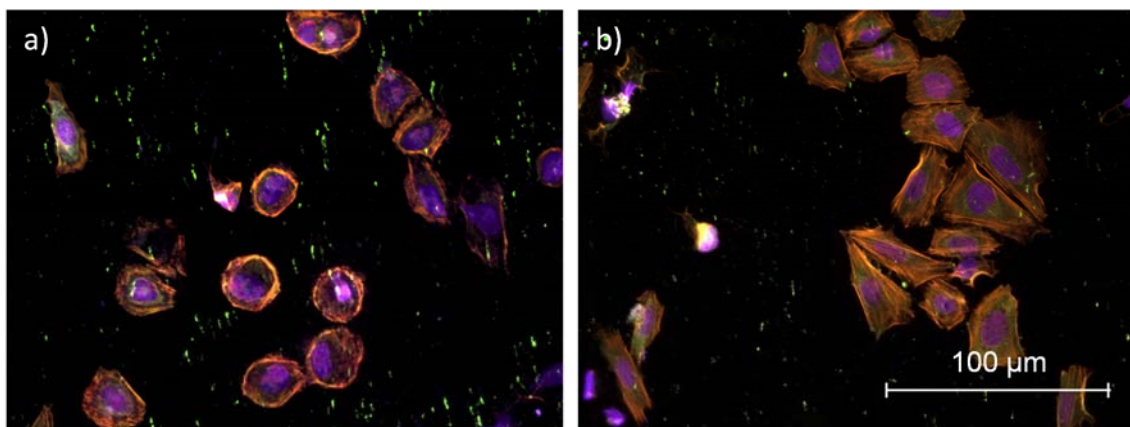
Dargestellt ist der Resazurinumsatz als Maß für die Stoffwechselaktivität von Osteoblasten nach Inkubation mit PBS- (a) bzw. Mediumextrakten (b) im Vergleich zum Standard (reines PBS bzw. Zellkulturmedium). Die Extrakte wurden durch zweimonatige Extraktion von unbeschichteten und DLC-beschichteten FGL mit PBS bzw. Zellkulturmedium bei 37 °C gewonnen. Die Inkubationsdauer der Extrakte auf den vorkultivierten Osteoblasten (3d) wurde vorab ermittelt und betrug 16 h für PBS bzw. 24 h für Zellkulturmedium.

Insgesamt können durch die PBS-Extrakte Auswirkungen auf die Stoffwechselaktivität der Osteoblasten beobachtet werden, für Extrakte mit Zellkulturmedium ist dies nicht zu beobachten.

### Analyse der Zellmorphologie zur Bewertung des Direktkontaktes

Neben den Extraktionsversuchen wurde die Zellmorphologie von Osteoblasten bei Direktkontakt mit unbeschichteten und DLC-beschichteten FGL bewertet. Dafür

wurden die Zellen für 24 h auf den Oberflächen inkubiert. Anschließend erfolgte die Fluoreszenzfärbung entsprechend der in Kapitel 4.9.2 beschriebenen Vorgehensweise. Anhand vergleichender fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen wurde die Zellmorphologie der Osteoblasten bewertet. Eine stark abgerundete Morphologie der Osteoblasten auf unbeschichteten FGL-Proben zeigt sich in Abbildung 52 a. Eine Spreitung der Zellen ist nicht erkennbar. Zusätzlich entstand der Eindruck, dass die Zelldichte auf den unbeschichteten FGL in den betrachteten Bereichen vergleichsweise niedrig ist. Auf den DLC-beschichteten FGL hingegen entstand der Eindruck einer im Vergleich deutlich höheren Zellzahl.



**Abbildung 52: Morphologie humaner Osteoblasten auf unbeschichteten und beschichteten FGL**  
*Dargestellt sind fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von humanen Osteoblasten auf unbeschichteten (a) und DLC-beschichteten FGL (b) nach eintägiger Inkubation. Angefärbt wurden das Zytoskelett (TRITC) und die Zellkerne (DAPI). Die Aufnahmen erfolgten bei 100facher Vergrößerung.*

Die Zellmorphologie der auf DLC-beschichteten FGL inkubierten Osteoblasten (Abbildung 52 b) zeigte sich natürlich ausgeprägt mit einer gut erkennbaren Zellspreitung. Zytoskelett und Zellkerne erscheinen in gesunder Morphologie.

## 6. Diskussion

Die vorliegende Arbeit ist in zwei Abschnitte untergegliedert. Ziel des ersten Abschnittes ist die Auswahl einer geeigneten Abscheidemethode für eine Beschichtung aus diamantähnlichem Kohlenstoff (DLC), welche mittels Elektronenstrahl (eBeam) modifiziert werden kann. Die Modifizierung soll eine gezielte Steuerung der Zelladhäsion für den biomedizinischen Einsatz der Beschichtungen ermöglichen.

Im zweiten Abschnitt werden vertiefenden Fragestellungen zur eBeam-Modifizierung anhand der ausgewählten DLC-Beschichtung untersucht. Die Mechanismen und Grenzen der Modifizierung sowie deren Stabilität werden bewertet. Die Biokompatibilität und -funktionalität der modifizierten Schichten wird anhand ausgewählter zellbiologischer Methoden sowie humaner Zellen und Zelllinien analysiert. Anhand des Anwendungsbeispiels einer Hüftendoprothese mit integrierten Aktoren auf Basis von Formgedächtnislegierungen (FGL) wird anschließend der praktische Bezug hergestellt.

### 6.1. Auswahl einer Methode zur DLC-Abscheidung

Im ersten Abschnitt der vorliegenden Arbeit werden vier Abscheidemethoden für DLC-Beschichtungen verglichen. Dabei handelt es sich um Methoden, die auf der Gasphasenabscheidung basieren: die plasmaaktivierte chemische Gasphasenabscheidung (PA-CVD), das Magnetronspütern (PVD-Spu) und die Lichtbogenverdampfung (PVD-Arc) bzw. die gefilterte Lichtbogenverdampfung (PVD-Arcfil). Eine detaillierte Beschreibung der Methoden findet sich in Kapitel 3.1.1 bzw. 4.3. Ziel ist die Auswahl einer Abscheidemethode anhand folgender Kriterien: Stabilität der Beschichtung, Schichtmorphologie, Biokompatibilität und Veränderung der Zelladhäsion durch die eBeam-Modifizierung

Im ersten Schritt wurde mittels Photoelektronenspektroskopie (XPS) überprüft, ob die Zusammensetzung der verschiedenen DLC-Schichten hinsichtlich der Hybridisierung der Kohlenstoffatome den avisierten Vorgaben aus Kapitel 4.3 entspricht. Abbildung 14

stellt die Schichtzusammensetzung der verschiedenen Beschichtungen dar. Mittels PA-CVD abgeschiedene DLC-Schichten weisen den höchsten  $sp^2$ -Gehalt auf, gefolgt von PVD-Spu-Beschichtungen. Für PVD-Arc- und PVD-Arcfil-Schichten wurde der geringste  $sp^2$ -Gehalt ermittelt. Hingegen ist der  $sp^3$ -Gehalt dieser Schichten am höchsten. PVD-Spu- und PA-CVD-Beschichtungen liegen darunter und zeigen einen vergleichbaren  $sp^3$ -Gehalt.

Auch der Wasserstoffgehalt ist nach den Maßgaben aus Kapitel 4.3 ein Kriterium zur Charakterisierung der verschiedenen DLC-Beschichtungen. Anhand eines deutlichen Basislinienanstieges bei der Analyse von PA-CVD-Schichten im Ramanspektrum [189] konnte gezeigt werden, dass die Photolumineszenz dieser Schichten erhöht ist. Dies ist auf einen Wasserstoffgehalt von über 30 % zurückzuführen [199,200]. Somit ist belegt, dass durch die unterschiedlichen Abscheidemethoden DLC-Beschichtungen entsprechend den Vorgaben aus Kapitel 4.3 abgeschieden werden konnten. Auch die Schichtdickenbestimmung bestätigt, dass die angestrebte Schichtdicke von mindestens einem Mikrometer erreicht wurde (Tabelle 12).

Als nächster Schwerpunkt wurde die Oberflächenmorphologie analysiert. Mittels Rasterelektronenmikroskopie (REM) erfolgte eine visuelle Bewertung. Dabei zeigte sich, dass die PVD-Arc- und PVD-Arcfil-Oberflächen mit zahlreichen Droplets belegt sind (Abbildung 26). Bei PA-CVD und PVD-Spu hingegen ist nach der Beschichtung weiterhin die Grundstruktur des Edelstahlsubstrates erkennbar. Als objektive Messgröße wurde anschließend der Mittenrauwert mittels Weißlichtinterferometrie bestimmt. Das Beschichtungssubstrat ist durch einen Mittenrauwert von  $0,146 \mu\text{m}$  gekennzeichnet, dieser wird durch die Beschichtungen um ca.  $0,010 \mu\text{m}$  erhöht (Abbildung 25). Gemessen an der Grundraugigkeit des Substrates ist dies eine sehr geringe Zunahme und zeigt, dass alle Abscheidemethoden geeignet sind auch feine Substratstrukturen detailgetreu abzubilden. Die Ursache für die leichte Erhöhung des Wertes liegt in der Art der Schichtabscheidung. Alle Methoden zählen zu den *Source controlled* Abscheidemethoden. Dabei kommt es in tiefer liegenden Bereichen des Substrates (Einkerbungen etc.) zur Abscheidung geringerer Schichtdicken aufgrund von Abschattungseffekten [201]. Somit erhöht sich der Abstand zwischen Profilmaxima und -minima. Der stark erhöhte Mittenrauwert der PVD-Arcfil-Beschichtung, welcher auch

mit einer deutlich größeren Standardabweichung verbunden ist, weist auf die bereits in der REM-Analyse beobachtete hohe Dropletzahl hin.

Nachdem die Schichtzusammensetzung und -morphologie der verschiedenen DLC-Beschichtungen verglichen wurde, stellt die Schichtstabilität den nächsten Vergleichsschwerpunkt dar.

Die Haftfestigkeit der Schichten konnte für alle Abscheidemethoden mit der Haftfestigkeitsklasse 1 bewertet werden, d.h. die Beschichtungen weisen eine sehr gute Haftfestigkeit auf. Dabei ist jedoch zu berücksichtigen, dass das weiche Edelstahlsubstrat die Anforderungen der VDI 3198 zur Haftfestigkeitsprüfung nicht hinreichend erfüllt und die Messungen somit nur eingeschränkt aussagefähig sind.

Für das medizintechnische Einsatzgebiet ist neben der Schichthftung die Sterilisationsfestigkeit vor allem aus Gründen der Biokompatibilität und des Korrosionsschutzes von grundlegender Bedeutung [189]. Bereits Jones et al. zeigten, dass chirurgische Instrumente, welche mit DLC-Schichten ausgestattet wurden dem Praxisgebrauch samt mehrfachen Sterilisation stand halten können [70]. In der vorliegenden Arbeit wurde die Sterilisationsfestigkeit anhand eines speziell entwickelten Testregimes untersucht. Dafür mussten die Proben 80 alternierende Zyklen von Desinfektion und Heißdampfsterilisation durchlaufen. Anhand der kontinuierlichen Dokumentation der Defekte in den Schichten erfolgte die Bewertung der Sterilisationsfestigkeit. Bereits im Ausgangszustand weisen die PA-CVD-Schichten eine etwa 10fach größere Defektfläche als die anderen Beschichtungen auf (Abbildung 17). Die Defektgröße dieser Schichten ist im Vergleich ebenfalls deutlich höher. Im Verlauf der Sterilisationszyklen setzt sich dieses Bild fort (Abbildung 18). Nach 80 Sterilisationszyklen liegt die Defektfläche von PA-CVD knapp zwei Logarithmusstufen höher als die Defektfläche der anderen Beschichtungen. Dies verdeutlicht eine unzureichende Stabilität dieser DLC-Beschichtungen für den Praxisgebrauch. PVD-Spu-, PVD-Arc- und PVD-Arcfil-Schichten zeigen im Verlauf der 80 Zyklen nur einen sehr geringen Anstieg der Defektfläche, was die Praxistauglichkeit hinsichtlich Schichtstabilität für diese Beschichtungen nachweist.

Anschließend wurden die Reibeigenschaften der Beschichtungen mittels Tribometermessung untersucht (Abbildung 16). Für das Anwendungsbeispiel der Hüftendoprothese kann es zu Mikrobewegungen zwischen Implantat und Knochen kommen. In zahlreichen Studien wurde belegt, dass Bewegungen im Mikrobereich bis zu einer Größenordnung von 100  $\mu\text{m}$  die Osseointegration fördern [202,203]. Die mechanische Belastung darf sich jedoch nicht negativ auf die Schichtstabilität auswirken und sollte zudem durch einen möglichst geringen Reibwiderstand gekennzeichnet sein, um Partikelabtrag und eine damit verbundene Irritation des angrenzenden Gewebes zu vermeiden [204].

Die Reibungszahlen für die PA-CVD-, PVD-Spu- und PVD-Arc-Schichten nehmen in der Einlaufphase der Messung kontinuierlich ab, dabei wird für PVD-Spu-Schichten die geringste Reibungszahl beobachtet (Abbildung 16). Die Ergebnisse für PVD-Arcfil-Beschichtungen spiegeln die in der Betrachtung der Schichtmorphologie beobachteten Resultate wieder. Die dropletreichen Oberflächen dieser Schichten weisen im Vergleich eine deutlich längere Einlaufphase sowie eine Erhöhung der Reibungszahl zum Messbeginn auf. Das verdeutlicht, dass diese Beschichtungen unter Belastung zur Absonderung von Droplets neigen, was im biologischen Einsatzgebiet als äußerst kritisch einzustufen ist. Mikropartikel können auf zellulärer Ebene interagieren und damit einen direkten Einfluss auf die Zellvitalität ausüben. Santos et al. belegten dies ebenfalls in ihren Untersuchungen, bei denen sich vor allem Partikelgrößen unter 25  $\mu\text{m}$  als zytotoxisch erwiesen [205]. Weiterhin korreliert diese Tatsache mit den in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Ergebnissen zur Biokompatibilität, bei denen PVD-Arcfil-Schichten, d.h. die dropletreichsten Schichten, am schlechtesten abschneiden.

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit zum Vergleich der Biokompatibilität der DLC-Beschichtungen wurden mit Fibroblasten durchgeführt. Die Fibroblasten zählen zum größten Anteil der am Wundheilungsvorgang beteiligten Zellen und dienen als Modell in zahlreichen Forschungstätigkeiten [114,134,141,206–208]. In der vorliegenden Arbeit wurden Zellzahl, -morphologie und -stoffwechselaktivität bewertet. Abbildung 19 stellt die Zellzahl der Fibroblasten nach Inkubation auf den verschiedenen DLC-Beschichtungen dar. Auf PVD-Spu-Schichten wird gefolgt von PA-CVD-Schichten die höchste Zellzahl erreicht. Auf PVD-Arc- und PVD-Arcfil-Schichten wird



gemessen am Standard lediglich 50 % der Zellzahl beobachtet, was darauf hinweist, dass diese Beschichtungen eine geringe Biokompatibilität aufweisen.

Um hinsichtlich der Stoffwechselaktivität eine zellbezogene Aussage zu erhalten, wurde die gemessene Gesamt-Stoffwechselaktivität pro Probe auf die jeweils bestimmte Zellzahl bezogen und somit die zelluläre Stoffwechselaktivität bestimmt (Abbildung 20). Die zelluläre Stoffwechselaktivität von Zellen auf PA-CVD-, PVD-Spu- und PVD-Arc-Schichten ist mit 80 % bis 100 % vergleichbar mit dem Standard. Die Zellen auf PVD-Arcfil-Schichten zeigen eine deutlich reduzierte zelluläre Aktivität. Eine Ursache dafür stellt die dropletreiche Oberfläche dieser Beschichtungen dar. Die Droplets der PVD-Arcfil-Schichten bewegen sich mit 0,5  $\mu\text{m}$  bis 5,0  $\mu\text{m}$  in einem Größenbereich, der die Zelladhäsion hemmt [204,209]. Iwamoto et al. zeigten ebenfalls, dass Rauigkeiten in Größenbereichen ab 2  $\mu\text{m}$  bis 3  $\mu\text{m}$  die Zelladhäsion muriner Präosteoblasten unterbinden können [210]. Zudem wurde in der vorliegenden Arbeit in den Untersuchungen der Reibeigenschaften dargelegt, dass die PVD-Arcfil-Schichten zur Dropletabsonderung neigen (Abbildung 16). Wie bereits beschrieben, können dadurch die Zellen und somit die Biokompatibilität negativ beeinflusst werden [205,211]. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde zusätzlich die Zellmorphologie bestimmt, wodurch dieser Zusammenhang ebenfalls untermauert wird.

In Abbildung 21 ist die fluoreszenzmikroskopische Analyse der Zellmorphologie von Fibroblasten auf den unterschiedlichen Beschichtungen dargestellt. Auf PVD-Arcfil-Beschichtungen weisen die Fibroblasten eine gering gespreitete, abgerundete Form auf (Abbildung 21 e), was auf eine ungenügende Verträglichkeit des Untergrundes schließen lässt [3,127,147]. Im Vergleich dazu zeigen die Zellen auf der Standardoberfläche eine für Fibroblasten typische spindelartige Morphologie mit ausgeprägter Spreitung, scharfen Zellgrenzen und zipfelartigen Ausläufern sowie intakte, runde Zellkerne (Abbildung 21 a) [212]. Auch auf PVD-Spu und PVD-Arc ist diese Zellmorphologie zu beobachten (Abbildung 21 c, d). Auf PA-CVD hingegen ergibt sich ebenfalls eine leicht veränderte Morphologie. Dabei ist keine ausgeprägte Spreitung erkennbar (Abbildung 21 b). Ursachen für die veränderte Zellmorphologie auf den PA-CVD- und PVD-Arcfil-Schichten sind in der unzureichenden Schichthaftung (PA-CVD) bzw. der dropletreichen Oberfläche (PVD-Arcfil) begründet.

---

In beiden Fällen kommt es zum Ablösen von Schichtbestandteilen, welche mit den Zellen wechselwirken und somit die Biokompatibilität dieser Beschichtungen herabsetzen.

Ein entscheidender Schwerpunkt für den Vergleich der Abscheidemethoden ist die Möglichkeit, die DLC-Beschichtungen zu modifizieren, um dadurch biofunktionale Oberflächen zu erzeugen. Zur Modifizierung soll die nicht-thermische Elektronenstrahlbehandlung zur Anwendung kommen. Um Aussagen über die Möglichkeit zur eBeam-Modifizierung der DLC-Oberflächen zu treffen, wurde auf die Proben eine Dosis von 500 kGy appliziert. Dafür wurden wie in Kapitel 4.4 beschrieben 10 Einzeldosen mit je 50 kGy appliziert. Die Behandlung fand unter Atmosphärendruck und mit Luft als Prozessatmosphäre statt.

Um Veränderungen durch die Modifizierung zu bewerten, wurden die Proben mittels Kontaktwinkelmessung sowohl vor als auch nach der Modifizierung analysiert. Die Kontaktwinkelmessung gibt Auskunft über die Benetzbarkeit der Oberflächen und diente im nächsten Schritt auch der Berechnung der Oberflächenenergie. Über diese Parameter können bereits erste Tendenzen hinsichtlich einer veränderten Zellreaktion auf den modifizierten Oberflächen abgeschätzt werden.

Die Kontaktwinkelmessung vor und nach der Modifizierung ergab, dass der Kontaktwinkel auf den DLC-Schichten reduziert wird, womit eine Hydrophilierung der Oberfläche verbunden ist (Abbildung 22). Der stärkste Effekt ist auf PVD-Spu-Beschichtungen zu beobachten. Auch Miksovsky et al. beobachteten eine Hydrophilierung auf DLC-Oberflächen nach Behandlung mit Stickstoffplasma [78]. Als Ursache für die Verringerung des Kontaktwinkels kann in der vorliegenden Arbeit die Veränderung der Oberflächenenergie identifiziert werden. Diese liegt für die verschiedenen Beschichtungen vor der Modifizierung in einem Bereich von 40 bis 45 mN/m. Durch die Modifizierung steigt der Wert um 5 bis 10 mN/m an. Bei Betrachtung der polaren und dispersen Anteile wird ersichtlich, dass bei allen Beschichtungen durch die Modifizierung der polare Anteil der Oberflächenenergie zunimmt und der disperse leicht sinkt (Abbildung 23). Die stärksten Veränderungen ergeben sich dabei für PA-CVD-, PVD-Spu- und PVD-Arc-Beschichtungen.

Wohingegen der polare Anteil auf den PVD-Arcfil-Schichten nur geringe Veränderungen aufweist.

Die Kontaktwinkelmessung wird auf PVD-Arcfil-beschichteten Oberflächen zusätzlich durch die dropletbedingte Mikrorauheit beeinflusst. Dazu kommt, dass diese Mikrorauheit durch die eBeam-Modifizierung ebenfalls verändert wird. Sowohl bei der REM-Analytik als auch bei der Bestimmung des Mittenrauwertes zeigte sich, dass es nach durchgeführter Modifizierung im untersuchten Probenbereich zu einer Verringerung der Droplettdichte und -größe kommt und der Mittenrauwert sinkt (Abbildung 26 l-n; Abbildung 25). Diese Faktoren stellen somit eine zusätzliche Einflussgröße für die Kontaktwinkelmessung dar [142]. Damit kann die Abnahme des Kontaktwinkels auf PVD-Arcfil-Schichten nicht eindeutig der Veränderung der Oberflächenenergie bzw. der Rauigkeit zugeordnet werden.

Die Beschichtungen der anderen Abscheidemethoden zeigen keine Veränderungen der Oberflächenmorphologie nach der eBeam-Modifizierung (Abbildung 26 b-k), womit die Hydrophilierung an dieser Stelle eindeutig auf die Steigerung der polaren Anteile der Oberflächenenergie zurückgeführt werden kann. Die Verringerung der Dropletzahl und -größe auf PVD-Arcfil-Schichten kann durch einen Ätzprozess durch die umgebenden Spezies<sup>7</sup> während der eBeam-Behandlung begründet sein [104,213]. Dies wird durch die Beobachtungen von Koval et al. untermauert. Diese Wissenschaftler stellten eine Verringerung der Rauigkeit verschiedener Stählen nach eBeam-Behandlung fest [113].

Basierend auf den bisherigen Ergebnissen wurden an dieser Stelle zwei DLC-Abscheidemethoden für die weiteren Untersuchungen ausgeschlossen.

Die oberflächenanalytischen Untersuchungen zeigen, dass die PA-CVD-Schichten ungenügende Ergebnisse hinsichtlich Schichtstabilität und Sterilisationsfestigkeit erbringen. Die PVD-Arcfil-Beschichtungen zeigen im Vergleich die schlechteste Zellverträglichkeit. Auch die Modifizierung mittels eBeam erbringt bei diesen Schichten vergleichsweise geringe Effekte. Zusätzlich können diese Effekte nicht eindeutig oberflächenenergetischen oder morphologischen Veränderungen zugeordnet

---

<sup>7</sup> Die eBeam-Modifizierung an Atmosphärendruck führt zur Ionisierung bzw. Radikalbildung in der umgebenden Prozessatmosphäre. Reaktivität und Konzentration dieser Spezies sind abhängig von der Zusammensetzung der Prozessatmosphäre.

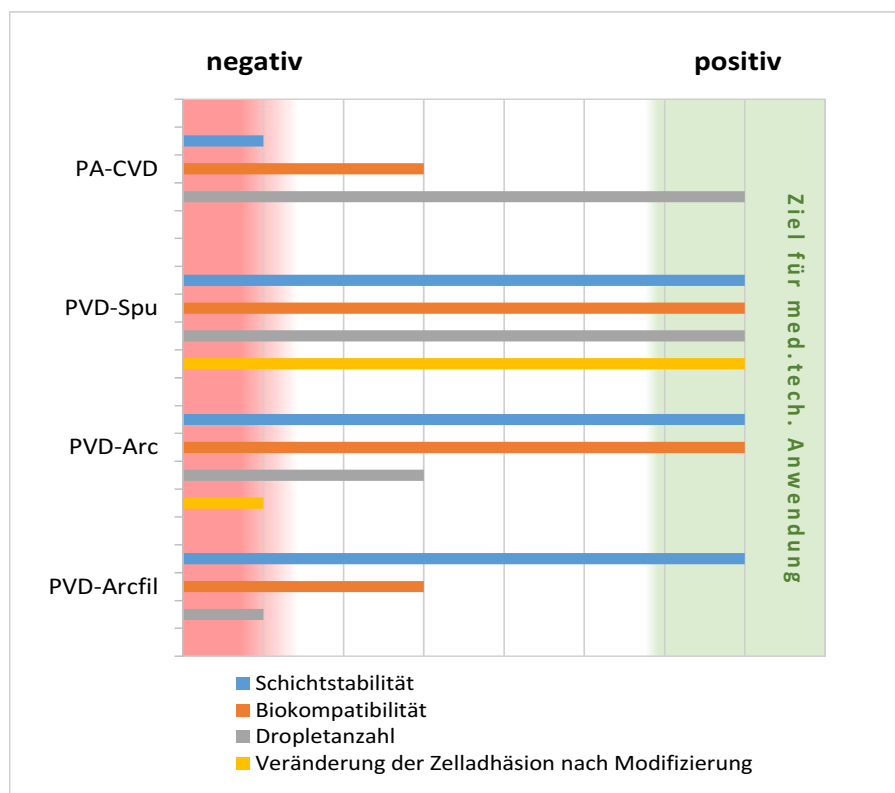
werden. Diese Kritikpunkte führen zum Ausschluss der beiden Abscheidemethoden. Die eBeam-Modifizierung für die vergleichenden biologischen Untersuchungen wurde daher nur an PVD-Spu- und PVD-Arc-Schichten durchgeführt.

Für die zellbiologische Bewertung kamen ebenfalls Fibroblasten zum Einsatz. Es wurden die Zellzahl, -morphologie und -stoffwechselaktivität als Vergleichskriterien herangezogen. Neben der Referenz zur Standardoberfläche (Glas; s. Kapitel 4.9.1) ist nun der Vergleich von unbehandelter und modifizierter Oberflächen von zentralem Interesse. Abbildung 30 stellt die Morphologie der Fibroblasten auf den modifizierten Proben und dem Standard dar. Für beide Beschichtungen (PVD-Spu und PVD-Arc) zeigt sich eine mit dem Standard vergleichbare Zellmorphologie mit einer spindelartigen Spreitung, zipfelartigen Ausläufern und scharfen Zellgrenzen sowie intakten Zellkernen. Auch im Vergleich zu den Fibroblasten auf den unbehandelten Beschichtungen ist keine phänotypische Veränderung zu beobachten (Vergleich Abbildung 21 c, d). Damit sind anhand des Kriteriums der Zellmorphologie zunächst keine negativen Veränderungen durch die eBeam-Modifizierung der Schichten zu beobachten.

Die Zellzahl auf den unbehandelten Schichten ist im Vergleich zum Standard kaum verändert. Auf der modifizierten PVD-Spu-Beschichtung hingegen ist die Zellzahl signifikant um ca. 75 % reduziert (Abbildung 27). Diese Tatsache ist auch in der Darstellung der angefärbten Zellkerne auf den Probenoberflächen in Abbildung 28 deutlich erkennbar. Bei PVD-Arc zeigt sich keine Veränderung der Zellzahl durch die Modifizierung. Um zu überprüfen ob die reduzierte Zellzahl auf PVD-Spu-Schichten mit einer Veränderung des zellulären Metabolismus einhergeht, wurde im Folgenden die zelluläre Stoffwechselaktivität überprüft. Dabei ergab sich für keine der Proben ein signifikanter Unterschied im Vergleich zum Standard (Abbildung 29). Anhand der untersuchten Parameter kann durch die Modifizierung keine negative Auswirkung auf die Biokompatibilität beobachtet werden. Auf PVD-Spu-Proben ist es möglich die Zellzahl der adhätierenden Fibroblasten durch die eBeam-Modifizierung der Oberfläche signifikant zu verringern. Damit ergibt sich die Möglichkeit, die eBeam-Modifizierung zur gezielten Steuerung der Zelladhäsion auf der Beschichtung zu nutzen, um anwendungsspezifisch biofunktionale Oberfläche zu gestalten. Da nur auf modifizierten

PVD-Spu-Beschichtungen eine veränderte Zellzahl beobachtet wurde, führen diese Ergebnisse zum Ausschluss der Abscheidemethode PVD-Arc für die weiterführenden Untersuchungen.

In Abbildung 53 sind zusammenfassend die Ausschlusskriterien für die untersuchten Abscheidemethoden dargestellt. Für eine Anwendung im biomedizinischen Bereich sind neben der Biokompatibilität eine gute Schichtstabilität sowie eine geringe Dropletzahl aus o.g. Gründen maßgebend. Die Möglichkeit zur Modifizierung mittels eBeam und damit die Steuerung der Zelladhäsion stellt ein weiteres Auswahlkriterium hinsichtlich Biofunktionalisierung dar.



**Abbildung 53: Kriterien für die Auswahl einer Abscheidemethode**

Dargestellt sind die vier Auswahlkriterien, anhand derer im ersten Abschnitt der vorliegenden Arbeit die Eingrenzung auf eine Abscheidemethode für DLC-Beschichtungen erfolgte. Für biomedizinische Fragestellungen sind Biokompatibilität, zuverlässige Schichtstabilität sowie eine geringe Dropletzahl und die Möglichkeit zur Steuerung der Zelladhäsion mittels eBeam-Modifizierung maßgebend.

Die mittels PVD-Spu abgeschiedenen DLC-Beschichtungen erfüllen die gestellten Ansprüche und werden daher für die folgenden Untersuchungen genutzt. Die Abscheideparameter bleiben wie in Kapitel 4.3 beschrieben unverändert.

## 6.2. Elektronenstrahl-Modifizierung von DLC-Beschichtungen

Ein wichtiger Aspekt bei der Modifizierung der DLC-Beschichtungen ist die zellbiologische Wechselwirkung mit diesen Oberflächen. Diese kann sowohl durch chemisch/energetische als auch morphologische Veränderungen beeinflusst werden. Die oberflächenanalytische Bewertung wurde daher auf diese zwei Schwerpunkte ausgerichtet, um Aussagen über die Hintergründe der Modifizierung mittels eBeam zu erhalten. Zusätzlich wurde untersucht, ob eine partielle Modifizierung der DLC-Oberflächen möglich ist und damit gegebenenfalls auch eine Feinstrukturierung erzielt werden kann. Anschließend wurde die Langzeitstabilität der Modifizierung in verschiedenen Umgebungsmedien bewertet.

### 6.2.1. Kenngrößen und Wirkmechanismen

Die eBeam-Modifizierung der DLC-Schichten soll zur Steuerung der Zelladhäsion genutzt werden. Die Wirkmechanismen der Modifizierung sowie zugehörige Kenngrößen und Grenzen der Methode werden im Folgenden Kapitel betrachtet.

Bereits im ersten Abschnitt der vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass die eBeam-Behandlung zur Modifizierung von DLC-Schichten geeignet ist. Durch die eBeam-Modifizierung kommt es zu einer Hydrophilierung der Oberfläche, d.h. der Kontaktwinkel auf den Oberflächen wird verringert. Es sollte untersucht werden, ob diesbezüglich eine Dosisabhängigkeit vorliegt. Dazu wurden die Proben mit Dosen zwischen 25 kGy und 1000 kGy behandelt. Abbildung 31 demonstriert, dass der Kontaktwinkel bis zu einer Dosis von 500 kGy sukzessive abnimmt, wobei ab 50 kGy signifikante Veränderungen gemessen am Ausgangszustand auftreten. Zwischen einer Behandlung mit 500 kGy und 1000 kGy ist dann wiederum keine signifikante Differenz mehr erkennbar. Es ist also anzunehmen, dass ab 500 kGy eine Art Sättigungseffekt eintritt, d.h. eine weitere Dosiserhöhung führt zu keiner weiteren Veränderung des Kontaktwinkels.

Aus der Literatur ist bekannt, dass die eBeam-Behandlung sowohl eine Veränderung der Rauigkeit als auch der chemischen Eigenschaften einer Oberfläche hervor rufen

kann [214]. Beide Größen beeinflussen den Kontaktwinkel auf einer Oberfläche. Somit ist zunächst die Frage zu beantworten, ob der verringerte Kontaktwinkel auf morphologische oder chemische Veränderungen zurückzuführen ist. Auch eine Kombination beider Ursachen ist möglich [104]. Um diese Fragestellung zu beantworten, wurde sowohl die Rauigkeit als auch die chemische Oberflächenbeschaffenheit vor und nach der eBeam-Behandlung untersucht.

Anhand der REM-Aufnahmen wird belegt, dass auf den PVD-Spu-Schichten durch die eBeam-Behandlung keine Veränderung der Oberflächenmorphologie verursacht wird (Abbildung 26 e bis g). Auch die Bestimmung des Mittenrauwertes von unbehandelten und modifizierten DLC-Schichten untermauert dieses Ergebnis (Abbildung 25, PVD-Spu Beschichtungen). Somit können morphologische Veränderungen als Ursache für die Verringerung des Kontaktwinkels ausgeschlossen werden. Die Bestimmung der Oberflächenenergie belegt eine Zunahme der polaren Anteile nach der eBeam-Behandlung (Abbildung 23). Daher können Veränderungen der Oberflächenchemie als Ursache der Hydrophilierung identifiziert werden.

Wie in der Literatur beschrieben, kann eine Hydrophilierung von DLC-Beschichtungen mit einer Veränderung der  $sp^2$ - und  $sp^3$ -Bindungsanteile einhergehen [98,100,215]. Dabei werden hohe  $sp^3$ -Anteile mit einer Oberflächenhydrophobie verbunden [215]. Es ist belegt, dass es bei der Behandlung mit Photonen im MeV-Bereich und auch nach Laserbehandlung zu einer Graphitisierung von DLC-Schichten kommt [105,216]. Der gleiche Effekt wurde bei Ionenbeschuss beobachtet [96]. Weiterhin wird in der Literatur berichtet, dass die Elektronenbehandlung von DLC-Schichten zu einer Veränderung der  $sp^2/sp^3$ -Stöchiometrie führt, wobei sowohl  $sp^2$ - als auch  $sp^3$ -Umwandlung beobachtet wurden und teilweise zusätzliche Deckschichten zum Einsatz kamen [97,217]. Die Veränderungen konnte in den genannten Untersuchungen auf thermische Vorgänge während der Behandlung zurückgeführt werden. Die Behandlung mit hohen Temperaturen führt zur Abspaltung von Wasserstoff aus DLC-Schichten, was mit einer Graphitisierung einhergeht [218,219]. Diese Ergebnisse aus der Literatur belegen den Einfluss der Temperatur während der DLC-Modifizierung. Ab circa 200 °C ist eine temperaturbedingte Graphitisierung von DLC möglich [217].

Die in der vorliegenden Arbeit genutzte eBeam-Technologie stellt demgegenüber einen großen Vorteil dar, da sie zu den nicht-thermischen Verfahren zählt (s. Kapitel 3.2). Hinzu kommt, dass diese Technologie im Gegensatz zu den in der Literatur beschriebenen Verfahren, die im MeV-Bereich betrieben werden, lediglich mit Beschleunigungsspannung im keV-Bereich auskommt. Folglich kann eine Temperaturerhöhung als zusätzliche Einflussgröße der Modifizierung grundlegend ausgeschlossen werden.

Doch auch eine temperaturunabhängige Veränderung der Hybridisierungszustände von Kohlenstoffverbindungen ist laut Literatur möglich [213]. Deshalb, wurden die im Rahmen der vorliegenden Arbeit modifizierten DLC-Schichten raman-spektroskopisch untersucht, um Aussagen über die Stöchiometrie von  $sp^2$ - und  $sp^3$ -Bindungen zu erhalten. Beim Vergleich der unbehandelten und modifizierten Oberflächen in Abbildung 32 d ist erkennbar, dass sich im Bereich der für DLC-Beschichtungen signifikanten Peaks (D- und G-Peak [190]) weder nach durchgeführter eBeam-Modifizierung mit 100 kGy noch mit 500 kGy Veränderungen nachweisen lassen. Die eBeam-Behandlung hat daher keinen Einfluss auf die Stöchiometrie der  $sp^2$ - und  $sp^3$ -Bindungsanteile, da es laut Ferrari und Robertson ansonsten zu einer Peakverschiebung im Ramanspektrum kommen müsste [190]. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stimmen mit den Untersuchungen von Aizawa et al. überein. Diese Wissenschaftler stellten ebenfalls keine Unterschiede im Ramanspektrum einzelner „DLC-Säulen“ nach einer eBeam-Behandlung fest. Lediglich im Bereich zwischen den Säulen fand eine intrakolumnare Graphitisierung, verbunden mit einer Erhöhung der Materialdichte statt [220]. Basierend auf den Ergebnissen von Mikhailov et al. sowie Avasthi kann davon ausgegangen werden, dass wesentlich höhere Beschleunigungsspannungen bei der eBeam-Behandlung notwendig wären, um Veränderungen im Hybridisierungsverhältnis der DLC-Beschichtungen zu verursachen [36,107]. In den genannten Arbeiten wurden für die DLC-Behandlung Spannungen im MeV-Bereich angewendet, wohingegen die vorliegenden Untersuchungen mit einer eBeam-Beschleunigungsspannung im keV-Bereich arbeiten. Damit ist ein wesentlich geringerer Energieeintrag in die Proben verbunden. Gleichzeitig kann dadurch bei Behandlung an Atmosphäre ein starker Temperatureintrag in die Proben ausgeschlossen werden [104]. Damit stellt die in der



---

vorliegenden Arbeit genutzte Art der Oberflächenmodifizierung gleichzeitig eine äußerst materialschonende Behandlungsmethode dar und ermöglicht auch die Modifizierung sensibler Substratmaterialien.

Prinzipiell kann auch durch die während der eBeam-Behandlung emittierte Röntgenstrahlung eine Veränderung der DLC-Schichten durch eine Verringerung des Wasserstoffgehalts hervorgerufen werden [106]. Da die Dosis der emittierten Röntgenstrahlung im genutzten eBeam-Prozess der vorliegenden Arbeit ca. zwei bis drei Größenordnungen unter der des eBeam liegt [104,221], kann die Röntgenstrahlung jedoch als Ursache für die beobachteten Veränderungen ausgeschlossen werden.

Als weitere Ursache für die beobachtete Hydrophilierung kommt eine Veränderung der funktionellen Oberflächengruppen in Betracht. Beispielsweise beobachteten Mochizuki et al. eine Verringerung des Kontaktwinkels bei Plasmabehandlung von DLC-Schichten [13]. Damit wurde die Anlagerung positiv geladener, funktioneller Gruppen verbunden (Stickstoffplasma). Weiterhin wurde die Anlagerung von Carboxylgruppen beobachtet (Sauerstoffplasma) [13]. Ebenso wurde durch Bachmann et al. eine Hydrophilierung von DLC-Oberflächen bei Plasmabehandlung in Zusammenhang mit der Ausbildung funktioneller Gruppen beobachtet [222]. Da funktionelle Gruppen sowohl durch die direkte als auch die indirekte eBeam-Wirkung<sup>8</sup> beeinflusst werden können, wurde zunächst untersucht, welcher dieser Wirkmechanismen für die Modifizierung während der eBeam-Behandlung der DLC-Beschichtungen verantwortlich ist.

Dafür wurden die Proben mit 500 kGy behandelt und dabei die Expositionszeit und die Elektronenmenge variiert, wobei jeweils einer der Parameter konstant gehalten wurde. Die Elektronenmenge wurde dabei über die Dosisrate verändert. Im Vergleich zur Standardbehandlung (500 kGy) mit einfacher Expositionszeit und einfacher Elektronenmenge führt eine Variation der Expositionszeit zu signifikanten Veränderungen des Kontaktwinkels. Es zeigt sich, dass die Intensität der Hydrophilierung in direktem Zusammenhang mit der Expositionszeit steht. Im Gegensatz zeigt die Variation der Elektronenmenge über die Dosisrate keine erkennbare Veränderung des Kontaktwinkels gemessen an der Standardbehandlung. Die

---

<sup>8</sup> Erläuterungen zur direkten und indirekten eBeam-Wirkung in Kapitel 3.2

Elektroneneinwirkung auf die Probe ist maßgeblich von der applizierten Elektronenmenge abhängig und trägt damit zur direkten eBeam-Wirkung bei. Die Expositionszeit hingegen beeinflusst die indirekten Wirkmechanismen. Abbildung 33 belegt einen signifikanten Zusammenhang zwischen Expositionszeit und Intensität der Modifizierung. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Hydrophilierung durch die eBeam-Modifizierung auf indirekte Wirkmechanismen zurückzuführen ist. Diese Erkenntnis ermöglicht eine gezielte Optimierung der Prozessparameter, da in diesem Fall zur Modifizierung keine komplette Durchstrahlung der Beschichtung notwendig ist. Daher kann die Beschleunigungsspannung bei der eBeam-Behandlung so niedrig gewählt werden, dass das beschichtete Substrat durch den eBeam nicht beeinflusst wird, wodurch die ursprünglichen Substrateigenschaften, wie zum Beispiel Härte oder E-Modul unverändert bleiben.

An den indirekten Wirkmechanismen der eBeam-Behandlung sind reaktive Spezies<sup>9</sup> der Prozessatmosphäre beteiligt. Daher wurde im Folgenden die Prozessatmosphäre variiert, um Aufschluss über die für die Modifizierung verantwortlichen Spezies zu erhalten. Die Modifizierung mittels eBeam wurde bis zu diesem Zeitpunkt standardmäßig an Luft durchgeführt. Da Sauerstoff und Stickstoff die Hauptbestandteile der Luft darstellen, wurde die Modifizierung im Folgenden zunächst unter Stickstoff- und Sauerstoffatmosphäre durchgeführt. Zusätzlich wurde die Modifizierung unter 10 %iger Wasserstoffatmosphäre untersucht. Es wurden jeweils 500 kGy appliziert und die Ergebnisse wurden mit der Standardbehandlung an Luft verglichen. Im Vergleich zur Standardbehandlung kommt es zu einer deutlich stärkeren Veränderung des Kontaktwinkels bei Behandlung an Sauerstoff- bzw. Stickstoffatmosphäre. Die Behandlung an Wasserstoffatmosphäre hingegen hat keinen Effekt und führt zu keiner Veränderung des Kontaktwinkels (Abbildung 34). Dies belegt nochmals eindeutig, dass die während der eBeam-Behandlung auftretenden reaktiven Spezies maßgeblich für die Modifizierung verantwortlich sind. Diese werden bei Behandlung unter Wasserstoffatmosphäre nicht gebildet, wodurch Wasserstoff als

---

<sup>9</sup> Die eBeam-Modifizierung an Atmosphärendruck führt zur Ionisierung bzw. Radikalbildung in der umgebenden Prozessatmosphäre. Reaktivität und Konzentration dieser Spezies sind abhängig von der Zusammensetzung der Prozessatmosphäre.

beteiligter Reaktionspartner ausgeschlossen werden kann, wohingegen Sauerstoff und Stickstoff als wichtige Reaktionspartner identifiziert sind. Der Einfluss von Sauerstoff hebt sich dabei gegenüber dem von Stickstoff hervor (Abbildung 34). Dieses Ergebnis korreliert mit den Untersuchungen von Clem et al., die durch Behandlung mit Sauerstoffplasma ebenfalls eine sehr starke Kontaktwinkelverringerng auf DLC-Schichten beobachteten [10]. Gleichmaßen belegten Bachmann et al., dass die Behandlung mit Sauerstoffplasma zu einer Ausbildung von Carboxylgruppen führt, was ebenfalls mit eine Hydrophilierung verbunden ist [222]. Weiterhin konnte in den Untersuchungen von Bachmann et al. wie auch in der vorliegenden Arbeit keine Veränderung der Oberflächen durch Behandlung unter Wasserstoff beobachtet werden [222].

Während der eBeam-Modifizierung kommt es in der vorliegenden Arbeit zur Veränderung von Oberflächenfunktionalitäten auf den Beschichtungen. Dabei müssen basierend auf den oben genannten Ergebnissen sauerstoff- und stickstoffhaltige Gruppen im Vordergrund stehen. Für eine weitere Charakterisierung wurden die unter den verschiedenen Prozessatmosphären modifizierten Proben daher einer XPS-Analytik unterzogen. Dadurch konnten Aussagen über die Elementverteilung auf den modifizierten Oberflächen getroffen werden. Die unter Wasserstoffatmosphäre modifizierten Proben wurden dabei nicht analysiert, da bereits anhand der Kontaktwinkelmessung für diese Proben keine Veränderungen beobachtet wurden. Die Spektren der XPS-Analyse wurden hinsichtlich Kohlenstoff-, Sauerstoff-, und Stickstoffgehalt quantitativ analysiert. Insgesamt zeigten sich lediglich Veränderungen im Bereich weniger Prozent (Abbildung 35). Dies könnte in der Analysetiefe der XPS begründet sein. Mittels XPS kann die Elementzusammensetzung der obersten Nanometer einer Oberfläche bestimmt werden [10]. Wird durch die eBeam-Modifizierung eine Veränderung im äußersten Randbereich der DLC-Schichten erzielt, so könnte die dafür relevante Analysetiefe durch die XPS überschritten werden und Informationen aus tiefer liegenden Bereichen in hohem Maß zum Messergebnis beitragen, wodurch die Relation der oberflächlichen Elementzusammensetzung verfälscht würde. Ein Hinweis darauf ist beispielsweise der verhältnismäßig hohe Kohlenstoffanteil auch nach der Modifizierung (Abbildung 35 a). Mittels

Kontaktwinkelmessung konnte bei Behandlung mit 500 kGy ein Sättigungsverhalten für die Modifizierung beobachtet werden (Abbildung 31). Demnach wäre zu erwarten, dass auch die DLC-Oberflächen gesättigt mit Sauerstoff- bzw. Stickstoffunktionalitäten vorliegen und die Anteile für Kohlenstoff entsprechend reduziert wären. Prinzipiell ist jedoch nur ein um wenige Prozent verringerter Kohlenstoffanteil nach der Modifizierung auf den Proben zu beobachten. Gleichzeitig kommt es zu einer Zunahme von Sauerstoff und Stickstoff im gleichen Größenbereich (Abbildung 35 b, c). Die Modifizierung an Luft und Sauerstoffatmosphäre führt zu einem vergleichbaren Anstieg des Sauerstoffgehaltes der Oberflächen nach der Modifizierung. Diese Ergebnisse korrelieren mit den Beobachtungen von Park et al., welche ebenfalls eine Steigerung des Sauerstoffgehalts nach Behandlung von DLC-Schichten mit dem Elektronenstrahl beobachteten [219]. Bei Clem et al. kam es durch die Oberflächenbehandlung mit Sauerstoffplasma ebenfalls zur Steigerung der Sauerstoffanteile auf der Oberfläche, was mit einer sehr starken Hydrophilierung einherging (Kontaktwinkel  $< 2^\circ$ ) [10]. Es ist anzunehmen, dass durch den Sauerstoff bei der Modifizierung auf den DLC-Oberflächen Carboxylgruppen ausgebildet werden, da vor allem gebildete Sauerstoffradikale eine hohe Affinität zu Kohlenstoffatomen aufweisen [222]. Nach Behandlung unter Stickstoffatmosphäre wird in der vorliegenden Arbeit trotz Sauerstoffausschluss ein geringer Anstieg des Sauerstoffgehaltes beobachtet (Abbildung 35 b). Dies ist darauf zurückzuführen, dass aus versuchstechnischen Gründen in der Prozessatmosphäre ein geringer Rest-Sauerstoffanteil vorhanden ist. Sauerstoff ist beispielweise oberflächlich in Form von Wasser gebunden und kann daher nie vollständig als Reaktionspartner ausgeschlossen werden [78]. Die Analyse des Stickstoffanteiles auf den DLC-Schichten der vorliegenden Arbeit ergab, dass eine deutliche Zunahme lediglich bei Modifizierung an Luft erkennbar ist (Abbildung 35 c). Der im Vergleich zum Ausgangszustand nahezu konstante Stickstoffgehalt bei Modifizierung unter Sauerstoffatmosphäre ist auf den absoluten Stickstoffausschluss zurückzuführen. Doch auch die Modifizierung direkt unter Stickstoffatmosphäre führt im Vergleich zum Ausgangszustand lediglich zu einer geringen Zunahme des Stickstoffgehaltes (Abbildung 35 c). Als Minimum wurde für diese Modifizierung eine Steigerung des Stickstoffgehaltes im gleichen Größenbereich wie bei Modifizierung an

Luft erwartet. Eine mögliche Ursache, für die geringer ausfallende Veränderung kann darin begründet sein, dass die Anlagerung von Stickstoff und Stickstofffunctionalitäten an die Gegenwart von Sauerstoff gekoppelt ist. Sauerstoff kann in diesem Fall als Bindungsvermittler fungieren. Es liegt daher nahe, dass während der Modifizierung auf den DLC-Beschichtungen neben Carboxylgruppen auch Oberflächenfunctionalitäten gebildet werden, die Sauerstoff und Stickstoff enthalten. Auch in der Literatur wird eine Hydrophilierung von DLC-Schichten mit der Zunahme von Stickstoff- und Sauerstoffgehalt in Verbindung gebracht [10,78]. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit findet die Modifizierung standardmäßig unter Atmosphärendruck und an Luft statt, wobei vor allem vermehrt Sauerstoffradikale und vergleichsweise weniger Ionen gebildet werden [20]. Durch Sauerstoffradikale kann es während der Modifizierung beispielsweise zum Aufbrechen bestehender Bindungen kommen. An diesen Stellen ist die Ausbildung von Stickstofffunctionalitäten möglich. Auch diese Theorie unterstützt die Annahme, dass eine Zunahme des Stickstoffgehaltes an die Gegenwart von Sauerstoff während der Modifizierung gekoppelt ist.

### 6.2.2. Partielle Modifizierung und Strukturierung

Um durch die eBeam-Modifizierung der DLC-Beschichtungen biofunktionale Oberflächen zu generieren, wurde die Möglichkeit untersucht, eine partielle Modifizierung mittels eBeam zu erzeugen. Damit sollten unterschiedliche Oberflächeneigenschaften auf einer geschlossenen Beschichtung generiert werden, um beispielsweise variierenden Funktionsansprüchen hinsichtlich Zelladhäsion in angrenzenden Bereichen gerecht zu werden. Zunächst wurden die DLC-Proben halbseitig abgedeckt und modifiziert (500 kGy). Anschließend wurde die Benetzbarkeit dieser zwei Bereiche untersucht. Dafür wurde kontinuierlich destilliertes Wasser auf der modifizierten Seite aufgebracht. In Abbildung 36 a und b ist erkennbar, dass sich das Wasser bis zur Grenze der Modifizierung ausbreitet und dort sehr exakt die Grenze zwischen unbehandelter und modifizierter Oberfläche abbildet. Eine weitere Wasserzugabe führte zu keinem Überschreiten der Grenze. Erst nach extremer Volumenzugabe erfolgte die Benetzung der unbehandelten Oberfläche. Damit ist belegt, dass die Möglichkeit besteht, mittels eBeam aneinander grenzende Bereiche mit

---

unterschiedlichem Benetzungsverhalten zu generieren, d.h. die DLC-Schichten partiell zu modifizieren. Diese Versuche demonstrieren zunächst die prinzipielle Möglichkeit den eBeam zur Erzeugung verhältnismäßig großer Strukturen einzusetzen.

Für die Steuerung der Zelladhäsion, -differenzierung und -migration sind vor allem Strukturen im Mikrobereich von großem Interesse [75]. Daher wurde im Folgenden untersucht, inwiefern durch eBeam-Behandlung auch Strukturen in diesem Größenbereich generiert werden können. Dazu wurden feine Netzchen als Masken zur Abschattung des eBeams während der Modifizierung genutzt (sogenannte TEM-Grids, s. Abbildung 11 a, b). Die Maschenweite der Netzchen betrug 70 bzw. 100  $\mu\text{m}$ . Die Netzchen wurden auf einem Dosimeterstreifen befestigt und dieser anschließend eBeam-behandelt. Anhand der Belichtung des Dosimeterstreifens wurde geprüft, ob die feinen Strukturen abgebildet werden. Wie die Aufnahme der behandelten Dosimeterstreifen in Abbildung 37 darstellt, kann bis zu einer Maschenweite von 70  $\mu\text{m}$  die eBeam-Einwirkung definiert abgebildet werden. Damit ist bewiesen, dass es möglich ist mittels eBeam sehr feine Strukturen bis unter 100  $\mu\text{m}$  abzubilden.

Um dieses Erkenntnis auch direkt auf den DLC-Schichten zu überprüfen, wurden die Beschichtungen mit einer linienartigen Struktur modifiziert (500 kGy). Dafür erfolgte die eBeam-Abschattung mit einer Edelstahlmaske aus 25 mm langen Stegen, welche eine Breite von 300  $\mu\text{m}$  und einen Abstand von 200  $\mu\text{m}$  hatten (Abbildung 11 c). Nach der Modifizierung wurde ein sogenannter Tropfenabrolltest durchgeführt. Dafür wurden die Proben im 45°-Winkel positioniert und ein Wassertropfen auf die Probenoberseite aufgegeben. Anschließend wurde die Zeit gemessen, die der Tropfen zum Zurücklegen einer definierten Strecke auf der Probe benötigte. Die linienartige Strukturierung wurde dabei sowohl parallel als auch senkrecht zur Abrollrichtung des Tropfens positioniert (Vergleich Abbildung 12). Die Videoanalyse in Abbildung 38 und Abbildung 39 ergibt, dass bei paralleler Anordnung der Linienstruktur die benötigte Zeit für die festgelegte Messstrecke ca. 6-fach geringer ist als bei senkrechter Ausrichtung. Der Tropfen passiert bei senkrechter Ausrichtung der Struktur abwechselnd Bereiche hoher und geringer Hydrophilie. Die hydrophilen Bereiche sind durch den Wassertropfen gut benetzbar, erreicht der Tropfen dann jedoch die Grenze zum nächsten, weniger hydrophilen Bereich, so wird das Abrollen des Tropfens durch die erschwerte

---

Benetzung in diesem Bereich verzögert. Bei paralleler Anordnung der Linienstruktur tritt diese Verzögerung nicht in Erscheinung, da ein dauerhafter Kontakt des Tropfens mit den hydrophilen Bereichen durch die parallele Positionierung gewährleistet ist. Das Abrollen kann damit ungehindert und wesentlich schneller erfolgen. Der deutliche Unterschied der Abrollzeiten bei paralleler bzw. senkrechter Ausrichtung bestätigt, dass die eBeam-Modifizierung linienartig umgesetzt wurde. Die Nutzung des eBeams zur Modifizierung auch sehr kleiner Strukturen ist demnach ebenfalls möglich.

### 6.2.3. Stabilität der Elektronenstrahl-Modifizierung

Für den Einsatz im medizintechnischen Bereich ist es wichtig Erkenntnisse über die Stabilität der eBeam-modifizierten DLC-Beschichtungen zu erhalten. Implantate werden beispielsweise bereits bei der Produktion und damit zeitlich weit vor ihrem Einsatz beschichtet und modifiziert.

Zum einen ist die Langzeitstabilität in verschiedenen Umgebungsmedien von Bedeutung zum anderen muss die Stabilität gegenüber definierten Reinigungs- und Sterilisationsverfahren belegt werden. Die Stabilität der Beschichtung selbst konnte mittels Rockwelltest und speziell entwickeltem Testregime zur Prüfung der Sterilisationsfestigkeit in der vorliegenden Arbeit bereits belegt werden (s. Kapitel 6.1, Ergebnisse PVD-Spu). Im Folgenden wird die Stabilität der Modifizierung auf den DLC-Beschichtungen betrachtet.

Zahlreiche Studien untersuchen die Möglichkeit der Modifizierung von DLC-Schichten mittels verschiedener Plasmen [10,13,78,223]. Dabei kann bisher jedoch keine zeitlich stabile Modifizierung erzeugt werden [20,78,222]. Auch eine Optimierung der Lagerbedingungen durch verringerte Temperatur und Luftfeuchte (4 °C bzw. 30 % relative Luftfeuchte) führte nach Plasmabehandlung lediglich zu einer Verlangsamung des beobachteten Rückbildungsprozesses [224].

In der vorliegenden Arbeit wurde zur Bewertung der Stabilität der Modifizierung die Kontaktwinkelmessung genutzt. Die DLC-Schichten wurden mit 500 kGy modifiziert. Der Kontaktwinkel wurde sowohl vor als auch nach der Modifizierung gemessen. Anschließend erfolgte eine zweimonatige Lagerung an Luft. In diesem Zeitraum wurde

der Kontaktwinkel mehrfach gemessen. Abbildung 40 demonstriert, dass der verringerte Kontaktwinkel und damit die Modifizierung über diesen Zeitraum stabil sind. Zusätzlich wurde die Ramananalytik genutzt, um mögliche zeitabhängige Veränderungen in der Stöchiometrie von  $sp^2$ - und  $sp^3$ -Gehalt zu bewerten. Im Bereich der für DLC-Schichten signifikanten Peaks (D- und G-Peak [190]) ergeben sich weder direkt nach durchgeführter eBeam-Modifizierung noch nach zweimonatiger Lagerung Veränderungen (Abbildung 41). Somit wird deutlich, dass die Modifizierung auch keinen zeitlich versetzten Einfluss auf die Stöchiometrie der  $sp^2$ - und  $sp^3$ -Bindungsanteile in den DLC-Schichten ausübt und über einen Zeitraum von mindestens zwei Monaten stabil ist.

Die zeitliche Stabilität der modifizierten DLC-Schichten muss ebenfalls nach dem Einsatz eines Implantates im Körper gewährleistet sein. Daher erfolgte neben der Langzeitlagerung an Luft eine zweimonatige Lagerung in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS). Für diese Untersuchungen wurden die Proben ebenfalls mit 500 kGy modifiziert. Der Kontaktwinkel wurde vor der Modifizierung und direkt danach bestimmt. Anschließend erfolgte eine zweimonatige Lagerung in PBS. Danach wurde der Kontaktwinkel erneut gemessen. In Abbildung 42 sind die Ergebnisse dargestellt. Der durch die eBeam-Modifizierung verringerte Kontaktwinkel ist nach zweimonatiger Lagerung in PBS konstant. Somit ist bestätigt, dass die Modifizierung der DLC-Beschichtung über einen Zeitraum von zwei Monaten sowohl an Luft als auch in PBS stabil ist. Dieses Ergebnis stellt einen deutlichen Vorteil gegenüber der Oberflächenmodifizierung mit Plasma dar, welche mit den oben genannten Problemen der zeitlichen Instabilität behaftet ist. Eine Ursache für die wesentlich stabilere Modifizierung ist in der Tatsache begründet, dass bei Plasmabehandlung lediglich die umgebende Atmosphäre in einen angeregten Zustand versetzt wird, wohingegen die eBeam-Behandlung durch das Eindringen der Elektronen in das Behandlungsgut auch im Randbereich der Substratoberfläche eine Aktivierung erzielt [104]. Weitere Vorteile der eBeam-Modifizierung gegenüber der Anwendung von Plasmabehandlungen ergeben sich aus den Prozessparametern. Die Plasmabehandlung findet meist unter Vakuum und bei erhöhter Temperatur statt. Der Temperatureinfluss auf die Schichteigenschaften von DLC ist stark umstritten und auch die Behandlungszeit ist bei der Plasmamodifizierung



---

gegenüber der eBeam-Behandlung deutlich länger. Vor allem durch die Temperatureinwirkung kommt es bei der Plasmabehandlung zu Veränderungen der DLC-Beschichtungen hinsichtlich Schichtmorphologie und Hybridisierung [20,78,223]. Gezielt eingestellte Schichteigenschaften als auch die biologische Reaktion können dadurch stark verändert werden, was als weiterer Nachteil der Plasmabehandlung gegenüber der eBeam-Modifizierung zu werten ist.

Als weiterer Schwerpunkt hinsichtlich der Stabilität, wurde die Widerstandsfähigkeit der modifizierten Proben gegenüber einem praxisüblichen Reinigungs- und Sterilisationsregimen analysiert. Dafür wurden die Proben einer mechanischen Reinigung mit Ethanol sowie einer Dampfsterilisation unterzogen. Für das Anwendungsbeispiel Implantat wird davon ausgegangen, dass es lediglich zur einmaligen Sterilisation vor dem Einsatz kommt. Als Bewertungskriterium wurde ebenfalls die Kontaktwinkelmessung sowohl vor als auch nach Modifizierung sowie nach durchgeführtem Reinigungsprozedere herangezogen. Abbildung 43 verdeutlicht, dass die mechanische Reinigung der modifizierten DLC-Schichten mittels Ethanol mit anschließender Dampfsterilisation zu keiner Veränderung des Kontaktwinkels führt. Damit ist auch die Stabilität der Modifizierung gegenüber praxisüblichen Aufbereitungs- und Sterilisationsverfahren belegt. Die Modifizierung mittels eBeam stellt somit eine für biologisch-medizintechnische Fragestellungen geeignete Möglichkeit der Funktionalisierung von DLC-Oberflächen dar.

Die herkömmliche Sterilisation mittels Heißdampf stellt für das später diskutierte Anwendungsbeispiel der FGL-Bauteile aufgrund der thermischen Aktivierung des FGL-Materials ein Problem dar. Andere, schonende Sterilisationsverfahren, wie beispielsweise die Strahlensterilisation könnten hier eine Alternativlösung bieten. Zudem wird in der Literatur berichtet, dass es durch die praxisübliche Reinigung und Sterilisation auf medizinischen Oberflächen zu „nicht-biologischen Kontaminationen“ kommen kann, wodurch die Zellreaktion auf solchen Oberflächen negativ beeinflusst wird [128]. Als weiterer Vorteil der Modifizierung mittels eBeam ist angesichts dieser Problematik anzuführen, dass auch die eBeam-modifizierten Proben zur Sterilisation nicht zwingend autoklaviert werden müssten. Die eBeam-Behandlung selbst kann ebenfalls zu Sterilisationszwecken genutzt werden. Es wurde bereits belegt, dass die

---

Sterilisation mittels eBeam für Oberflächen wirkungsvoll und zuverlässig angewandt werden kann [117,119–121]. Die Strahlensterilisation ist ein anerkanntes Verfahren, bei dem nach DIN EN ISO 11137 eine Sterilisationsdosis von 25 kGy erforderlich ist. In der vorliegenden Arbeit wird für die Modifizierung der DLC-Schichten eine Dosis von 500 kGy appliziert. Zusätzlich wurde anhand der Kontaktwinkelmessung gezeigt, dass eine Behandlung mit 25 kGy noch keine Veränderung auf den DLC-Proben hervorruft (Abbildung 31). Daher wäre eine eBeam-Sterilisation mit einer Dosis von 25 kGy sowohl für unbehandelte als auch für modifizierte Oberflächen, d.h. auch für partiell modifizierte Schichten möglich. Aufgrund eines deutlich schnelleren Sterilisationsprozesses (wenige Sekunden), stellt die eBeam-Sterilisation auch gegenüber der vielfach genutzten Gammabehandlung für sensible Materialien eine vielversprechende Alternative sowohl für die medizinische Anwendung der modifizierten DLC-Schichten als auch für das konkrete Anwendungsbeispiel dar.

### 6.3. DLC-Beschichtungen im Kontakt mit Zellen

Für die Anwendung als biofunktionale Implantatbeschichtung wurde untersucht, ob die eBeam-Modifizierung der DLC-Schichten eine Möglichkeit zur Steuerung der Zelladhäsion darstellt. Dabei wurden auch entzündliche Parameter wie die Interleukinausschüttung sowie mögliche Veränderungen der Zellvitalität und der Phasen des Zellzyklus betrachtet. Für das Anwendungsfeld der Hüftimplantate wurde die osteogene Differenzierung humaner mesenchymaler Stammzellen auf den DLC-Schichten analysiert.

#### 6.3.1. Einfluss der Elektronenstrahl-Modifizierung auf die Zelladhäsion

Die modifizierten DLC-Beschichtungen sollen im biomedizinischen Bereich, beispielsweise als Implantatbeschichtung, eingesetzt werden. Daher ist die detaillierte Betrachtung der Reaktion bei zellbiologischem Kontakt ein grundlegendes Entscheidungskriterium, ob die modifizierten Beschichtungen für den medizintechnischen Einsatz geeignet sind. Die Oberflächen sollen keine Veränderungen der Zellstoffwechselaktivität hervorrufen, zudem darf von den Schichten auch kein

---

Entzündungspotential ausgehen. Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Steuerung der Zelladhäsion auf den DLC-Beschichtungen durch deren Modifizierung. Auch dadurch darf die Biokompatibilität der Oberflächen nicht negativ beeinflusst werden.

Im ersten Abschnitt der vorliegenden Arbeit konnte bereits nachgewiesen werden, dass es auf den DLC-Schichten durch die Modifizierung zu einer signifikanten Verringerung der Zellzahl humaner Fibroblasten kommt (Abbildung 27, Ergebnisse PVD-Spu; Abbildung 28). Dies führt jedoch zu keiner signifikanten Veränderung der zellulären Stoffwechselaktivität (Abbildung 29, Ergebnisse PVD-Spu). Anhand dieser Ergebnisse sind zunächst keine zytotoxischen Effekte durch die modifizierten Proben zu beobachten. Auch die Zellmorphologie der Fibroblasten auf den Oberflächen belegt diese Annahme, da sowohl auf den unbehandelten als auch auf den modifizierten Proben keine Veränderungen im Vergleich zur Standardoberfläche erkennbar sind (Abbildung 21 (PVD-Spu) und Abbildung 30 (PVD-Spu)).

Die Untersuchungen zur Dosisabhängigkeit der Modifizierung mittels Kontaktwinkelmessung ergaben, dass ab 500 kGy eine Art Sättigungseffekt eintritt (Abbildung 31). Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob die Verringerung der Zellzahl durch die Modifizierung ebenfalls dieser dosisabhängigen Sättigung unterliegt. Dafür wurden die Proben mit Dosen bis 1000 kGy modifiziert und die Zellzahl humaner Fibroblasten auf diesen Oberflächen mit unbehandelten DLC-Schichten verglichen. Auf den modifizierten Schichten ist die Zellzahl signifikant auf ca. 25 % im Vergleich zur unbehandelten Oberfläche reduziert. Bei Dosiserhöhung von 500 kGy auf 1000 kGy zeigt sich mit einer Zellzahl von ca. 30 % ein vergleichbares Ergebnis (Abbildung 44). Zwischen der Modifizierung mit 500 kGy und 1000 kGy kann kein signifikanter Unterschied in der Zellzahl festgestellt werden. Somit ist auch für den zellbiologischen Kontakt hinsichtlich der Zellzahl eine Art Sättigungsverhalten ab einer Dosis von 500 kGy nachgewiesen, was mit den Resultaten der Kontaktwinkelmessung korreliert. Basierend auf diesem Zusammenhang kann in Betracht gezogen werden, dass die in Kapitel 6.2 ermittelten Ursachen der eBeam-Modifizierung auch in direktem Zusammenhang mit den zellbiologischen Reaktionen stehen.

Die Hintergründe der verringerten Zelladhäsion sollen mittels Zellvitalitätstest und Zellzyklusanalyse näher untersucht werden. Wie bereits erwähnt, ist es für die medizintechnische Anwendung grundlegend, dass durch die modifizierten Oberflächen keine Beeinträchtigungen der Zellvitalität oder der Phasen des Zellzyklus hervorgerufen werden. Daher müssen diese Zusammenhänge als Ursache der reduzierten Zellzahl ausgeschlossen werden.

Die Beurteilung der Zellvitalität samt apoptotisch/nekrotischer Anteile erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Die Proben wurden sowohl in Referenz zum Standard als auch im Vergleich unbehandelte/modifizierte Schichten bewertet. Gemessen am Standard weisen sowohl die unbehandelten Beschichtungen als auch die modifizierten DLC-Schichten vergleichbare Werte für die vitalen Zellanteile auf (Abbildung 45 a). Die Negativkontrolle, bei welcher Apoptose/Nekrose induziert wurde, weist hingegen signifikant verringerte Vitalanteile von lediglich 1 % auf. Mit 99 % entfällt bei der Negativkontrolle der Großteil auf apoptotisch/nekrotische Zellen. Bei Betrachtung der apoptotisch/nekrotischen Zellen ergeben sich auf dem Standard und den DLC-Schichten (unbehandelt und modifiziert) sehr geringe Anteile von lediglich 10 % (Abbildung 45 b). Es ist üblich, dass die Vitalanteile des Standards und auch der DLC-Proben nicht vollständig bei 100 % liegen. Diese Beobachtung ist darin begründet, dass sich ein geringer Anteil der Zellpopulation über die Versuchszeit in den apoptotischen Zelltod bewegt. Zusätzlich wird durch das Ablösen der Zellen für die Messung Stress ausgeübt, wodurch ebenfalls ein geringfügiger Anstieg der nekrotischen Anteile verursacht wird [147]. Mit dem Ergebnis kann eine Veränderung der Zellvitalität als Ursache für die reduzierte Zellzahl auf den modifizierten DLC-Schichten ausgeschlossen werden. Die Modifizierung der Proben hat keinen negativen Einfluss auf die relative Verteilung vitaler und apoptotisch/nekrotischer Zellanteile auf diesen Oberflächen.

Nachdem zytotoxische Effekte als Ursache der reduzierten Zellzahl auf den modifizierten Oberflächen ausgeschlossen werden konnten, wurde im Folgenden eine weitere Möglichkeit analysiert. Als Ursache für die reduzierte Zellzahl können auch starke Wechselwirkungen zwischen Zelle und Oberfläche in Betracht gezogen werden.

Wie bereits in Kapitel 3.3 erläutert, kann ein Überangebot an RGD-Motiven<sup>10</sup> auf der Oberfläche die Zellproliferation einschränken. Unter nativen Bedingungen lösen sich die Zellen in der G2/M-Phase des Zellzyklus von der Oberfläche ab, um ihre Teilung durchzuführen [127,147]. Erfolgt kein Ablösen aufgrund zu starker Wechselwirkung mit der Oberfläche, so wird die weitere Proliferation unterbunden. Im Zellzyklus erfolgt dann ein G2/M-Arrest. Das bedeutet, dass die Zellen in der G2/M-Phase verweilen [150]. Um dies als mögliche Ursache für die reduzierte Zellzahl auf den modifizierten DLC-Schichten auszuschließen, wurde eine Zellzyklusanalyse durchgeführt.

Über die Anfärbung mit Propidiumiodid kann die Zellpopulation im Hinblick auf die verschiedenen Zellzyklusphasen (G1, G2/M, S) anteilmäßig differenziert werden. In Abbildung 47 ist die Verteilung der auf den verschiedenen Oberflächen kultivierten Zellen auf die einzelnen Zellzyklusphasen dargestellt. Es zeigt sich, dass die Verteilung der Zellen sowohl auf unbehandelten DLC-Schichten als auch auf den modifizierten Schichten vergleichbar mit dem Standard ist. Erwartungsgemäß befindet sich der größte Anteil der Zellen in der G1-Phase. Deutlich weniger Zellen befinden sich in der S-Phase bzw. in der G2/M-Phase. Dies entspricht einer natürlichen Verteilung auf die einzelnen Zellzyklusphasen und lässt keine Veränderungen erkennen [127]. Würden die Zellen auf den modifizierten Oberflächen so stark adhärieren, dass ein Ablösen zur Zellteilung unterbunden wird, so wäre eine Verschiebung der Anteile mit einer starken Zunahme der Zellanteile in der G2/M-Phase zu beobachten [150]. Da weder die unbehandelten noch die modifizierte Schichten Unterschiede im Vergleich zum Standard aufweisen, können zu starke Zell-Substrat-Wechselwirkungen als Ursache für die verringerte Zellzahl auf den modifizierten DLC-Beschichtungen ausgeschlossen werden.

Eine weitere Ursache der reduzierten Zellzahl könnte in einer prämaternen Seneszenz<sup>11</sup> begründet sein. Senescente Zellen befinden sich in der sogenannten G0-Phase. Die Zellzyklusanalyse beruht auf der Quantifizierung der DNA-Menge pro Zelle. Da der DNA-Gehalt in der G0-Phase keinen quantitativen Unterschied zu dem DNA-Gehalt

---

<sup>10</sup> RGD-Motiv, nähere Erläuterungen dazu in Kapitel 3.3

<sup>11</sup> Die Zelluläre Seneszenz beschreibt den Zustand eines permanenten Zellzyklusarrestes. Die entsprechende Zellzyklusphase wird als G0 bezeichnet. Es wird zwischen replikativer („altersbedingter“) Seneszenz und prämaturner Seneszenz differenziert. Die prämaturne Seneszenz kann durch Stressfaktoren oder DNA-Schädigung induziert werden [225]

---

von Zellen in der G1-Phase aufweist, kann eine Differenzierung zwischen G0 und G1 anhand der durchgeführten Zellzyklusanalyse nicht erfolgen. Nach Goldstein sind seneszente Zellen durch ein weiteres Merkmal gekennzeichnet, da in diesem Zusammenhang eine deutlichen Volumenzunahme sowie granulöse Strukturen dokumentiert wurden [226]. Im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen wurde jedoch keine veränderte Zellmorphologie bzw. -größe beobachtet (Vergleich Abbildung 30). Somit kann eine prämaturre Seneszenz ebenfalls ausgeschlossen werden.

Neben zytotoxischen Effekten und zu starken Zell-Substrat-Wechselwirkungen müssen auch entzündliche Reaktionen als Ursache der verringerten Zellzahl in Betracht gezogen werden. Für den medizintechnischen Einsatz der modifizierten Beschichtungen sollten von der Oberfläche ausgehende inflammatorische Einflüsse ausgeschlossen werden. Daher wurde die Interleukinausschüttung von Fibroblasten für Interleukin-6 (IL-6) und Interleukin-8 (IL-8) mittels ELISA analysiert.

IL-6 zählt zu den Zytokinen, die als Botenstoffe der Akute-Phase-Reaktion im Rahmen einer unspezifischen Immunantwort fungieren. Damit stellt IL-6 einen ersten Marker für eine Entzündungsreaktion dar [227]. IL-8 repräsentiert einen chemotaktischen Botenstoff zur Rekrutierung von Leukozyten. Diese orientieren sich anhand eines IL-8-Konzentrationsgradienten und werden so zum Entzündungsherd geleitet [228]. Auch IL-8 ist damit ein Marker für entzündliche Reaktionen. In der vorliegenden Arbeit wurde neben der Referenz zum Standard auch der Vergleich von unbehandelten und modifizierten DLC-Schichten betrachtet. Zusätzlich wurden Positivkontrollen mitgeführt, bei welchen die IL-Ausschüttung durch Stimulation mit Lipopolysaccharid (LPS) induziert wurde. Die IL-Ausschüttung der Positivkontrollen zeigt sich folglich sowohl für IL-6 als auch für IL-8 signifikant erhöht (Abbildung 46). Die Messergebnisse auf dem Standard sowie den unbehandelten und modifizierten DLC-Beschichtungen liegen in einem deutlich geringeren und untereinander vergleichbaren Größenbereich (Faktor 15 gemessen an der Positivkontrolle). Somit ist belegt, dass für die untersuchten Interleukine weder auf den unbehandelten noch auf den modifizierten Proben eine erhöhte Ausschüttung stattfindet. Die mit den untersuchten Interleukinen in Verbindung stehenden Entzündungsreaktionen können damit als Ursache der verringerten Zellzahl auf den modifizierten Oberflächen ausgeschlossen werden. Diese

---

Erkenntnis ist grundlegend für den medizintechnischen Einsatz der DLC-Oberflächen als Implantatbeschichtung,

Basierend auf den bisherigen Ergebnissen können sowohl Veränderungen der Phasen des Zellzyklus, der Zellvitalität und auch entzündliche Reaktionen als Ursache der verringerten Zellzahl auf den modifizierten DLC-Oberflächen ausgeschlossen werden. Die eBeam-Modifizierung geht mit einer Hydrophilierung der Oberflächen einher, womit auch eine Steigerung der polaren Anteile der Oberflächenenergie verbunden ist (s. Kapitel 6.2). Die Untersuchungen zum dosisabhängigen Sättigungsverhalten lassen vermuten, dass die verringerte Zellzahl damit in direktem Zusammenhang steht. Aus der Literatur ist bekannt, dass bei der eBeam-Behandlung von Polymeren ebenfalls eine Verringerung des Kontaktwinkels sowie eine verringerte Zelladhäsion beobachtet wurden. Diese Beobachtungen standen, wie in der vorliegenden Arbeit auch, mit der Zunahme sauerstoffhaltiger Oberflächenfunktionalitäten in Verbindung [114]. Im Gegensatz dazu führte eine Behandlung der gleichen Polymere mit Sauerstoffplasma zur Steigerung der Zelladhäsion [114]. Auch Miksovsky et al. beschreiben, dass die Plasmabehandlung von DLC-Oberflächen die Zelladhäsion steigert [78].

Dowling et al. und Miksovsky et al. untersuchten die Abhängigkeit zwischen Zelladhäsion und dem Kontaktwinkel auf einer Oberfläche. Dabei stellten sie fest, dass es für einige Osteosarcoma-Zelllinien hinsichtlich der Zelladhäsion einen optimalen Kontaktwinkel gibt [78,229]. Nimmt der Kontaktwinkel größere oder kleinere Werte an, wird die Adhäsion aufgrund veränderter Proteinadsorption eingeschränkt [229]. Auch Bergs Gesetz definiert einen Kontaktwinkel von etwa  $65^\circ$  als kritischen Wert, um hinsichtlich der Proteinadhäsion zwischen „hydrophoben“ ( $>65^\circ$ ) und „hydrophilen“ ( $<65^\circ$ ) Oberflächen zu unterscheiden [230]. Demnach sind bei Werten unter  $65^\circ$  die Proteine nicht in der Lage oberflächlich angelagertes Wasser zu verdrängen und es erfolgt keine Proteinadsorption. Diese These korreliert mit der Veränderung des Kontaktwinkels der untersuchten DLC-Schichten in der vorliegenden Arbeit. Durch die Modifizierung (500 kGy) werden mit  $40^\circ$  bis  $50^\circ$  Kontaktwinkelwerte unter  $65^\circ$  erreicht, im Ausgangszustand liegen die Werte hingegen über  $65^\circ$ . Somit ergibt sich eine erste These, die besagt, dass durch die Veränderung der Nettoladung der DLC-Oberflächen die Proteinadhäsion eingeschränkt wird, wodurch auch die Zelladhäsion

stark verringert würde. Diese erste Annahme bedingt also eine Verringerung bzw. ein Unterbinden der Proteinadhäsion, wodurch im Anschluss auch keine Zelladhäsion möglich wäre. Dem gegenüber steht eine weitere Annahme, deren Basis eine qualitative Veränderung der Proteinadhäsion darstellt, wodurch die nachfolgende Zelladhäsion ebenfalls eingeschränkt würde. Auf diese Möglichkeit soll im Weiteren eingegangen werden.

Durch Liao et al. wurde gezeigt, dass die Stöchiometrie der  $sp^2$  und  $sp^3$ -Bindungen von DLC-Beschichtungen ebenfalls Einfluss auf die zellbiologischen Wechselwirkungen mit Oberflächen hat [231]. In deren Untersuchungen zeigten sich auf  $sp^3$ -reichen Oberflächen im Vergleich zu  $sp^2$ -reichen deutlich bessere Ergebnisse hinsichtlich der Bioverträglichkeit. Da die Veränderung der  $sp^2$ - und  $sp^3$ -Anteile auch eine Hydrophilierung von DLC-Schichten verursachen kann [98,100], mussten die chemisch-physikalischen Ursachen der eBeam-Modifizierung eingehend untersucht werden. Wie bereits in Kapitel 6.2 diskutiert, konnte belegt werden, dass durch die eBeam-Modifizierung keine Veränderung der  $sp^2/sp^3$ -Verhältnisse hervorgerufen wird. Damit kann dieser Zusammenhang als Ursache für die veränderte Zellzahl auf den modifizierten DLC-Oberflächen ausgeschlossen werden.

Weiterhin wurde in Kapitel 6.2 bestätigt, dass es durch die eBeam-Modifizierung zur Veränderung der Oberflächenfunktionalitäten der DLC-Schichten kommt. Dabei stehen sauerstoff- und stickstoffhaltige Gruppen im Mittelpunkt. Derartige Veränderungen können einen Einfluss auf die Proteinadsorption haben (Vergleich Kapitel 3.3) und stehen daher ebenfalls in direktem Zusammenhang mit der Zelladhäsion. So können beispielsweise die Wechselwirkungen zwischen Zelle und Oberfläche so intensiv werden, dass die Zellen nicht mehr in der Lage sind sich zur Zytokinese abzulösen, wodurch die zu Versuchsbeginn ausgebrachte Zellzahl konstant bliebe [127,147]. Diese Vermutung konnte jedoch wie bereits im vorangegangenen Abschnitt erläutert anhand der Zellzyklusanalyse ausgeschlossen werden.

Die XPS-Analytik der modifizierten Beschichtungen ergab ebenfalls, dass durch die Modifizierung vor allem der Anteil sauerstoff- und stickstoffhaltiger Gruppen auf den Oberflächen zunimmt (s. Kapitel 6.2). Dies ist auch als Ursache für die Veränderung



der Zelladhäsion auf den modifizierten Oberflächen anzunehmen. Clem et al. konnten beispielsweise durch Behandlung mit Sauerstoffplasma eine Adhäsion von mesenchymalen Stammzellen (MSC) auf DLC-Oberflächen vollständig unterbinden. Dabei beobachteten sie eine sehr starke Abnahme des Kontaktwinkels auf Werte unter  $2^\circ$  [10], wohingegen in der vorliegenden Arbeit eine weniger intensive Abnahme des Kontaktwinkels auf  $40^\circ$  bis  $50^\circ$  beobachtet wurde. Miksovsky et al. belegten ebenfalls eine Verringerung des Kontaktwinkels, dafür wurden DLC-Beschichtungen mit Stickstoffplasma behandelt. Im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit beobachteten sie jedoch, dass dadurch das Anwachsverhalten von Osteosarcomazellen gefördert wurde [78]. In der genannten Literatur wurde bei der Modifizierung Stickstoff oder Sauerstoff als Umgebungsatmosphäre während der Modifizierung genutzt. Hingegen wird für die Modifizierung mittels eBeam in der vorliegenden Arbeit Luft als Umgebungsmedium genutzt, wodurch Stickstoff und Sauerstoff gleichzeitig vorliegen. Durch die Untersuchung der eBeam-Modifizierung unter variierender Prozessatmosphäre konnte bereits in Kapitel 6.2 demonstriert werden, dass eine stärkere Hydrophilierung der DLC-Schichten bei Modifizierung unter Sauerstoffatmosphäre stattfindet. Diese Ergebnisse korrelieren mit den o.g. Untersuchungen von Clem et al. [10]. Damit könnten die durch die Modifizierung an Luft generierten sauerstoffhaltigen Funktionalitäten als Ursache für die verringerte Zellzahl auf modifizierten Schichten betrachtet werden. Im Vergleich zu den Arbeiten von Clem et al. kommt es in der vorliegenden Arbeit bei Modifizierung an Luft zu einer weniger intensiven Veränderung des Kontaktwinkels. Das spricht dafür, dass die Oberflächen nicht vollständig mit sauerstoffhaltigen Funktionalitäten belegt sind. In Bereichen der modifizierten Oberfläche, die eine hohe Dichte an sauerstoffhaltigen Funktionalitäten aufweisen, findet keine Zelladhäsion statt. Bereichen, die weniger dicht mit sauerstoffhaltigen Funktionalitäten belegt sind, und in denen dann beispielsweise stickstoffhaltige Funktionalitäten in höherem Maß vorliegen, gestatten die Adhäsion einiger weniger Zellen. Diese Vermutung wird ebenfalls durch die Bestimmung der Zellzahl in Abbildung 28 bestätigt. Dabei wird kein 100 %iger Ausschluss der Zelladhäsion beobachtet, sondern lediglich eine starke Verringerung. Für eine Bestätigung dieser Thesen sollten unter Sauerstoffatmosphäre modifizierte Proben der

---

zellbiologischen Analytik unterzogen werden. Zeigt sich dann eine weitere Verringerung oder sogar ein Ausschluss der Zelladhäsion, wird die o.g. Annahme bestätigt.

Wie in Kapitel 3.3 beschrieben, ist die Zelladhäsion auf Oberflächen maßgeblich von der zeitlich vorangeschalteten Proteinadhäsion abhängig [128]. Daher muss davon ausgegangen werden, dass der verringerten Zellzahl auf den modifizierten Oberflächen eine veränderte Proteinadsorption zu Grunde liegt. Dabei sind sowohl qualitative als auch quantitative Veränderungen in Betracht zu ziehen [4,127,128]. Das heißt ein Über- oder Unterangebot an Proteinen und auch eine veränderte Proteinkonformation können die Zelladhäsion ungünstig beeinflussen oder sogar unterbinden. Aussagen darüber konnten durch die Untersuchung der Proteinadsorption mittels Fibronectin gewonnen werden.

Fibronectin zählt zu den am häufigsten vorkommenden Proteinen der extrazellulären Matrix und stellt einen wichtigen Faktor für die Zelladhäsion dar [3,146,147]. Abbildung 48 demonstriert, dass auf den modifizierten DLC-Schichten eine deutlich höhere Fibronectinadhäsion stattfindet. Da durch die Modifizierung die Oberflächen hydrophiler werden, steht diese Beobachtung zunächst im Gegensatz zu einigen Angaben der Literatur, in denen auf hydrophoben Oberflächen eine schnellere und bessere Proteinadsorption, d.h. Adsorption im nativen Konformationszustand beobachtet wird [3,4,130]. Durch die genutzte Analytik der vorliegenden Arbeit kann jedoch keine Aussage zur Proteinkonformation getroffen werden. Weiterhin wird in der Literatur berichtet, dass auch hydrophile Oberflächen die Proteinadsorption begünstigen können, wobei die Wirkung einer zu starken Hydrophilie (Superhydrophilie) wiederum eine negative Auswirkung auf die Adhäsion zeigt [131].

Aufgrund der kontroversen Aussagen aus der Literatur ist an dieser Stelle noch keine direkte Korrelation zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit möglich. Dennoch wird die Annahme verfolgt, dass die reduzierte Zellzahl auf den modifizierten Schichten mit einer veränderten Proteinadhäsion in Verbindung steht.

Aus der Literatur geht hervor, dass beispielsweise durch Stickstoff-Doping von DLC-Schichten die Proteinadhäsion gezielt und konzentrationsabhängig beeinflusst werden kann. Hohe Stickstoffgehalte reduzieren die Proteinadhäsion, wohingegen geringe

Stickstoffgehalte die Adhäsion fördern [232,233]. Im neutralen pH-Bereich liegen die Carboxyl- und Aminogruppen der Proteine ionisiert vor. Somit sind über beide Funktionalitäten Wechselwirkungen zur Adhäsion auf einer Oberfläche möglich [234]. Eine weitere Möglichkeit der Proteinadhäsion basiert auf hydrophoben Wechselwirkungen, bei denen die hydrophoben Kernsegmente des Proteins durch Entfaltung exponiert werden, um mit der Oberfläche in Wechselwirkung zu treten [128]. Da die Modifizierung mittels eBeam in der vorliegenden Arbeit jedoch zu einer Hydrophilierung der DLC-Schichten führt, kann dieser Mechanismus ausgeschlossen werden.

Doch auch die Wechselwirkung mit stickstoff- und sauerstoffhaltigen Gruppen kann zur Veränderung der Proteinkonformation führen [136]. Dies kann einerseits zu einem Überangebot von RGD-Motiven für die integrinvermittelte Zelladhäsion führen, andererseits aber auch eine sterische Behinderung verursachen, die zur Inaktivierung der adhären Proteine und damit zur Verringerung der Zelladhäsion führt [128]. Wie bereits erläutert, konnte ein Überangebot von RGD-Motiven über die Zellzyklusanalyse ausgeschlossen werden. Somit wird vermutet, dass durch die gebildete PAL<sup>12</sup> die Zelladhäsion nicht begünstigt wird. Einerseits könnten Proteine adhären, die nicht adhäsionsvermittelnd wirken, andererseits könnte eine Konformationsänderung während der Proteinadhäsion stattfinden. So wird beispielsweise bei der Adsorption großer Proteinkonzentrationen (Fibronectin und Vitronectin) eine Konformationsänderungen beobachtet, wohingegen geringere Proteinkonzentrationen im nativen Zustand adhären können [128,142]. Diese Aussage zur Konformationsänderung bei hohen Proteinkonzentration korreliert mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit zur Fibronectin-Adhäsion. Über die genutzte Analytik zur Bewertung der Proteinadhäsion am Beispiel Fibronectin kann eine Aussage über die adhären Proteinmenge, jedoch nicht über deren Konformation gewonnen werden [128]. In den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit adhären große Mengen Fibronectin sowohl auf den antiadhäsiven Referenzoberflächen als auch auf den eBeam-modifizierten DLC-Schichten. Auf den adhäsionsfördernden Oberflächen und den unbehandelten Beschichtungen hingegen adhären vergleichsweise geringe

---

<sup>12</sup> PAL – protein adsorption layer, Erläuterungen dazu in Kapitel 3.3

Mengen (Abbildung 48). Die antiadhäsiven Kontrolloberflächen werden standardmäßig zur Kultur von Suspensionszellen eingesetzt. Durch spezielle Oberflächenbehandlung unterbinden sie die Zelladhäsion. Dennoch konnten große Mengen adhärenter Fibronektins auf diesen Oberflächen nachgewiesen werden (Abbildung 48). Somit kann davon ausgegangen werden, dass für die adhärenen Proteine aufgrund der hohen Konzentrationen eine Konformationsänderung stattfindet, wodurch die anschließende Zelladhäsion auf den Oberflächen unterbunden wird. Ein vergleichbarer Mechanismus ist für die eBeam-modifizierte DLC-Beschichtungen anzunehmen, da auch bei diesen im Versuch sehr hohe Fibronektinkonzentrationen detektiert wurden (Abbildung 48). Dennoch weisen auch Wilson und Clegg et al. darauf hin, dass derartige Untersuchungen zur Proteinadhäsion lediglich als Trend für das tatsächliche *in vivo* Verhalten zu bewerten sind. Unter den vereinfachten *in vitro* Bedingungen mit PBS als Lösungsmittel fehlen proteinaktivierende Gegenionen und weitere parallel agierende Proteine [128].

Unter der Annahme, dass auf den modifizierten Beschichtungen im Rahmen der zellbiologischen Untersuchungen prinzipiell zelladhäsionsfördernde Proteine adhären, jedoch in zu großer Menge, kann davon ausgegangen werden, dass die Proteinkonformation dabei verändert wird. Dies erklärt die signifikant reduzierte Zellzahl auf den modifizierten Oberflächen und stützt zudem die in Kapitel 6.2.1 bereits diskutierte These zur Rolle der sauerstoffhaltigen Funktionalitäten auf den modifizierten DLC-Schichten. Wie in Kapitel 6.2.1 beschrieben sind die modifizierten Oberflächen zu einem großen Teil mit sauerstoffhaltigen Funktionalitäten belegt. In diesen Bereichen ist die Proteinadhäsion mit einer Konformationsänderung verbunden, die basierend auf den Ergebnissen der Proteinadhäsionsversuche auf zu große Mengen der adsorbierten Proteine zurückzuführen ist. Dazwischen befinden sich wenige Bereiche, die nur gering mit sauerstoffhaltigen Funktionalitäten belegt sind, und über stickstoffhaltige Funktionalitäten die Zelladhäsion gestatten. Es ist davon auszugehen, dass genau an diesen Stellen die zelladhäsionsfördernden Proteine aufgrund der stickstoffhaltigen Funktionalitäten in nativer Konformation adhären können. Befinden sich nativ adsorbierte Proteine in einem für die Zelladhäsion notwendigen Mindestabstand [128], so findet vereinzelt Zelladhäsion, ohne Einschränkung der

Zellvitalität statt. Die uneingeschränkte Zellvitalität konnte in der vorliegenden Arbeit ebenfalls belegt werden (Abbildung 45). Auf Basis dieser These zur Zelladhäsion auf den modifizierten Beschichtungen ist es wichtig auszuschließen, dass durch die Adsorption der denaturierten Proteine eine sogenannte *frustrierte Phagozytose*<sup>13</sup> ausgelöst wird, da dies zu einer Implantatabstoßung führen kann [236]. Im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen zum Entzündungspotential wurden jedoch für die dabei betrachteten Interleukine keine gesteigerte Ausschüttung und damit keine entzündliche Reaktion beobachtet.

Zusammenfassend wird festgestellt, dass die reduzierte Zellzahl auf den modifizierten DLC-Schichten in Zusammenhang mit den durch die Modifizierung veränderten sauerstoff- und stickstoffhaltigen Funktionalitäten auf den Oberflächen steht, wodurch die Protein- und Zelladhäsion verändert wird. Es bestehen zwei mögliche Thesen für die veränderte Proteinadhäsion. Einerseits könnten die Schichten nach der durchgeführten eBeam-Modifizierung durch Veränderungen der Oberflächenladung proteinabweisend wirken. Andererseits könnte es zu Konformationsänderungen der adhären Proteine kommen.

Angesichts der Ergebnisse der XPS-Analytik und der Kontaktwinkelmessung, wird in Korrelation mit den Ergebnissen von Clem et al. die These der veränderten Proteinkonformation favorisiert [10]. Auch die vorliegenden Ergebnisse zur Proteinadhäsion am Beispiel Fibronectin stützen diese Annahme.

### 6.3.2. Osteogene Differenzierung auf DLC-Beschichtungen

Die Beschichtung von Hüftimplantaten repräsentiert ein mögliches Einsatzgebiet für die in der vorliegenden Arbeit untersuchten DLC-Beschichtungen. Möglichst geringe Entzündungsreaktionen sowie eine Förderung der Knochenneubildung sind Eigenschaften, die durch Beschichtungen in diesem Einsatzfeld realisiert werden

---

<sup>13</sup> *Phagozyten sind in der Lage Partikel, die vom Immunsystem als Pathogene erkannt werden aufzunehmen, dieser Vorgang wird als Phagozytose bezeichnet. Bei der frustrierten Phagozytose übertrifft die Größe des Partikels oder Gegenstandes die Aufnahmekapazität der Phagozyten. Es erfolgt keine Aufnahme, sondern lediglich eine Anlagerung [235]. Dadurch kann es beispielsweise bei Implantaten zur Implantatabstoßung kommen [236].*

müssen. [231]. Um ein optimales Einwachsen eines beschichteten Implantates gewährleisten zu können, ist beispielsweise die Adhäsion von Prä-Osteoblasten und auch von mesenchymalen Stammzellen (MSC) sowie deren uneingeschränkte osteogene Differenzierung von grundlegender Bedeutung [128].

Daher wurde anhand von MSC untersucht, ob auf den DLC-Beschichtungen die osteogene Differenzierung verändert ist. Als Marker für die osteogene Differenzierung wurde der Gehalt an Alkalischer Phosphatase (ALP) und Calcium bestimmt. Der Calciumgehalt ist als *später* Marker einer der am häufigsten untersuchten Marker für die Bewertung der osteogenen Differenzierung von Stammzellen. Vor allem um eine Integration von Hüftimplantaten gewährleisten zu können, ist die Bildung der mineralisierten Matrix von entscheidender Bedeutung [10]. Als *früher* Marker für den Beginn der Mineralisation der Knochenmatrix wird meist ALP genutzt [197].

Für die Untersuchungen wurden die DLC-Schichten in Referenz zu einer Zellkultur-Standardoberflächen (Tissue Culture Plates (TCP) aus Polystyrol) betrachtet. Zusätzlich wurde bei einem Teil der Proben durch die Zugabe von Differenzierungsmedium die osteogene Differenzierung induziert. Damit konnten nicht nur die DLC-Schichten in Referenz zum Standard, sondern auch die Proben ohne und mit osteogener Induktion verglichen werden. Bei den Kontrollen (keine osteogene Induktion) zeigte sich eine geringe ALP-Konzentration. Bei osteogener Induktion hingegen stieg die ALP-Konzentration sowohl auf den Beschichtungen als auch auf der Standardoberfläche auf vergleichbare Werte an (Abbildung 49 a). Die Bewertung des *frühen* Markers ALP verdeutlicht, dass sich für DLC-Schichten bei osteogener Induktion keine erkennbaren Unterschiede im Vergleich zu den Standardoberflächen ergeben. Somit kann im *in vitro* Versuch eine Beeinträchtigung der osteogenen Differenzierung durch die Beschichtungen in der frühen Differenzierungsphase ausgeschlossen werden.

Bezüglich des Calciumgehaltes ergeben sich ähnliche Verhältnismäßigkeiten. Ohne osteogene Stimulierung kam es weder auf den DLC-Schichten noch auf den Standardoberflächen zu einer nachweisbaren Konzentration an Calcium, (Abbildung 49 b). Bei osteogener Induktion hingegen ist die Calciumkonzentration die auf den Beschichtungen gegenüber dem Standard deutlich erhöht (Abbildung 49 b). Somit kann über die Bestimmung des Calciumgehaltes als späten Differenzierungsmarker belegt

werden, dass die Beschichtungen eine wesentliche Verbesserung im Vergleich zum Standard erzielen. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass es unter *in vivo* Bedingungen zu einer beschleunigten Osseointegration von DLC-beschichteten Oberflächen kommt. Somit kann der avisierte Einsatz der untersuchten DLC-Schichten für Hüftimplantate basierend auf den vorliegenden Ergebnissen als vorteilhaft bewertet werden.

Dennoch geben Wilson et al. zu bedenken, dass *in vitro* Untersuchungen nur eingeschränkte Auskunft über die *in vivo* Performance von Implantatoberflächen geben. So geht beispielsweise der Osteoblastenadhäsion die Bildung kleinerer Thromben und die Aktivierung von Thrombozyten voraus, wodurch sich der ursprüngliche Zustand der Oberfläche bis zum Eintreffen der Osteoblasten verändern kann [128]. Folglich müssen die positiven Ergebnisse der vorliegenden Arbeit vor dem Einsatz der Beschichtungen durch *in vivo* Untersuchungen bestätigt werden.

#### 6.4. Barriereigenschaften der DLC-Beschichtung

Zahlreiche Forschungsarbeiten beschäftigen sich mit der Nutzung von DLC-Beschichtungen als Barrierschichten für medizintechnische Anwendungen, um beispielsweise den Austritt zytotoxischer Substanzen zu verringern [42,168,180,181,183,187].

So demonstrierte Bociaga am Beispiel von Schmuckedelstahl (316L), dass eine unerwünschte Immunreaktion auf dieses Material durch DLC-Schichten unterbunden werden kann, wodurch die biologische Verträglichkeit deutlich verbessert wird [69]. Die Barriewirkung von DLC-Schichten auf Nickel-Titan-Legierungen wurde durch Sui et al. untersucht [168]. Die Wissenschaftler belegten eine maßgebliche Verbesserung der Biokompatibilität, da die Korrosionsbeständigkeit des Substrates erhöht und der Austritt von Nickel unterbunden wurde. Die Hämokompatibilität wurde durch die DLC-Beschichtung ebenfalls verbessert. Die materialtechnische Bewertung zeigte, dass durch die Beschichtung die Formgedächtniseigenschaft der Nickel-Titan-Legierung nicht beeinträchtigt wurde [168]. Auch Gutensohn et al. beschäftigten sich mit nickelhaltigen Substratmaterialien der Medizintechnik [71]. Sie zeigten, dass unbeschichtete Stents aus Nickel bereits nach 24 h Inkubationszeit in humanem Plasma eine hohe Menge an Nickelionen freisetzen (12,6 ng/mL), womit Thrombosen aber auch

---

Entzündungsreaktionen einhergehen können. In den Untersuchungen von Gutensohn et al. konnte durch die DLC-Beschichtung eine deutliche Verringerung des Nickelaustritts erzielt werden [71].

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Barrierewirkung der DLC-Beschichtung bezüglich des Nickel-Austritts aus FGL-Material untersucht. Aufgrund des avisierten Einsatzfeldes zur Beschichtung von Hüftimplantaten wurde eine Osteoblastenzelllinie für die biologische Bewertung genutzt. Die Barrierewirkung wurde mittels Extraktionsversuchen untersucht.

Als Extraktionsmedium wurde Zellkulturmedium verwendet. Durch die darin enthaltenen Proteine kann jedoch eine Pufferwirkung verursacht werden, was bedeutet, dass Nickelionen zunächst „abgefangen“ werden indem sie mit Proteinen Komplexe bilden [237]. Um diesen möglicherweise verfälschenden Effekt zu berücksichtigen, wurde neben der *in vivo*-nahen Extraktion mit Medium auch PBS als Extraktionsmedium genutzt. Da PBS keine Eiweiße und Proteine enthält, kommt es zu keiner Pufferwirkung. Freigesetzte Nickelionen wirken dann direkt auf die Zellen und ermöglichen eine genauere Aussage bzgl. der Konzentration an freigesetzten Nickelionen.

Im ersten Schritt wurden vorkultivierte Osteoblasten (s. Kapitel 4.9.9) gezielt mit nickelhaltigem PBS bzw. Zellkulturmedium über eine definierte Zeit inkubiert und anschließend die Stoffwechselaktivität der Zellen bestimmt. Anhand der Ergebnisse wurde abgeschätzt, ab welcher Nickelkonzentration in PBS bzw. Medium eine Auswirkung auf die Stoffwechselaktivität der Zellen zu beobachten ist. Es wurden Nickelkonzentrationen von 1 ppm bis 100 ppm eingestellt. Diese Versuche ergaben, dass bei Nutzung von PBS bereits ab 10 ppm Nickel eine signifikante Verringerung der Stoffwechselaktivität beobachtet wird (Abbildung 50 a). Wird Medium genutzt, so zeigt sich erst ab 50 ppm Nickel eine Verringerung der Zellstoffwechselaktivität (Abbildung 50 b).

Anschließend wurden die Extrakte von unbeschichteten und DLC-beschichteten FGL untersucht. Diese wurden durch zweimonatige Extraktion mit PBS bzw. Zellkulturmedium bei 37 °C gewonnen. Für die Analyse der gewonnen Extrakte wurden ebenfalls Osteoblasten über drei Tage vorkultiviert. Dann wurden die Extrakte auf diese



---

Zellen gegeben, für eine definierte Zeit inkubiert und anschließend mittels Resazurintest die Stoffwechselaktivität bestimmt. Damit sollte über die Bestimmung der Stoffwechselaktivität bewertet werden, in welchem Konzentrationsbereich Nickelionen in den Extrakten vorliegen.

Der PBS-Extrakt der unbeschichteten FGL-Proben führte bei den Osteoblasten gemessen an der Referenz zu einer signifikanten Verringerung der Stoffwechselaktivität (Abbildung 51 a). Hingegen verursachte der PBS-Extrakt der DLC-beschichteten Proben keine Veränderung der Stoffwechselaktivität. Bei der Inkubation der Osteoblasten mit den Medium-Extrakten kam es weder bei unbeschichteten noch bei DLC-beschichteten FGL-Proben zu einer Veränderung der Stoffwechselaktivität (Abbildung 51 b). Da bei PBS als Extraktionsmedium eine Verringerung der Stoffwechselaktivität beobachtet wird, bei Medium als Extraktionsmedium hingegen nicht, kann basierend auf den zuvor durchgeführten Versuchen eine Nickelkonzentration über 10 ppm und unter 50 ppm in den Extrakten abgeschätzt werden. Diese Werte korrelieren mit den Ergebnissen von Messer et al., die ebenfalls bei einer Nickelkonzentration von 50 ppm bereits massive Veränderungen der Zellmorphologie von Fibroblasten feststellten [238]. Basierend auf den vorliegenden Ergebnissen ist anzunehmen, dass es für unbeschichtete FGL-Materialien unter *in vivo* Bedingungen zur lokalen Akkumulation von Nickelionen im Implantatbereich kommt, wodurch der Zellstoffwechsel massiv beeinträchtigt wird [172,173]. Die untersuchten DLC-beschichtungen können demgegenüber eine Verringerung des Nickelaustritts erzielen und somit die Biokompatibilität der FGL-Materialien maßgeblich verbessern.

Für die praktische Überführung der Ergebnisse muss berücksichtigt werden, dass die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuche zur Extraktion unter statischen Bedingungen, d.h. ohne Verformung der FGL-Proben durchgeführt wurden. Die Verformbarkeit der FGL-Bauteile stellt das Alleinstellungsmerkmal dieses Materials dar und ist daher die Grundlage für dessen Anwendung. Bei der Verformung wird die schützende Oxidschicht<sup>14</sup> der Oberfläche zerstört. Dann ist damit zu rechnen, dass lokal erhöhte Nickelkonzentrationen freigesetzt werden [165,175]. Dies verdeutlicht den Nutzen einer stabilen und flexiblen Barrierschicht für die Anwendung im

---

<sup>14</sup> Nähere Erläuterungen zur Oxidschicht auf FGL in Kapitel 3.5

Implantatbereich, um eine hinreichende Biokompatibilität von FGL-Materialien zu gewährleisten. Bereits Gerke demonstrierte, dass die tolerierbare Schichtdehnung bei Erhalt der Schichtintegrität in direktem Zusammenhang mit dem Wasserstoffgehalt der Beschichtung steht [165]. In diesem Zusammenhang konnte bei der Raman-Analyse der DLC-Schichten ein starker Basislinienanstieg beobachtet werden, was auf einen hohen Wasserstoffgehalt sowie langkettige Kohlenstoffketten hinweist, wodurch eine sehr gute Dehnungstoleranz für diese Beschichtungen erwartet werden kann [200].

Die Extraktionsversuche stellen eine indirekte Methode zur Bewertung des Nickelaustritts aus den FGL dar. Um einen Eindruck über die Auswirkung bei Direktkontakt zu erhalten, wurden Osteoblasten direkt auf unbeschichteten und DLC-beschichteten FGL-Proben kultiviert. Anschließend wurde die Zellmorphologie als Bewertungskriterium für die Barrierewirkung herangezogen. Die Zellen wurden dafür mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert und mikroskopisch analysiert. Die Morphologie der Osteoblasten auf den unbeschichteten FGL-Proben ist stark abgekugelt mit zum Teil abgeflachten oder ausgefranst Zellkernen. Es ist nahezu keine Spreitung erkennbar (Abbildung 52 a). Auch die Zelldichte auf diesen Proben erschien vergleichsweise niedrig. Hingegen zeigen die Osteoblasten auf den beschichteten FGL eine vergleichsweise hohe Zellzahl, sowie eine für Osteoblasten natürlich ausgeprägte Zellspreitung (Abbildung 52 b). Die Grundform der Zellen erscheint größtenteils kubisch mit einer spindelartigen Verlängerung. Die Zellkerne sind sphärisch ausgeprägt. Damit wird eine gute Verträglichkeit der DLC-beschichteten FGL bestätigt, wohingegen die unzureichende Spreitung der Zellen auf den unbeschichteten FGL bereits auf eine ungenügende Gewebeintegration solch einer Oberfläche hinweist [127]. Eine geringe Spreitung sowie fehlende fokale Kontakte können zu Apoptose führen. Sowohl die Vitalität als auch die Proliferationsrate von gut gespreiteten Zellen ist deutlich besser und bildet damit die Basis für eine erfolgreiche Implantatintegration [127]. Durch den direkten Kontakt der Zellen mit der unbeschichteten FGL-Oberflächen ist anzunehmen, dass die unnatürlich veränderte Zellmorphologie auf den Austritt von Nickelionen zurück zu führen ist [238]. Die DLC-Beschichtung fungiert demgegenüber als wirksame Barriere und stellt damit eine vielversprechende Möglichkeit zur Steigerung der Biokompatibilität des FGL-Materials dar.

## **7. Zusammenfassung und Reflexion der Ergebnisse auf das Anwendungsbeispiel Hüftendoprothese mit FGL-Aktor**

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Modifizierung von Beschichtungen auf Basis von diamantähnlichem Kohlenstoff (DLC). Die Modifizierung erfolgte mittels Elektronenstrahl (eBeam) und sollte der Oberflächenfunktionalisierung durch die Steuerung der Zelladhäsion dienen. Das Anwendungsfeld der modifizierten DLC-Schichten findet sich im biomedizinischen Bereich. Als Anwendungsbeispiel wurden Aktoren aus Formgedächtnislegierung (FGL) herangezogen. Diese sollen in Hüftendoprothesen genutzt werden. Ihre Aufgabe ist es, bei Implantatlockerung eine Wiederverankerung im Knochen, ohne äußeren Eingriff zu ermöglichen. Die Aktoren stellen an eine Beschichtung besondere Herausforderungen hinsichtlich Schichtstabilität und -flexibilität, Zelladhäsion sowie Barrierefunktion. Im Folgenden werden die untersuchten Schwerpunkte mit Bezug auf dieses Anwendungsbeispiel zusammenfassend dargestellt.

Im ersten Abschnitt der vorliegenden Arbeit wurden vier Abscheidemethoden für DLC-Beschichtungen verglichen: die plasmaaktivierte chemische Gasphasenabscheidung (PA-CVD), das Magnetronspütern (PVD-Spu), und die Lichtbogenverdampfung -ungefiltert und -gefiltert (PVD-Arc bzw. PVD-Arcfil). Aus diesen Abscheidemethoden sollte eine für das medizintechnische Einsatzgebiet geeignete Methode zur DLC-Abscheidung ausgewählt werden. Dafür wurden folgende Kriterien untersucht: Schichtmorphologie und -stabilität, Biokompatibilität und die Möglichkeit zur Modifizierung mittels eBeam.

Es zeigte sich, dass mittels Magnetronspütern homogene DLC-Schichten abgeschieden werden können. Diese Beschichtungen zeigen im Vergleich zu den Beschichtungen der anderen Abscheideverfahren die beste Biokompatibilität. Die Modifizierung der Schichten mittels eBeam ermöglicht eine gezielte Verringerung der Zelladhäsion auf den Oberflächen, ohne zelltoxische Nebenwirkungen. Mit diesem Resultat wird die ausgewählte Beschichtung den Funktionsansprüchen des Anwendungsbeispiels gerecht.

Als Anwendungsbeispiel wurden Aktoren einer *intelligenten* Hüftendoprothese herangezogen. Die Aktoren bestehen aus FGL-Material und sollen im Anwendungsfall eine intrakorporale Verformung durchführen. Die DLC-Beschichtung soll den Austritt von toxischen Nickelionen aus diesem Material verringern. Daher ist die Stabilität der DLC-Schichten auf den Aktoren für den zielgerechten Einsatz von grundlegender Bedeutung. Die Formflexibilität von DLC-Schichten ist aus der Literatur bekannt, womit sie eine geeignete Barrierebeschichtung für verformbare Bauteile darstellen, ohne dabei die Funktion des Substratmaterials zu beeinträchtigen. Grundlage für diese Formflexibilität stellen eine gute Schichthaftung und Langzeitstabilität dar. Auch an dieser Stelle zeigten die mittels Magnetronspattern abgeschiedenen DLC-Schichten sehr gute Ergebnisse. Selbst die Beanspruchung durch wiederholte Desinfektion und Sterilisation führte bei dieser Beschichtung zu keiner Veränderung.

Im Anwendungsbeispiel Hüftendoprothese kann es an der Implantat-Knochen-Schnittstelle zu Mikrobewegungen kommen. Durch die im Vergleich zu den anderen Beschichtungen sehr guten Ergebnisse der PVD-Spu-Schichten bei der tribologischen Charakterisierung, stellen diese Schichten eine für das Anwendungsbeispiel geeignete Beschichtung dar. Ein geringer Reibwert gewährleistet dabei eine ungestörte Gewebsintegration

Das Magnetronspattern wurde basierend auf diesen Ergebnissen als geeignete Abscheidemethode für die DLC-Beschichtung von Implantatmaterialien ausgewählt.

Im zweiten Abschnitt der Arbeit wurden die Modifizierung der Beschichtung, die Reaktion im biologischen Kontakt und die Barrierefunktion der Schichten bewertet.

Durch die eBeam-Modifizierung der DLC-Beschichtung wird eine Hydrophilierung erzielt, die mit einer signifikanten Verringerung der Zellzahl auf der Oberfläche verbunden ist. Nach Beurteilung der Schichtmorphologie von unbehandelten und modifizierten DLC-Oberflächen konnte ausgeschlossen werden, dass die Hydrophilierung auf Veränderungen der Oberflächenmorphologie zurück zu führen ist. Vielmehr wurden chemisch-energetische Veränderungen als Ursache identifiziert, wobei die indirekte eBeam-Wirkung während der Modifizierung zum Tragen kommt. Die Intensität der Hydrophilierung ist dosisabhängig und zeigt eine Art Sättigungsverhalten ab 500 kGy. Es konnte gezeigt werden, dass durch die

Modifizierung der Anteil stickstoff- und sauerstoffhaltiger Funktionalitäten auf der DLC-Oberfläche zunimmt. Die Verringerung der Zellzahl, welche ebenfalls eine Art Sättigung bei 500 kGy zeigt, steht über die Proteinadhäsion mit diesen Veränderungen in direktem Zusammenhang. In Korrelation mit der Literatur scheint es durch die Zunahme der sauerstoffhaltigen Funktionalitäten zu einer veränderten Proteinadhäsion zu kommen. Dabei wird die Proteinkonformation verändert, was die anschließende Zelladhäsion verringert.

Mittels eBeam können sehr feine Strukturen bis in den Mikrometerbereich modifiziert werden, was bedeutet, dass damit die Zelladhäsion in den aneinander angrenzenden Bereichen des Aktors gezielt eingestellt werden kann. Damit wird die DLC-Beschichtung mit dieser Modifizierung den Funktionsansprüchen des Aktorbauteiles gerecht.

Die Analyse der Langzeitstabilität zeigte, dass die Modifizierung sowohl an Luft als auch in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) über einen Zeitraum von mindestens zwei Monaten stabil ist. Somit kann für das Anwendungsbeispiel die Modifizierung bereits langfristig vor dem Einsatz eines Implantates erfolgen.

Bisher wurden derartige Modifizierungen hauptsächlich mittels Plasmabehandlung durchgeführt. Im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit können damit jedoch keine zeitlich stabilen Effekte erzielt werden. Weitere Nachteile der Plasmamethoden ergeben sich durch Materialveränderungen und verhältnismäßig lange Prozesszeiten. Weiterhin wird laut Literatur bei der Plasmabehandlung von DLC-Oberflächen eine Steigerung der Zelladhäsion erzielt. In der vorliegenden Arbeit besteht das Ziel jedoch in der Verringerung der Zelladhäsion, wodurch sich auch unter diesem Aspekt die eBeam-Modifizierung gegenüber der Plasmamodifizierung als vorteilhaft erweist.

Zusätzlich wurde neben der Langzeitstabilität für die eBeam-modifizierten DLC-Beschichtungen auch eine Stabilität gegenüber chemisch-mechanischer Reinigung mit anschließender Dampfsterilisation belegt. Da jedoch die FGL-Aktoren im Anwendungsbeispiel durch thermischen Energieeintrag aktiviert werden, könnte die herkömmliche Anwendung der Dampfsterilisation ein Problem darstellen. Auch dafür bietet die eBeam-Behandlung als alternative Sterilisationsmethode einen Lösungsansatz. Mit einer Sterilisationsdosis von lediglich 25 kGy ist die Anwendung

des eBeams sowohl zur Sterilisation von unbehandelten als auch modifizierten DLC-Oberflächen möglich, ohne deren Eigenschaften oder die des beschichteten Substrates zu beeinflussen.

Die eBeam-Modifizierung der DLC-Oberflächen bietet basierend auf den vorliegenden Ergebnissen eine Möglichkeit zur Steuerung der Zelladhäsion, da in den modifizierten Bereichen eine signifikante Verringerung der Zellzahl erzielt wird. Eine Verringerung der Zellzahl ist für die beweglichen Bereiche der FGL-Aktoren besonders wichtig, um deren Funktion zu gewährleisten (s. Abbildung 1). Für die modifizierten Schichten werden dabei keine Beeinträchtigung der Zellvitalität oder Veränderungen der Phasen des Zellzyklus festgestellt. Weiterhin ist belegt, dass von diesen Beschichtungen kein erhöhtes Entzündungspotential ausgeht, was den uneingeschränkten Einsatz der modifizierten DLC-Beschichtungen im biomedizinischen Bereich ermöglicht.

Die unbehandelten DLC-Oberflächen hingegen sollen im Anwendungsbeispiel eine schnelle Implantatintegration gewährleisten. Auch diesem Anspruch wird die Beschichtung gerecht, da die osteogene Differenzierung humaner mesenchymaler Stammzellen auf diesen Oberflächen uneingeschränkt verläuft. Die Analyse des Calciumgehaltes als späten Differenzierungsmarker lässt sogar auf einen stimulierenden Effekt durch die Schichten schließen. Folglich kann für den Anwendungsfall der Hüftendoprothese eine beschleunigte Osseointegration erwartet werden.

Die größte Herausforderung für die DLC-Beschichtungen bestand in der Verringerung des Nickelaustrittes aus dem FGL-Material. Die Ergebnisse der Extraktionsversuche belegen, dass aus unbeschichteten FGL Nickelionen austreten und die Stoffwechselaktivität von Osteoblasten beeinflussen. Auf DLC-beschichteten Proben hingegen kann kein messbarer Austritt von Nickelionen festgestellt werden. Im Direktkontakt mit humanen Osteoblasten zeigt sich auf den unbeschichteten FGL eine unnatürliche Zellmorphologie, was auf den Nickelaustritt zurückgeführt werden kann. Dahingegen erscheinen die Zellen auf den DLC-beschichteten Oberflächen in vitaler Morphologie. Diese Ergebnisse demonstrieren die Wirksamkeit der DLC-Beschichtung als Barriere gegenüber dem Austritt von Nickelionen.

Zusammenfassend wird festgestellt, dass das Magnetronspütern die Abscheidung von DLC-Schichten ermöglicht, die dem Anwendungsbeispiel Hüftendoprothese mit FGL-Aktor sowohl hinsichtlich Barrierefunktion als auch Biokompatibilität gerecht werden. Die Modifizierung mittels eBeam gewährleistet dabei die gezielte Steuerung der Zellzahl, wodurch die DLC-Beschichtungen auch die biofunktionalen Ansprüche des Anwendungsbeispiels bedienen.

DLC-Beschichtungen weisen aufgrund ihrer großen Variabilität hinsichtlich Materialeigenschaften und der sehr guten Biokompatibilität ein breites Spektrum für biomedizinische Anwendungen auf. Die eBeam-Modifizierung der Beschichtungen eröffnet aufgrund ihrer Langzeitstabilität darüber hinaus weitere Einsatzfelder. Vor allem die Option einer partiellen Oberflächenmodifizierung ermöglicht es, variierenden Funktionsansprüchen zahlreicher Anwendungen gerecht zu werden und die im Rahmen der vorliegenden Arbeit gewonnen Erkenntnisse auf weitere Einsatzfelder zu übertragen.

## 8. Ausblick

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Oberflächenmodifizierung von Beschichtungen aus diamantähnlichem Kohlenstoff (DLC). Zur Modifizierung wurde die Behandlung mittels nicht-thermischem Elektronenstrahl (eBeam) genutzt. Als anwendungsnahe Beispiel wurde die Beschichtung von Formgedächtnislegierungen (FGL) herangezogen. Es ergeben sich basierend auf den vorliegenden Ergebnissen zwei Hauptaspekte für weiterführende Arbeiten.

Der Prozess der Oberflächenmodifizierung von DLC-Schichten mittels eBeam kann weiter optimiert werden. Im Rahmen der Untersuchungen wurde festgestellt, dass die Modifizierung auf indirekte Wirkmechanismen bei der eBeam-Behandlung zurück zu führen ist. Daher ist eine komplette Durchstrahlung der DLC-Beschichtungen nicht notwendig. Folglich könnte für eine Optimierung des Modifizierungsprozesses die Beschleunigungsspannung des eBeams so weit reduziert werden, dass die Elektronenstrahlung nur noch oberflächlich in die DLC-Schichten eindringt. Dadurch kann das unterliegende Substrat geschont und die benötigte Prozessenergie auf ein Minimum reduziert werden. Somit könnten negative Substratveränderungen, wie sie Meisner et al. beobachteten, ausgeschlossen werden [239]. Weiterhin kann die eBeam-Behandlung auch zur Steigerung der Dehnbarkeit der DLC-Beschichtungen genutzt werden. Bereits Aizawa et al. konnten die Grundlagen dafür nachweisen [220]. Daraus resultierend ergibt sich der zweite Aspekt für weiterführende Arbeiten. Die DLC-Beschichtung dient beim Anwendungsbeispiel der FGL als Barrierschicht. Die Funktion der FGL besteht in deren Verformung, wobei die Schichtintegrität der DLC-Oberfläche für die Barrierefunktion gewährleistet sein muss. Prinzipiell tolerieren die Beschichtungen eine gewisse Dehnungsbeanspruchung. Kann die Dehnbarkeit der DLC-Schichten jedoch durch eBeam-Behandlung wie oben beschrieben weiter gesteigert werden, so können für die FGL-Bauteile größere Verformungen und damit ein größeres Einsatzspektrum eröffnet werden. Weiterhin sollte die Barrierefunktion der ausgewählten DLC-Beschichtung unter mechanischer Beanspruchung untersucht werden, um *in vivo* auftretende Mikrobewegungen im Anwendungsfall berücksichtigen zu können. Eine zusätzliche Optimierungsmöglichkeit bei der DLC-Abscheidung auf



den FGL-Materialien findet sich in der Anpassung der Schichtdicke. In der vorliegenden Arbeit wurde eine definierte Schichtdicke von 1  $\mu\text{m}$  genutzt. Es ist aus der Literatur bekannt, dass dünne Schichten aufgrund geringerer Eigenspannungen stärkere Verformungen tolerieren als dicke Schichten. Für den Anwendungsfall muss bei der Abscheidung geringerer Schichtdicken geprüft werden, bis zu welcher Schichtdicke dann die Barrierefunktion uneingeschränkt erhalten bleibt.

Über die oben genannten Aspekte der Optimierungsmöglichkeiten hinaus, ergeben sich für die Zukunft weitere Einsatzgebiete für die eBeam-modifizierte DLC-Beschichtungen. Diese liegen im Bereich der antibakteriellen Oberflächen, da DLC-Oberflächen auch eine keimabweisende Wirkung aufweisen. Jones et al. belegten dies bereits gegenüber der Adhäsion von *Escherichia coli*, wobei auch in diesem Beispiel die Reduktion der Schichtdicke einen positiven Effekt auf die Wirksamkeit zeigt [87]. Darüber hinaus ist bekannt, dass die Bakterienadhäsion durch hydrophobe Wechselwirkungen bestimmt ist und eine Oberflächenhydrophilierung, wie sie mittels eBeam-Modifizierung möglich ist, eine weitere Verringerung der Bakterienadhäsion hervorrufen kann [240,241].

Durch die Nutzung der keimabweisenden Wirkung von DLC-Schichten und der möglichen Steigerung dieser durch die eBeam-Modifizierung, eröffnen sich angefangen von der dentalen Implantologie bis hin zu der Beschichtung von Kontaktlinsen über das betrachtete Anwendungsbeispiel hinaus zahlreiche neue Applikationsfelder für eBeam-modifizierte DLC-Beschichtungen [242–244].

## **Danksagung**

Mein größter Dank gilt Dr.-Ing. habil. Christiane Wetzel, Professor Hans-Peter Wiesmann und Professor Richard H.W. Funk für ihre tatkräftige Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit. Angefangen bei der Bereitstellung des Themas bis hin zur kritischen Auswertung der Ergebnisse.

Dr.-Ing. Dr. rer. medic. Jörg Neunzehn danke ich für die ambitionierte und kreative Bewältigung der direkten Betreuungsarbeit in der Abschlussphase meiner Dissertation, sowie die Unterstützung bei der wissenschaftlichen Veröffentlichung meiner Ergebnisse.

Jana Beckmann danke ich für die zielstrebige Bearbeitung ihrer Masterarbeit zum Thema *Untersuchung zur Elektronenstrahlmodifikation von DLC-Schichten und deren Auswirkung auf die Sterilisationsfestigkeit*, welche mit der Beurteilung der Sterilisationsfestigkeit, Rauheit sowie den Untersuchungen zur Oberflächenenergie Grundbausteine für die vorliegende Dissertation lieferte.

Hagen Grüttner von der Hochschule Mittweida danke ich für die Durchführung der Ramanmessungen sowie für die gemeinschaftliche Diskussion dieser Ergebnisse.

Der Firma EC Europ Coating GmbH und insbesondere Herrn Burkhard Scholz sowie Dr. Ulrich Herrmann danke ich für die sehr gute Kooperation im Rahmen des Förderprojektes DLC-Bio-MIC (SMWK, Fördernummer: 100106122) sowie für die Probenbeschichtung und die XPS-Messung der unbehandelten Beschichtungen, für die Härte- und Tribometermessung sowie für die Schichtdickenbestimmung.

Den Projektpartnern des über die Fraunhofer Gesellschaft geförderten Leitprojektes *Theranostische Implantate* danke ich für die kreative Zusammenarbeit. Insbesondere danke ich Markus Schandar und Gabriele Vacun für die Durchführung der Untersuchungen zur Osteoinduktion am Fraunhofer IGB. Des Weiteren danke ich Joachim Mayer und Dr. Michaela Müller für die Durchführung der XPS-Messung an den modifizierten Beschichtungen am Fraunhofer IGB. Christian Rotsch, Frau Sandra Hunger und Sebastian Winkler vom Fraunhofer IWU danke ich für die Bereitstellung

der FGL-Proben sowie die Edelstahlmaske für die Versuche zur Feinstrukturierung der Beschichtungen.

Ich danke all meinen Arbeitskollegen aus der Arbeitsgruppe medizinische Applikationen und E-Prozesse für die angenehme Arbeitsatmosphäre, die kreativen Pausen und ihre mentale Unterstützung in den zahlreichen Hochs und Tiefs meiner Promotionszeit. Allen voran danke ich Jessy Schönfelder für ihre jederzeit beruhigende Art und ihren Ehrgeiz selbst in komplizierten Situationen die Übersicht und einen kühlen Kopf zu bewahren. Weiterhin kommt auch Simona und Jana großer Dank für ihre Unterstützung mit zahlreichen kalorienreichen Naschereien, das Blumengießen und natürlich auch die fachlich stets angeregten Gespräche im gemeinsamen Büro zu. André und Javier danke ich für die hilfreiche Unterstützung bei der Elektronenstrahlbehandlung meiner Proben. Lysann danke ich für das meist sehr spontane Auftauen und Einfrieren der Zellkulturen, die REM-Aufnahmen sowie die allzeit vorhandene Gesprächsbereitschaft bei kleineren und größeren Laborkrisen. Auch Marleen und Carola danke ich für ihre Hilfsbereitschaft im Labor und vor allem die Geduld während der endlos scheinenden FACS-Tage. Nicht zuletzt gilt mein Dank auch Christiane, durch die ich vor nun bereits 10 Jahren in diese Arbeitsgruppe kam und die mich in dieser Zeit stets an meinen Aufgaben wachsen ließ. Auch Torsten und Frank-Holm danke ich für ihre ständige Gesprächsbereitschaft und Unterstützung während meiner Zeit am Fraunhofer FEP.

Allen voran danke ich meiner Familie und meinen Freunden, die nicht immer genau wussten, *was ich da tue* und doch stets hinter mir stand und sich mit mir über jeden kleinen und großen Erfolg freute.

Philip, auch wenn es noch so turbulent zugeht, bist Du mein Ruhepol. Dafür und für deine unerschöpfliche Geduld danke ich Dir von ganzem Herzen!

## **Eigenständigkeitserklärung**

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts habe ich Unterstützungsleistungen von folgenden Personen erhalten: Prof. Dr. rer. medic. Hans-Peter Wiesmann; Prof. Dr. med. Richard H. W. Funk; Dr.-Ing. habil. Christiane Wetzel. Weitere Personen waren an der geistigen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir keine geldwerten Leistungen für Arbeiten erhalten, die in Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt und ist auch noch nicht veröffentlicht worden.

Die Promotionsordnung der TU Dresden, Fakultät Maschinenwesen vom 1. Juli 2001 wird hiermit anerkannt.

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Funktioneller Aufbau des Hüftschafes einer <i>intelligenten</i> Hüftendoprothese .....	3
Abbildung 2: Einordnung der genutzten Abscheidungsverfahren für DLC-Beschichtungen .....	8
Abbildung 3: Methodische Vorgehensweise der vorliegenden Arbeit .....	25
Abbildung 4: Beschichtungssubstrate aus chirurgischem Edelstahl und Probengeometrie .....	26
Abbildung 5: Prinzip der Schichtdickenberechnung mittels Kalottenschliff .....	30
Abbildung 6: Beurteilung der Schichthaftung nach Haftfestigkeitsklassen .....	31
Abbildung 7: Prinzip der Tribometermessung [41] .....	32
Abbildung 8: Kräfteverhältnisse bei der Kontaktwinkelmessung (Bildquelle: [189]) .....	35
Abbildung 9: Bestimmung von Defektfläche und maximaler Defektgröße .....	37
Abbildung 10: Probenpräparation zur halbseitigen eBeam-Modifizierung (Grobstrukturierung) .....	38
Abbildung 11: Masken zur Feinstrukturierung .....	39
Abbildung 12: Vorgehensweise beim Tropfenabrolltest .....	40
Abbildung 13: Spektren der XPS-Analyse der verschiedenen DLC-Beschichtungen .....	52
Abbildung 14: $sp^2$ -, $sp^3$ - und CO-Bindungsanteile der verschiedenen DLC-Beschichtungen .....	53
Abbildung 15: Haftfestigkeitsbestimmung der verschiedenen DLC-Beschichtungen .....	54
Abbildung 16: Reibungszahl der verschiedenen DLC-Beschichtungen .....	55
Abbildung 17: Defektfläche und -größe der verschiedenen DLC-Schichten im Ausgangszustand .....	56
Abbildung 18: Entwicklung der Defektflächen während der Sterilisationszyklen .....	57
Abbildung 19: Zellzahl humaner Fibroblasten auf den DLC-Beschichtungen .....	58
Abbildung 20: Zelluläre Stoffwechselaktivität humaner Fibroblasten auf den DLC- Beschichtungen .....	59
Abbildung 21: Morphologie humaner Fibroblasten auf den DLC-Beschichtungen .....	60
Abbildung 22: Kontaktwinkel der unbehandelten und modifizierten DLC-Beschichtungen .....	62
Abbildung 23: Oberflächenenergie der unbehandelten und modifizierten DLC-Beschichtungen .....	63
Abbildung 24: Morphologie von Substrat, unbehandelten und modifizierten DLC-Schichten ..	64
Abbildung 25: Mittenrauwert von Substrat, unbehandelten und modifizierten DLC-Schichten	65
Abbildung 26: REM-Aufnahme vom Substrat, unbehandelten und modifizierten DLC-Schichten .....	67
Abbildung 27: Zellzahl humaner Fibroblasten auf unbehandelten und modifizierten DLC- Schichten .....	68
Abbildung 28: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme zur Bestimmung der Zellzahl auf unbehandelten und modifizierten PVD-Spu-Schichten .....	69
Abbildung 29: Zelluläre Stoffwechselaktivität humaner Fibroblasten auf unbehandelten und eBeam-modifizierten DLC-Beschichtungen .....	70
Abbildung 30: Zellmorphologie humaner Fibroblasten auf dem Standard und modifizierten DLC-Beschichtungen .....	71
Abbildung 31: Kontaktwinkel auf den DLC-Schichten als Funktion der Modifizierungsdosis .....	73
Abbildung 32: Ramanspektren der unbehandelten und modifizierten DLC-Schichten .....	74

Abbildung 33: Veränderung des Kontaktwinkels auf den modifizierten DLC-Schichten bei variierender Expositionszeit und Elektronenmenge.....	76
Abbildung 34: Veränderung des Kontaktwinkels auf den modifizierten DLC-Schichten bei variierender Prozessatmosphäre .....	77
Abbildung 35: Elementzusammensetzung der unbehandelten und modifizierten DLC-Schichten .....	78
Abbildung 36: Benetzungsverhalten von halbseitig modifizierten DLC-Proben.....	80
Abbildung 37: Belichtung eBeam-behandelter Dosimeter bei Abschattung mit TEM-Netzchen	81
Abbildung 38: Videoanalyse zum Tropfenabrolltest, Linienstruktur senkrecht zur Abrollrichtung .....	83
Abbildung 39: Videoanalyse zum Tropfenabrolltest, Linienstruktur parallel zur Abrollrichtung	84
Abbildung 40: Kontaktwinkel der modifizierten Schichten während Langzeitlagerung an Luft.	85
Abbildung 41: Ramanspektren der modifizierten DLC-Schichten vor und nach Langzeitlagerung an Luft .....	86
Abbildung 42: Kontaktwinkel der modifizierten Schichten nach Langzeitlagerung in PBS .....	87
Abbildung 43: Kontaktwinkel der modifizierten Schichten nach Desinfektion und Sterilisation	88
Abbildung 44: Zellzahl auf modifizierten DLC-Beschichtungen bei variierender eBeam-Dosis..	90
Abbildung 45: Anteile vitaler und apoptotisch/nekrotischer Fibroblasten auf unbehandelten und modifizierten DLC-Beschichtungen.....	92
Abbildung 46: Interleukin-Ausschüttung humaner Fibroblasten auf unbehandelten und modifizierten DLC-Beschichtungen.....	93
Abbildung 47: Zellzyklusphasen humaner Fibroblasten auf unbehandelten und modifizierten DLC-Schichten .....	94
Abbildung 48: Proteinadhäsion auf unbehandelten und modifizierten DLC-Schichten.....	96
Abbildung 49: ALP- und Ca-Gehalt mesenchymaler Stammzellen auf DLC-Beschichtungen .....	98
Abbildung 50: Stoffwechselaktivität humaner Osteoblasten bei Inkubation mit Ni-haltigem PBS bzw. Ni-haltigem Osteoblastenmedium .....	101
Abbildung 51: Stoffwechselaktivität humaner Osteoblasten bei Inkubation mit Extrakten ....	102
Abbildung 52: Morphologie humaner Osteoblasten auf unbeschichteten und beschichteten FGL.....	103
Abbildung 53: Kriterien für die Auswahl einer Abscheidemethode .....	112

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Probenbezeichnung und Farbcodierung .....	25
Tabelle 2: Abscheideverfahren und -parameter für die DLC-Schichten der vorliegenden Arbeit .....	28
Tabelle 3: Übersicht der Prozessparameter zur eBeam-Behandlung der DLC-Schichten.....	28
Tabelle 4: Datensätze der Testflüssigkeiten für Kontaktwinkelmessung .....	35
Tabelle 5: Übersicht der genutzten Zellen und Zelllinien .....	41
Tabelle 6: Übersicht zu Spendern für die Gewinnung von hMSC .....	41
Tabelle 7: Kulturmedien für humane Fibroblasten.....	42
Tabelle 8: Kulturmedien für humane mesenchymale Stammzellen.....	42
Tabelle 9: Kontrollmedien für osteogene Differenzierung von humanen mesenchymalen Stammzellen.....	42
Tabelle 10: Osteogenes Differenzierungsmedium für humanen mesenchymalen Stammzellen	43
Tabelle 11: Kulturmedien für humane Osteoblasten .....	43
Tabelle 12: Schichtdicke der verschiedenen DLC-Beschichtungen.....	53
Tabelle 13: Signifikanzen zu Abbildung 31.....	73
Tabelle 14: Signifikanzen zu Abbildung 33.....	76
Tabelle 15: Signifikanzen zu Abbildung 48.....	96
Tabelle 16: Signifikanzen zu Abbildung 50 (links: PBS; rechts: Osteoblastenmedium) .....	101

**Abkürzungen und Symbole**

AG01522D	Humane Fibroblasten (Primärzellen)
Al	Aluminium
ALD	Atomic Layer Deposition (dt. Atomlagenabscheidung)
ALP	Alkalische Phosphatase
AuCd	Gold-Cadmium
BSA	Bovine Serum Albumin (dt. Rinderserumalbumin)
C	Kohlenstoff
Ca	Calcium
Co	Cobalt
Cr	Chrom
Cr6	Wälzlagerstahl nach EN ISO 683-17
CuAlNi	Kupfer-Aluminium-Nickel
CuZnAl	Kupfer-Zink-Aluminium
CVD	Chemical Vapour Deposition (dt. Chemische Gasphasenabscheidung)
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DLC	Diamon Like Carbon (dt. Diamantähnlicher Kohlenstoff)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium (dt. Eagle's medium modifiziert nach Dulbecco)
DNA	Deoxyribonucleic Acid (dt. DNS bzw. Desoxyribonukleinsäure)
DPBS	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (dt. gepufferte Salzlösung nach Dulbecco)
eBeam	Elektronenstrahl
EC	Europ Coating GmbH
ECM	extra cellular matrix (dt.: extrazelluläre Matrix)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ESCA	Electron Spectroscopy for Chemical Analysis (Vergl. XPS)
ESR	Elektronenspinresonanz
EtOH	Ethanol
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting (dt, hier: Durchflusszytometrie)
FCS	Fetal Calf Serum (dt. Fötale Kälberserum)
FeMnSi	Eisen-Mangan-Silizium
FGL	Formgedächtnislegierung
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
F <sub>N</sub>	Normalkraft
F <sub>R</sub>	Reibungskraft
H	Wasserstoff
HaCaT	Human adult low calcium high temperature keratinocytes
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution (dt. gepufferte Salzlösung nach Hank)
hMSC	human mesenchymal stem cells (humane mesenchymale Stammzellen)
IL-6	Interleukin 6
IL-8	Interleukin 8
LPS	Lipopolysaccharid
MEM	Minimal Eagle's Medium (dt. Basismedium nach Eagle)
Mg	Magnesium
MIC	Minimal Invasive Chirurgie
Mo	Molybdän
MSC	Mesenchymal Stem Cells (dt. Mesenchymale Stammzellen)
N / N <sub>2</sub>	Stickstoff



NaHCO <sub>3</sub>	Natriumhydrogencarbonat
NEA	Non Essential Amino Acids (dt. nicht-essenzielle Aminosäuren)
Ni	Nickel
NiMnGa	Nickel-Mangan-Gallium
NiTi	Nickel-Titan-Legierung
O / O <sub>2</sub>	Sauerstoff
OWRK	Methode zur Berechnung der Oberflächenenergie nach Owens, Wendt, Rable und Kaelbel
PA-CVD	Plasma Assisted Chemical Vapour Deposition (dt. Plasmaunterstützte chemische Gasphasenabscheidung)
PAL	Protein Adsorption Layer (adsorbierte Proteinschicht)
PBS	Phosphate Buffered Saline (dt. Phosphatgepufferte Salzlösung)
PI	Propidiumiodid
PVD	Physical Vapour Deposition (dt. Physikalische Gasphasenabscheidung)
PVD-Arc	Cathodic Arc Deposition (dt. Lichtbogenverdampfung)
PVD-Arc fil	Filtered Cathodic Arc Deposition (dt. Gefilterte Lichtbogenverdampfung)
PVD-Spu	Magnetronsputterbeschichtung
RGD	Einbuchstabencode für: Arginin, Glycin und Asparaginsäure
RNA	Ribonucleic Acid (dt. RNS bzw. Ribonukleinsäure)
SaOS-2	Osteosarcomazelllinie
SFT	Surface Tension (dt. Oberflächenspannung bzw. freie Oberflächenenergie)
SFT (d)	dispenser Anteil der SFT
SFT (p)	polarer Anteil der SFT
SI	Système international d'unités (dt. Internationale Einheitensystem )
Si	Silizium
SiO <sub>2</sub>	Siliciumdioxid
SMWK	Sächsisches Staatsministerium für Wissenschaft und Kunst
sp <sup>2</sup>	Hybridisierungszustand des C, bei dem die Bindungen um das C-Atom trigonal planar im Raum angeordnet sind
sp <sup>3</sup>	Hybridisierungszustand des C, bei dem die Bindungen um das C-Atom tetraedrisch im Raum angeordnet sind
TCP	Tissue Culture Plate (dt. hier: Zellkulturoberfläche)
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
Ti	Titan
TRITC	Tetramethylrhodamineisothiocyanate
UV	Ultraviolett
V	Vanadium
VDI	Verein Deutscher Ingenieure
WC	Wolframcarbid
WLI	Weißlichtinterferometrie
XPS	X-ray Photoelectron Spectroscopy (dt. Photoelektronenspektroskopie)
α	Alpha
γ <sub>sl</sub>	Grenzflächenspannung zwischen Feststoff und Flüssigkeit
σ <sub>l</sub>	Oberflächenspannung der Flüssigkeit
σ <sub>s</sub>	Oberflächenspannung des Feststoffes
Θ	Randwinkel

**Einheiten**

°	Grad
°C	Grad Celsius
µm	Mikrometer
at%	Atomprozent
bar	Bar
cm <sup>3</sup>	Kubikzentimeter
fg	Femtogramm
g	Gramm
Gy / kGy	Gray bzw. Kilogray
h	Stunde
Hz	Hertz
kGy	Kilogray
kV / keV	Kiloelektronenvolt
L	Liter
m	Meter
M	Mol
mbar	Millibar
mg	Milligramm
min	Minute
mL	Milliliter
mm	Millimeter
mN	Millinewton
MV / MeV	Megaelektronenvolt
N	Newton
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
pg	Pikogramm

## Literatur

- [1] M. Tallawi, E. Rosellini, N. Barbani, M.G. Cascone, R. Rai, G. Saint-Pierre, A.R. Boccaccini, Strategies for the chemical and biological functionalization of scaffolds for cardiac tissue engineering: a review, *Journal of the Royal Society, Interface / the Royal Society* 12 (2015) 20150254.
- [2] T. Hanawa, Biofunctionalization of titanium for dental implant, *Japanese Dental Science Review* 46 (2010) 93–101.
- [3] E. Wintermantel, S.-W. Ha, *Medizintechnik Life Science Engineering* (2008).
- [4] H.J. Breme, C.J. Kirkpatrick, R. Thull, *Metallic biomaterial interfaces*, Wiley-VCH, Weinheim, 2008.
- [5] K. Chwalek, Y. Dening, C. Hinüber, H. Brünig, M. Nitschke, C. Werner, Providing the right cues in nerve guidance conduits: Biofunctionalization versus fiber profile to facilitate oriented neuronal outgrowth, *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications* 61 (2016) 466–472.
- [6] L. Tian, M.P. Prabhakaran, J. Hu, M. Chen, F. Besenbacher, S. Ramakrishna, Synergistic effect of topography, surface chemistry and conductivity of the electrospun nanofibrous scaffold on cellular response of PC12 cells, *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces* 145 (2016) 420–429.
- [7] M.M. Bilek, Biofunctionalization of surfaces by energetic ion implantation: Review of progress on applications in implantable biomedical devices and antibody microarrays, *Applied Surface Science* 310 (2014) 3–10.
- [8] P. Amornsudthiwat, R. Mongkolnarin, S. Kanokpanont, J. Panpranot, C.S. Wong, S. Damrongsakkul, Improvement of early cell adhesion on Thai silk fibroin surface by low energy plasma, *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces* 111 (2013) 579–586.
- [9] A. Aminian, B. Shirzadi, Z. Azizi, K. Maedler, E. Volkmann, N. Hildebrand, M. Maas, L. Treccani, K. Rezwani, Enhanced cell adhesion on bioinert ceramics mediated by the osteogenic cell membrane enzyme alkaline phosphatase, *Materials Science and Engineering: C* 69 (2016) 184–194.
- [10] W.C. Clem, S. Chowdhury, S.A. Catledge, J.J. Weimer, F.M. Shaikh, K.M. Hennessy, V.V. Konovalov, M.R. Hill, A. Waterfeld, S.L. Bellis, Y.K. Vohra, Mesenchymal stem cell interaction with ultra-smooth nanostructured diamond for wear-resistant orthopaedic implants, *Biomaterials* 29 (2008) 3461–3468.
- [11] A. Bral, M.Y. Mommaerts, In vivo biofunctionalization of titanium patient-specific implants with nano hydroxyapatite and other nano calcium phosphate coatings: A systematic review, *Journal of cranio-maxillo-facial surgery official publication of the European Association for Cranio-Maxillo-Facial Surgery* 44 (2016) 400–412.
- [12] M.H. Ahmed, J.A. Byrne, J. McLaughlin, A. Elhissi, W. Ahmed, Comparison between FTIR and XPS characterization of amino acid glycine adsorption onto diamond-like carbon (DLC) and silicon doped DLC, *Applied Surface Science* 273 (2013) 507–514.
- [13] A. Mochizuki, T. Ogawa, K. Okamoto, T. Nakatani, Y. Nitta, Blood compatibility of gas plasma-treated diamond-like carbon surface—Effect of physicochemical properties of DLC surface on blood compatibility, *Materials Science and Engineering: C* 31 (2011) 567–573.

- [14] Y. Zhao, K.W. Yeung, P.K. Chu, Functionalization of biomedical materials using plasma and related technologies, *Applied Surface Science* 310 (2014) 11–18.
- [15] R. Hauert, A review of modified DLC coatings for biological applications, *Diamond and Related Materials* 12 (2003) 583–589.
- [16] E.M. Regan, J.B. Uney, A.D. Dick, Y. Zhang, J. Nunez-Yanez, J.P. McGeehan, F. Claeysens, S. Kelly, Differential patterning of neuronal, glial and neural progenitor cells on phosphorus-doped and UV irradiated diamond-like carbon, *Biomaterials* 31 (2010) 207–215.
- [17] T. Nakamura, T. Tsuchiya, T. Ohana, Fabrication of sulfur-functionalized DLC films by photochemical modification and attachment of gold nanoparticles, *Applied Surface Science* 317 (2014) 443–448.
- [18] J.-S. Oh, Y. Kakuta, Y. Yasuoka, H. Furuta, A. Hatta, Localized DLC etching by non-thermal atmospheric-pressure helium plasma jet in ambient air, *Diamond and Related Materials* (2014).
- [19] C. Corbella, S. Portal, M. Rubio-Roy, M.A. Vallvé, J. Ignés-Mullol, E. Bertran, J.L. Andújar, Surface structuring of diamond-like carbon films by colloidal lithography with silica sub-micron particles, *Diamond and Related Materials* 19 (2010) 1124–1130.
- [20] F.R. Marciano, J.S. Marcuzzo, L.F. Bonetti, E.J. Corat, V.J. Trava-Airoldi, Use of near atmospheric pressure and low pressure techniques to modification DLC film surface, *Surface and Coatings Technology* 204 (2009) 64–68.
- [21] G. Dearnaley, J.H. Arps, Biomedical applications of diamond-like carbon (DLC) coatings: A review, *Surface and Coatings Technology* 200 (2005) 2518–2524.
- [22] J. Vetter, 60years of DLC coatings: Historical highlights and technical review of cathodic arc processes to synthesize various DLC types, and their evolution for industrial applications, *Surface and Coatings Technology* 257 (2014) 213–240.
- [23] Fraunhofer Gesellschaft, Theranostische Implantate. Fraunhofer Leitprojekt, 2013.
- [24] VDI, VDI-Richtlinie 2840: Kohlenstoffschichten; Grundlagen, Schichttypen und Eigenschaften 25.220.99.
- [25] Vollhardt, K. P. C, N.E. Schore, *Organische Chemie: Set aus Lehrbuch und Arbeitsbuch*, 5th ed., Wiley-VCH, Weinheim, 2012.
- [26] W.M. Haynes, D.R. Lide, T.J. Bruno, *CRC handbook of chemistry and physics: A ready-reference book of chemical and physical data*, 2016th ed.
- [27] Z. He, S. Zhang, Q. Song, W. Li, D. Liu, H. Li, M. Tang, R. Chai, The structural development of primary cultured hippocampal neurons on a graphene substrate, *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces* 146 (2016) 442–451.
- [28] J.-Y. Kim, J.Y. Lee, K.-Y. Shin, H. Jeong, H.J. Son, C.-H. Lee, J.H. Park, S.-S. Lee, J.G. Son, M.J. Ko, Highly crumpled graphene nano-networks as electrocatalytic counter electrode in photovoltaics, *Applied Catalysis B: Environmental* 192 (2016) 342–349.
- [29] C.-M. Seah, B. Vigolo, S.-P. Chai, A.R. Mohamed, Mechanisms of graphene fabrication through plasma-induced layer-by-layer thinning, *Carbon* 105 (2016) 496–509.
- [30] K.A. Shah, B.A. Tali, Synthesis of carbon nanotubes by catalytic chemical vapour deposition: A review on carbon sources, catalysts and substrates, *Materials Science in Semiconductor Processing* 41 (2016) 67–82.
- [31] M. Ema, M. Gamo, K. Honda, A review of toxicity studies of single-walled carbon nanotubes in laboratory animals, *Regulatory toxicology and pharmacology RTP* 74 (2016) 42–63.

- [32] A. Zeng, V.F. Neto, J.J. Gracio, Q.H. Fan, Diamond-like carbon (DLC) films as electrochemical electrodes, *Diamond and Related Materials* 43 (2014) 12–22.
- [33] A. Fujishima, T.N. Rao, New directions in structuring and electrochemical applications of boron-doped diamond thin films, *Diamond and Related Materials* 10 (2001) 1799–1803.
- [34] R. Ohr, Analytische und funktionale Charakterisierung von ultradünnen kohlenstoffbasierten Schichten.
- [35] W.S. Choi, K. Kim, J. Yi, B. Hong, Diamond-like carbon protective anti-reflection coating for Si solar cell, *Materials Letters* 62 (2008) 577–580.
- [36] D.K. Avasthi, Effects and uses of ion beams with diamond, DLC and fullerene films, *Vacuum* 47 (1996) 1249–1258.
- [37] J. Robertson, Diamond-like amorphous carbon, *Materials Science and Engineering: R: Reports* 37 (2002) 129–281.
- [38] K.S. SreeHarsha (Ed.), *Principles of physical vapor deposition of thin films*, 1st ed., Elsevier, Amsterdam, Boston, London, 2006.
- [39] U. Behringer, H. Gärtner, R. Grün, G. Kienel, M. Knepper, E. Lugscheider, H. Oechsner, G. Wahl, J. Waldorf, G.K. Wolf, *Vakuumbeschichtung 2*, VDI-Verl., Düsseldorf, 1995.
- [40] U. Behringer, D. Bonnet, A. Forchel, G. Kienel, E. Obermeier, B. Schröder, R. Wördenweber, *Vakuumbeschichtung 4*, VDI, Düsseldorf, 1993.
- [41] G. Gotzmann, C. Wetzel, B. Scholz, U. Herrmann, Entwicklung biofunktionaler, sterilisationsfester DLC-Schichten für die Anwendung in der Minimal-Invasiv-Chirurgie „DLC-Bio-MIC“: Fördernummer SMWK: 100106122. Gemeinsamer Sachbericht, 2014.
- [42] L. Gerke, J.-C. Schauer, M. Pohl, J. Winter, Adhesion and elasticity of plasma deposited wear resistant a-C:H coatings on nickel–titanium, *Surface and Coatings Technology* 203 (2009) 3214–3218.
- [43] M. Reinoso, F. Álvarez, H. Huck, Hard carbon coatings deposited on steel, *Applied Surface Science* 254 (2007) 181–184.
- [44] M. Azzi, P. Amirault, M. Paquette, J.E. Klemberg-Sapieha, L. Martinu, Corrosion performance and mechanical stability of 316L/DLC coating system: Role of interlayers, *Surface and Coatings Technology* 204 (2010) 3986–3994.
- [45] C. Bauer, Superharte, unterschiedlich gradierte PVD-Kohlenstoffschichten mit und ohne Zusätze von Titan und Silizium.
- [46] R. Hatada, S. Flege, A. Bobrich, W. Ensinger, K. Baba, Surface modification and corrosion properties of implanted and DLC coated stainless steel by plasma based ion implantation and deposition, *Surface and Coatings Technology* (2013).
- [47] M. Jelinek, T. Kocourek, J. Zemek, J. Mikšovský, S. Kubinová, J. Remsa, J. Kopeček, K. Jurek, Chromium-doped DLC for implants prepared by laser-magnetron deposition, *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications* 46 (2015) 381–386.
- [48] M.K. Hassan, B.K. Pramanik, A. Hatta, Comparative Study on Chemical Vapor Deposition of Diamond-Like Carbon Films from Methane and Acetylene Using RF Plasma, *Jpn. J. Appl. Phys.* 45 (2006) 8398–8400.
- [49] Š. Meškiniš, A. Vasiliauskas, K. Šlapikas, R. Gudaitis, S. Tamulevičius, G. Niaura, Piezoresistive properties and structure of hydrogen-free DLC films deposited by DC and pulsed-DC unbalanced magnetron sputtering, *Surface and Coatings Technology* 211 (2012) 172–175.

- [50] E. Peiner, A. Tibrewala, R. Bandorf, S. Biehl, H. Lüthje, L. Doering, Micro force sensor with piezoresistive amorphous carbon strain gauge, *Sensors and Actuators A: Physical* 130-131 (2006) 75–82.
- [51] Š. Meškiniš, R. Gudaitis, V. Kopustinskas, S. Tamulevičius, Electrical and piezoresistive properties of ion beam deposited DLC films, *Applied Surface Science* 254 (2008) 5252–5256.
- [52] N. Kitahara, T. Sato, H. Isogawa, Y. Ohgoe, S. Masuko, F. Shizuku, K.K. Hirakuri, Antibacterial property of DLC film coated on textile material, *Diamond and Related Materials* 19 (2010) 690–694.
- [53] X. Deng, H. Kousaka, T. Tokoroyama, N. Umehara, Tribological behavior of tetrahedral amorphous carbon (ta-C) coatings at elevated temperatures, *Tribology International* 75 (2014) 98–103.
- [54] K. Al Mahmud, M. Varman, M.A. Kalam, H.H. Masjuki, H.M. Mobarak, N. Zulkifli, Tribological characteristics of amorphous hydrogenated (a-C:H) and tetrahedral (ta-C) diamond-like carbon coating at different test temperatures in the presence of commercial lubricating oil, *Surface and Coatings Technology* 245 (2014) 133–147.
- [55] J. Oksanen, T.J. Hakala, S. Tervakangas, P. Laakso, L. Kilpi, H. Ronkainen, J. Koskinen, Tribological properties of laser-textured and ta-C coated surfaces with burnished WS<sub>2</sub> at elevated temperatures, *Tribology International* 70 (2014) 94–103.
- [56] S. Makowski, V. Weihnacht, F. Schaller, A. Leson, Ultra-low friction of biodiesel lubricated ta-C coatings, *Tribology International* 71 (2014) 120–124.
- [57] H.A. Tasdemir, M. Wakayama, T. Tokoroyama, H. Kousaka, N. Umehara, Y. Mabuchi, T. Higuchi, Ultra-low friction of tetrahedral amorphous diamond-like carbon (ta-C DLC) under boundary lubrication in poly alpha-olefin (PAO) with additives, *Tribology International* 65 (2013) 286–294.
- [58] J. Jiang, R.D. Arnell, J. Tong, An investigation into the tribological behaviour of DLC coatings deposited on sintered ferrous alloy substrate, *Wear* 214 (1998) 14–22.
- [59] S.J. Bull, Tribology of carbon coatings: DLC, diamond and beyond, *Diamond and Related Materials* 4 (1995) 827–836.
- [60] G. Wu, W. Dai, H. Zheng, A. Wang, Improving wear resistance and corrosion resistance of AZ31 magnesium alloy by DLC/AlN/Al coating, *Surface and Coatings Technology* 205 (2010) 2067–2073.
- [61] R. Asakawa, S. Nagashima, Y. Nakamura, T. Hasebe, T. Suzuki, A. Hotta, Combining polymers with diamond-like carbon (DLC) for highly functionalized materials, *Surface and Coatings Technology* 206 (2011) 676–685.
- [62] F. Cui, D. Li, A review of investigations on biocompatibility of diamond-like carbon and carbon nitride films, *Surface and Coatings Technology* 131 (2000) 481–487.
- [63] V. Tiainen, Amorphous carbon as a bio-mechanical coating — mechanical properties and biological applications, *Diamond and Related Materials* 10 (2001) 153–160.
- [64] M. Jelínek, K. Smetana, T. Kocourek, B. Dvořánková, J. Zemek, J. Remsa, T. Luxbacher, Biocompatibility and sp<sup>3</sup>/sp<sup>2</sup> ratio of laser created DLC films, *Materials Science and Engineering: B* 169 (2010) 89–93.
- [65] E. Salgueiredo, M. Vila, M.A. Silva, M.A. Lopes, J.D. Santos, F.M. Costa, R.F. Silva, P.S. Gomes, M.H. Fernandes, Biocompatibility evaluation of DLC-coated Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub> substrates for biomedical applications, *Diamond and Related Materials* 17 (2008) 878–881.
- [66] M. Jones, I. McColl, D. Grant, K. Parker, T. Parker, Haemocompatibility of DLC and TiC–TiN interlayers on titanium, *Diamond and Related Materials* 8 (1999) 457–462.

- [67] N. Ali, Y. Kousar, T.I. Okpalugo, V. Singh, M. Pease, A.A. Ogwu, J. Gracio, E. Titus, E.I. Meletis, M.J. Jackson, Human micro-vascular endothelial cell seeding on Cr-DLC thin films for mechanical heart valve applications, *Thin Solid Films* 515 (2006) 59–65.
- [68] L. Wang, J.F. Su, X. Nie, Corrosion and tribological properties and impact fatigue behaviors of TiN- and DLC-coated stainless steels in a simulated body fluid environment, *Surface and Coatings Technology* 205 (2010) 1599–1605.
- [69] D. Bociaga, K. Mitura, Biomedical effect of tissue contact with metallic material used for body piercing modified by DLC coatings, *Diamond and Related Materials* 17 (2008) 1410–1415.
- [70] B.J. Jones, A. Mahendran, A.W. Anson, A.J. Reynolds, R. Bulpett, J. Franks, Diamond-like carbon coating of alternative metal alloys for medical and surgical applications, *Diamond and Related Materials* 19 (2010) 685–689.
- [71] K. Gutensohn, C. Beythien, J. Bau, T. Fenner, P. Grewe, R. Koester, K. Padmanaban, P. Kuehnl, In Vitro Analyses of Diamond-like Carbon Coated Stents, *Thrombosis Research* 99 (2000) 577–585.
- [72] R. Sharma, A.K. Pandey, N. Sharma, D. Sasmal, P.K. Barhai, Diamond like carbon films as a protective surface on PMMA for biomedical applications, *Surface and Coatings Technology* 205 (2010) 2495–2502.
- [73] H.S. Tran, M.M. Puc, C.W. Hewitt, Diamond-Like Carbon Coating and Plasma or Glow Discharge Treatment of Mechanical Heart Valves, *Journal of Investigative Surgery* 12 (2009) 133–140.
- [74] A. Grill, Diamond-like carbon coatings as biocompatible materials—an overview, *Diamond and Related Materials* 12 (2003) 166–170.
- [75] E.M. Regan, J.B. Uney, A.D. Dick, Y. Zhang, J. Nunez-Yanez, J.P. McGeehan, F. Claeysens, S. Kelly, Differential patterning of neuronal, glial and neural progenitor cells on phosphorus-doped and UV irradiated diamond-like carbon, *Biomaterials* 31 (2010) 207–215.
- [76] S.C. Kwok, J. Wang, P.K. Chu, Surface energy, wettability, and blood compatibility phosphorus doped diamond-like carbon films, *Diamond and Related Materials* 14 (2005) 78–85.
- [77] N.W. Khun, E. Liu, Investigation of corrosion behavior of nitrogen doped and platinum/ruthenium doped diamond-like carbon thin films in Hank's solution, *Materials Science and Engineering: C* 31 (2011) 1539–1544.
- [78] J. Miksovsky, A. Voss, R. Kozarova, T. Kocourek, P. Pisarik, G. Ceccone, W. Kulisch, M. Jelinek, M.D. Apostolova, J.P. Reithmaier, C. Popov, Cell adhesion and growth on ultrananocrystalline diamond and diamond-like carbon films after different surface modifications, *Applied Surface Science* 297 (2014) 95–102.
- [79] K. Myllymaa, Novel Carbon Coatings and Surface Texturing for Improving Biological Response of Orthopedic Implant Materials.
- [80] M. Wang, Y. Zhao, R. Xu, M. Zhang, R.K. Fu, P.K. Chu, Direct formation of amine functionality on DLC films and surface cyto-compatibility, *Diamond and Related Materials* 38 (2013) 28–31.
- [81] M.H. Ahmed, J.A. Byrne, J. McLaughlin, Evaluation of glycine adsorption on diamond like carbon (DLC) and fluorinated DLC deposited by plasma-enhanced chemical vapour deposition (PECVD), *Surface and Coatings Technology* 209 (2012) 8–14.

- [82] F.R. Marciano, L.F. Bonetti, L.V. Santos, N.S. Da-Silva, E.J. Corat, V.J. Trava-Airoldi, Antibacterial activity of DLC and Ag–DLC films produced by PECVD technique, *Diamond and Related Materials* 18 (2009) 1010–1014.
- [83] J.L. Endrino, M. Allen, R.E. Galindo, H. Zhang, A. Anders, J.M. Albella, Biocompatible Silver-containing a-C:H and a-C coatings: A comparative Study.
- [84] N.K. Manninen, F. Ribeiro, A. Escudeiro, T. Polcar, S. Carvalho, A. Cavaleiro, Influence of Ag content on mechanical and tribological behavior of DLC coatings, *Surface and Coatings Technology* 232 (2013) 440–446.
- [85] Y.-H. Chan, C.-F. Huang, K.-L. Ou, P.-W. Peng, Mechanical properties and antibacterial activity of copper doped diamond-like carbon films, *Surface and Coatings Technology* 206 (2011) 1037–1040.
- [86] L. Swiatek, A. Olejnik, J. Grabarczyk, A. Jedrzejczak, A. Sobczyk-Guzenda, M. Kaminska, W. Jakubowski, W. Szymanski, D. Bociaga, Multi-doped diamond like-carbon coatings (DLC-Si/Ag) for biomedical applications fabricated using the modified chemical vapour deposition method, *Diamond and Related Materials* 67 (2016) 54–62.
- [87] D.S. Jones, C.P. Garvin, D. Dowling, K. Donnelly, S.P. Gorman, Examination of surface properties and in vitro biological performance of amorphous diamond-like carbon-coated polyurethane, *J. Biomed. Mater. Res.* 78B (2006) 230–236.
- [88] F.R. Marciano, L.F. Bonetti, N.S. Da-Silva, E.J. Corat, V.J. Trava-Airoldi, Diamond-like carbon films produced from high deposition rates exhibit antibacterial activity, *Synthetic Metals* 159 (2009) 2167–2169.
- [89] K. Myllymaa, J. Levon, V.-M. Tiainen, S. Myllymaa, A. Soininen, H. Korhonen, E. Kaivosoja, R. Lappalainen, Y.T. Konttinen, Formation and retention of staphylococcal biofilms on DLC and its hybrids compared to metals used as biomaterials, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 101 (2013) 290–297.
- [90] T. Kocourek, M. Jelinek, V. Vorlíček, J. Zemek, T. Janča, V. Žížková, J. Podlaha, C. Popov, DLC coating of textile blood vessels using PLD, *Appl. Phys. A* 93 (2008) 627–632.
- [91] C.V. Falub, U. Müller, G. Thorwarth, C. Affolter, P. Schmutz, M. Tobler, C. Voisard, R. Hauert, Adhesion Lifetime Prediction of Diamond-Like-Carbon (DLC) Coatings on Biomedical Implants, *European Cells and Materials* (2009) 12.
- [92] K. Ozeki, I. Nagashima, Y. Ohgoe, K.K. Hirakuri, H. Mukaibayashi, T. Masuzawa, Gas barrier properties of diamond-like carbon films coated on PTFE, *Applied Surface Science* 255 (2009) 7286–7290.
- [93] Gasab, M. T. I., M. Uchiyama, T. Nakatani, A. Valanezhad, I. Watanabe, H. Fujiyama, Advanced DLC coating technique on silicone-based tubular medical devices, *Surface and Coatings Technology* (2016).
- [94] M. Morshed, B. McNamara, D. Cameron, M. Hashmi, Stress and adhesion in DLC coatings on 316L stainless steel deposited by a neutral beam source, *Journal of Materials Processing Technology* 141 (2003) 127–131.
- [95] T. Oates, L. Ryves, F.A. Burgmann, B. Abendroth, M. Bilek, D.R. McKenzie, D.G. McCulloch, Ion implantation induced phase transformation in carbon and boron nitride thin films, *Diamond and Related Materials* 14 (2005) 1395–1401.
- [96] C. Uzan-Saguy, C. Cytermann, R. Brener, V. Richter, M. Shaanan, R. Kalish, Damage threshold for ion-beam induced graphitization of diamond, *Appl. Phys. Lett.* 67 (1995) 1194.
- [97] A. Grigonis, M. Šilinskas, V. Kopustinskas, V. Šablinskas, Influence of ion and electron irradiation on properties of diamond-like carbon films.



- [98] T. Aizawa, E. Iwamura, K. Itoh, Development of nano-columnar carbon coating for dry micro-stamping, *Surface and Coatings Technology* 202 (2007) 1177–1181.
- [99] M. Šniurevičiūtė, J. Laurikaitienė, D. Adlienė, L. Augulis, Ž. Rutkūnienė, A. Jotautis, Stress and strain in DLC films induced by electron bombardment, *Vacuum* 83 (2009) S159.
- [100] X. Liu, L. Wang, J. Pu, Q. Xue, Surface composition variation and high-vacuum performance of DLC/ILs solid–liquid lubricating coatings: Influence of space irradiation, *Applied Surface Science* 258 (2012) 8289–8297.
- [101] C. Chen, X. Fan, D. Diao, Low-energy electron irradiation induced top-surface nanocrystallization of amorphous carbon film, *Applied Surface Science* 384 (2016) 341–347.
- [102] S. Silva, S. Xu, B.K. Tay, H.S. Tan, H.-J. Scheibe, M. Chhowalla, W.I. Milne, The structure of tetrahedral amorphous carbon thin films, *Thin Solid Films* 290-291 (1996) 317–322.
- [103] F. Balon, V. Stolojan, S. Silva, M. Michalka, A. Kromka, Diamond-like carbon thin films for high-temperature applications prepared by filtered pulsed laser deposition, *Vacuum* 80 (2005) 163–167.
- [104] S. Schiller, U. Heisig, S. Panzer, *Elektronenstrahltechnologie*, 1st ed., Verl. Technik, Berlin, 1995.
- [105] D. Adlienė, J. Laurikaitienė, S. Tamulevičius, Modification of amorphous DLC films induced by MeV photon irradiation, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms* 266 (2008) 2788–2792.
- [106] D. Adlienė, J. Laurikaitienė, V. Kopustinskas, Š. Meškinis, V. Šablinskas, Radiation induced changes in amorphous hydrogenated DLC films, *Materials Science and Engineering: B* 152 (2008) 91–95.
- [107] S.N. Mikhailov, J. Weber, Y. Baer, Y. von Kaenel, J. Stiegler, E. Blank, W. Hänni, Damage and structural modification of CVD diamond films caused by  $\alpha$ -particles, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms* 118 (1996) 753–757.
- [108] N. Aloysius Sabu, K.P. Priyanka, S. Ganesh, T. Varghese, Modifications in the structural and optical properties of nanocrystalline CaWO<sub>4</sub> induced by 8MeV electron beam irradiation, *Radiation Physics and Chemistry* 123 (2016) 1–5.
- [109] J. Kim, J.-S. Kim, E.-G. Kang, H.W. Park, Surface modification of the metal plates using continuous electron beam process (CEBP), *Applied Surface Science* 311 (2014) 201–207.
- [110] V.V. Uglov, A.K. Kuleshov, E.A. Soldatenko, N.N. Koval, Y. Ivanov, A.D. Teresov, Structure, phase composition and mechanical properties of hard alloy treated by intense pulsed electron beams, *Surface and Coatings Technology* 206 (2012) 2972–2976.
- [111] M.C. Li, S.Z. Hao, H. Wen, R.F. Huang, Surface composite nanostructures of AZ91 magnesium alloy induced by high current pulsed electron beam treatment, *Applied Surface Science* 303 (2014) 350–353.
- [112] V. Rotshtein, Y. Ivanov, A. Markov, *Surface Treatment of Materials with Low-Energy, High-Current Electron Beams* 205–240.
- [113] N.N. Koval, Y.F. Ivanov, A.D. Teresov, Y.A. Denisova, E.A. Petrikova, Pulsed-Electron-Beam Processing of Materials for Medical Applications, *Russ Phys J* 56 (2014) 1150–1155.

- [114] J. Schönfelder, Untersuchungen zur Biofunktionalisierung von blutführenden flexiblen Polymerwerkstoffen mittels Elektronenstrahl. Diplomarbeit, Zittau, 2008.
- [115] P. Pokharel, W. Jian, S. Choi, Evaluation of fatigue crack behavior in electron beam irradiated polyethylene pipes, *Radiation Physics and Chemistry* 126 (2016) 103–110.
- [116] N. Misra, M. Rapolu, S. Venugopal Rao, L. Varshney, V. Kumar, Nonlinear optical studies of inorganic nanoparticles–polymer nanocomposite coatings fabricated by electron beam curing, *Optics & Laser Technology* 79 (2016) 24–31.
- [117] G. Gotzmann, Vergleichende Untersuchungen zum Sterilisationsprozess mittels Elektronenstrahl. Bachelorarbeit, Zittau, 2008.
- [118] F.-H. Rögner, C. Wetzel, O. Röder, G. Gotzmann, Society of Vacuum Coaters 52nd Annual Technical Conference proceedings, May 9-14, 2009, Santa Clara, CA, USA: Sterilization of surgical instruments using mini electron accelerators, Society of Vacuum Coaters, Albuquerque, NM, 2009.
- [119] J. Portillo, G. Gotzmann, J. Schönfelder, F. H. Rögner, S. Wronski, M. Müller, Y. Kohl, E. Gorjup, I. F. Chaberny, Low-Energy Electron Beam Sterilization for Medical Technical Applications, SVC Society of Vacuum Coaters, Technical Conference 2017 Proceedings (2017).
- [120] J. Melke, Entwicklung eines mikrobiologischen Testregimes für den Sterilitätsnachweis an verpackten Implantaten. Bachelorarbeit, Zittau, 2010.
- [121] C. Drewniok, Begleitende mikrobiologische Untersuchungen für den Sterilitätsnachweis an einem neu zu entwickelndem Mini-Sterilisator. Bachelorarbeit, Zittau, 2012.
- [122] A. Dannoux, S. Esnouf, J. Begue, B. Amekraz, C. Moulin, Degradation kinetics of poly(ether-urethane) Estane® induced by electron irradiation, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms* 236 (2005) 488–494.
- [123] A.A. El-Saftawy, A. Elfalaky, M.S. Ragheb, S.G. Zakhary, Electron beam induced surface modifications of PET film, *Radiation Physics and Chemistry* 102 (2014) 96–102.
- [124] Haryanto, D. Singh, S.S. Han, J.H. Son, S.C. Kim, Poly(ethylene glycol) dicarboxylate/poly(ethylene oxide) hydrogel film co-crosslinked by electron beam irradiation as an anti-adhesion barrier, *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications* 46 (2015) 195–201.
- [125] S.-Y. Lee, T. Kamarul, N-O, carboxymethyl chitosan enhanced scaffold porosity and biocompatibility under e-beam irradiation at 50 kGy, *International journal of biological macromolecules* 64 (2014) 115–122.
- [126] J. Dipl. Ing. Schönfelder, A. Deußen, R. Prof. dr. rer. medic. Funk, C. Wetzel, Elektronensterilisation von Gewebe für die Transplantationsmedizin, Xanten, 2014.
- [127] B. Alberts, J. Wilson, T. Hunt, *Molecular biology of the cell*, 5th ed., Garland Science, New York, 2008.
- [128] C.J. Wilson, R.E. Clegg, D.I. Leavesley, M.J. Percy, Mediation of biomaterial-cell interactions by adsorbed proteins: a review, *Tissue engineering* 11 (2005) 1–18.
- [129] C.H. Bamford, S.L. Cooper, T. Tsurutta, *The Vroman effect: Festschrift in honor of the 75th birthday of Dr. Leo Vroman*, VSP, Utrecht, the Netherlands, 1992.
- [130] R. Schmidt, *Werkstoffverhalten in biologischen Systemen: Grundlagen, Anwendungen, Schädigungsmechanismen, Werkstoffprüfung ; mit 158 Tabellen*, 2nd ed., Springer, Berlin, Heidelberg, New York, Barcelona, Hongkong, London, Mailand, Paris, Singapur, Tokio, 1999.

- [131] L. Bacakova, E. Filova, M. Parizek, T. Ruml, V. Svorcik, Modulation of cell adhesion, proliferation and differentiation on materials designed for body implants, *Biotechnology advances* 29 (2011) 739–767.
- [132] S. Guo, X. Zhu, X.J. Loh, Controlling cell adhesion using layer-by-layer approaches for biomedical applications, *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications* 70 (2017) 1163–1175.
- [133] F.R. Baxter, C.R. Bowen, I.G. Turner, Dent, A C E, Electrically active bioceramics: a review of interfacial responses, 2010.
- [134] P. Aliuos, A. Sen, U. Reich, W. Dempwolf, A. Warnecke, C. Hadler, T. Lenarz, H. Menzel, G. Reuter, Inhibition of fibroblast adhesion by covalently immobilized protein repellent polymer coatings studied by single cell force spectroscopy, *Journal of biomedical materials research. Part A* 102 (2014) 117–127.
- [135] T.E. Benavidez, D. Torrente, M. Marucho, C.D. Garcia, Adsorption of soft and hard proteins onto OTCEs under the influence of an external electric field, *Langmuir the ACS journal of surfaces and colloids* 31 (2015) 2455–2462.
- [136] K. Nakanishi, T. Sakiyama, K. Imamura, On the adsorption of proteins on solid surfaces, a common but very complicated phenomenon, *Journal of Bioscience and Bioengineering* 91 (2001) 233–244.
- [137] E.A. Vogler, Protein adsorption in three dimensions, *Biomaterials* 33 (2012) 1201–1237.
- [138] M.S. Lord, M. Foss, F. Besenbacher, Influence of nanoscale surface topography on protein adsorption and cellular response, *Nano Today* 5 (2010) 66–78.
- [139] K. Cai, J. Bossert, K.D. Jandt, Does the nanometre scale topography of titanium influence protein adsorption and cell proliferation?, *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces* 49 (2006) 136–144.
- [140] K. Rechendorff, M.B. Hovgaard, M. Foss, V.P. Zhdanov, F. Besenbacher, Enhancement of protein adsorption induced by surface roughness, *Langmuir the ACS journal of surfaces and colloids* 22 (2006) 10885–10888.
- [141] den Braber, E. T., de Ruijter, J. E., L.A. Ginsel, von Recum, A. F., J.A. Jansen, Orientation of ECM protein deposition, fibroblast cytoskeleton, and attachment complex components on silicone microgrooved surfaces, *J. Biomed. Mater. Res.* 40 (1998) 291–300.
- [142] W.-H. Lee, C.-Y. Loo, R. Rohanizadeh, A review of chemical surface modification of bioceramics: effects on protein adsorption and cellular response, *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces* 122 (2014) 823–834.
- [143] M. Arnold, E.A. Cavalcanti-Adam, R. Glass, J. Blümmel, W. Eck, M. Kantelehner, H. Kessler, J.P. Spatz, Activation of integrin function by nanopatterned adhesive interfaces, *Chemphyschem a European journal of chemical physics and physical chemistry* 5 (2004) 383–388.
- [144] Y. Dori, H. Bianco-Peled, S.K. Satija, G.B. Fields, J.B. McCarthy, M. Tirrell, Ligand accessibility as means to control cell response to bioactive bilayer membranes, *Journal of Biomedical Materials Research* 50 (2000) 75–81.
- [145] E. Ruoslahti, RGD and other recognition sequences for integrins, *Annual review of cell and developmental biology* 12 (1996) 697–715.
- [146] R. Neumeier, Zell-Adhäsion und Wachstumskontrolle, *Biologie in unserer Zeit* 13 (1983) 33–38.

- [147] S. Schmitz, *Der Experimentator: Zellkultur*, 2nd ed., Spektrum, Akad. Verl., Heidelberg, 2009.
- [148] Y. Yamada, H.K. Kleinman, Functional domains of cell adhesion molecules, *Current Opinion in Cell Biology* 4 (1992) 819–823.
- [149] K. Okamoto, T. Matsuura, R. Hosokawa, Y. Akagawa, RGD Peptides Regulate the Specific Adhesion Scheme of osteoblasts to Hydroxyapatite but not to Titanium // RGD Peptides Regulate the Specific Adhesion Scheme of Osteoblasts to Hydroxyapatite but not to Titanium, *Journal of Dental Research* 77 (1998) 481–487.
- [150] E. de Beus, K. Jacobson, Integrin involvement in keratocyte locomotion, *Cell Motil. Cytoskeleton* 41 (1998) 126–137.
- [151] J. Grossmann, Molecular mechanisms of “detachment-induced apoptosis—Anoikis”, *APOPTOSIS* 7 (2002) 247–260.
- [152] B. Kasemo, Biological surface science, *Surface Science* 500 (2002) 656–677.
- [153] Statistisches Bundesamt, *Fallpauschalenbezogene Krankenhausstatistik (DRG-Statistik) Operationen und Prozeduren der vollstationären Patientinnen und Patienten in Krankenhäusern - Ausführliche Darstellung 2012, 2013*.
- [154] M. Rabenberg, *Arthrose*, Robert-Koch-Institut, Berlin, 2013.
- [155] S. Reuter, B. Weßkamp, R. Büscher, A. Fischer, B. Barden, F. Löer, V. Buck, Correlation of structural properties of commercial DLC-coatings to their tribological performance in biomedical applications, *Wear* 261 (2006) 419–425.
- [156] R. Hauert, G. Thorwarth, U. Müller, M. Stiefel, C.V. Falub, K. Thorwarth, T.J. Joyce, Analysis of the in-vivo failure of the adhesive interlayer for a DLC coated articulating metatarsophalangeal joint, *Diamond and Related Materials* 25 (2012) 34–39.
- [157] M. Amaral, M.M. Maru, S.P. Rodrigues, C.P. Gouvêa, R.M. Trommer, F.J. Oliveira, C.A. Achete, R.F. Silva, Extremely low wear rates in hip joint bearings coated with nanocrystalline diamond, *Tribology International* 89 (2015) 72–77.
- [158] M.M. Maru, M. Amaral, S.P. Rodrigues, R. Santos, C.P. Gouvea, B.S. Archanjo, R.M. Trommer, F.J. Oliveira, R.F. Silva, C.A. Achete, The High performance of nanocrystalline CVD diamond coated hip joints in wear simulator test, *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials* 49 (2015) 175–185.
- [159] B. Rahmati, A.A. Sarhan, W.J. Basirun, W. Abas, Ceramic tantalum oxide thin film coating to enhance the corrosion and wear characteristics of Ti6Al4V alloy, *Journal of Alloys and Compounds* 676 (2016) 369–376.
- [160] R.M. Trommer, M.M. Maru, W.L. Oliveira Filho, V. Nykanen, C.P. Gouvea, B.S. Archanjo, E.H. Martins Ferreira, R.F. Silva, C.A. Achete, Multi-Scale Evaluation of Wear in UHMWPE-Metal Hip Implants Tested in a hip Joint Simulator, *Biotribology* 4 (2015) 1–11.
- [161] D. de Villiers, A. Traynor, S.N. Collins, S. Banfield, J. Housden, J.C. Shelton, Chromium nitride coating for large diameter metal-on-polyethylene hip bearings under extreme adverse hip simulator conditions, *Wear* 328-329 (2015) 363–368.
- [162] W.-C. Witzleb, A. Knecht, T. Beichler, T. Köhler, K.-P. Günther, Hüftgelenk-Oberflächenersatzendoprothesen, *Der Orthopäde* 33 (2004) 1236–1242.
- [163] G. Yamako, E. Chosa, K. Totoribe, S. Hanada, N. Masahashi, N. Yamada, E. Itoi, In-vitro biomechanical evaluation of stress shielding and initial stability of a low-modulus hip stem made of  $\beta$  type Ti-33.6Nb-4Sn alloy, *Medical engineering & physics* 36 (2014) 1665–1671.

- [164] L. El Medawar, P. Rocher, J.-C. Hornez, M. Traisnel, J. Breme, H. Hildebrand, Electrochemical and cytocompatibility assessment of NiTiNOL memory shape alloy for orthodontic use, *Biomolecular Engineering* 19 (2002) 153–160.
- [165] L. Gerke, Diamantähnliche Kohlenstoffschichten als dehnungstoleranter Verschleiß- und Korrosionsschutz für Formgedächtnislegierungen. Dissertation, Shaker, Aachen, 2012.
- [166] T. Duerig, A. Pelton, D. Stöckel, An overview of nitinol medical applications, *Materials Science and Engineering: A* 273-275 (1999) 149–160.
- [167] J. Mohd Jani, M. Leary, A. Subic, M.A. Gibson, A review of shape memory alloy research, applications and opportunities, *Materials & Design* 56 (2014) 1078–1113.
- [168] J.H. Sui, W. Cai, Effect of diamond-like carbon (DLC) on the properties of the NiTi alloys, *Diamond and Related Materials* 15 (2006) 1720–1726.
- [169] A. Nespoli, V. Dallolio, F. Stortiero, S. Besseghini, F. Passaretti, E. Villa, Design and thermo-mechanical analysis of a new NiTi shape memory alloy fixing clip, *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications* 37 (2014) 171–176.
- [170] A. Le Corre, L. Ardouin, T. Loubersac, E. Gaisne, P. Bellemère, Retrospective study of two fixation methods for 4-corner fusion: Shape-memory staple vs. dorsal circular plate, *Chirurgie de la main* 34 (2015) 300–306.
- [171] P. Aliuos, Introduction to the Nano World of Cochlear Implant (CI) Surfaces, Hannover, 2012.
- [172] D.M. Saylor, L. Adidharma, J.W. Fisher, R.P. Brown, A biokinetic model for nickel released from cardiovascular devices, *Regulatory toxicology and pharmacology RTP* 80 (2016) 1–8.
- [173] F. Takeshita, H. Takata, Y. Ayukawa, T. Suetsugu, Histomorphometric analysis of the response of rat tibiae to shape memory alloy (nitinol), *Biomaterials* 18 (1997) 21–25.
- [174] A. Koller, G. Rubányi, L. Ligeti, A.G. Kovách, Effect of verapamil and phenoxybenzamine on nickel-induced coronary vasoconstriction in the anaesthetized dog, *Acta physiologica Academiae Scientiarum Hungaricae* 59 (1982) 287–290.
- [175] S.M. Toker, D. Canadinc, H.J. Maier, O. Birer, Evaluation of passive oxide layer formation-biocompatibility relationship in NiTi shape memory alloys: geometry and body location dependency, *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications* 36 (2014) 118–129.
- [176] C. Praisarnti, Chang, Jeffrey W W, Cheung, Gary S P, Electropolishing enhances the resistance of nickel-titanium rotary files to corrosion-fatigue failure in hypochlorite, *Journal of endodontics* 36 (2010) 1354–1357.
- [177] W. Simka, M. Kaczmarek, A. Baron-Wiecheć, G. Nawrat, J. Marciniak, J. Žak, Electropolishing and passivation of NiTi shape memory alloy, *Electrochimica Acta* 55 (2010) 2437–2441.
- [178] J.S. Covington, M.A. McBride, W.F. Slagle, A.L. Disney, Quantization of nickel and beryllium leakage from base metal casting alloys, *The Journal of Prosthetic Dentistry* 54 (1985) 127–136.
- [179] S. Kobayashi, Y. Ohgoe, K. Ozeki, K. Sato, T. Sumiya, K.K. Hirakuri, H. Aoki, Diamond-like carbon coatings on orthodontic archwires, *Diamond and Related Materials* 14 (2005) 1094–1097.
- [180] J.H. Sui, W. Cai, L.H. Liu, L.C. Zhao, Surface characteristics and electrochemical corrosion behavior of NiTi coated with diamond-like carbon, *Materials Science and Engineering: A* 438-440 (2006) 639–642.

- [181] R. Hang, S. Ma, P.K. Chu, Corrosion behavior of DLC-coated NiTi alloy in the presence of serum proteins, *Diamond and Related Materials* 19 (2010) 1230–1234.
- [182] J.H. Sui, Z.Y. Gao, W. Cai, Z.G. Zhang, Corrosion behavior of NiTi alloys coated with diamond-like carbon (DLC) fabricated by plasma immersion ion implantation and deposition, *Materials Science and Engineering: A* 452-453 (2007) 518–523.
- [183] M.I. Jamesh, P. Li, M.M. Bilek, R.L. Boxman, D.R. McKenzie, P.K. Chu, Evaluation of corrosion resistance and cytocompatibility of graded metal carbon film on Ti and NiTi prepared by hybrid cathodic arc/glow discharge plasma-assisted chemical vapor deposition, *Corrosion Science* 97 (2015) 126–138.
- [184] Y. Cheng, Y.F. Zheng, The corrosion behavior and hemocompatibility of TiNi alloys coated with DLC by plasma based ion implantation, *Surface and Coatings Technology* 200 (2006) 4543–4548.
- [185] A.C. Ferrari, S.E. Rodil, J. Robertson, W.I. Milne, Is stress necessary to stabilise sp<sup>3</sup> bonding in diamond-like carbon?, *Diamond and Related Materials* 11 (2002) 994–999.
- [186] T. Takeno, H. Shiota, T. Sugawara, H. Miki, T. Takagi, Highly adherent tungsten-containing diamond-like carbon (W-DLC) coating on a NiTi shape memory alloy under 10% tensile strain, *Diamond and Related Materials* 18 (2009) 403–406.
- [187] J. Sui, W. Cai, Mechanical properties and anti-corrosion behavior of the diamond-like carbon films, *Surface and Coatings Technology* 201 (2006) 1323–1327.
- [188] K. Naganuma, K. Mogi, H. Yamada, Group-delay measurement using the Fourier transform of an interferometric cross correlation generated by white light, *Opt. Lett.* 15 (1990) 393.
- [189] J. Beckmann, Untersuchung zur Elektronenstrahlmodifikation von DLC-Schichten und deren Auswirkung auf die Sterilisationsfestigkeit. Masterarbeit, Dresden, 2013.
- [190] A.C. Ferrari, J. Robertson, Interpretation of Raman spectra of disordered and amorphous carbon, *Phys. Rev. B* 61 (2000) 14095–14107.
- [191] A. Ferrari, J. Robertson, Resonant Raman spectroscopy of disordered, amorphous, and diamondlike carbon, *Phys. Rev. B* 64 (2001).
- [192] A.C. Ferrari, J. Robertson, Raman spectroscopy of amorphous, nanostructured, diamond-like carbon, and nanodiamond, *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* 362 (2004) 2477–2512.
- [193] M. Gradowski, A.C. Ferrari, R. Ohr, B. Jacoby, H. Hilgers, H.-H. Schneider, H. Adrian, Resonant Raman characterisation of ultra-thin nano-protective carbon layers for magnetic storage devices, *Surface and Coatings Technology* 174-175 (2003) 246–252.
- [194] D.K. Owens, R.C. Wendt, Estimation of the surface free energy of polymers, *Journal of Applied Polymer Science* (1969) 1741–1747.
- [195] L. Zamaï, B. Canonico, F. Luchetti, P. Ferri, E. Melloni, L. Guidotti, A. Cappellini, G. Cutroneo, M. Vitale, S. Papa, Supravital exposure to propidium iodide identifies apoptosis on adherent cells, *Cytometry* 44 (2001) 57–64.
- [196] Ralph-Christian Ohr, Analytische und funktionale Charakterisierung von ultradünnen kohlenstoffbasierten Schichten in der Magnetspeichertechnologie, 2003.
- [197] J. Zernik, K. Twarog, W.B. Upholt, Regulation of alkaline phosphatase and alpha<sub>2</sub>(I) procollagen synthesis during early intramembranous bone formation in the rat mandible, *Differentiation* 44 (1990) 207–215.
- [198] M. Lucassen, B. Sarkar, Nickel(II)-binding constituents of human blood serum, *Journal of toxicology and environmental health* 5 (1979) 897–905.

- [199] B. Marchon, Jing Gui, K. Grannen, G.C. Rauch, J.W. Ager, S. Silva, J. Robertson, Photoluminescence and Raman spectroscopy in hydrogenated carbon films, *IEEE Trans. Magn.* 33 (1997) 3148–3150.
- [200] C. Casiraghi, F. Piazza, A.C. Ferrari, D. Grambole, J. Robertson, Bonding in hydrogenated diamond-like carbon by Raman spectroscopy, *Diamond and Related Materials* 14 (2005) 1098–1102.
- [201] M.A. Herman, Physical principles of ultrahigh vacuum atomic layer epitaxy, *Applied Surface Science* 112 (1997) 1–11.
- [202] A. Müller, Untersuchung zur Mikrobewegung von dentalen Implantaten im spongiösen Knochenpräparat des Rindes unter horizontaler Belastung, Göttingen, 2010.
- [203] K. Vandamme, I. Naert, L. Geris, J. Vander Sloten, R. Puers, J. Duyck, The effect of micro-motion on the tissue response around immediately loaded roughened titanium implants in the rabbit, *European journal of oral sciences* 115 (2007) 21–29.
- [204] E.J. Evans, Cell damage in vitro following direct contact with fine particles of titanium, titanium alloy and cobalt-chrome-molybdenum alloy, *Biomaterials* 15 (1994) 713–717.
- [205] H.A. Santos, J. Riikonen, J. Salonen, E. Mäkilä, T. Heikkilä, T. Laaksonen, L. Peltonen, V.-P. Lehto, J. Hirvonen, In vitro cytotoxicity of porous silicon microparticles: effect of the particle concentration, surface chemistry and size, *Acta Biomaterialia* 6 (2010) 2721–2731.
- [206] M. Allen, F. Law, N. Rushton, The effects of diamond-like carbon coatings on macrophages, fibroblasts and osteoblast-like cells in vitro, *Clinical Materials* 17 (1994) 1–10.
- [207] J.C. Wataha, C.T. Hanks, R.G. Craig, Uptake of metal cations by fibroblasts in vitro, *Journal of Biomedical Materials Research* 27 (1993) 227–232.
- [208] M.-T. Tsai, Y.-Y. Chang, H.-L. Huang, Y.-C. Chen, S.-P. Wang, C.-H. Lai, Biological characteristics of human fetal skin fibroblasts and MG-63 human osteosarcoma cells on tantalum-doped carbon films, *Surface and Coatings Technology* 245 (2014) 16–21.
- [209] M. Ventre, C.F. Natale, C. Rianna, P.A. Netti, Topographic cell instructive patterns to control cell adhesion, polarization and migration, *Journal of the Royal Society, Interface / the Royal Society* 11 (2014) 20140687.
- [210] T. Iwamoto, Y. Hieda, Y. Kogai, Effect of hydroxyapatite surface morphology on cell adhesion, *Materials Science and Engineering: C* (2016) 1263–1267.
- [211] M. Motskin, D.M. Wright, K. Muller, N. Kyle, T.G. Gard, A.E. Porter, J.N. Skepper, Hydroxyapatite nano and microparticles: correlation of particle properties with cytotoxicity and biostability, *Biomaterials* 30 (2009) 3307–3317.
- [212] M.S. Arsham, M.J. Barch, H.J. Lawce, *The AGT cytogenetics laboratory manual*.
- [213] Li Bin, Feng Yi, Ding Ke-wang, Qian Gang, Zhang Xue-bin, Liu Yan-fang, Effect of electron beam irradiation on multi-walled carbon nanotubes, *Transactions of Nonferrous Metals Society of China* 24 (2014) 764–769.
- [214] A.A. El-Saftawy, A. Elfalaky, M.S. Ragheb, S.G. Zakhary, Electron beam induced surface modifications of PET film, *Radiation Physics and Chemistry* 102 (2014) 96–102.
- [215] R. Paul, S.N. Das, S. Dalui, R.N. Gayen, R.K. Roy, R. Bhar, A.K. Pal, Synthesis of DLC films with different sp<sup>2</sup>/sp<sup>3</sup> ratios and their hydrophobic behaviour, *J. Phys. D: Appl. Phys.* 41 (2008) 055309.
- [216] C. Popescu, G. Dorcioman, B. Bitu, C. Besleaga, I. Zgura, C. Himcinschi, A.C. Popescu, Fabrication of periodical surface structures by picosecond laser irradiation of

- carbon thin films: transformation of amorphous carbon in nanographite, *Applied Surface Science* (2016).
- [217] S. De, B.S. Satyanarayana, G. Sanjeev, K. Ramakrishna, K. Mohan Rao, M. Pattabi, Effect of electron irradiation on morphological, compositional and electrical properties of nanocluster carbon thin films grown using room temperature based cathodic arc process for large area microelectronics, *Microelectronics Reliability* 54 (2014) 2740–2746.
- [218] S. Praver, B. Ran, R. Kalish, C. Johnston, P. Chalker, S.J. Bull, A. McCabe, A.M. Jones, Radiation hardness of DLC films produced by ion-assisted deposition, *Diamond and Related Materials* 5 (1996) 405–409.
- [219] M.-S. Park, M.-J. Jung, Y.-S. Lee, Significant reduction in stabilization temperature and improved mechanical/electrical properties of pitch-based carbon fibers by electron beam irradiation, *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 37 (2016) 277–287.
- [220] T. Aizawa, E. Iwamura, T. Uematsu, Formation of nano-columnar amorphous carbon films via electron beam irradiation, *J Mater Sci* 43 (2008) 6159–6166.
- [221] C. Grupen, B.A. Shwartz, H. Spieler, Particle detectors, 2nd ed., Cambridge University Press, Cambridge, UK, New York, 2008.
- [222] S. Bachmann, M. Schulze, J. Morasch, S. Hesse, L. Hussein, L. Krell, J. Schnagl, R.W. Stark, S. Narayan, Aging of oxygen and hydrogen plasma discharge treated a-C:H and ta-C coatings, *Applied Surface Science* 371 (2016) 613–623.
- [223] D.Y. Yun, W.S. Choi, Y.S. Park, B. Hong, Effect of H<sub>2</sub> and O<sub>2</sub> plasma etching treatment on the surface of diamond-like carbon thin film, *Applied Surface Science* 254 (2008) 7925–7928.
- [224] N. de Geyter, R. Morent, C. Leys, Influence of ambient conditions on the ageing behaviour of plasma-treated PET surfaces, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms* 266 (2008) 3086–3090.
- [225] H. Zhang, Molecular signaling and genetic pathways of senescence: Its role in tumorigenesis and aging, *Journal of cellular physiology* 210 (2007) 567–574.
- [226] S. Goldstein, Replicative senescence: the human fibroblast comes of age: Vol. 249, Issue 4973, *Science* 249 (1990) 1129–1133.
- [227] P.C. Heinrich, I. Behrmann, S. Haan, H.M. Hermanns, G. Müller-Newen, F. Schaper, Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation, *The Biochemical journal* 374 (2003) 1–20.
- [228] M. Baggiolini, I. Clark-Lewis, Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine, *FEBS Letters* 307 (1992) 97–101.
- [229] D.P. Dowling, I.S. Miller, M. Ardhaoui, W.M. Gallagher, Effect of surface wettability and topography on the adhesion of osteosarcoma cells on plasma-modified polystyrene, *Journal of biomaterials applications* 26 (2011) 327–347.
- [230] Q. Wei, T. Becherer, S. Angioletti-Uberti, J. Dzubielia, C. Wischke, A.T. Neffe, A. Lendlein, M. Ballauff, R. Haag, Wechselwirkungen von Proteinen mit Polymerbeschichtungen und Biomaterialien, *Angew. Chem.* 126 (2014) 8138–8169.
- [231] T.T. Liao, T.F. Zhang, S.S. Li, Q.Y. Deng, B.J. Wu, Y.Z. Zhang, Y.J. Zhou, Y.B. Guo, Y.X. Leng, N. Huang, Biological responses of diamond-like carbon (DLC) films with different structures in biomedical application, *Materials Science and Engineering: C* 69 (2016) 751–759.
- [232] M.H. Ahmed, J.A. Byrne, Effect of surface structure and wettability of DLC and N-DLC thin films on adsorption of glycine, *Applied Surface Science* 258 (2012) 5166–5174.



- [233] M.H. Ahmed, J.A. Byrne, J. McLaughlin, A. Elhissi, W. Ahmed, Comparison between FTIR and XPS characterization of amino acid glycine adsorption onto diamond-like carbon (DLC) and silicon doped DLC, *Applied Surface Science* 273 (2013) 507–514.
- [234] Q. Luo, J.D. Andrade, Cooperative Adsorption of Proteins onto Hydroxyapatite, *Journal of Colloid and Interface Science* 200 (1998) 104–113.
- [235] M. Ferenčík, *Wörterbuch Allergologie und Immunologie: Fachbegriffe, Personen und klinische Daten von A-Z*, Springer, Wien, New York, 2004.
- [236] P. Tengvall, *How Surfaces Interact with the Biological Environment*.
- [237] G. Löffler, *Biochemie und Pathobiochemie: Mit 192 Tabellen ; [+ online specials]*, 8th ed., Springer, Heidelberg, 2007.
- [238] R. Messer, Effects of metallic ion toxicity on human gingival fibroblasts morphology, *Biomaterials* 20 (1999) 1647–1657.
- [239] L.L. Meisner, A.B. Markov, D.I. Proskurovsky, V.P. Rotshtein, G.E. Ozur, S.N. Meisner, E.V. Yakovlev, T.M. Poletika, S.L. Girsova, V.O. Semin, Effect of inclusions on cratering behavior in TiNi shape memory alloys irradiated with a low-energy, high-current electron beam, *Surface and Coatings Technology* 302 (2016) 495–506.
- [240] J. Wang, N. Huang, P. Yang, Y.X. Leng, H. Sun, Z.Y. Liu, P.K. Chu, The effects of amorphous carbon films deposited on polyethylene terephthalate on bacterial adhesion, *Biomaterials* 25 (2004) 3163–3170.
- [241] M. Kobayashi, A.A. Abdulmajeed, J. Moon, R. Punkkinen, J. Shimada, P.K. Vallittu, L.V. Lassila, Effect of UV on wettability and bacterial adhesion of TiO<sub>2</sub>-nanotubes, *Dental Materials* 30 (2014) e160–e161.
- [242] E.H. Abdulkareem, K. Memarzadeh, R.P. Allaker, J. Huang, J. Pratten, D. Spratt, Antibiofilm activity of zinc oxide and hydroxyapatite nanoparticles as dental implant coating materials, *Journal of dentistry* 43 (2015) 1462–1469.
- [243] J.W. Costerton (Ed.), *The Role of Biofilms in Device-Related Infections*, Springer, Berlin [u.a.], 2009.
- [244] V.M. Elinson, V.V. Sleptsov, A.N. Laymin, V.V. Potraysay, L.N. Kostuychenko, A.D. Moussina, Barrier properties of carbon films deposited on polymer-based devices in aggressive environments, *Diamond and Related Materials* 8 (1999) 2103–2109.