

Aus der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie
(Direktor: Prof. Dr. Dr. J. Wiltfang)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**In-vitro Untersuchung der Biokompatibilität neuartiger
Algenmembranen zur Versorgung knöcherner Defekte des
Mund-, Kiefer- und Gesichtsbereiches**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde der Zahnmedizin
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
Theresa Ariadne Leoni Kohlhaas
aus Bonn

Kiel 2022

1. Berichterstatter:	PD Dr. med. dent. Aydin Gülses
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Hans-Jürgen Wenz
Tag der mündlichen Prüfung:	03.07.2023
Zum Druck genehmigt:	Kiel, den 06.03.2023

gez. PD Dr. med. dent. Aydin Gülses
(Vorsitzender der Prüfungskommission)

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	III
Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	V
1 Einleitung	1
1.1 Einsatz von Membranen in der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie und Zahnmedizin	1
1.1.1 Einsatz in der Implantologie und bei Knochenaugmentationen	1
1.2 Anforderungen an Membranen	2
1.3 Membranarten	3
1.4 Algen.....	6
1.4.1 Einsatz von Algen	6
1.4.2 Potential von Algen	8
1.5 Fragestellung	9
2 Material und Methoden.....	10
2.1 Studiendesign	10
2.2 Verwendete Algenmembranen	10
2.3 Herstellung der Algenmembran	11
2.3.1 Herstellung des MAPs	11
2.3.2 Weiterverarbeitung des MAPs.....	11
2.4 Voruntersuchungen der Algenmembranen	12
2.5 Eluate.....	13
2.6 In-vitro-Untersuchungen zur Biokompatibilität	13
2.6.1 Verwendete Zellen	13
2.6.2 Zellkulturmedien	13
2.6.3 Anzucht der Zellen	14
2.6.4 Zellkulturanlage.....	15
2.7 WST-Test.....	18
2.8 MTT-Test.....	18
2.9 BrdU-Test.....	19
2.10 FDA/PI-Färbung	19
2.11 Rasterelektronenmikroskopie	20
2.12 Statistische Auswertung.....	21

3	Ergebnisse	22
3.1	Voruntersuchungen der Algenmembranen	22
3.1.1	Oberflächenbeschaffenheit	22
3.1.2	Kontaktwinkel bzw. Benetzungsverhalten	23
3.1.3	FT-IR-Spektroskopie	23
3.2	Biokompatibilität der Algenmembranen auf humane Zellen in-vitro	24
3.2.1	Fibroblasten	24
3.2.2	Osteosarkomazellen (SaOs-2)	28
3.2.3	Osteoblasten	32
4	Diskussion	37
4.1	Biokompatibilität der Algenmembranen auf humane Zellen in-vitro	37
4.1.1	Material und Methoden	37
4.1.2	Voruntersuchungen	40
4.1.3	Ergebnisse Biokompatibilität der Algenmembranen auf humane Zellen in-vitro	42
4.1.4	Zusammenfassung der Ergebnisse und Ausblick	45
5	Zusammenfassung	48
6	Literaturverzeichnis.....	VI
	Danksagung.....	XVIII
	Aus dieser Dissertation hervorgegangene Publikationen.....	XIX
	Eidesstattliche Versicherung	XX

Abkürzungsverzeichnis

cm-1	Wellenzahl
®	Registered
°C	Grad Celsius
3D	dreidimensional
Abb.	Abbildung
BMP	Bone morphogenetic protein
BrdU	5-bromo-2'-deoxyuridine
C	Kohlenstoff
DMEM	Dulbecoo's modified Eagle's minimum essential medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E./ml	Einheiten pro Milliliter
FDA	Fluorescein Diacetate
FT-IR	Fourier-Transform-Infrarot
GBR	Guided Bone Regeneration
GMA	Glycidylmethacrylat
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
GTR	Guided Tissue Regeneration
h	Stunde
H	Wasserstoff
HOB	Humane Osteoblasten
iCVD	Initiated chemical vapor deposition
KEM	Knochenersatzmaterial
KO	Negativkontrolle (Glas)
kV	Kilovolt
MAP	Marine Algae Powder/Algenpulver
mmol	Millimol
MPa	Megapascal
MSC	mesenchymale Stammzellen
MW	Mittelwert
N	Stickstoff
NAD(P)H	reduzierte Form des Nicotinamadenindinukleotid(phosphat)
nm	Nanometer
nmol	Nanomol
O	Sauerstoff
P	Phosphor

PBS	Phosphatpufferlösung
PCL	Polycaprolacton
PCL-g-MA	mit Maleinsäureanhydrid behandeltes PCL
PEG	Polyethylenglycol
PGA	Polyglycolid
PHA	Polyhydroxylalkanoate
PI	Propidium Iodide
PLA	Polylacpoltid
PTFE	Polytetrafluoroethylene
RM	Referenzmembran
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
S	Schwefel
s.	siehe
SaOs-2	Osteosarkomazellen
STABW	Standardabweichung
SVP	Sargassum vulgare
Tab.	Tabelle
TMAP	vernetztes MAP
x	mal
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1: Herstellungsprozess der Algenmembranen	12
Abbildung 2: Zellkulturanlage einer 96er Well-Mikrotiterplatte	16
Abbildung 3: Zellkulturanlage einer 24er Well-Platte	17
Abbildung 4: Zellkulturanlage der 8er Objektträger	17
Abbildung 5: Rasterelektronenmikroskop-Aufnahmen der Oberflächen (in 250x Vergrößerung)	22
Abbildung 6: Kontaktwinkel [in °] der einzelnen Algenmembranen	23
Abbildung 7: FT-IR-Spektroskopie	23
Abbildung 8: Zellaktivität der Fibroblasten im WST-Test	24
Abbildung 9: Zellaktivität der Fibroblasten im MTT-Test	25
Abbildung 10: Zellproliferation der Fibroblasten im BrdU-Test	26
Abbildung 11: Fluoreszenz-Färbung der Fibroblasten nach 72 h in 20-facher Vergrößerung	27
Abbildung 12: Rasterelektronenmikroskopie der Fibroblasten	27
Abbildung 13: Rasterelektronenmikroskopie der Fibroblasten	28
Abbildung 14: Rasterelektronenmikroskopie der Fibroblasten	28
Abbildung 15: Zellaktivität der SaOs-2 im WST-Test	29
Abbildung 16: Zellaktivität der SaOs-2 im MTT-Test	29
Abbildung 17: Zellproliferation der SaOs-2 im BrdU-Test	30
Abbildung 18: Fluoreszenz-Färbung der SaOs-2 in 20-facher Vergrößerung nach 72h	31
Abbildung 19: Rasterelektronenmikroskopie der SaOs-2	31
Abbildung 20: Rasterelektronenmikroskopie der SaOs-2	32
Abbildung 21: Rasterelektronenmikroskopie der SaOs-2	32
Abbildung 22: Zellaktivität der Osteoblasten im WST-Test	33
Abbildung 23: Zellaktivität der Osteoblasten im MTT-Test	34
Abbildung 24: Zellproliferation der Osteoblasten im BrdU-Test	34
Abbildung 25: Fluoreszenz-Färbung der Osteoblasten in 20-facher Vergrößerung	35
Abbildung 26: Rasterelektronenmikroskopie der Osteoblasten	36
Abbildung 27: Rasterelektronenmikroskopie der Osteoblasten	36
Abbildung 28: Rasterelektronenmikroskopie der Osteoblasten	36
 Tabelle 1: Vorteilhafte medizinische Eigenschaften, der in dieser Studie verwendeten Algenarten	 8
Tabelle 2: Zuordnung Membranen/Algenart sowie Klasse und Herkunft der Algen	10

1 Einleitung

1.1 Einsatz von Membranen in der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie und Zahnmedizin

Verschiedene Membranen werden bereits seit den 1980er Jahren in der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie und Zahnmedizin im operativen Bereich zur Versorgung knöcherner Defekte verwandt [1]. Membranen besitzen die Fähigkeit, Räume zu trennen sowie den Durchtritt bestimmter Stoffe zu filtern [2].

Guided Tissue Regeneration (GTR) und Guided Bone Regeneration (GBR) sind Verfahren, welche sich dies zunutze machen, indem mithilfe einer Membran ein schnelles Einwachsen von Bindegewebszellen, sogenannter Fibroblasten, in knöcherne Defekte verhindert wird. Somit ermöglichen sie die ungestörte Regeneration von Knochen (GBR) bzw. das Reattachement des parodontalen Ligaments (GTR) [1,3]. Diese durch eine Membran ausgeübte Schutzfunktion ist erforderlich, da Knochenzellen, sogenannte Osteoblasten, vergleichsweise langsam Knochen regenerieren [4].

GTR und GBR finden heutzutage vor allem bei der Versorgung knöcherner Defekte in der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie und in der Parodontologie Anwendung [5].

In der Parodontologie können Membranen zur Deckung vertikaler Defekte oder freiliegender Furkationen herangezogen werden [1,6].

In der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie stellen Traumata, Tumor-Operationen, angeborene Fehlbildungen [7] sowie die Implantologie und Knochenaugmentationen eine mögliche Indikation für den Einsatz von Membranen dar [5].

Auch das Gebiet der mukogingivalen Chirurgie profitiert von Membranen, welche bei der Deckung von Weichgewebsdefekten, wie Rezessionen, genutzt werden und eine Alternative zum freien Schleimhauttransplantat bilden [8].

1.1.1 Einsatz in der Implantologie und bei Knochenaugmentationen

Bei Knochenaugmentation findet zumeist eine Kombination eines Knochenersatzmaterials (KEM) mit einer Membran statt. Ziel einer Knochenaugmentation ist es, einem Knochenverlust entgegenzuwirken bzw. Knochen neu aufzubauen, um anschließend zum Beispiel zu implantieren [9]. Es werden verschiedene Arten von Knochenaugmentationen unterschieden: Der Sinus Lift, die Socket Preservation sowie die horizontale und vertikale Kieferkammvergrößerung.

Beim Sinus Lift wird im Oberkiefer durch Anheben der Schneider'schen Membran und Einbringen eines Knochenersatzmaterials in die Kieferhöhle die Retentionshöhe für die Implantatintegration vergrößert [10]. Die Socket Preservation umfasst die operative Behandlung bzw. Versorgung von Extraktionsalveolen bei der Knochenersatzmaterial in Verbindung mit einer Membran eingebracht werden kann [11]. Alternativ kann auch nur eine Membran verwendet werden, die primär als eine Barriere für schnell einwachsende Zellen dient [12].

Gerade bei der Versorgung von *critical size defects* ist der Einsatz von Membranen essentiell [13]. *Critical size defects* beschreiben den geringstmöglichen Defekt, bei denen keine spontane Knochenheilung ohne Knochenersatzmaterial oder Membran zu erwarten ist [14].

Auch bei Patienten mit Periimplantitis ist die Verwendung von Membranen in Kombination mit einem Knochenersatzmaterial, vorzugsweise mit autologem Knochen [15], im Vergleich zu einem alleinigen KEM-Einsatz erfolgreicher [16,17].

Knochenaugmentationen und Implantatinserktionen können sowohl gleichzeitig als auch zweizeitig erfolgen. Beim zweizeitigen Verfahren findet zunächst die Knochenaugmentation statt und anschließend nach Ausheilung des Operationsgebietes, in einem zweiten Eingriff, die Implantatsetzung. Auch beim gleichzeitigen Verfahren mit direkter Implantatversorgung können Membranen als Barriere über dem Implantat positioniert werden und somit die Knochenregeneration in der Einheilphase unterstützen [18,19].

1.2 Anforderungen an Membranen

Im Jahr 1993 skizzierte Scantlebury fünf essentielle Kriterien für das Design von GTR-Membranen. Die Membranen sollten eine Barriere- und eine Platzhalterfunktion aufweisen, biokompatibel und benutzerfreundlich sein sowie die Gewebeintegration unterstützen [20]. Diese und weitere Kriterien haben bis heute Gültigkeit.

Die Barrierefunktion beschreibt die primäre Aufgabe von Membranen, der Bildung einer Barriere zum Schutz vor schnell einwachsenden Fibroblasten [21]. Die Platzhalterfunktion soll verhindern, dass eine Zerstörung des Blutkoagulums durch Aufklappen oder Eindrücken der Wunde stattfindet [22], da das Blutkoagulum eine Schutzfunktion gegenüber dem entblößten Gewebe ausübt und als provisorische Matrix für die Zellmigration dient [23].

Auch gegebenenfalls vorhandenes Knochenersatzmaterial sollte in einer definitiven Position fixiert werden können [24]. Dies ist beispielsweise bei horizontalen und vertikalen Knochenaugmentationen von Bedeutung [25]. Darüber hinaus sollte auch die Membran selbst als Gerüst wirken, entlang dessen sich das Gewebewachstum und die Neoangiogenese, das

Einwachsen von Kapillaren, richten können [25]. Die Zelladhäsion kann hierbei durch eine geeignete Oberflächenbeschaffenheit der Membran unterstützt werden [26,27].

Entscheidend für den klinischen Erfolg ist neben der klinischen Anwendbarkeit, welche eng mit der Membrandicke und Sprödigkeit zusammenhängt, vor allem die Biokompatibilität [28]. Würde keine ausreichende Biokompatibilität vorliegen, käme es infolgedessen zu einer Entzündungsreaktion, welche ein Entfernen der Membran zur Folge hätte.

1.3 Membranarten

Heutzutage kommen je nach Indikation unterschiedliche Arten von Membranen zum Einsatz. Sie können in nicht resorbierbare und resorbierbare Membranen unterteilt werden.

Nicht resorbierbare Materialien sind zum Beispiel Titanmeshes, welche keine Membranen im eigentlichen Sinn sind, aber ebenfalls in der GBR verwendet werden können [28]. Sie weisen trotz des geringen Eigengewichts eine hohe mechanische Stabilität sowie eine gute Biokompatibilität auf [29]. Sie kommen vor allem bei horizontalen und vertikalen Knochenaugmentationen zum Einsatz [30], da sie in der Lage sind, auch größere zusammenhängende Defekte zuverlässig zu stabilisieren [31] und zugleich eine gute Handhabbarkeit aufweisen [32]. Von Nachteil erweist sich allerdings, dass Titanmeshes keine Barrierefunktion besitzen [28] und es somit zu einem unkontrollierbaren Durchtritt von Gewebe kommen kann.

Ebenfalls nicht resorbierbar sind sogenannte Teflon- bzw. Goretexmembranen, welche im Gegensatz zu den Titanmeshes eine Barrierefunktion aufweisen [33]. Sie besitzen eine hydrophobe Oberfläche, aufgrund derer sie nicht fest mit dem Weichgewebe verwachsen und somit durch spezielle Befestigungssysteme in Position gehalten werden müssen [25]. Von Vorteil erweist sich die hohe mechanische Stärke und einfache klinische Handhabung [34], von Nachteil, dass es bei Exposition der Membran zu Entzündungen kommen kann, die schlussendlich zu einer Entfernung der Membran und einer inadäquaten Knochenheilung führen können [33].

Um eine ausreichende Barrierefunktion und gleichzeitige mechanische Stabilität zu erreichen, existieren nicht resorbierbare titanverstärkte PTFE (Polytetrafluoroethylen) bzw. Teflon-Membranen [35]. Diese ermöglichen gerade im Frontzahnbereich eine gut vorhersagbare Knochenregeneration [36]. Aufgrund ihrer fehlenden Resorbierbarkeit müssen sowohl Titanmeshes als auch Teflon- bzw. Gore-tex® membranen in einem erneuten operativen Eingriff mit möglichen Komplikationen, vor allem Verletzungen des peri-membranösen

Gewebes, wieder entfernt werden [28]. Dadurch kommt es zu einem höheren Zeitaufwand, höheren Kosten und zu einer Erhöhung der Morbidität [28,34].

Im Gegensatz dazu bieten resorbierbare Membranen den Vorteil, keinen Zweiteingriff zur Entfernung zu benötigen [28]. Von Nachteil ist allerdings der nicht exakt vorhersagbare Abbau der Membranen, welcher durch gegebenenfalls entstehende Entzündungen begünstigt werden kann [37,38].

Häufig handelt es sich bei resorbierbaren Membranen um Kollagenmembranen, vor allem vom Kollagen Typ I und III [39]. Kollagen Typ I zeichnet sich unter anderem durch eine hohe mechanische Widerstandskraft und eine gute Biokompatibilität für die Verwendung als Membranmaterial aus [40]. Kollagenmembranen weisen eine gute Barrierefunktion gegen einwachsende Zellen auf, gleichzeitig ermöglichen sie eine suffiziente Nährstoffversorgung per Diffusion [41]. Des Weiteren bieten sie aufgrund ihrer Verformbarkeit nach Kontakt mit Flüssigkeiten eine unkomplizierte Handhabung [25]. Nach der Ausheilung von knöchernen Defekten lassen sich weniger Weichgewebsdehiszenzen im Vergleich zu anderen Membranarten feststellen [42]. Problematisch ist allerdings die geringe mechanische Stabilität, sodass diese Membranen nicht universal einsetzbar sind [38].

Bei der porcinen 3D-Kollagenmatrix-Membran Mucograft (Geistlich, Wolhusen, Schweiz) handelt es sich um eine Weiterentwicklung der konventionellen Kollagenmembran für die mukogingivale Chirurgie. Diese ermöglicht eine Behandlung von Rezessionen und dünnen Schleimhauttypen, unter Umgehung der Verwendung eines freien Schleimhauttransplantats. Dadurch wird die Gewebeentnahme am Gaumen vermieden, welches eine erniedrigte Operationszeit und einen erhöhten Patientenkomfort zur Folge hat [8,43]. Eine offene Einheilung unter antibiotischer Abschirmung wiesen in einer Studie von Tan et al. keine postoperativen Komplikationen auf [44]. Der zweilagige Aufbau der Membran unterstützt dies durch die kompakte Gestaltung der äußeren Schicht. Die innere Schicht hingegen zeichnet sich durch eine porösere Gestaltung aus, welche die Stabilisierung des Blutkoagulums, das Einwachsen von Zellen, und die frühzeitige Vaskularisierung begünstigt [8].

Kollagenmembranen sind vor allem porciner oder boviner Herkunft [45]. Sie werden durch im Gewebe vorhandene Kollagenasen zu Gelatine und anschließend mittels Gelantinasen und Peptidasen zu Aminosäuren abgebaut [22,46]. Die Verwendung tierischer Produkte kann jedoch bei Patienten aufgrund von religiösen oder weltlichen Wertvorstellungen [47] sowie ökologischen Aspekten zu einer Ablehnung führen. Darüber hinaus besteht die Möglichkeit der Übertragung von Erkrankungen durch infektiöse Eiweißpartikel, sogenannten Prionen, welche im Zusammenhang mit bestimmten Gehirnerkrankungen wie der Creutzfeld-Jakob-Erkrankung auftreten. Es sind wenige Erkrankungen im Zusammenhang mit medizinischen

Materialien bekannt, allerdings kann durch eine stetige Weiterentwicklung von zoologisch übertragbaren Erkrankungen eine Krankheitsübertragung nicht vollständig ausgeschlossen werden [48].

Als Alternative zu Kollagenmembranen tierischer Herkunft, besteht die Möglichkeit der Verwendung von Membranen synthetischer Herkunft. Diese bestehen zumeist aus aliphatischen Polyestern wie Polyglycolid (PGA), Polylactid (PLA), Polycaprolacton (PCL) oder Polyhydroxylalkanoate (PHA) sowie deren Kopolymeren [49,50]. Der Vorteil dieser liegt in ihrer vielfältigen Kombinierbarkeit, der guten Biokompatibilität, der guten Verarbeitbarkeit und dem kontrollierbaren Abbau [50]. Vor allem PLA, welches aus nachwachsenden Rohstoffen wie Mais und Reis hergestellt wird, bietet sich durch seine Biokompatibilität und passenden mechanischen Eigenschaften als Membranmaterial an. Aufgrund dieser Eigenschaften und der guten thermalen Verarbeitbarkeit findet PLA ebenfalls Anwendung in medizinischen Produkten wie Nahtmaterialen oder Klips. Außerhalb der Medizin wird PLA auch als Verpackungs- oder Filmmaterial verwendet [51].

Polylactide und Polyglycolide werden durch Hydrolyse der Esterverbindungen zu Milchsäure und Glycolsäure, welche dann in den Zitronensäurezyklus eingehen und zu Kohlenstoffdioxid und Wasser verstoffwechselt werden [46]. Hierbei kann es durch den zum Teil hohen Säuregehalt im Verlauf ihres Abbaus zu inflammatorischen Reaktionen kommen [49]. Diesem wird versucht durch die Kombination mit synthetischen oder natürlichen Polymeren entgegenzuwirken. Beim Abbau von Polycaprolactan, zum Beispiel, kommt es im Gegensatz zu PLA und PGA zu keiner Entstehung eines sauren Milieus, allerdings weist PCL eine sehr lange Resorptionszeit von ca. 2-3 Jahren auf [50]. Durch die Kombination mit natürlichen Polymeren konnten unter anderem die thermischen und mechanischen Eigenschaften des PLA verbessert werden. Dabei könnten auch Algen als natürliche Polymere eine potenzielle Rolle spielen [50,52].

Polyethylenglycol (PEG) ist ein weiteres resorbierbares Polymer, welches zurzeit Gegenstand der Forschung ist und in Form von PEG-Hydrogelen angewendet werden soll [53]. Diese fixieren bei Applikation das Knochenersatzmaterial durch Aushärten und ermöglichen eine regelgerechte Verknöcherung [5]. Ein Vorteil dieser Produkte ist die mögliche Integration von Medikamententrägern oder Wachstumsfaktoren in das Gel, wie zum Beispiel des Bone morphogenetic proteins (BMP), welches osteoinduktiv wirkt [54]. Von Nachteil erweist sich bei dieser Methode allerdings eine leicht gesteigerte inflammatorische Reaktion sowie eine erhöhte Dehiszenzneigung [5,55].

Aufgrund der vielfältigen Einsatzmöglichkeiten von Membranen werden fortlaufend neue Materialien zur Herstellung von Membranen untersucht. Vor allem phylogene Materialien,

wie zum Beispiel Algen, rücken aufgrund ihrer guten und umweltschonenden Reproduzierbarkeit im Vergleich zu tierischen Materialien, ihrer vielfältigen Einsetzbarkeit und ihrer Bioresorbierbarkeit in den Fokus [52].

1.4 Algen

Algen sind Photosynthese betreibende Organismen, die vor allem in aquatischen Lebensräumen und Feuchtgebieten vorkommen [56]. Sie enthalten Chlorophyll [57], welches die Produktion von Sauerstoff ermöglicht und sie zu einem der Hauptsauerstofflieferanten unseres Planeten macht [58]. Die dafür benötigten Substrate sind Sonnenenergie, Kohlenstoffdioxid, Wasser und Mineralien [59]. Bei der Photosynthese und den anschließenden Stoffwechselvorgängen entstehen organische Moleküle, wie Lipide und Fettsäuren, Proteine und Aminosäuren, Kohlenhydrate und Polysaccharide, Ballaststoffe, Mineralien, Pigmente und Vitamine [58,60,61]. Je nach Art sind Algen in der Lage, sowohl in Salzwasser als auch in Süßwasser zu überleben und sich extremen Umweltbedingungen des pH-Werts, der Temperatur, des osmotischen Drucks sowie der Abwesenheit von Sauerstoff zu widersetzen [56,62]. Algen können als Plankton, frei umher schwimmend, oder Benthos, festsitzend, auftreten [56,63].

Es werden Mikro- und Makroalgen unterschieden. Mikroalgen, zu dieser Gruppe gehören unter anderem die Cyanobakterien, welche auch als Blaualgen bezeichnet werden, sind Einzeller und nur mithilfe eines Mikroskops sichtbar. Beim Auftreten in größeren Gruppen können jedoch auch Mikroalgen mit dem bloßen Auge erkennbar sein [58,64,65]. Der Ausdruck Mikroalgen umfasst sowohl Eukaryoten, Organismen mit Zellkern und Kompartimentierung als auch Prokaryoten, Organismen ohne Zellkern [58]. Makroalgen sind ohne Mikroskop sichtbar, sie werden auch als Seegras bezeichnet [65]. Anhand ihrer Pigmente können sie grob in Braun- (Phaeophyta), Rot- (Rhodophyta) und Grünalgen (Chlorophyta) unterschieden werden [63].

1.4.1 Einsatz von Algen

Mikroalgen, wie Chlorella oder Spirulina, kommen sowohl in der menschlichen Nahrung als auch in der Tiernahrung, aufgrund ihres hohen Proteingehalts und hohen Nährstoffgehalts, als Nahrungsergänzungsmittel vor. In der Tiernahrung werden auch Makroalgen als Nahrungsergänzungsmittel verwendet. In der menschlichen Nahrung kommen Makroalgen, beispielsweise Porphyra in Form von Nori-Blättern im Sushi vor [57,62] und Undaria

pinnatifida, auch Wakame genannt [66], im Algensalat [67]. Überdies können aus Makroalgen Phykokolloide, gelbildende Polysaccharide, extrahiert werden [68,69]. Polysaccharide wiederum sind Kohlenhydrate bestehend aus mehr als zehn Monosacchariden [70], welchen antioxidative, antivirale, antiproliferative bzw. antitumorale, antihyperlipidämische, immunstimulierende und antikoagulierende bzw. heparinähnliche Wirkungen zugesprochen werden [71]. Agar, Carragene und Alginate repräsentieren die drei Haupt-Phykokolloide [68]. Sie finden unter anderem Anwendung als Gelier- oder Verdickungsmittel oder als Stabilisatoren, zum Beispiel in der Nahrungsmittelindustrie, in der Pharmaindustrie oder in der Forschung, wo sogenannte Agarplatten als Nährboden für Mikroorganismen unverzichtbar sind [62].

In der Pharmaindustrie werden Algen zur Produktion von Proteinen für den medizinischen Einsatz verwendet, dabei können zum Beispiel Antikörper gegen Herpes-Simplex-Viren gezüchtet werden [72]. Neben der Pharmaindustrie hat auch die Kosmetikindustrie ein Interesse an den Inhaltsstoffen der Algen. Enthaltene β -Carotinoide und Vitamine werden aufgrund ihrer antioxidativen Fähigkeiten für Anti-Aging-Produkte genutzt [56,73].

Weitere Verwendungsmöglichkeiten bestehen im Abwassermanagement [74], als Biodiesel [75], als Bioindikator [76], als Biodünger [77], als Dynamit aus Kieselgur und Nitroglycerin [78] und zur Herstellung feuerretardierender Textilien aus Alginsäure [79,80].

1.4.1.1 Einsatz von Algen in der (Zahn-)Medizin

In der Zahnmedizin finden Algen in Form des Abformmaterials Alginat® Anwendung, welches sich gut für Situationsabformungen und Gegenkiefermodelle eignet [81]. Alginat ist das Salz der Alginsäure und entstammt den Zellwänden der Braunalgen [82].

In der modernen Wundheilung kann Alginat bei nässenden Wunden angewendet werden, dabei kommt es zu einer die Wunde schützenden Gelbildung [83]. Auch als Bestandteil in Medikamenten gegen Sodbrennen kommt es zum Einsatz, da es durch die Bildung eines Gelschaums zum Schutz der Schleimhaut beiträgt [84].

In der Implantologie findet bereits seit Jahrzehnten das sogenannte Symbios Algipore®, ehemals Frios Algipore® (Dentsply Sirona Implants, Mannheim, Deutschland) Anwendung. Hierbei handelt es sich um ein Knochenersatzmaterial, welches zu annähernd 100 % aus hochporösem Hydroxylapatit besteht und durch hydrothermale Umwandlung aus der Rotalge *Corallina officinalis* gewonnen wurde [85,86].

Als Weiterentwicklung des seit 1988 genutzten Algiopores wurde das Symbios Biphassische Knochenersatzmaterial® (Fa. Dentsply Sirona Implants, Mannheim, Deutschland) vorgestellt, welches sich zu 20 % aus Hydroxylapatit und zu 80 % aus β -Trikalziumphosphat zusammensetzt. Das β -Trikalziumphosphat soll dabei im Vergleich zum ursprünglichen Produkt eine schnellere Resorption ermöglichen [87].

SIC nature graft® (SIC Invent AG, Basel, Schweiz) ist ein weiteres Knochenersatzmaterial phykogenen Ursprungs. Laut Herstellerangaben handelt es sich um ein Produkt auf Calcium-Phosphat-Basis, welches innerhalb von 24-36 Monaten vollständig umgebaut sein soll.

1.4.2 Potential von Algen

Algen werden zurzeit unter anderem auf ihre antioxidativen, antitumorösen, antibakteriellen, antimikrobiellen, antiviralen, antifungalen, antiallergischen, antikoagulierenden, immunstimulierenden Eigenschaften untersucht [60,67,71]. Dadurch zeichnet sich bereits eine potentielle Nutzung für die Medizin und Pharmaindustrie ab. Die vorteilhaften Eigenschaften, der in dieser Studie verwendeten Algen, finden sich beispielhaft in Tabelle (Tab.) 1.

Tabelle 1: Vorteilhafte medizinische Eigenschaften, der in dieser Studie verwendeten Algenarten

(Diese Tabelle erhebt keinen Anspruch auf Vollständigkeit) [88–104]

Algenart	Vorteilhafte medizinische Eigenschaften
Corallina elongata	Antibakteriell, Antiinflammatorisch, Antioxidativ
Galaxaura oblongata	Antikancerös, Antiödematös, Lunge-/Leberprotektiv
Cystoseira compressa	Antidiabetischer Effekt, Antiinflammatorisch, Antiödematös, Antioxidierend, Antiproliferativ gegen humane Tumorzellen, Gastroprotektiv, Moderat antimikrobiell, Non-toxisch
Sargassum vulgare	Antikoagulierend, Antithrombotisch, Antioxidativ, Antikarzinogen, Antiinflammatorisch, Antibakteriell, Antiviral, Hepato- und neuroprotektiv, Ggf. Aktivierung Immunsystem, Ggf. Anti-Alzheimer
Stypopodium schimperi	Potentiell antioxidativ

Ein weiterer Vorteil der Verwendung phykogener Materialien besteht darin, dass eine geringere Gefahr der Übertragung von Krankheiten im Gegensatz zu tierischen Materialien vorhanden ist [67,105]. Dies könnte einen Rückgang der industriellen Massentierhaltung begünstigen, einen positiven ökologischen Effekt haben und den Einsatz bei Patienten ermöglichen, die Materialien boviner oder porciner Herkunft ablehnen.

Dies sind hervorragende Voraussetzungen für eine potentielle Verwendung als Membranmaterial.

Es muss allerdings bedacht werden, dass die chemisch aktiven Metabolite der Algen, die wir zu nutzen gedenken, unter anderem zum Eigenschutz der Alge produziert wurden und auf andere Lebewesen toxisch wirken könnten [106].

Aufgrund dessen ist eine Untersuchung der Biokompatibilität von Algen bzw. extrahierten Algenextrakten gegenüber humanen Zellen essentiell.

1.5 Fragestellung

In dieser Studie wurden Algenmembranen, für den potentiellen Einsatz als Regenerationsmaterial von verloren gegangenem Knochen im Mund-, Kiefer- und Gesichtsbereich, aus Polylactid (PLA) und Algenpulver hergestellt und auf ihre Biokompatibilität untersucht. Daraus ergab sich folgende Fragestellung:

Weisen Algenmembranen eine ausreichende in-vitro Biokompatibilität für den medizinischen Einsatz im Vergleich zu einer Glaskontrolle und zu der Kollagenmembran BioGide® (Geistlich, Wohlhusen, Schweiz) auf?

Wie reagieren humane Fibroblasten, Osteoblasten und Osteosarkomazellen auf die Algenmembranen?

2 Material und Methoden

2.1 Studiendesign


In dieser Studie wurden fünf verschiedene Algenmembranen hinsichtlich ihrer Biokompatibilität gegenüber humanen Fibroblasten, Osteoblasten und Osteosarkomazellen getestet. Als Positivkontrolle bzw. Referenzmembran (RM) diente BioGide® (Fa. Geistlich, Wolhusen, Schweiz), als Negativkontrolle (KO) Cover slides aus Glas. Neben den Vitalitäts- und Proliferationstests WST, MTT und BrdU wurden FDA/PI-Färbungen und Rasterelektronenmikroskop-Aufnahmen angefertigt.

2.2 Verwendete Algenmembranen

Die für diese Arbeit zur Verfügung gestellten Algenmembranen stammen aus der Meereswissenschaftlichen und Technischen Fakultät der Iskenderun Technical University in Iskenderun/Hatay (Türkei) und wurden in Zusammenarbeit mit dem Institute for Materials Science der Fakultät für Ingenieurwissenschaften der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel untersucht. Folgende Algenarten fanden bei der Herstellung der Membranen Anwendung (siehe (s.) Tab. 2). Sie alle stammen aus Tiefen zwischen 0 - 40 m.

Tabelle 2: Zuordnung Membranen/Algenart sowie Klasse und Herkunft der Algen

[Algenabbildungen aus Sayin et al. [107]]

Material	Algenart	Beispielfotos	Klasse	Herkunft
Typ I	Corallina elongata		Rhodophyta (Rotalgen)	Aus der Nähe von Antalya (Türkei)
Typ II	Galaxaura oblongata			
Typ III	Cystoseira compressa		Phaeophyta (Braunalgen)	Aus der Nähe von Iskenderun (Türkei)
Typ IV	Sargassum vulgare			
Typ V	Stypopodium schimperi			

2.3 Herstellung der Algenmembran

Die Algenmembranen wurden aus einer Mischung aus Algenpulver (MAP) und Polylactid (PLA) hergestellt. Das Algenpulver machte dabei einen Anteil von 5-10% des Gesamtgemisches aus. Durch diese Mischung von PLA mit MAP weisen die Membranen gesteigerte mechanische und thermale Eigenschaften auf sowie eine bessere Zytokompatibilität im Gegensatz zu der alleinigen Anwendung von PLA [108–110].

Bei der Membranherstellung wurde auf eine möglichst identische Oberflächenstruktur geachtet, um ggf. auftretende Unterschiede auf die jeweilige Algenart zurückführen zu können.

2.3.1 Herstellung des MAPs

Die Algen wurden nach erfolgter Identifizierung für 72 h in destilliertes Wasser gelegt um wasserlösliche Komponenten zu entfernen. Nach anschließendem Filtern fand ein viermaliges Zermahlen der Algen in einer Mörsermühle (Mortar Grinder RM 200, Retsch, Haan, Deutschland) bei 300 rpm für 10 min statt. Nach 24 h Vakuumtrocknung bei 50 °C fand ein erneutes Zermahlen der Algen statt. Im Anschluss wurden die Algen, zunächst durch 200-Loch-Siebe und anschließend durch 400-Loch-Siebe geseiht. Hieraufhin wurde eine erneute Vakuumtrocknung bei 100 °C für 12 h vollzogen, sodass die MAP zuletzt eine absolute Feuchtigkeit von unter 3 % aufwiesen.

2.3.2 Weiterverarbeitung des MAPs

Die MAPs wurden mit Aceton gewaschen und anschließend für 24 h bei 80 °C im Ofen getrocknet. Im Anschluss wurden MAP und PLA in einem Mixer bei 150 °C und 50 rpm für 15 min vermischt. Konsekutiv wurden in einer heißen Presse bei 180 °C mit einem Druck von 8 MPa und über einen Zeitraum von 20 min dünne Platten geformt, welche im letzten Schritt in einem Ofen abgekühlt wurden (s. Abb. 1).

In Vorbereitung auf die Vitalitäts- & Proliferationstests wurden die Algenmembranen in ca. 1 cm x 1 cm große Stücke zerschnitten. Anschließend wurden die Membranstücke in 70%igen Alkohol über einen Zeitraum von 2,5 Tagen desinfiziert.

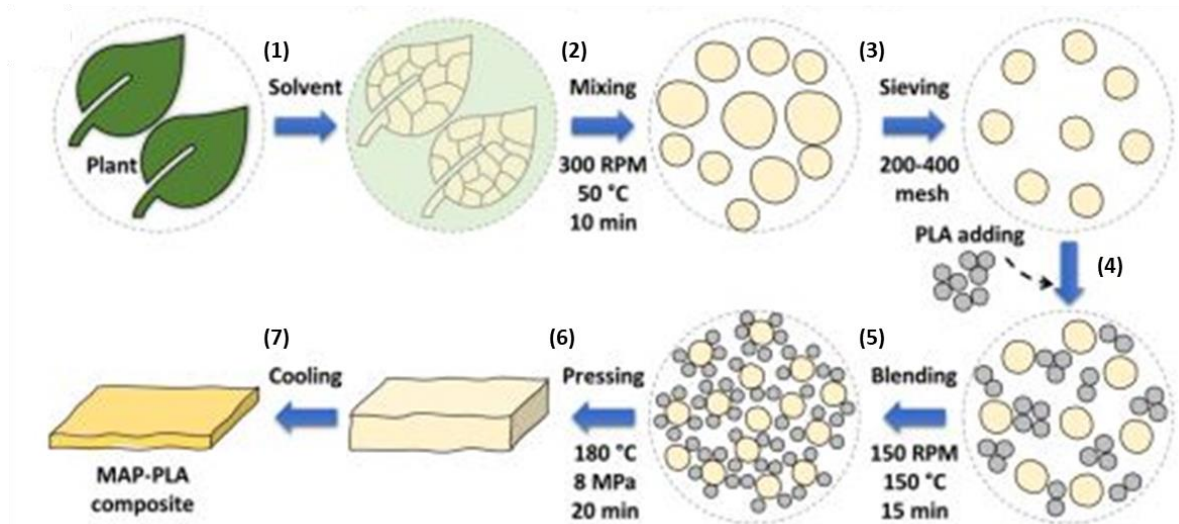


Abbildung 1: Herstellungsprozess der Algenmembranen

(1) Entfernung der wasserlöslichen Komponenten für 72h in destilliertem Wasser; (2) Filtern (nicht abgebildet) und anschließendes Zermahlen bei 50°C mit 300 rpm für 10 min; (3) Seihen der Algen durch 200- und 400-Loch-Siebe und anschließende Vakuumtrocknung (nicht aufgeführt); (4) Hinzufügen PLA; (5) Vermischen bei 150°C mit 150 rpm für 15 min; (6) Pressen der Membranen bei 180°C mit einem Druck von 8 MPa für 20 min; (7) Abkühlen im Ofen; [Abbildung (Abb.) aus Sayin et al. [107]]

2.4 Voruntersuchungen der Algenmembranen

Im Rahmen der Studie wurden Untersuchungen der Oberflächenbeschaffenheit, des Kontaktwinkels und eine FT-IR-Spektroskopie durch das Institute for Materials Science der Fakultät für Ingenieurwissenschaften der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel durchgeführt. Zur Beurteilung der Oberflächenbeschaffenheit der Algenmembranen wurden Rasterelektronenmikroskop-Aufnahmen angefertigt.

Das Benetzungsverhalten der Algenmembran wurde mithilfe des Kontaktwinkels bestimmt. Für die Kontaktwinkelbestimmung mit destilliertem Wasser erfolgte die Verwendung eines Kontaktwinkelmessgeräts. Hydrophilere Materialien zeigen einen niedrigeren Wert als hydrophobe Materialien, aufgrund ihres besseren Benetzungsverhaltens [111].

Die FT-IR-Spektroskopie, die in einem FT-IR-Spektrometer erfolgte, gibt Aufschluss über die chemische Zusammensetzung der Algenmembranen und ihre reaktiven Gruppen. Die chemische Zusammensetzung der Algenarten ist grundsätzlich artenspezifisch, kann jedoch durch Faktoren wie dem Klima beeinflusst werden [52].

2.5 Eluate

Vor der Durchführung der Vitalitäts- und Proliferationstests und der FDA-Färbung erfolgte die Herstellung von Eluaten. Eluate entstehen durch Herauslösen von adsorbierten Stoffen aus festen Adsorptionsmitteln. Zur Herstellung dieser wurden die desinfizierten Algen in 50 ml Röhrchen (Sarstedt, Inc. Newton, NC, USA) mit je 16 ml Nährmedium (s. Zellkulturmedien 2.3.2) für 6, 12, 24 und 72 Stunden im Kühlschrank gelagert. Zum jeweiligen Untersuchungszeitpunkt wurden 4 ml Eluat entnommen und in ein neues 50 ml Röhrchen pipettiert. Für jedes Material wurden drei Wiederholungen durchgeführt.

2.6 In-vitro-Untersuchungen zur Biokompatibilität

2.6.1 Verwendete Zellen

Bei den zur Prüfung der Biokompatibilität verwendeten Zellen handelt es sich um humane Fibroblasten, Osteosarkomazellen (SaOs-2) und Osteoblasten (HOB). Die Fibroblasten wurden aus der Gingiva gesunder Patienten entnommen, die sich in der Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie des Universitätsklinikums Schleswig-Holsteins in Kiel zum Beispiel einer Weisheitszahnextraktion unterzogen haben. Die Osteoblasten stammen aus dem Beckenkamm, ebenfalls gesunder Patienten, bei denen in der selbigen Klinik eine Knochenaugmentation erfolgte. Die Patienten wurden vor den Eingriffen aufgeklärt und willigten schriftlich in die Verwendung der Zellen für wissenschaftliche Zwecke ein. Die Entnahme und Einlagerung bei -70 °C fand durch eine Arbeitsgruppe um PD Dr. Aydin Gülses und Dr. Johannes Spille (Ethiknummer D640/20) statt. Die Osteosarkomazellen (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH Braunschweig, Deutschland) wurden kommerziell erworben.

2.6.2 Zellkulturmedien

Zellkulturmedium Fibroblasten

- 500 ml Dulbeco's modified Eagle's minimum essential medium (DMEM; PAA Laboratories, Österreich)
- 50 ml fetales Kälberserum (Biochrom GmbH, Berlin Deutschland)
- 10 ml L-Alanyl-Glutamin (Biochrom GmbH, Berlin Deutschland)
- 5 ml Pencillin-Streptomycin-Vitamin C-Gemisch

- 100 E./ml Penicillin (Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland)
- 100 µg/ml Streptomycin (Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland)
- 1 mmol/l Vitamin C (Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland)

Zellkulturmedium Osteoblasten und Osteosarkomazellen

- 500 ml Dulbeco's modified Eagle's minimum essential medium (DMEM; PAA Laboratories, Österreich)
- 50 ml fetales Kälberserum (Biochrom GmbH, Berlin Deutschland)
- 10 ml L-Alanyl-Glutamin (Biochrom GmbH, Berlin Deutschland)
- 5 ml Pencillin-Streptomycin-Vitamin C-Gemisch
 - 100 E./ml Penicillin (Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland)
 - 100 µg/ml Streptomycin (Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland)
 - 1 mmol/l Vitamin C (Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland)
- 1 ml Dexamthason (100 nmol/l SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg)
- 5 ml Amphothericin B 100X (EuroClone S.p.A., Pero, Italien)

2.6.3 Anzucht der Zellen

Das Auftauen der benötigten Zelllinien erfolgte eine Woche vor Versuchsbeginn, sodass ausreichend Zeit für die Proliferation der Zellen verblieb. Die Arbeiten wurden unter der Laminar Flow (Heraeus Instruments, Osterode, Deutschland) durchgeführt. Nach dem Transfer der aufgetauten Zellen in ein 50 ml Röhrchen (Sarstedt, Inc. Newton, NC, USA), wurden 10 ml Nährmedium hinzugegeben. Im Anschluss wurde das Einfriermedium durch Zentrifugieren (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) von den Zellen getrennt und konnte als Überstand abgesaugt (Absauger von Serres Oy, Kauhajoki, Finnland) werden. Die Zellen wurden erneut in sterilem 10 ml Medium suspendiert und auf Zellkulturflaschen (Tissue Culture Flask, Stand., Vent. Cap, Sarstedt, Inc. Newton, NC, USA) verteilt, welche im Brutschrank bei 37 °C in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre und 5 % Kohlenstoffdioxidgehalt gelagert wurden (HERAcell 240 CO2-Inkubator, Heraeus, Hanau, Deutschland). In den folgenden Tagen erfolgte eine tägliche Kontrolle der Zellen auf Kontaminationen. Des Weiteren fanden Medienwechsel am ersten und am vierten Tag nach dem Auftauen statt.

Zu Versuchsbeginn wurden die Zellen erneut unter dem Lichtmikroskop (Leitz, Wetzlar, Deutschland) auf mögliche Kontaminationen geprüft. Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen mit 5 - 6 ml Phosphatpufferlösung (PBS; PBS Dulbecco, Biochrom GmbH, Berlin,

Deutschland) pro Flasche zweimal gewaschen. Anschließend wurden die Zellkulturflaschen mit je 3 ml einer Trypsin-PBS-Lösung (1 : 10) für jeweils drei Minuten in den Brutschrank gestellt. Das Trypsin löst die Zellen von den Flascheninnenflächen [112]. In Folge dessen konnten die Zellen in ein 50 ml-Röhrchen überführt werden. Dieses enthielt bereits 10 ml Nährmedium, welches durch das enthaltene fetale Kälberserum die Reaktion des Trypsins stoppte [112]. Nach fünfminütiger Zentrifugation konnte der Überstand abgesaugt werden und 1 ml neues Medium hinzugegeben werden. Nach Verteilen der Zellen im Medium mithilfe einer 1000 µl Pipette (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) wurde die Zellzahl in einer Neubauer Zählkammer (Brand, Wertheim, Deutschland) ermittelt. Anschließend wurden die Zellen auf die Platten und Objektträger verteilt.

2.6.4 Zellkulturanlage

Alle Versuche wurden in dreifacher Ausführung durchgeführt und nach 6, 12, 24 und 72 h untersucht. Pro Zelllinie wurde ein Untersuchungszeitraum von zwei Wochen angesetzt. In der ersten Woche erfolgte die Herstellung der Eluate und Fixierung der 24-Well-Platten für die Rasterelektronenmikroskopie sowie die Durchführung der FDA/PI-Färbung, der WST-, MTT- und BrdU-Tests für die ersten beiden Zeitpunkte (6 h und 12 h). In der zweiten Woche wurden mit den bei 4 °C gelagerten Eluate der beiden anderen Zeitpunkte (24 h und 72 h) die FDA/PI-Färbung und die WST-, MTT- und BrdU-Tests durchgeführt.

96er Well-Mikrotiterplatten (Cell Culture Plate, Flat Base, Sarstedt, Inc. Newton, NC, USA)

Es wurden 24 Mikrotiterplatten pro Zelllinie bzw. 6 Mikrotiterplatten pro Zeitpunkt und Zelllinie für die WST-, MTT- und BrdU-Tests benötigt. In jede Vertiefung wurden 5×10^3 Zellen passagiert und 100 µl Nährmedium hinzugefügt. Für den Standard, welcher sich in den ersten beiden Spalten befindet (s. Abb.2), wurden in die Wells der obersten Zeilen (s. Beschriftung Std. 100%) ebenfalls 5×10^3 Zellen passagiert, die anschließend nach unten hin halbiert wurden. In Abbildung 2 findet sich exemplarisch die Aufteilung der Materialien, der Kontrolle und des Standards auf die 96-Well-Platte.

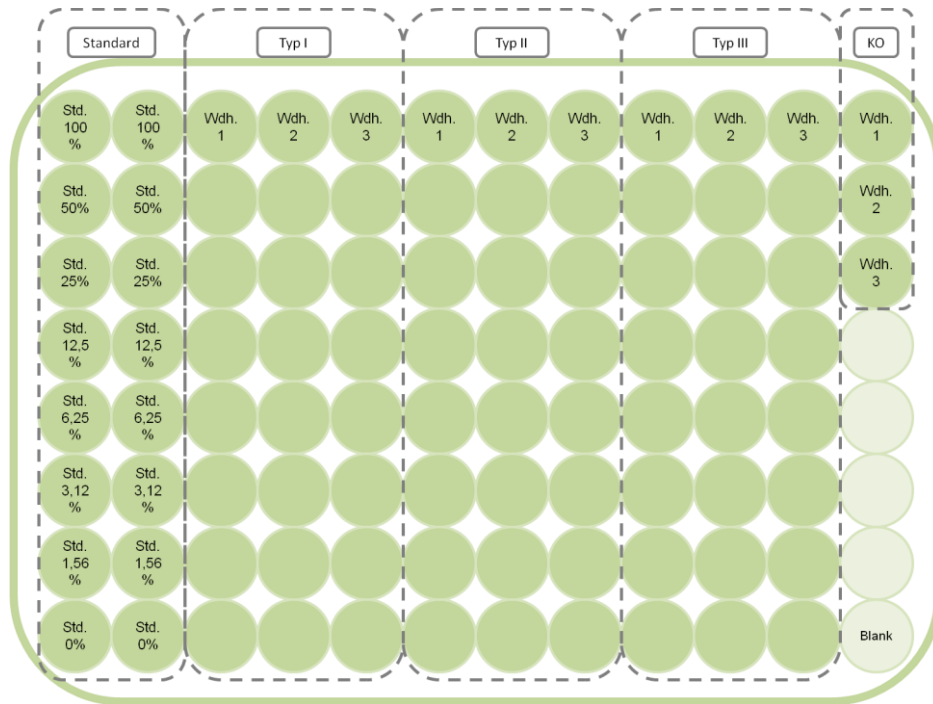


Abbildung 2: Zellkulturanlage einer 96er Well-Mikrotiterplatte

Exemplarisch wurde hier die Aufteilung des Standards, der Materialien (Typ 1, Typ 2, Typ 3), der Kontrollen und ihrer jeweiligen Wiederholungen in einer 96er Well-Mikrotiterplatte für die WST-, MTT- und BrdU-Tests dargestellt. Alle Materialien erhielten drei Wiederholungen. Die grünen Punkte stellen ein Well dar. Nicht grün ausgemalte Punkte wurden leer belassen. Die grüne durchgezogene Linie markiert die Ausbreitung der Platte, die grau gestrichelte Linie verdeutlicht die Aufteilung der unterschiedlichen Materialien.

24er Well-Platten (Cell Culture Plate, Flat Base, Sarstedt, Inc. Newton, NC, USA)

Es wurden vier Platten pro Zelllinie bzw. eine Platte pro Zeitpunkt und Zelllinie für die Rasterelektronenmikroskopie gebraucht. In jede Vertiefung wurden eine Algenprobe ca. 1 cm x 1 cm und 50 µl à 5×10^3 Zellen gegeben, welche nach einer Stunde Inkubation im Brutschrank mit ca. 1 ml Nährmedium aufgefüllt wurden. In Abbildung 3 findet sich exemplarisch die Aufteilung aller Materialien und Kontrollen auf eine 24-Well-Platte.



Abbildung 3: Zellkulturanlage einer 24er Well-Platte

Exemplarisch wurde hier die Aufteilung aller Materialien, der Kontrollen und ihrer jeweiligen Wiederholungen in einer 24er Well-Platte für die Rasterelektronenmikroskopie dargestellt. Alle Materialien erhielten drei Wiederholungen. Die grünen Punkte stellen ein Well dar. Nicht grün ausgemalte Punkte wurden leer belassen. Die grüne durchgezogene Linie markiert die Ausbreitung der Platte, die grau gestrichelte Linie verdeutlicht die Aufteilung der unterschiedlichen Materialien.

8er Objektträger (Lab-Tek® II Chamber Slide™ System, Nunc, Rochester, NY, USA)

Es wurden zwölf Objektträger pro Zelllinie bzw. drei Objektträger pro Zeitpunkt und Zelllinie für die FDA/PI-Färbung benötigt. In jedem Well fanden sich 1×10^4 Zellen, sowie 500 μ l Nährmedium. In Abbildung 4 findet sich exemplarisch die Aufteilung der Materialien und der Kontrolle auf einen 8er Objektträger.

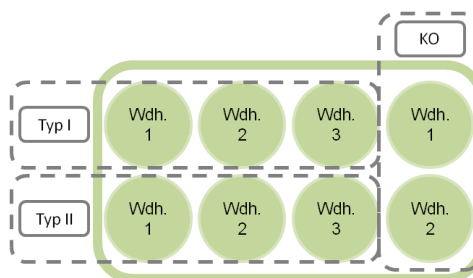


Abbildung 4: Zellkulturanlage der 8er Objektträger

Exemplarisch wurden hier die Aufteilung der Materialien (Typ 1, Typ 2), der Kontrolle und ihrer jeweiligen Wiederholungen auf einem 8er Objektträger für die FDA/PI-Färbung dargestellt. Die getesteten Materialien erhielten drei Wiederholungen, die Kontrollen erhielten zwei Wiederholungen. Die grünen Punkte stellen dabei ein Well dar. Die grüne durchgezogene Linie markiert die Ausbreitung des Objektträgers, die grau gestrichelte Linie verdeutlicht die Aufteilung der unterschiedlichen Materialien.

2.7 WST-Test

Der WST-Test trifft eine Aussage über die Anzahl der lebenden Zellen nach Zugabe des Eluats. Kommt das im oxidierten Zustand farblose Tetrazoliumsalz in Kontakt mit NAD(P)H, wird es im Zuge einer Redoxreaktion in den reduzierten Zustand überführt, wodurch gefärbtes Formazan entsteht. Dies dient als Indikator. Die Reaktion des Tetrazoliumsalzes mit NAD(P)H findet primär an der Zelloberfläche lebender Zelle statt, somit korreliert die Farbintensität mit der Anzahl der metabolisch aktiven Zellen. Zur Durchführung wurde das Cell-Proliferation Reagent WST-1 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) genutzt.

Nach Bestückung der 96-Well-Platten mit 5×10^3 Zellen pro Well und 24h-stündiger Inkubation im Brutschrank wurde das Nährmedium gegen das Eluat des jeweiligen Zeitpunktes ausgetauscht. Im Anschluss erfolgte eine zweitägige Inkubation der Zellen im Brutschrank. Vor Zugabe von 10 μ l WST-Reagenz pro Well wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Nach vier Stunden Lagerung der Platten im Brutschrank, konnten die Platten bei 460 nm im Photometer (SpectraMax plus, Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, CA, USA) abgelesen werden.

2.8 MTT-Test

Der MTT-Test ist ein Indikator für die Zellproliferation und Zytotoxizität. Hierbei wird gelbgefärbtes Tetrazoliumsalz durch Enzyme des endoplasmatischen Retikulums innerhalb der Zelle in violettes Formazan umgewandelt. Die entstandene Farbintensität spiegelt die Zellzahl wider. Es wurde das MTT Cell Proliferation Kit I (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) verwendet.

Die Zellen, 5×10^3 Zellen pro Well, wurden, bedeckt von Nährmedium, in 96-Well-Platten für 24h im Brutschrank inkubiert. Infolgedessen wurde das Nährmedium gegen das Eluat ausgetauscht und die Zellen wurden weitere zwei Tage im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden 10 μ l der MTT-Reagenz, ohne vorherigen Mediumwechsel, in jedes Well pipettiert und die Zellen wurden für weitere vier Stunden in den Brutschrank gestellt. Nach Ablauf der Zeit wurden 100 μ l Solubilization Solution dazu pipettiert. Die Platten wurden über Nacht im Brutschrank verwahrt und am nächsten Morgen bei 550 nm im Photometer abgelesen.

2.9 BrdU-Test

Beim BrdU-Test werden die Zellen, erneut 5×10^3 pro Well, mit einem Labeling Medium kultiviert, welches 5-Bromo-2'-Desoxyuridine (BrdU) enthält. BrdU ist ein Pyrimidin-Analogon und wird anstelle von Thymin während der DNA-Synthese in den DNA-Strang proliferierender Zellen eingebaut. Die erhaltene Färbung korreliert mit der Anzahl der Zellen, die BrdU in ihrer DNA besitzen und somit auch mit der Zellproliferation. Hierbei fand das BrdU Cell Proliferation ELISA Kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) Anwendung.

Auch beim BrdU-Test erfolgte zunächst eine 24h-stündige Inkubation der Zellen in den 96-Well-Platten und anschließend ein Wechsel des vorhandenen Nährmediums mit dem Eluat. Nach zweitägiger Inkubation fand ein Mediumwechsel statt. Daraufhin erfolgte die Zugabe von 10 µl BrdU labeling reagent pro Well, welches zuvor 1 : 100 mit sterilem Nährmedium verdünnt wurde. Die Zellen wurden für 24 h im Brutschrank inkubiert. Am Folgetag wurde das Nährmedium entfernt und die Zellen mit 200 µl Fix Denat pro Well für 30 Minuten bei Zimmertemperatur fixiert. Dabei wurden die Zellen fixiert und die DNA denaturiert. Währenddessen wurde die Stammlösung hergestellt. Dazu wurde das Anti BrdU-POD in 1,1 ml Aqua Dest gelöst, welches dann 1 : 100 mit der Antibody-Dilution-Solution verdünnt wurde. Dieser vorbereitete Antikörper wurde auf den Wells verteilt. Jedes Well erhielt dabei 100 µl. Der Antikörper konnte nun das BrdU in der DNA lokalisieren. Nach zwei weiteren Stunden Inkubation bei Raumtemperatur konnte der Antikörper entfernt werden. In der Zwischenzeit fand die Herstellung der Washing Solution durch Verdünnen von Washing solution mit Aqua Dest im Verhältnis 1 : 10 statt. Mit der hergestellten Washing Solution wurden die Zellen dreimal mit 200 µl pro Well gewaschen. In Folge dessen wurden in jedes Well 100 µl Substrat-Lösung zur Farbentwicklung pipettiert. Die Platten wurden bei Zimmertemperatur bis zu der erwarteten Farbentwicklung gelagert und dann mit 50 µl 1 Molarer Schwefelsäure (H_2SO_4) abgestoppt. Im Anschluss wurden die Platten bei 450 nm im Photometer abgelesen.

2.10 FDA/PI-Färbung

Die FDA/PI-Färbung wurde mithilfe zweier Vitalstoffe durchgeführt. Fluorescein Diacetate (FDA; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) färbt vitale Zellen, da es ein Substrat für auf der Zellmembran befindliche Esterasen ist. Diese spalten eine Acetat-Gruppe ab und erzeugen somit eine grün fluoreszierende Färbung. Propidium Iodide (PI; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) ist in der Lage die Zellmembran toter Zellen zu durchdringen und an die DNA oder RNA zu binden. Dadurch kommt es zu einer roten Färbung der betroffenen Zellen.

Als Vorbereitung auf dieses Testverfahren wurden zuvor bereits die Stamm- und Gebrauchslösungen hergestellt. Für die Stammlösung des Fluorescein Diacetate wurde 1 mg FDA mit 1 ml Aceton vermischt. Die Stammlösung des Propidium Iodides besteht aus 1 mg PI und 1 ml Aqua Dest. Zur Herstellung der Gebrauchslösungen wurden jeweils 500 µl PI-Stammlösung und 30 µl FDA-Stammlösung mit 10 ml PBS verdünnt.

1×10^4 Zellen pro Well wurden auf die 8er Objektträger aufgetragen, mit Nährmedium aufgefüllt und für 24 h im Brutschrank inkubiert. Anschließend erfolgte ein Wechsel des Mediums mit dem jeweiligen Eluat und eine erneute 48h-stündige Inkubation. Nach einmaligem Waschen mit PBS erfolgte die Färbung mit der FDA-Gebrauchslösung und eine 15-minütigen Lagerung im Brutschrank. Anschließend wurde die FDA-Färbung entfernt und die Zellen für zwei Minuten mit der PI-Gebrauchslösung im Dunkeln bei Raumtemperatur gefärbt. Daraufhin wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und bis zum Fotografieren im Dunkeln in PBS gelagert. Die Anregung erfolgte bei 488 nm unter blauem Licht (Argon Laser). Die grünen (FDA, 530 nm) und roten (PI, 620 nm) Fluoreszenzen wurden bei unterschiedlichen Wellenlängen fotografiert und konsekutiv digital zusammengefügt (Mikroskop Axioplan2/Digitalkamera AxioCam MRc5, ZEISS, Deutschland).

2.11 Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Die 24-Well-Platten wurden mit je drei Wiederholungen pro Algenmembran und Kontrolle bestückt. Anschließend wurden die Zellen auf die Objekte transferiert und für eine Stunde im Brutschrank inkubiert. Nach einer Stunde wurden die Wells mit je 1 ml Nährmedium aufgefüllt und die Platten bis zu ihrem jeweiligen Untersuchungszeitpunkt im Brutschrank gelagert.

Nach 6 h, 12 h, 24 h und 72 h wurde jeweils das Nährmedium abgesaugt, einmal mit PBS gewaschen und die Zellen in 3 % Glutaraldehyd in PBS fixiert. Bis zur Rasterelektronenmikroskopie wurden die in Parafilm (Pechiney Plastic Packaging, Menasha, WI, USA) eingewickelten Platten bei 4 °C gelagert.

Am Vortag der REM-Untersuchung wurde das 3%-Glutaraldehyd abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Daraufhin wurde eine aufsteigende Alkoholverdünnungsreihe (50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 96 %, 100 %) zur Dehydratation durchgeführt. Die Zellen hatten fünf Minuten Kontakt mit der jeweiligen Ethanol-Konzentration. Nach dem Kleben der Präparate auf die vorbereiteten Stiffteller wurde zur Trocknung der Präparate für eine Minute Hexamethyldisilazane (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) appliziert.

Über Nacht wurden die vorbereiteten Proben im Exikator gelagert und konnten anschließend mit einer Schichtstärke von 15 nm goldbedampft (SCD 500, Bal-Tec, Balzers, Lichtenstein) und unter dem REM (XL30CP, Philips Electron Optics GmbH, Kassel) bei einer Spannung von 10 kV untersucht werden.

2.12 Statistische Auswertung

Alle Experimente fanden in dreifacher Ausführung statt und wurden als Mittelwert (MW) und Standardabweichung (STABW) des Mittelwerts angegeben. Daten aus drei oder mehr Gruppen wurden mithilfe der einfaktoriellen Varianzanalyse und dem Dunnett's post hoc verglichen. Zur Bestimmung der Signifikanz wurde eine Bonferroni-Korrektur durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Voruntersuchungen der Algenmembranen

3.1.1 Oberflächenbeschaffenheit

Die untersuchten Algenmembranen wiesen eine sehr ähnliche Morphologie mit größeren Poren und kleineren Pin-Locks auf. Die Poren hatten eine Größe von 300 μm bis 750 μm . Die kleinen Pin-Locks warteten mit einer Größe zwischen 30 μm und 50 μm auf. Alle Algenmembranen zeigten eine typische Polymerstruktur [107], darüber hinaus waren sie allesamt flach und dünn. Beim Vergleich der Algenmembranen untereinander wiesen Typ I, II, III und V im Gegensatz zu Typ IV eine fast identische Oberflächenbeschaffenheit mit Löchern und sich gelegentlichen über die Membran spannenden Fasern auf (s. Abb. 5 (A)-(E)). Typ IV zeigt vornehmlich eine Oberfläche mit luftblasenähnlichen Strukturen (s. Abb 5 (D)). Die zweischichtige Referenzmembran zeigt im Gegensatz zu den Algenmembranen eine glatte Seite und eine Seite mit einer faserartigen Struktur [113], wie in Abbildung 5 (F) zu erkennen ist.

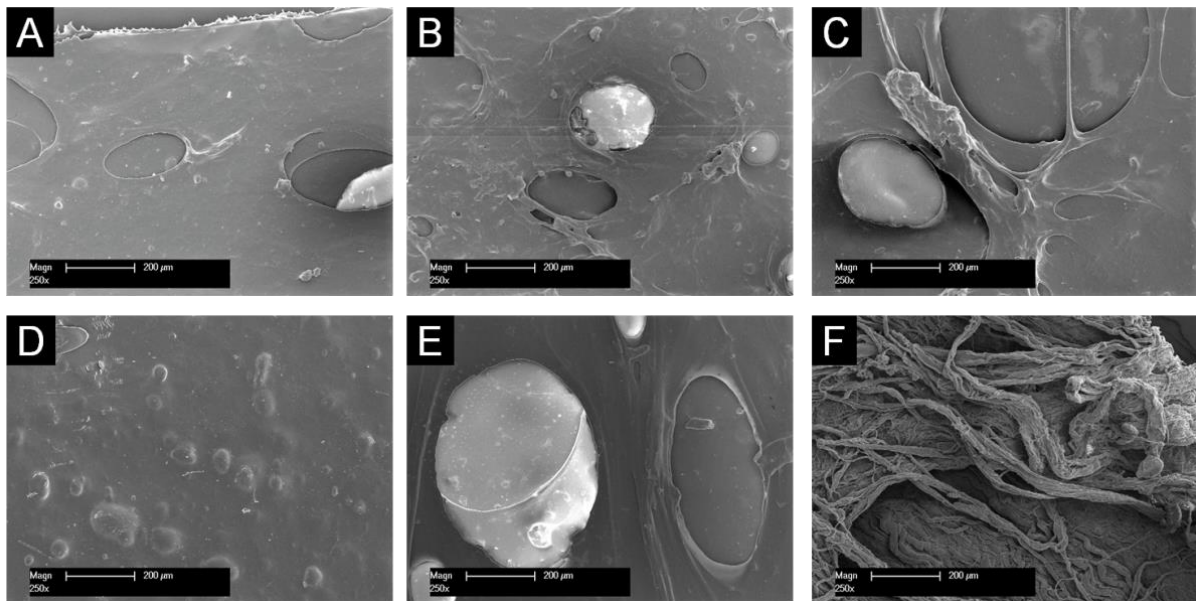


Abbildung 5: Rasterelektronenmikroskop-Aufnahmen der Oberflächen

250x Vergrößerung; (A) Typ I: löchrige Oberflächenbeschaffenheit mit vereinzelten Fasern; (B) Typ II: löchrige Oberflächenbeschaffenheit mit vermehrten Fasern und einzelnen Faser-Geflechten; (C) Typ III: löchrige Oberflächenbeschaffenheit mit vermehrten Fasern und einem einzelnen Faser-Geflecht; (D) Typ IV: Oberfläche mit luftblasenähnlichen Strukturen; (E) Typ V: löchrige Oberflächenbeschaffenheit mit vermehrten Fasern; (F) RM: Zweischichtige Referenzmembran, faserartige Seite abgebildet; Alle Algenmembranen (A)-(E) sind flach und dünn gestaltet.; (A)(B)(C) und (E) weisen eine fast identische Oberflächenbeschaffenheit auf.

3.1.2 Kontaktwinkel bzw. Benetzungsverhalten

Zur Beurteilung des Benetzungsverhaltens der Algenmembranen erfolgte die Bestimmung des Kontaktwinkels der Algenmembranen. Dabei zeigte Typ I mit 109,5 ° den höchsten Winkel und Typ III mit 77,3 ° den niedrigsten Winkel [107]. Die Einzelergebnisse können der folgenden Abbildung (s. Abb. 6) entnommen werden.

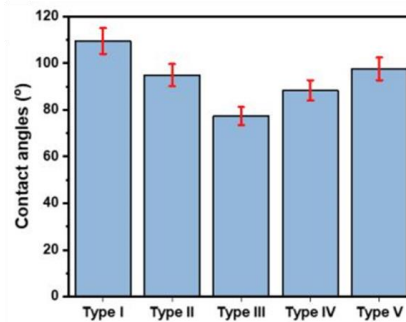


Abbildung 6: Kontaktwinkel [in °] der einzelnen Algenmembranen

Error von $\pm 5\%$; Typ I: 109,5°; Typ II: ca. 94,9°; Typ III: 77,3°; Typ IV: ca. 88,3°; Typ V: 97,6° [Abb. aus Sayin et al. [107]]

3.1.3 FT-IR-Spektroskopie

Zur Beurteilung der chemischen Zusammensetzung der unterschiedlichen Algentypen erfolgte die Durchführung einer FT-IR Analyse. Bei der Untersuchung traten mehrere Peaks auf, welche bei den unterschiedlichen Algen in unterschiedlichen Ausmaßen vorkamen (s. Tabelle aus Abb. 7). Abbildung 7 ermöglicht das Erkennen von Unterschieden zwischen den verschiedenen Algengattungen (Rot- und Braunalgen) sowie den einzelnen Algentypen [107].

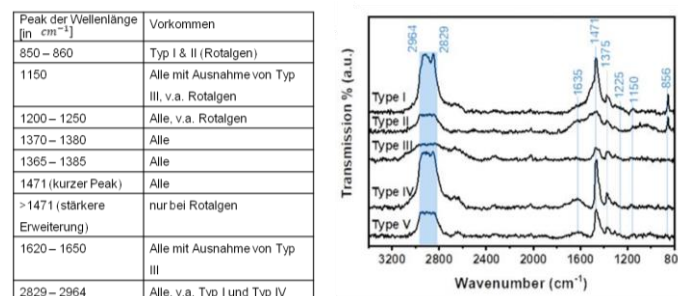


Abbildung 7: FT-IR-Spektroskopie

Erhöhung der Wellenlänge [in cm^{-1}] und das jeweilige Vorkommen bei den unterschiedlichen Algenmembranen (links); FT-IR Spektrum der unterschiedlichen Algenmembranen, Darstellung der Transmission [in %] in Abhängigkeit der Wellenlänge [in cm^{-1}] (rechts) [Abb. aus Sayin et al. [107]]

3.2 Biokompatibilität der Algenmembranen auf humane Zellen in-vitro

3.2.1 Fibroblasten

3.2.1.1 WST-, MTT- & BrdU-Test

Der WST-, MTT- und BrdU-Test sind Verfahren zur Bestimmung der Zellviabilität und Zellproliferation. Die Ergebnisse wurden als Zelldichte in Abhängigkeit zu der Zeit dargestellt.

Die Fibroblasten, die mit den Eluaten der Algenmembranen des Typs I, II, III und IV kombiniert worden waren, zeigten im WST-Test (s. Abb. 8) zu dem ersten Zeitpunkt im Vergleich zur Kontrolle leicht niedrigere Werte. Typ I ($p = 1,71E-10$), Typ II ($p = 6,08E-09$) und Typ III ($p = 0,0002$) wiesen bei 6 h signifikant niedrigere Werte als die Kontrolle auf. Die Referenzmembran und Typ V zeigten nicht-signifikant höhere Werte. Bei 12 h wiesen alle Membranen außer Typ V eine höhere Zelldichte als die Kontrolle auf. Typ I ($p = 8,17E-07$), Typ II ($p = 1,28E-05$) und Typ III ($p = 1,45E-09$) zeigten dabei einen signifikanten Unterschied zur Kontrolle. Ab 24 h erfolgte eine ähnlich schnelle Zellproliferation aller Gruppe mit Ausnahme der Referenzmembran, die dadurch einen signifikanten Unterschied zur Kontrolle aufwies ($p = 0,0002$). Nach 72 h wiesen die Referenzmembran ($p = 4,24E-05$) und zusätzlich Typ III ($p = 0,0011$) einen signifikant niedrigeren Wert als die Kontrolle auf. Über den Verlauf der Untersuchung zeigten jedoch alle Gruppen Werte oberhalb der Kontrolle.

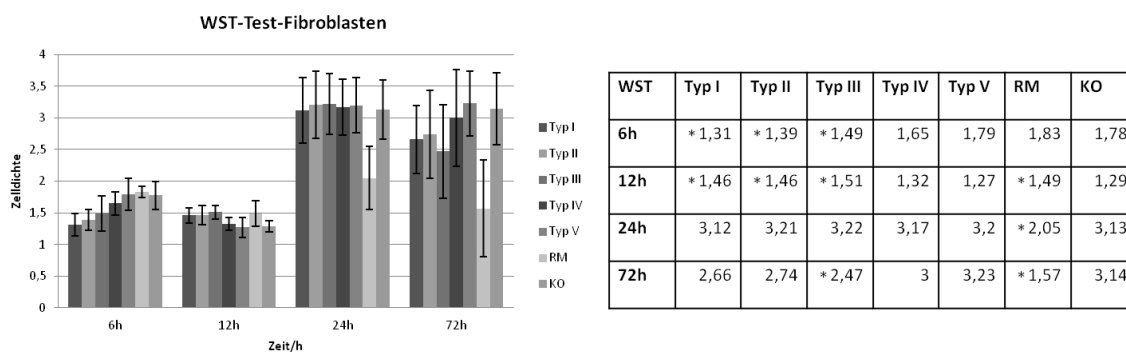


Abbildung 8: Zellaktivität der Fibroblasten im WST-Test

Die Abbildung (links) zeigt die Zelldichte der Fibroblasten in Abhängigkeit zu der Zeit [in h] im WST-Test.; Die Tabelle (rechts) enthält die entsprechenden Mittelwerte. Mit * gekennzeichnete Mittelwerte weisen einen signifikanten Unterschied zur Kontrolle auf ($p < 0,005$). Die Algenmembranen der Typen I, II, III und die Referenzmembran zeigen bei 6h (Typ I, II, III), bei 12h (Typ I, II, III, RM), bei 24h (RM) und bei 72h (Typ III, RM) einen signifikanten Unterschied zur Kontrolle.

Im MTT-Test (s. Abb. 9) zeigten sich im Vergleich zum WST-Test ein langsamer Rückgang der Zelldichte ab 12 h. Über den gesamten Untersuchungszeitraum kristallisierte sich vor allem Typ IV als Membran mit der höchsten Zelldichte im Vergleich zu den anderen Gruppen heraus. Bei 6 h ($p = 1,06E-05$), 12 h ($p = 3,15E-11$) und 24 h ($p = 4,65E-08$) ist dieser Unterschied gegenüber der Kontrolle signifikant. Auch gegenüber den anderen Algenmembranen wies Typ IV bei 12 h und 24 h einen signifikanten Unterschied auf. Kein signifikanter Unterschied bestand allerdings zwischen Typ IV und der Referenzmembran. Bei 6 h bestand ein signifikanter Unterschied von Typ IV zu Typ I ($p = 3,46E-13$), III ($p = 0,0003$) und V ($p = 7,81E-12$). Bei 72 h konnte nur noch ein signifikanter Unterschied von Typ IV zu Typ I ($p = 0,0004$) und zu Typ V ($p = 2,37E-05$) beobachtet werden. Mit Ausnahme von Typ V zeigten alle Gruppen Zelldichten oberhalb bzw. gleich der Kontrolle.

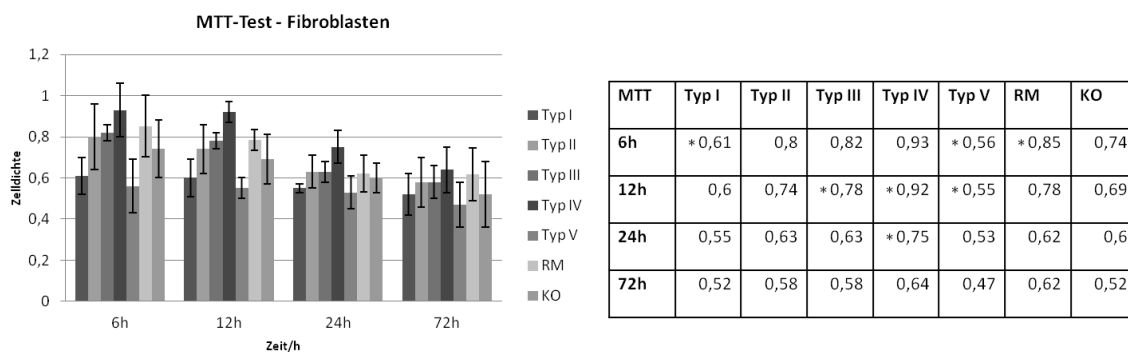


Abbildung 9: Zellaktivität der Fibroblasten im MTT-Test

Die Abbildung (links) zeigt die Zelldichte der Fibroblasten in Abhängigkeit zu der Zeit [in h] im MTT-Test.; Die Tabelle (rechts) enthält die entsprechenden Mittelwerte. Mit * gekennzeichnete Mittelwerte weisen einen signifikanten Unterschied zur Kontrolle auf ($p < 0,005$). Die Algenmembranen der Typen I, III, IV, V und die Referenzmembran weisen bei 6h (Typ I, V, RM), bei 12h (Typ III, IV, V) und bei 24h (Typ IV) einen signifikanten Unterschied zur Kontrolle auf.

Im BrdU-Test (s. Abb. 10) wiesen alle Gruppen und Zeitpunkte eine ähnlich hohe Zelldichte auf. Dabei traten bei 6 h keine signifikanten Unterschiede zwischen den Algenmembranen und der Kontrolle auf, lediglich die Referenzmembran wies einen signifikanten Unterschied zur Kontrolle auf ($p = 0,0003$). Bei 12 h zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen der Kontrolle und den Algenmembranen vom Typ I ($p = 2,41E-07$), Typ II ($p = 2,02E-06$) und III ($p = 0,0007$). Alle drei genannten Typen wiesen niedrigere Werte als die Kontrolle auf. Bei den letzten beiden Zeitpunkten kam es zur Abnahme der Zelldichte aller Gruppen. Dabei zeigte

keine der Membranen signifikant Unterschiede zur Kontrolle. Über den Gesamtverlauf der BrdU-Untersuchung zeigten alle Gruppen Werte oberhalb der Kontrolle.

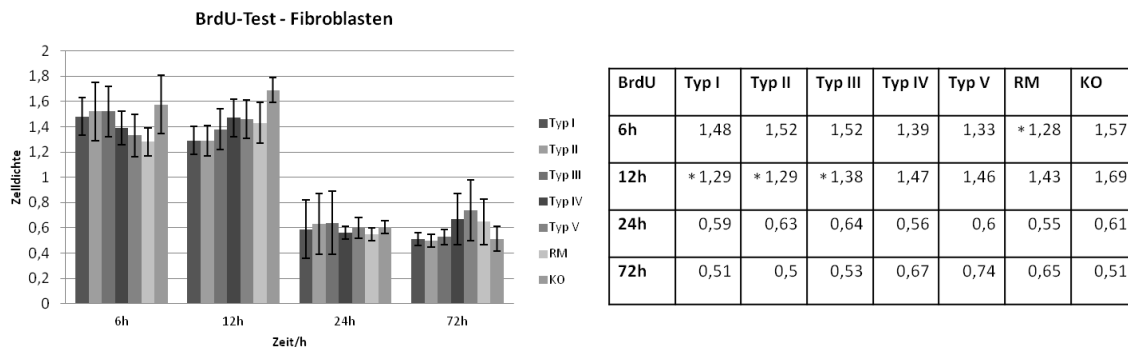


Abbildung 10: Zellproliferation der Fibroblasten im BrdU-Test

Die Abbildung (links) zeigt die Zelldichte der Fibroblasten in Abhängigkeit zu der Zeit [in h] im BrdU-Test.; Die Tabelle (rechts) enthält die entsprechenden Mittelwerte. Mit * gekennzeichnete Mittelwerte weisen einen signifikanten Unterschied zur Kontrolle auf ($p < 0.005$). Die Algenmembranen der Typen I, II, III und die Referenzmembran lassen bei 6h (RM) und bei 12h (Typ I, II, II) einen signifikanten Unterschied zur Kontrolle beobachten.

3.2.1.2 FDA/PI-Färbungen

Die FDA/PI-Färbung ermöglicht die Beurteilung der Zytotoxizität der getesteten Algenmembranen durch unterschiedliche Färbung vitaler (grün) und avitaler (rot) Zellen. Bei der Untersuchung der Fibroblasten mit der FDA/PI-Färbung konnten keine abnormen Zellformen oder große Ansammlungen toter Zellen identifiziert werden (s. Abb. 11). Darüber hinaus konnten die Zellen dünne Zellfortsätze bilden, sogenannte Filopodia. Mithilfe derer sind sie in der Lage, Verbindungen zwischen den Zellen zu knüpfen. Über diese Zell-zu-Zell-Kontakte ist eine Kommunikation zwischen den Zellen möglich. Filopodia und Zell-zu-Zell-Kontakte können sowohl in der Fluoreszenzfärbung als auch in der Rasterelektronenmikroskopie dargestellt werden. Zwischen den unterschiedlichen Algenmembranen zeigten sich keine wesentlichen Unterschiede.

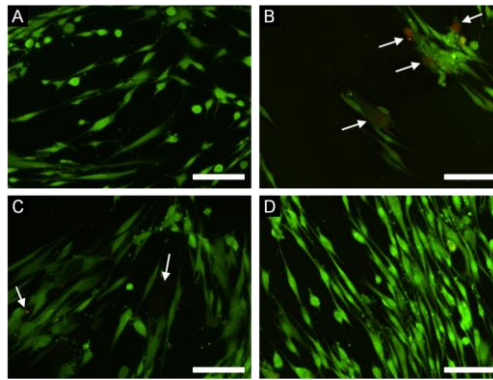


Abbildung 11: Fluoreszenz-Färbung der Fibroblasten nach 72 h in 20-facher Vergrößerung

Maßstabsbalken 200 µm; (A) Typ I: vitale grün fluoreszierende Zellen und Zell-zu-Zell-Kontakte erkennbar; (B) Typ IV: vitale grün fluoreszierende Zellen und rot fluoreszierende avitale Zellen (s. Pfeile); avitale Zellen weisen eine reguläre Zellform auf, welches auf einen physiologischen Prozess hindeutet; (C) RM: im Vordergrund vitale grün fluoreszierende Zellen und Zell-zu-Zell-Kontakte erkennbar, im Hintergrund rot fluoreszierende Zellen sichtbar (s. Pfeil); (D) KO: vitale grün fluoreszierende Zellen und Zell-zu-Zell-Kontakte erkennbar

3.2.1.3 Rasterelektronenmikroskopie

In keiner der Aufnahmen zeigten sich abnorme Zellformen der Fibroblasten (s. Abb. 12, 13, 14). Typ II, Typ IV (s. Abb 12), Typ V (s. Abb 13) und die Kontrolle (s. Abb. 14) ließen Filopodia und Zell-zu-Zell-Kontakte erkennen. Die größte Anzahl an adhärenenten Zellen zeigte Typ IV (s. Abb. 12). Typ I, Typ III und die Referenzmembran zeigten keine adhärenenten Zellen.

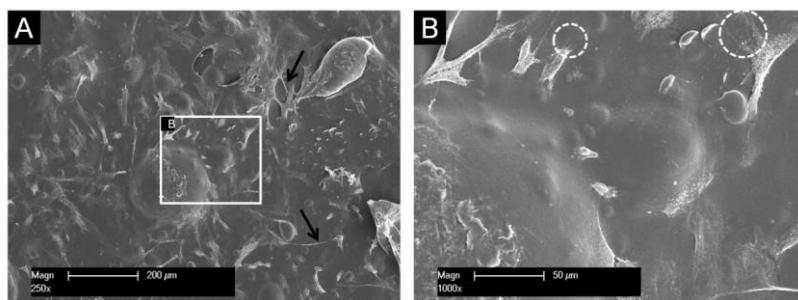


Abbildung 12: Rasterelektronenmikroskopie der Fibroblasten

(A) Typ IV, 12 h, 250x Vergrößerung, Zellen weisen eine regelrechte Morphologie und Zell-zu-Zell-Verbindungen (s. schwarze Pfeile) auf; (B) Ausschnitt aus (A): 1000x Vergrößerung, Filopodia erkennbar (s. Kreise)

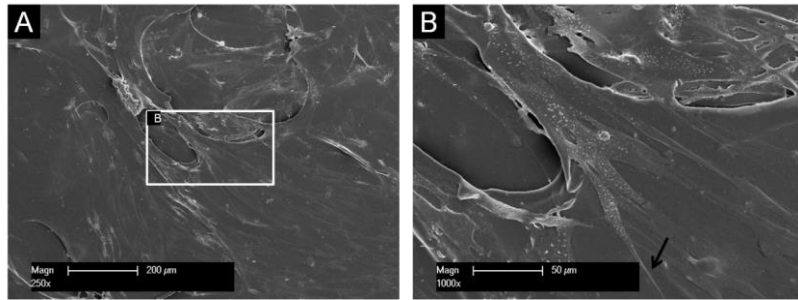


Abbildung 13: Rasterelektronenmikroskopie der Fibroblasten

(A) Typ V, 72 h, 250x Vergrößerung; Zellen erkennbar mit Filopodia und Zell-zu-Zell-Verbindungen; (B) Ausschnitt aus (A): 1000x Vergrößerung, Zell-zu-Zell-Verbindungen (s. schwarzer Pfeil) und das Überlagern von Zellen erkennbar

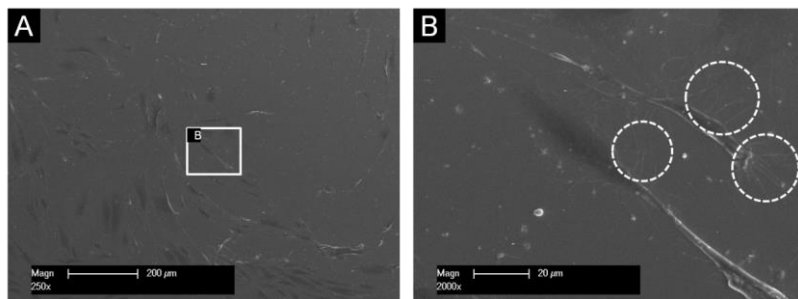


Abbildung 14: Rasterelektronenmikroskopie der Fibroblasten

(A) KO, 72 h, 250x Vergrößerung, Zellen erkennbar mit Filopodia und Zell-zu-Zell-Verbindungen; (B) Ausschnitt aus (A): 2000x Vergrößerung, zwei Zellen mit Filopodia erkennbar (s. Kreise)

3.2.2 Osteosarkomazellen (SaOs-2)

3.2.2.1 WST- & MTT- & BrdU-Test

Im WST-Test (s. Abb. 15) kam es zu einem langsamen kontinuierlichen Anstieg der Zelldichte im Verlauf der Zeit. Zwischen den unterschiedlichen Membrantypen zeigten sich bei 6 h keine signifikanten Unterschiede untereinander, bei 12 h und 72 h zeigten sich vereinzelt signifikante Unterschiede und bei 24 h zeigte knapp die Hälfte der Vergleiche untereinander signifikante Unterschiede, dabei kristallisierte sich allerdings keine der Membranen heraus. Auch zur Kontrolle waren kaum signifikante Unterschiede zu beobachten. Nur Typ V ($p = 0,002$) und die Referenzmembran ($p = 0,0005$) zeigten bei 6h einen signifikanten höhere Zelldicht als die

Kontrolle. Nicht signifikante Werte unterhalb der Kontrolle wiesen nur Typ V nach 12 h und Typ I nach 24 h auf.

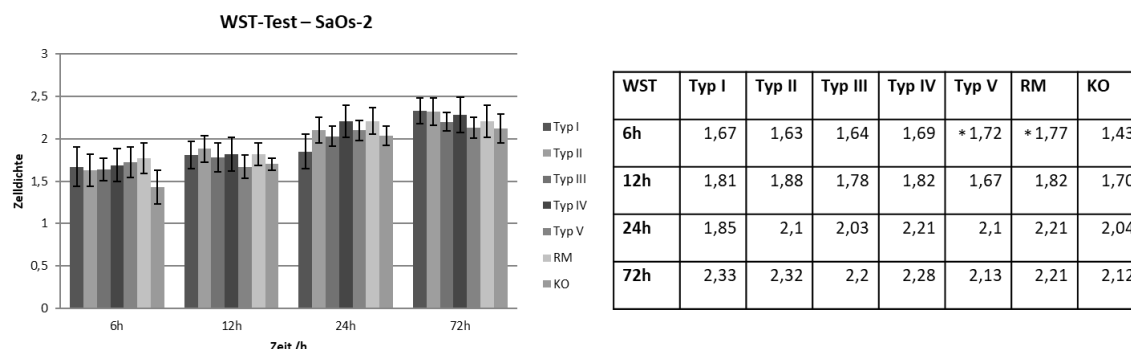


Abbildung 15: Zellaktivität der SaOs-2 im WST-Test

Die Abbildung (links) zeigt die Zelldichte der SaOs-2 in Abhängigkeit zu der Zeit [in h] im WST-Test.; Die Tabelle (rechts) enthält die entsprechenden Mittelwerte. Mit * gekennzeichnete Mittelwerte weisen einen signifikanten Unterschied zur Kontrolle auf ($p < 0.005$). Die Algenmembran des Typ V und die Referenzmembran weisen bei 6h einen signifikanten Unterschied zur Kontrolle auf.

Im MTT-Test (s. Abb. 16) zeigten sich durchweg leicht erhöhte Werte für die Membranen des Typ I, II und III im Gegensatz zu den Membranen des Typs IV, V, der Referenzmembran und der Kontrolle. Vor allem bei 12 h ist deutlich ein signifikanter Unterschied dieser zwei Gruppen zu erkennen. Typ IV verzeichnete über die Zeit eine Abnahme der Zelldichte sowie bei 24 h und 72 h einen nicht-signifikant niedrigeren Wert als die Kontrolle. Typ V bot ebenfalls zweimalig, bei 12 h und 72 h, nicht signifikante Zelldichten unterhalb des Kontrollwertes dar.

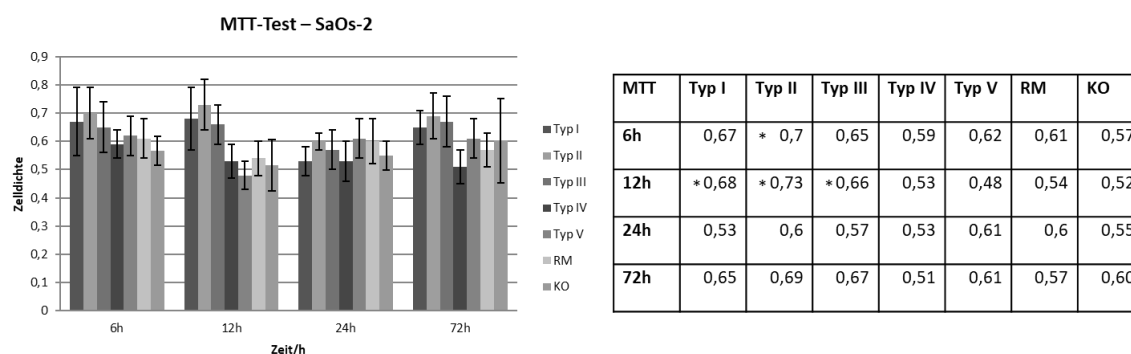


Abbildung 16: Zellaktivität der SaOs-2 im MTT-Test

Die Abbildung (links) zeigt die Zelldichte der SaOs-2 in Abhängigkeit zu der Zeit [in h] im MTT-Test.; Die Tabelle (rechts) enthält die entsprechenden Mittelwerte. Mit * gekennzeichnete

Mittelwerte weisen einen signifikanten Unterschied zur Kontrolle auf ($p < 0.005$). Die Algenmembranen der Typen I, II und III lassen bei 6h (Typ II) und bei 12h (Typ I, II, III) einen signifikanten Unterschied zur Kontrolle beobachten.

Im BrdU-Test (s. Abb. 17) ließ sich zunächst eine ähnlich leicht erhöhte, nicht signifikante Zelldichte der Membranen des Typs I, II und III im Vergleich zur Kontrolle feststellen. Die Gruppen des Typs IV, V und der Referenzmembran zeigten im gesamten Testverlauf signifikant niedrigere Zelldichten im Vergleich zur Kontrolle. Bei 24 h kam es bei allen untersuchten Gruppen zu Werten, die unterhalb der Kontrolle lagen. Dabei wiesen zusätzlich Typ I ($p = 3,61E-08$) und II ($1,17E-05$) einen signifikanten Unterschied zur Kontrolle auf. Lediglich Typ III zeigte bei 24 h keinen signifikanten Unterschied zu der Kontrolle. Bei 72 h zeigten sich durchweg Werte, die signifikant unterhalb der Kontrolle lagen. Besonders beachtenswert war dabei Typ IV, der bei drei der vier Zeitpunkte die niedrigste Zelldichte aufwies und dessen Zelldichte im Untersuchungszeitraum am auffälligsten abnahm.

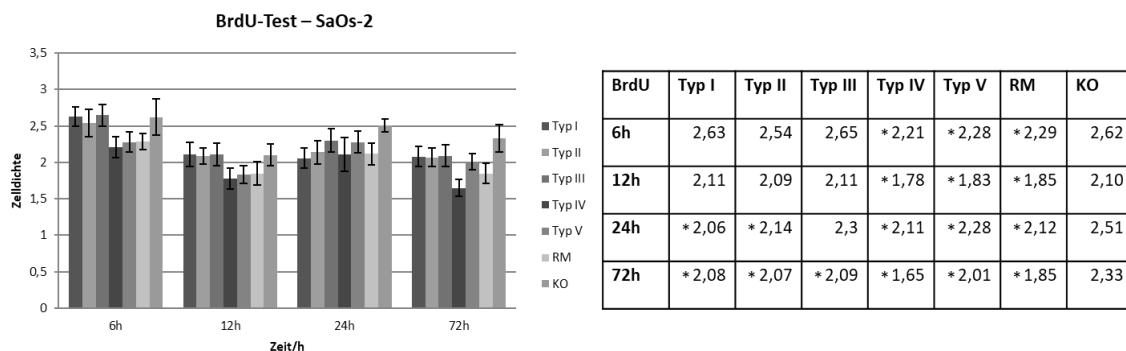


Abbildung 17: Zellproliferation der SaOs-2 im BrdU-Test

Die Abbildung (links) zeigt die Zelldichte der SaOs-2 in Abhängigkeit zu der Zeit [in h] im BrdU-Test.; Die Tabelle (rechts) enthält die entsprechenden Mittelwerte. Mit * gekennzeichnete Mittelwerte weisen einen signifikanten Unterschied zur Kontrolle auf ($p < 0.005$). Die Algenmembranen der Typen I, II, III, IV, V und die Referenzmembran zeigen bei 6h (Typ IV, V, RM), bei 12h (Typ IV, V, RM), bei 24h (Typ I, II, IV, V, RM) und bei 72h (alle Membranen) einen signifikanten Unterschied zur Kontrolle.

3.2.2.2 FDA/PI-Färbungen

Die Fluoreszenz-Aufnahmen ließen zu den ersten beiden Zeitpunkten bei allen Gruppen eine ähnliche Zelldichte sowie Filopodia, erkennen. Ab 24 h zeigten alle Gruppen eine geringere Zelldichte. Die Kontrolle wies gut ausgebreitete Zellen mit Filopodia und Zell-zu-Zell-

Verbindungen bei einer ebenfalls geringen Zelldichte auf (s. Abb. 18 (F)). Die Algenmembranen und die Referenzmembran ließen, im Gegensatz dazu, neben gesunden Zellen, kleine Zellen mit gestörter Morphologie und einer sehr geringeren Anzahl an Filopodia und Zell-zu-Zell-Kontakten erkennen (s. Abb, 18 (A)-(E)).

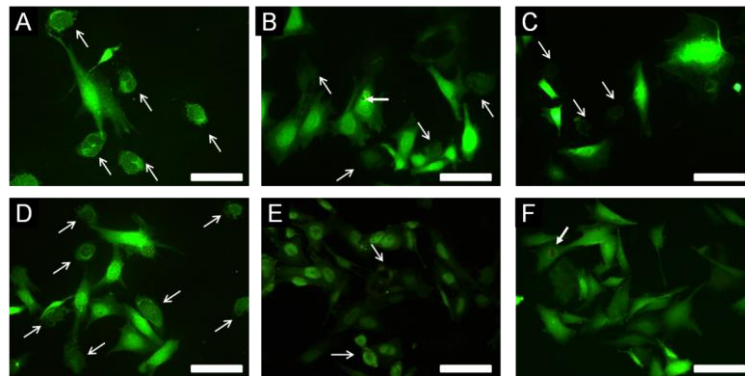


Abbildung 18: Fluoreszenz-Färbung der SaOs-2 in 20-facher Vergrößerung nach 72h

Maßstabsbalken 200 µm; Zellen mit gestörter Morphologie (s. dünne Pfeile); (A) Typ I ; (B) Typ IV, Zelle mit auslaufendem Zellkern (s. dicker Pfeil); (C) Typ V; (D) Typ II; (E) RM (F) KO, Roter Zellkern (s. dicker Pfeil), gut ausgebreitete Zellen mit Filopodia und Zell-zu-Zell-Kontakten; (A)-(E) zeigen sowohl gesunde, als auch kleine Zellen mit gestörter Morphologie und geringer Anzahl an Filopodia und Zell-zu-Zell-Kontakten.

3.2.2.3 Rasterelektronenmikroskopie

In der REM wies die Kontrolle Zellen mit Filopodia und Zell-zu-Zell-Kontakten auf (s. Abb. 21). Auf den Membranen des Typs I, IV (s. Abb. 19 (A) und 20 (A)) und V (s. Abb. 19 (B) und 20 (B)) ließen sich ebenfalls Zellen ausmachen, die Anzahl jener nahm jedoch mit Fortschreiten der Zeit ab. Typ II, III und die Referenzmembran wiesen zu keinem Zeitpunkt Zellen auf.

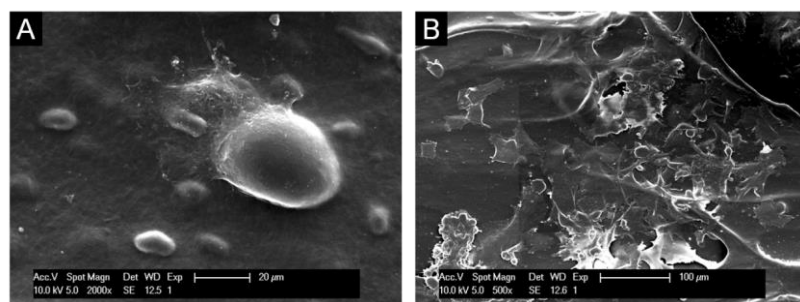


Abbildung 19: Rasterelektronenmikroskopie der SaOs-2

(A) Typ IV, 6 h, 2000x Vergrößerung, einzelne Zelle mit Filopodia erkennbar; (B) Typ V, 6 h, 500x Vergrößerung, Zellkolonie und einzelne Zellen mit Filopodia erkennbar

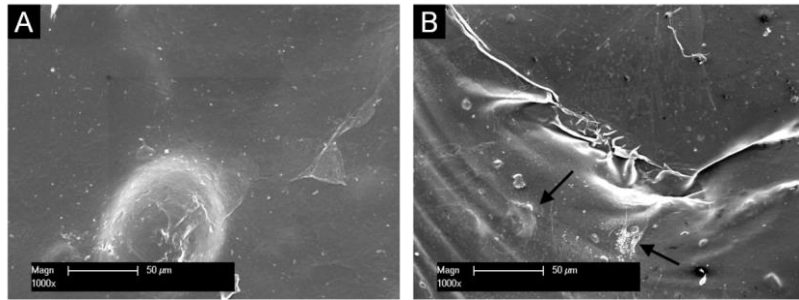


Abbildung 20: Rasterelektronenmikroskopie der SaOs-2

(A) Typ IV, 24 h, 1000x Vergrößerung, zwei einzelne verblasste Zellen erkennbar; (B) Typ V, 24 h, 1000x Vergrößerung, Überreste einzelner Zellen erkennbar (s. schwarzer Pfeil)

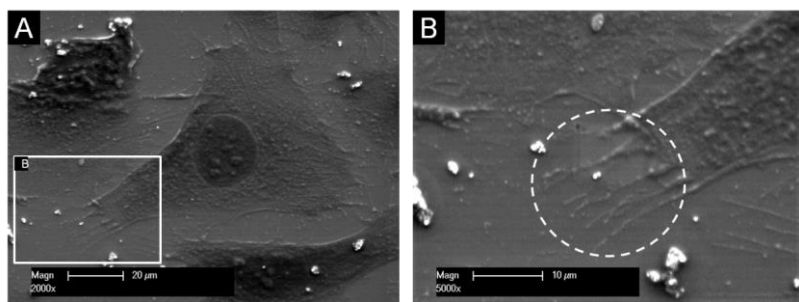


Abbildung 21: Rasterelektronenmikroskopie der SaOs-2

(A) KO, 72 h, 2000x Vergrößerung, gut ausgebreitete Zellen mit Zell-zu-Zell-Kontakten und Filopodia; (B) Ausschnitt aus (A): 5000x Vergrößerung, Darstellung Filopodia (s. Kreis)

3.2.3 Osteoblasten

3.2.3.1 WST-, MTT- & BrdU-Test

Im WST-Test (s. Abb. 22) zeichnete sich ein langsamer kontinuierlicher Anstieg der Zelldichte der Osteoblasten ab. Ab 72 h kam es zu einem leichten Rückgang bzw. einem Stagnieren einzelner Membranen. Alle Membranen, mit Ausnahme von Typ I, zeigten zu jedem Zeitpunkt Werte oberhalb der Kontrolle. Eine Signifikanz wiesen dabei nur die Referenzmembran bei 6 h ($p = 0,0022$) und Typ IV bei 24 h ($p = 0,0019$) sowie Typ I ($p = 6,45E-05$) und Typ II ($p = 0,0023$) bei 72 h auf. Die, durch Typ I verursachte, Ausnahme bei 6 h wies einen nicht signifikanten Wert unterhalb der Kontrolle auf. Ab 12 h zeichnete sich jedoch ein rascher Anstieg des Typs I ab und bei 72 h zeigte allein Typ I einen weiteren Anstieg der Zelldichte.

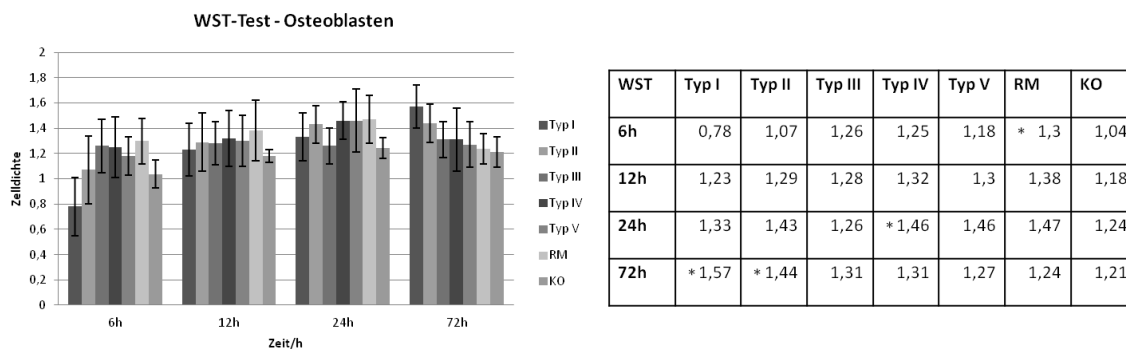


Abbildung 22: Zellaktivität der Osteoblasten im WST-Test

Die Abbildung (links) zeigt die Zelldichte der Osteoblasten in Abhängigkeit zu der Zeit [in h] im WST-Test.; Die Tabelle (rechts) enthält die entsprechenden Mittelwerte. Mit * gekennzeichnete Mittelwerte weisen einen signifikanten Unterschied zur Kontrolle auf ($p < 0.005$). Die Algenmembranen der Typen I, II, IV und die Referenzmembran zeigen bei 6h (RM), bei 24h (Typ IV) und bei 72h (Typ I, II) einen signifikanten Unterschied zur Kontrolle.

Im MTT-Test (s. Abb. 23) zeigte sich zu Beginn der Untersuchung eine hohe Zellaktivität, die mit der Zeit abnahm. Es konnten erneut keine Werte unterhalb der Kontrolle beobachtet werden. Allein Typ IV verzeichnete zu allen vier Zeitpunkten einen signifikanten Unterschied zu der Kontrolle. Auch die Referenzmembran zeigte bei drei von vier Zeitpunkten einen signifikanten Unterschied zu der Kontrolle. Im Gegensatz zu Typ V, welcher zu keiner Zeit einen signifikanten Unterschied zu der Kontrolle aufwies. Typ I, II und III warteten zu den ersten beiden Zeitpunkten mit einem signifikanten Unterschied zu der Kontrolle auf, Typ II ($p = 5,46 \times 10^{-5}$) darüber hinaus auch bei 72 h.

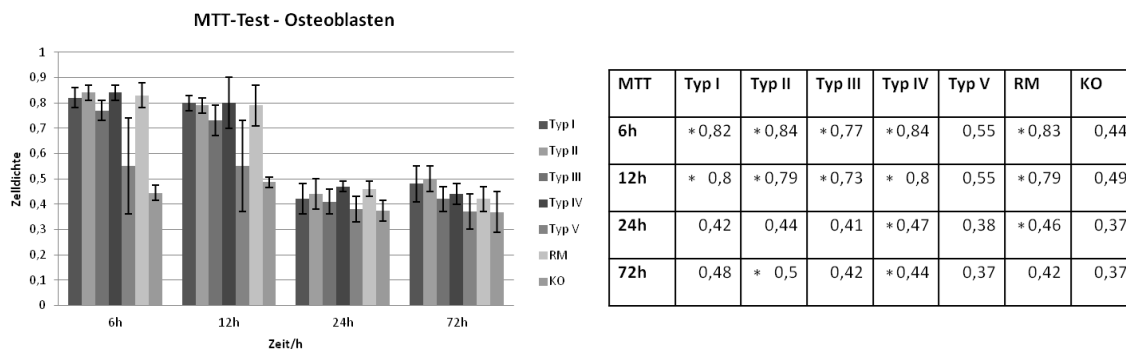


Abbildung 23: Zellaktivität der Osteoblasten im MTT-Test

Die Abbildung (links) zeigt die Zelldichte der Osteoblasten in Abhängigkeit zu der Zeit [in h] im MTT-Test.; Die Tabelle (rechts) enthält die entsprechenden Mittelwerte. Mit * gekennzeichnete Mittelwerte weisen einen signifikanten Unterschied zur Kontrolle auf ($p < 0.005$). Die Algenmembranen der Typen I, II, III, IV und die Referenzmembran lassen bei 6h (Typ I, II, III, IV, RM), bei 12h (Typ I, II, III, IV, RM), bei 24h (Typ IV, RM) und bei 72h (Typ II, IV) einen signifikanten Unterschied zur Kontrolle beobachten.

Im BrdU-Test (s. Abb. 24) zeigte sich über die gesamte Zeitspanne eine langsame Abnahme der Zelldichte. Eine Ausnahme bildete Typ I, welcher einen eher periodischen Verlauf aufwies. Zeitweise lag die Zellproliferation einzelner Membrantypen unterhalb der Kontrolle, jedoch erreichten alle Typen im Verlauf der Zeit ein Maximum oberhalb der Kontrolle. Bei 24 h wiesen Typ II ($p = 0,0005$), Typ III ($p = 5,86E-07$), Typ IV ($p = 0,0013$) und die Referenzmembran ($p = 8,58E-05$) einen signifikanten Unterschied zur Kontrolle auf, bei 72 h Typ I ($p = 0,0002$) und Typ II ($p = 0,0003$).

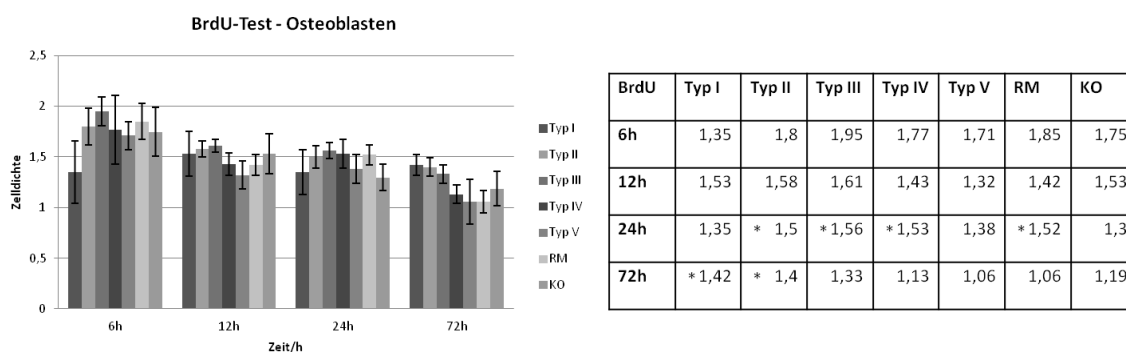


Abbildung 24: Zellproliferation der Osteoblasten im BrdU-Test

Die Abbildung (links) zeigt die Zelldichte der Osteoblasten in Abhängigkeit zu der Zeit [in h] im BrdU-Test.; Die Tabelle (rechts) enthält die entsprechenden Mittelwerte. Mit * gekennzeichnete Mittelwerte weisen einen signifikanten Unterschied zur Kontrolle auf ($p <$

0.005). Die Algenmembranen der Typen I, II, III, IV und die Referenzmembran weisen bei 24h (Typ II, III, IV, RM) und bei 72h (Typ I, II) einen signifikanten Unterschied zur Kontrolle auf.

3.2.3.2 FDA/PI-Färbungen

Alle Algenarten wiesen in der FDA/PI-Färbung eine erhöhte Zelldichte auf, die mit der Zeit weiter anstieg. Filopodia und Zell-zu-Zell-Kontakte waren zahlreich vorhanden (s. Abb. 25 (A)-(D)). Darüber hinaus stachen viele Zellen durch eine flächige Ausbreitung hervor (s. Abb. 25).

Zu Anfang zeigten vor allem Typ III und IV eine höhere Zelldichte im Vergleich zu den anderen Gruppen. Die Kontrolle wies im Vergleich mit den Membranen eine niedrigere Zelldichte und weniger Zell-zu-Zell-Kontakte auf, vor allem bei 6 h, 12 h und 72 h (s. Abb. 25 (F)).

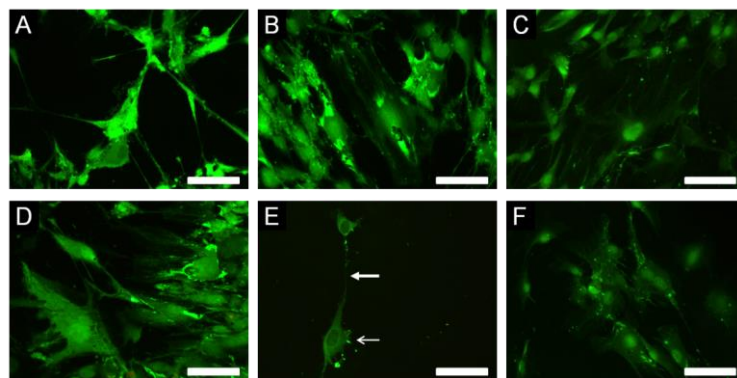


Abbildung 25: Fluoreszenz-Färbung der Osteoblasten in 20-facher Vergrößerung

In allen Abbildungen sind intakte Zellen mit Filopodia und Zell-zu-Zell-Kontakten erkennbar. Viele Zellen zeigten eine flächige Ausbreitung.; (A) Typ II, 24 h; (B) Typ IV, 72 h; (C) RM, 6 h; (D) Typ III, 72 h; (E) Typ V, 6 h, exemplarische Darstellung einer sehr langen Zell-zu-Zell-Verbindung (s. dicker Pfeil), Filopodia an Zelle (s. dünner Pfeil); (F) KO, 72 h; Nach einem Zeitraum von 72 h weist (F) im Vergleich zu (B) und (D) eine niedrigere Zelldichte und weniger Zell-zu-Zell-Kontakte auf.

3.2.3.3 Rasterelektronenmikroskopie

In der REM wiesen alle Zellen eine reguläre Zellform mit Filopodia und Zell-zu-Zell-Verbindungen auf (s. Abb. 26, 27, 28). Die Referenzmembran zeigte keinen Zellbesatz.

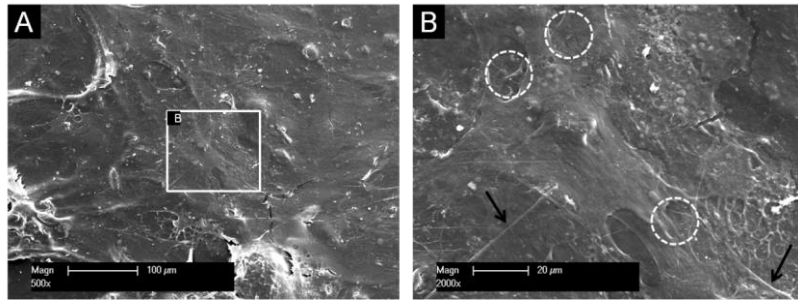


Abbildung 26: Rasterelektronenmikroskopie der Osteoblasten

(A) Typ III, 12 h, 500x Vergrößerung, Zellteppich erkennbar, zum Teil Überlagerungen mit benachbarten Zellen; (B) Ausschnitt aus (A): 2000x Vergrößerung, Zelle mit Zell-zu-Zell-Verbindungen (s. schwarze Pfeile) und Filopodia (s. Kreise)

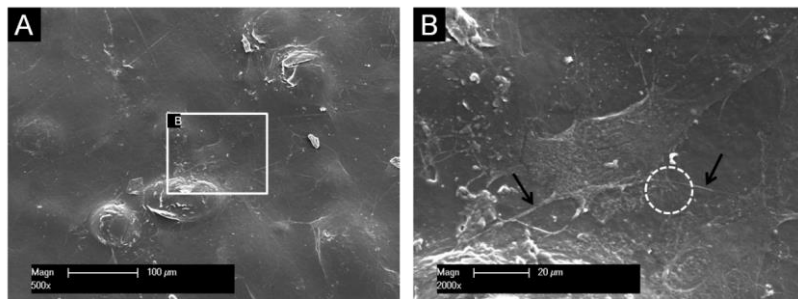


Abbildung 27: Rasterelektronenmikroskopie der Osteoblasten

(A) Typ IV, 72 h, 500x Vergrößerung, Zellteppich erkennbar; (B) Ausschnitt aus (A): 2000x Vergrößerung, Zellteppich erkennbar, Zell-zu-Zell-Verbindungen (s. schwarzer Pfeil) und Filopodia (s. Kreis)

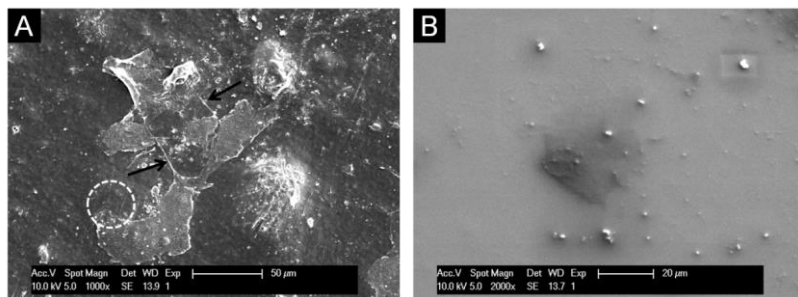


Abbildung 28: Rasterelektronenmikroskopie der Osteoblasten

(A) Typ I, 6 h, 1000x Vergrößerung, kleine Zellkolonie mit Zell-zu-Zell-Kontakten untereinander; (B) KO, 6 h, 2000x Vergrößerung, einzelne Zelle mit Filopodia erkennbar

4 Diskussion

4.1 Biokompatibilität der Algenmembranen auf humane Zellen in-vitro

4.1.1 Material und Methoden

4.1.1.1 Material

In dieser Studie wurden fünf verschiedene Algenmembranen mit einer Kontrolle aus Glas und einer Referenzmembran verglichen.

Bei der Referenzmembran handelte es sich um die klinisch bewährte Kollagenmembran BioGide® (Fa. Geistlich, Wohlhusen, Schweiz). Sie ermöglicht durch ihren stabilen zweischichtigen Aufbau, ihre gute Biokompatibilität [113] und ihre einfache Anpassbarkeit [114] ein zuverlässiges und sicheres Arbeiten. In einer Studie von Tawil et al. konnte gezeigt werden, dass durch die Kombination eines Knochenersatzmaterials mit BioGide® bei periimplantären Defekten eine Knochenzunahme von durchschnittlich 87,6 % möglich war. Zitzmann et al. zeigten, dass BioGide® im Vergleich zu einer Gore-Tex-Membran eine höhere Knochenfülle (92 % zu 78 %) bei periimplantären Defekten in Kombination mit einem Knochenersatzmaterial ermöglichte [115]. Darüber hinaus traten bei den mit BioGide® behandelten Defekten weniger Wunddehiszenzen auf und es waren weniger frühzeitige Membranentfernungen notwendig [115]. Als Nachteil resorbierbarer Kollagenmembranen erweist sich allerdings die Verwendung von porcinem Kollagen zur Herstellung der Membran. Eine Übertragung von Bakterien, Viren, Parasiten und Pilzen wurde auf ein Minimum reduziert, kann jedoch trotz gründlicher Reinigung nicht vollständig ausgeschlossen werden [116]. Darüber hinaus spielen religiöse und weltliche Gründe eine entscheidende Rolle bei der Entscheidung gegen die Verwendung einer Membran tierischen Ursprungs [47]. Probleme können auch durch eine nicht exakt vorhersagbare Degradation entstehen [117]. Daher wird heutzutage weiterhin nach alternativen Membranmaterialien geforscht.

Aufgrund der fehlenden Gefahr einer Krankheitsübertragung bilden alloplastische Materialien eine Alternative zu den etablierten Kollagenmembranen [118]. Die Verwendung von phykogenen beziehungsweise pflanzlichen Materialien als Filler in solchen Membranen ist eine günstige Art und Weise, sich die biomedizinischen Vorteile von Algen zunutze zu machen und gleichzeitig Materialien zu verwenden, die je nach Algenart im Überschuss vorhanden sind [52,119,120].

Das Ziel dieser Studie war es zu evaluieren, ob Algenmembranen eine ähnlich gute Biokompatibilität aufweisen wie Kollagenmembranen und somit eine potentielle Alternative darstellen.

Bei der Herstellung der verwendeten Materialien wurde auf eine Extraktion einzelner bioaktiver Stoffe verzichtet und das gesamte Algenmaterial als Filler verarbeitet. Um zu evaluieren, ob vorteilhafte biomedizinische Eigenschaften der Algen auch in dieser Form eine Wirkung hervorrufen und ob das PLA/MAP-Gemisch biokompatibel ist, waren Untersuchungen zur Vitalität und Proliferation von verschiedenen Zellarten unabdingbar.

Um eine flexible Membran zu erhalten, wurde das Algenpulver mit Polylactid vermischt. Bei Polylactid handelt es sich um einen resorbierbaren, aus erneuerbaren Ressourcen herstellbaren, aliphatischen Polyester, welcher eine gute Steuerung des Degradationsverhaltens zulässt. Mit seiner Carboxyl- und Hydroxylgruppe ist Polylactid in der Lage, einfache Polymere durch Polykondensation zu formen [50,121]. Gogolewski et al. untersuchten bereits im Jahr 1993 in einer in-vivo Studie mit Mäusen PLA und zwei weitere Polymere. Alle drei Polymere wurden vom Gewebe toleriert und zeigten keine akuten Entzündungen, Abszessformationen oder Gewebsnekrosen [122]. Allerdings wird in der Literatur weiterhin das Entstehen eines sauren Milieus beim Abbau der Membran [49] diskutiert. In einem Review von Silva et al. konnte festgestellt werden, dass PLA selten allergische Reaktionen auslöst und es vor allem durch den Bruch oder die Abnutzung von PLA-Implantaten zu inflammatorischen Reaktionen und Fremdkörper-Reaktionen kam [123]. Bekannte Alternativen zu PLA sind Polyglykolid Acid (PGA), Polyhydroxylalkanoate und Polycaprolactone (PCL). Polyglykolid Acid (PGA) ermöglicht einen vielfältigen, unter anderem einen medizinischen, Einsatz, allerdings weist PGA einen zu schnellen Abbau und einen schnellen Verlust der mechanischen Stärke nach Implantation auf [121], um Anwendung als Membranmaterial zu finden. Auch Polycaprolactone (PCL) weist neben den Vorteilen biokompatibel, resorbierbar und mit vielen Polymeren mischbar zu sein, einen entscheidenden Nachteil auf, den über 24 Monate andauernden Abbau [121].

4.1.1.2 Methoden

Bei Untersuchung neuer Materialien sind zunächst Zellkulturstudien mit humanen Zellen in-vitro durchzuführen. Dabei werden drei Expositionsarten unterschieden: Die Verwendung von Eluaten oder Extrakten sowie der direkte und indirekte Kontakt. Bei dem indirekten Kontakt befindet sich zwischen dem Material und den Zellen eine Membran oder Gelschicht, welche eine Diffusion zulässt [124].

Eluate wurden in dieser Studie für die Vitalitäts- und Proliferationstests sowie für die FDA-Färbung verwendet. Der sogenannte Direktkontakt fand in dieser Studie in der Rasterelektronenmikroskopie Anwendung.

Bei den angewendeten Testverfahren handelte es sich um etablierte Verfahren, die mithilfe von Test-Kits erfolgten. Zur Bestätigung der Ergebnisse der Vitalitäts- und Proliferationstests erfolgte die Durchführung der FDA/PI-Färbung. Bei der Durchführung der FDA/PI-Färbung der Fibroblasten kam es bei 6 h zu einem Abspülen der Zellen, wodurch kein Fotomaterial für diesen Zeitpunkt vorliegt. Dies wurde bereits in einer anderen Doktorarbeit und der dazugehörigen Publikation [125,126] beobachtet. Die Doktorandin schlug dabei eine Veränderung der Konzentrationen der verwendeten Lösungen vor [126]. Alternativ wäre es denkbar, die Zellen generell erst ab einem späteren Zeitpunkt zu untersuchen.

Zur Bestimmung der Untersuchungszeitpunkte wurde eine Literaturrecherche durchgeführt. In einer Studie von Wu et al. erfolgte ebenfalls eine MTT-Untersuchung zur Biokompatibilität von MAP/PLA-Membranen. Die dabei gewählten Untersuchungszeitpunkte waren 1, 3, und 7 Tage [110]. Eine Studie von Ignatius und Claes untersuchte die Biokompatibilität von Poly(L, DL-lactide) und Poly(L-lactide-co-glycolide). Dabei wurden für die Durchführung des MTT-Tests die Zeitpunkte 24 h, 48 h und 72 h gewählt [127]. Grigoriev et al. führten MTT-Tests an PLA-basierten spongiösen Gerüsten (Scaffolds) durch mit 1 und 7 Tagen als Untersuchungszeitpunkte [128]. In einer Studie von Kasaj et al. wurden resorbierbare und nicht-resorbierbare GTR-Membranen auf ihre Biokompatibilität gegenüber gingivalen und desmodontalen Fibroblasten und Osteoblasten-ähnliche Zellen untersucht. Die dabei gewählten Untersuchungszeitpunkte waren 1 h, 2½ h, 4 h, 24 h und 48 h [129].

Um einen guten Überblick über das Verhalten der Zellen gegenüber den Algenmembranen zu erhalten, wurde die Zeitpunkte 6 h, 12 h, 24 h und 72 h gewählt. Eine mögliche zu kurze Inkubationszeit ließ sich durch die Analyse der Kontrollen ausschließen, welche eine ausreichende Zelldichte aufwiesen.

Die Desinfektion der Algenmembranen vor Testbeginn erfolgte in dieser Studie in 70%igen Alkohol über einen Zeitraum von 2,5 Tagen. In zwei Studien von Wu et al. wurde die Desinfektion der PCL-MAP- und PLA-MAP-Membranen mithilfe von ultravioletem Licht über einen Zeitraum von 1 h durchgeführt [110,130]. Durch den Alkohol könnten potentiell schädliche Stoffe herausgelöst worden sein. Allerdings zeigten die zwei Studien von Wu et al. ähnliche Ergebnisse mit einer ausreichenden Biokompatibilität [110,130]. Dies würde gegen den Verdacht der Beeinflussung durch den Alkohol sprechen.

4.1.2 Voruntersuchungen

4.1.2.1 Oberflächenbeschaffenheit

Im Grunde zeigten alle Algenmembranen eine sehr ähnliche Oberflächenbeschaffenheit. Die Unterschiede der Porengrößen sind voraussichtlich auf Unterschiede zwischen der Oberflächenspannung zwischen MAP und PLA zurückzuführen. Die kleinen Pin-Locks entstanden vermutlich durch Erhitzen und Abkühlen im Herstellungsprozess [107]. Durch die Vermischung des Polylactids mit den unterschiedlichen Algenpulvern kam es auch zu der Entstehung leicht differierender Oberflächen des Typs IV im Gegensatz zu den anderen Algenmembranen. Typ IV zeigte keine Löcher, sondern Positivblasen. Es ist fraglich, ob die superiore Zelldichte, die Typ IV in einzelnen Testverfahren aufweist, im Zusammenhang mit dieser Oberflächenstruktur steht oder ob diese auf biologische Vorteile der Alge zurückführbar ist. Dies muss in weiteren Untersuchungen evaluiert werden.

4.1.2.2 Kontaktwinkel bzw. Benetzungsverhalten

Die Algenmembranen wiesen unterschiedliche Werte zwischen 77,3 ° (Typ III) und 109,5 ° (Typ I) auf. Im Vergleich dazu zeigte reines PLA einer Studie von Veziroglu et al. einen Kontaktwinkel von ca. 95 ° [131]. Nur Typ III und Typ IV wiesen niedrigere Werte als das reine PLA der Studie von Veziroglu et al. auf und schienen somit hydrophiler zu sein, im Gegensatz zu Typ I, Typ II und Typ V, die alle Werte oberhalb der 95 ° aufwiesen.

In einer Studie zeigten Wei et al. an Osteoblasten von Mäusen, dass das anfängliche Anhaften von Zellen durch eine Erhöhung der Oberflächenbenetzbarkeit verbessert werden konnte [132]. Lee et al. zeigten, dass eine moderate Hydrophilie mit einem Kontaktwinkel von 55 °, die höchste Zelladhäsion, im Vergleich zu mehr hydrophilen oder hydrophoben Polymeren, ermöglichte [133]. Tamada und Ikada beobachteten wiederum, dass ein Kontaktwinkel von 70° die höchste Zelladhäsion ermöglichte [134].

Typ IV (~85 °), welcher im Vergleich mit dem PLA aus der Studie von Veziroglu et al. hydrophiler war [131], zeigte in einzelnen Testverfahren erhöhte Zelldichten und konnte bestätigen, dass moderat hydrophile Oberflächen eine gute Oberflächenbenetzung ermöglichen. Allerdings zeigte Typ III (77,3 °) im Vergleich zu Typ IV weniger hohe Zelldichten, welches darauf hindeutet, dass bei den MAP/PLA-Membranen ein höherer Kontaktwinkel als in den oben genannten Studien erforderlich sein könnte.

In einem Review von Sheng et al. beschäftigten sich die Autoren mit dem Wenzel- und dem Cassie-Baxter-Modell. Sie folgerten, dass eine Erhöhung der Rauigkeit eines Materials eine

Besserung der Oberflächenbenetzbarkeit zur Folge haben kann [135]. Dies lässt vermuten, dass Typ III und Typ IV im Vergleich zu den übrigen Algenmembranen eine höhere Rauigkeit aufwiesen. Alternativ könnte die höhere Hydrophilie dieser beiden Membrantypen im Vergleich zu den anderen Algenmembranen auch auf die Eigenschaften ihres jeweiligen Algentypen zurückgeführt werden. Die Algenmembranen sollte in künftigen Studien genauer auf ihre Oberflächenrauigkeit und eine entsprechende Benetzbarkeit untersucht werden.

Um das Benetzungsverhalten der Algenmembranen zu verbessern, führten Reichstein et al. Untersuchungen an MAP/PLA-Membranen des Typs IV (*Sargassum vulgare*) durch, wobei diese mithilfe des iCVD-Verfahren eine neue Oberflächenbeschichtung erhielten. Dies ermöglichte eine verbesserte Benetzbarkeit der Algenmembran sowie eine ideale Zelladhäsion von Osteoblasten [136].

4.1.2.3 FT-IR-Spektroskopie

Die aus der FT-IR-Spektroskopie hervorgegangenen Ergebnisse ermöglichen die Beobachtung von Unterschieden der chemischen Zusammensetzung.

Zwischen den beiden Algengattungen der Rot- und Braunalgen zeigte sich ein auffälliger Unterschied bei $850 - 860 \text{ cm}^{-1}$ sowie bei 1150 cm^{-1} Wellenlänge. Die höheren Peaks der Rotalgen bei diesen Wellenlängen könnten mit S = O-Verbindungen [137] sowie mit C-O-C-Verbindungen der Cellulose in Verbindung gebracht werden [138]. Der erhöhte Cellulose-Anteil bestätigte sich durch eine höhere Steifheit der beiden Rotalgen (Typ I und II). Weitere Unterschiede könnten bei $1200 - 1250 \text{ cm}^{-1}$ ausgemacht werden. Hierbei zeigte vor allem Typ I eine höhere Transmission. Dies wird auf P=O- [52] und S = O-Verbindungen [137,139] zurückgeführt, welche typisch für Carrageene Oligosaccharide in Rotalgen sind [139]. Sie weisen laut Chen et al. in rationalen Konzentrationen eine geringe Zytotoxizität auf. Darüber hinaus stehen sie im Verdacht, den basic fibroblast growth factor zu binden und damit die Zellproliferation bestimmter Zelllinien zu hemmen [140]. Der Peak zwischen 1365 cm^{-1} und 1385 cm^{-1} , der bei allen Algenarten auftrat, wird auf S = O-Verbindungen [137] zurückgeführt sowie auf CH_3 -Verbindungen des reinen PLAs [141]. Bei 1471 cm^{-1} wiesen alle Algenarten einen kurzen Peak auf, der ebenfalls auf CH_3 -Verbindungen des reinen PLAs schließen lässt [141]. Eine stärkere Erweiterung beziehungsweise längere Erhöhung nach diesem kurzen Peak war nur bei den Rotalgen zu beobachten und deutet voraussichtlich auf N-H-Verbindungen hin [142]. Eine weitere auffällige Erhöhung bei 1620 cm^{-1} bis 1650 cm^{-1} lässt sich bei allen Algenarten außer Typ III nachvollziehen. Es besteht der Verdacht, dass diese Erhöhung auf Carboxylgruppen hinweisen könnte [52], welche hochaktive Gruppen auf der

Alginateoberfläche sind und zur Vernetzung von verschiedenen Biomolekülen, Proteinen und anderen bioaktiven Komponenten beitragen können [143]. Ein letzter Peak ist bei 2829 cm^{-1} bis 2964 cm^{-1} Wellenlänge zu beobachten. Dieser steht voraussichtlich erneut im Zusammenhang mit CH_3 -Gruppen des PLA [141]. Besonders ausgeprägt ist dieser bei Typ I und Typ IV.

4.1.3 Ergebnisse Biokompatibilität der Algenmembranen auf humane Zellen in-vitro

4.1.3.1 Fibroblasten

Zur Beurteilung der Biokompatibilität der PLA/MAP-Membranen gegenüber humanen Fibroblasten erfolgte die Durchführung von WST-, MTT- und BrdU-Tests.

Die WST- und BrdU-Tests zeigten keine Zytotoxizität der Algenmembranen, da alle Algenmembranen im Versuchsverlauf Werte oberhalb der Kontrolle aufwiesen.

Der MTT-Test bestätigte die Zytokompatibilität von Typ IV, da dieser durchweg Werte oberhalb der Kontrolle aufwies. Typ V zeigte im MTT-Test zu allen Zeitpunkten Werte unterhalb der Kontrolle. Im WST- und im BrdU-Test Werte allerdings zeigte ebendieser Typ auch Werte oberhalb der Kontrolle, welches auf eine ausreichende Biokompatibilität schließen lässt. Der darüber hinaus feststellbare Rückgang der Zelldichte im MTT-Test könnte mit dem Erreichen des Populationsmaximums in der Zellkulturplatte zusammenhängen.

Auch Wu untersuchte in einer Studie im Jahre 2015 PCL/MAP-, PCL-g-MA- und PCL-g-MA/TMAP Membranen. Bei TMAP handelt es sich um zuvor behandeltes vernetztes MAP, bei PCL-g-MA um ein zuvor mit Maleinsäureanhydrid behandeltes Polycaprolacton. Zur Beurteilung der Biokompatibilität erfolgte die Durchführung eines MTT-Tests mit humanen Lungenfibroblasten. Die Ergebnisse suggerierten eine ausreichende Biokompatibilität aller Membranen. Die besten Zytokompatibilitäts-Ergebnisse wiesen jedoch die PCL/MAP-Membranen mit einem 10%igen und 20%igen MAP-Anteil auf [130]. Ähnliche Ergebnisse zeigten sich in einer anderen Studie von Wu et al. mit PLA/MAP- und PLA-g-GMA/MAP-Membranen. Der mit normalen humanen Vorhaut-Fibroblasten durchgeführte MTT-Test zeigte die besten Kompatibilitätsergebnisse bei PLA-MAP-Membranen mit einem MAP-Anteil von 10 % und 20 %. Die PLA-g-GMA/MAP-Membranen zeigten eine niedrigere Zytokompatibilität. Reines PLA wies im Vergleich zu den MAP-Membranen eine noch niedrigere Zytokompatibilität auf [110]. Diese Studien bestätigen die Biokompatibilität von PLA/MAP bzw. PCL/MAP-Membranen gegenüber den Fibroblasten.

In einer zuvor erwähnten Studie von Chen et al. wurde der Verdacht geäußert, dass Rotalgen den basic fibroblast growth factor binden und damit die Zellproliferation bestimmter Zelllinien hemmen [140]. Eine Hemmung der Zellproliferation konnte in dieser Studie nicht beobachtet werden, da die Rotalgen im Vergleich zu den drei Braunalgentypen keine auffallend niedrigeren Zelldichten aufwiesen.

Abnorme Zellformen oder große Ansammlungen toter Zellen konnten in der FDA/PI-Färbung und Rasterelektronenmikroskopie nicht ausgemacht werden. Mehrmalig konnten allerdings Filopodia und Zell-zu-Zell-Kontakte beobachtet werden.

Auf Grundlage dieser Resultate kann eine Zytotoxizität der Algenmembranen gegenüber den Fibroblasten ausgeschlossen werden. Darüber hinaus steht vor allem Typ IV im Verdacht einen proliferativen Effekt auf die Fibroblasten zu haben, aufgrund seiner hohen Zellviabilität im MTT-Test.

4.1.3.2 Osteosarkomazellen (SaOs-2)

Zur Beurteilung der Biokompatibilität der PLA/MAP-Membranen gegenüber den SaOs-2 wurden ebenfalls WST-, MTT- und BrdU-Tests durchgeführt.

Der WST-Test zeigte Werte, die bis auf vereinzelte Ausnahmen kontinuierlich nicht- signifikant oberhalb der Kontrolle lagen. Es besteht dementsprechend kein Hinweis auf einen proliferativen oder antiproliferativen Effekt.

Im MTT-Test ließ sich beobachten, dass die Membranen des Typs I, II und III häufiger oberhalb der Kontrolle und die Membranen des Typs IV und V häufiger unterhalb der Kontrolle lagen. Bei 12 h war ein signifikanter Unterschied der beiden Gruppen auszumachen. Ein antiproliferativer Effekt der Membranen des Typ IV und V gegenüber den SaOs-2 ließ sich feststellen.

Der BrdU-Test offenbarte ebenfalls einen möglichen antiproliferativen Effekt der Algenmembranen auf die SaOs-2, da der Großteil der Zelldichten signifikant und nicht-signifikant unterhalb der Kontrolle lag.

Typ IV tat sich erneut am deutlichsten hervor mit einer signifikanten Abnahme der Zelldichte im MTT-Test und mehrmaligen Zelldichten unterhalb der Kontrolle, vor allem im BrdU-Test. Veziroglu et al. beobachten ebenfalls, dass Typ IV einen antiproliferativen Effekt im Vergleich zu PLA gegenüber den SaOs-2 aufwies.

In der Fluoreszenz-Färbung konnte bei allen Algenarten eine gestörte Morphologie der SaOs-2 und weniger bzw. keine Filopodia und Zell-zu-Zell-Kontakte festgestellt werden. Auch in der Rasterelektronenmikroskopie zeigten sich deutlich weniger Algenmembranen mit

adhärenten Zellen sowie eine Abnahme der Filopodia und Zell-zu-Zell-Verbindungen über die Zeit.

SaOs-2, welche charakteristische Eigenschaften von Osteoblasten beibehalten haben [144,145], sind in der Lage, aufgrund ihrer Herkunft aus einem Tumor, ohne Beschränkungen zu proliferieren [146]. Daher ist die Hemmung der Zellproliferation dieses Zelltyps durch die Algen besonders beachtenswert. Bereits 2007 konnten Sousa et al. einen antikanzerösen Effekt des Algentyps *Sargassum vulgare* (Typ IV, SVP) beobachten. In der in-vivo Studie hemmten SVP-Algenextrakte die Tumorstadiumsrate von Sarkom 180-Zellen, die zuvor in Mäuse transplantiert worden waren [147]. Eine Studie von Tannoury et al. aus dem Jahr 2016 untersuchte ebenfalls den potentiellen antikanzerösen Effekt von SVP. Auch hier zeigte SVP eine hohe zytotoxische Aktivität gegenüber der humanen T-Zell-Leukämiezelllinie Jurkat [148]. Nicht nur SVP weist antikanzeröse Eigenschaften auf, auch bei anderen Algentypen konnte ein antikanzeröser Effekt beobachtet werden. In einer Studie von Huang et al. hemmten Algenextrakte der Algenart *Galaxaura oblongata* (Typ II) und zweier weiterer Algen die Proliferation der humanen Leberzelllinie HuH 7 und der humanen Leukämiezelllinie U 937 und HL 60 [104].

Die Ergebnisse und die Studienlage lassen den Schluss zu, dass SVP (Typ IV) einen antiproliferativen Effekt auf die SaOs-2 hat.

4.1.3.3 Osteoblasten

Alle drei Viabilitäts- und Proliferations-Tests zeigten eine Zytokompatibilität der Algenmembranen gegenüber den Osteoblasten, da die Proben in allen drei Testverfahren im Versuchsverlauf Werte oberhalb der Kontrolle aufzeigten.

Der WST- und MTT-Test erlaubten darüber hinaus den Verdacht einer proliferativen Wirkung der Algenmembranen gegenüber den Osteoblasten.

Die kontinuierliche Abnahme der Zelldichte im MTT-Test könnte mit dem Erreichen des Populationsmaximums der Zellkulturflasche zusammenhängen.

Minetti et al. beobachteten in einer Studie einen positiven Effekt des Extrakts der Meeresalge *Padina pavonica* auf die Funktionalität, die Differenzierung und die Mineralisation von primären Osteoblasten [149]. Yoon et al. untersuchten den anti-osteoklastogenen Effekt von Sargachromanol G, welches aus der Alge *Sargassum siliquastrum* isoliert werden konnte. Sie vermuteten, dass dieser Effekt auf eine Modulation des osteoklastogenen Faktors durch Suppression der mitogen-aktivierten Proteinkinase und der Kernfaktor- κ B-Aktivierung

zurückgeführt werden kann [150]. Diese Studien bestätigen einen positiven Effekt einzelner Algen auf Osteoblasten bzw. eine Hemmung des Knochenabbaus.

Auch Reichstein et al. untersuchten die Biokompatibilität von, mithilfe des iCVD-Verfahrens beschichteten, SVP/PLA-Membranen, gegenüber den Osteoblasten. Im MTT-Test wiesen die beschichteten SVP-PLA-Membranen im Vergleich zu der unbeschichteten SVP-PLA-Membran eine höhere Zelldichte auf, der Unterschied war allerdings nicht signifikant. Im Vergleich zur Kontrollgruppe aus Glas zeigten alle Gruppen einen signifikanten Unterschied. Im BrdU-Test zeigten sich sehr ähnliche Zelldichten ohne signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen. Lediglich zu der Kontrolle konnte ein signifikanter Unterschied festgestellt werden [136]. Dies erhärtet den Verdacht einer guten Biokompatibilität der SVP/PLA-Membran.

In der FDA/PI-Färbung zeigten sich normale, teilweise auch flächig ausgebreitete, Zellen mit Filopodia und Zell-zu-Zell-Kontakten in allen Gruppen. Die Algenmembranen wiesen im Vergleich zur Kontrolle eine höhere Zelldichte auf.

In der bereits zuvor erwähnten Studie von Reichstein et al. zeigten die beschichteten SVP-PLA-Membranen in der FDA/PI-Färbung höhere Zelldichten im Vergleich zur Kontrolle und zur unbeschichteten SVP-PLA-Membran [136]. Dies sowie die geringe Hydrophilie der unbeschichteten Membranen unterstreichen den weiteren Forschungs- und Verbesserungsbedarf der Algenmembranen.

Auf allen rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen mit Zellbesatz zeigten die Osteoblasten sowohl Filopodia als auch Zell-zu-Zell-Verbindungen.

Diese Resultate ermöglichen das Ausschließen einer Zytotoxizität und vor allem die Rasterelektronenmikroskopie verstärkt den Verdacht einer proliferativen Wirkung des Algentyps IV. Zu demselben Ergebnis kamen auch Veziroglu et al. in ihrer Untersuchung der Algenmembran des Typs IV im Vergleich mit reinem PLA [131].

4.1.4 Zusammenfassung der Ergebnisse und Ausblick

Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse kann davon ausgegangen werden, dass alle Membrantypen eine ausreichende in-vitro Biokompatibilität aufweisen. Für den klinischen Einsatz sollte jedoch vor allem Typ IV genauer untersucht werden, da dieser die besten Ergebnisse aufwies und der Verdacht auf einen proliferativen Effekt der SVP-PLA-Membran gegenüber den Fibroblasten und Osteoblasten sowie der Verdacht auf einen antiproliferativen Effekt gegenüber den Osteosarkomazellen besteht.

Um im klinischen Alltag eine Rolle zu spielen, müssen die Algenmembranen weiteren Untersuchungen unterzogen werden. Ein Gegenstand zukünftiger Studien sollte eine mögliche bestehende Osteoinduktivität sein. Die Testung dieser sollte mit mesenchymalen Stammzellen (MSC) erfolgen, um zu prüfen, ob es zu der gewünschten Differenzierung der MSC zu knochenbildenden Osteoblasten kommt. Bei Implantaten konnte die Beeinflussung der Differenzierung von MSCs durch eine entsprechende Oberflächenmodifikation bereits beobachtet werden [151]. In der Studie von Reichstein et al. wurde eine solche Oberflächenmodifikation in-vitro erfolgreich durchgeführt [136]. Erste in-vivo Studien sollten in Zukunft durchgeführt werden, um eine mögliche Osteoinduktivität zu beurteilen.

Dass einzelne Algen, wie *Corallina elongata* oder *Sargassum vulgare*, antibakterielle Eigenschaften besitzen (s. Tab. 1), könnte sich als vorteilhaft erweisen, falls es zur Exposition von Membranen und somit zum Kontakt der Membran mit der Mundhöhle kommt. Es wäre möglich, dass die antibakteriellen Eigenschaften dieser Algenarten eine Einschränkung der Entzündungsreaktion zur Folge hätten und somit die Gefahr von postoperativen Komplikationen senken könnten. Dies sollte in in-vivo Untersuchungen aufmerksam verfolgt werden.

Des Weiteren sollte in in-vivo Untersuchungen beachtet werden, welche Mindestmenge des MAPs bzw. der Algenextrakte benötigt wird, um eine bioaktive Wirksamkeit zu erreichen. Dies ist entscheidend um zu beurteilen, ob Algen lediglich als günstige Filler von Bedeutung sind oder auch als Pharmaka.

Zurzeit gibt es keine Studien zu der in-vivo Degradierbarkeit der Algenmembranen. Es ist unklar, ob ein rückstandsloser Abbau möglich ist oder es gegebenenfalls zu Verzögerungen oder Beschleunigungen des Abbaus durch das Algenpulver kommen kann. Wu untersuchte in der bereits erwähnten Studie von 2015 unter anderem die Biodegradierbarkeit von PCL/MAP- und PCL-g-MA/TMAP-Membranen in gesiebter Erde in einem Gewächshaus bei $28\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$. Die Erde besaß einen Feuchtigkeitsgehalt von 35 % und die Proben befanden sich in einer Tiefe von 10 - 15 cm. Alle 20 Tage wurden die Membranen ausgegraben, gereinigt, getrocknet und untersucht. Der Untersuchungszeitraum betrug 120 Tage. Die Auswertung dieser Untersuchung zeigte, dass die PCL/MAP mit einem 20%igen MAP-Anteil über den gesamten Untersuchungszeitraum den höchsten Materialverlust im Vergleich zu den anderen Membranen mit einem 10%igen MAP-Anteil sowie den nur aus PCL bzw. PCL-g-MA bestehenden Membranen aufwies. Daraus schloss, dass das Hinzufügen von MAP eine Erhöhung der Biodegradierbarkeit verursacht [130]. Dieses Wissen bezüglich der Degradierbarkeit ist entscheidend für die Beurteilung der Barrierefunktion der Membran. Diese

besteht nur solange die Membran intakt ist. Gleichzeitig sollten die Membranen nach Abheilen der Wunde zügig und rückstandslos resorbiert werden.

Darüber hinaus ist es wichtig, eine durch Schwermetalle verursachte Toxizität der Algen zu vermeiden. Algen sind in der Lage, Schwermetall zu akkumulieren und dienen somit zugleich als Indikator für die industrielle Belastung einer Region [152]. In einer Studie von Su et al. fand eine experimentelle Analyse der Schwermetallbelastung der Algenart *Sargassum fusiforme* mithilfe einer laserinduzierten Durchbruchsspektroskopie erfolgreich statt [153]. Ein solches oder ähnliche Screening-Verfahren könnten somit ein Aussortieren von Algen mit Schwermetallbelastung ermöglichen.

Aufgrund ihrer sehr dünnen Gestaltung sind die Algenmembranen aus derzeitiger Sicht nicht in der Lage, eine adäquate Platzhalterfunktion zu garantieren. Da es sich bei den Membranen allerdings um Prototypen handelt, wäre eine Verdickung bzw. mehrschichtige Gestaltung der Membran für weiterführende Studien wünschenswert. Dabei muss darauf geachtet werden, eine zu hohe Sprödigkeit zu vermeiden, um ein Einreißen der Membran zu verhindern. Darüber hinaus sollte die einfache Handhabbarkeit sowie die Zuschneidbarkeit erhalten werden.

Auf Grundlage der ausreichenden Biokompatibilität der Algenmembranen und der potentiellen vielfältigen Einsatzmöglichkeiten, vor allem in der Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie, aber auch in anderen Fachdisziplinen, sollten Algen bzw. Algenmembranen in zukünftigen Studien weiter untersucht werden.

5 Zusammenfassung

Membranen finden in der Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie und in der Parodontologie vielfältige Anwendungsmöglichkeiten. Zum Beispiel als GBR- oder GTR-Membran zur Versorgung knöcherner Defekte oder als Alternative zum freien Schleimhauttransplantat.

Die Verwendung von resorbierbaren Kollagenmembranen ist heutzutage der Standard. Sie haben den Vorteil einer guten Biokompatibilität, einer einfachen Handhabbarkeit und ermöglichen eine gute Barrierefunktion. Von Nachteil erweist sich allerdings die geringe mechanische Stabilität, die tierische Herkunft, sowie die nicht genau vorhersagbare Degradation.

Eine Alternative bilden alloplastische bzw. synthetische Materialien wie Polylactid (PLA). PLA ist ein aliphatischer Polyester aus nachwachsenden Rohstoffen wie Mais und Reis. Von Vorteil sind seine vielfältige Kombinierbarkeit mit anderen Stoffen, die gute Biokompatibilität und die vorhersagbare Abbaubarkeit. Durch die Kombination mit natürlichen Polymeren können die thermischen und mechanischen Eigenschaften des PLAs weiter verbessert werden.

In dieser Studie wurden Algen als günstige und in großer Vielzahl vorhandene Filler verwendet. Algen weisen verschiedene Eigenschaften auf, die einen potentiellen Nutzen für die Medizin und Pharmaindustrie hätten. Algen können, je nach Algenart, unter anderem antioxidative, antitumoröse, antibakterielle, antimikrobielle, antivirale, antifungale, antiallergische, antikoagulierende und immunstimulierende Eigenschaften besitzen. Für die Herstellung, der in dieser Studie verwendeten Algenmembranen, wurden PLA und Algenpulver (MAP) vermischt und in Form von Membranen gepresst. Bei denen für die Studie verwendeten Algenarten handelt es sich um *Corallina elongata* (Typ I), *Galaxaura oblongata* (Typ II), *Cystoseira compressa* (Typ III), *Sargassum vulgare* (Typ IV) und *Stypopodium schimperi* (Typ V). Die Membranen wurden anschließend auf ihre Oberflächenbeschaffenheit, ihre Benetzbarkeit, ihre chemische Zusammensetzung und ihre Biokompatibilität untersucht. Für die Biokompatibilitätsuntersuchungen erfolgte die in-vitro Durchführung der Viabilitätstests WST- und MTT, des Proliferationstest BrdU, der FDA/PI-Färbung und der Rasterelektronenmikroskopie. Bei den untersuchten Zelllinien handelt es sich um Fibroblasten, Osteosarkomazellen und Osteoblasten.

Alle Algenmembranen zeigten eine sehr ähnliche, fast identische Oberflächenbeschaffenheit mit Ausnahme von Typ IV, welcher im Gegensatz zu den anderen Membranen kleine Positivblasen aufwies. Die Untersuchung des Benetzungsverhaltens zeigte, dass die

MAP/PLA-Membranen relativ hydrophobe Eigenschaften aufwiesen und weitere Studien zur Verbesserung der Hydrophilie, durch zum Beispiel Beschichtungen, notwendig sind. Die FT-IR-Spektroskopie zur Bestimmung der chemischen Zusammensetzung zeigte deutliche Unterschiede zwischen den Rot- und Braunalgen und den jeweiligen Algenarten untereinander. Ein festgestellter erhöhter Cellulose-Gehalt der Rotalgen ließ sich klinisch durch eine erhöhte Steifheit bestätigen. Die Biokompatibilitätsuntersuchungen zeigten allesamt eine ausreichende Biokompatibilität. Teils konnten proliferative Effekte einzelner Algenarten, vor allem des Typs IV, auf die Fibroblasten und Osteoblasten beobachtet werden sowie antiproliferative Effekte auf die Osteosarkomazellen.

Daher könnten Algenmembran aus MAP und PLA eine potentielle Alternative für die Verwendung von Kollagenmembranen sein. Die Membran benötigen jedoch noch weitere Modifikationen, wie zum Beispiel ein verbessertes Benetzungsverhalten durch eine entsprechende Beschichtung sowie eine höhere mechanische Stabilität um beispielsweise Knochenersatzmaterial in Position halten zu können. Außerdem, der Biodegradationsprozess von Algenmembranen soll auch mittels in-vivo Modellen weiter untersucht werden.

6 Literaturverzeichnis

- [1] Gottlow J., Nyman S., Lindhe J., Karring T., Wennström J. (1986). New attachment formation in the human periodontium by guided tissue regeneration. Case reports. *J Clin Periodontol* 13(6):604–16.
- [2] Strathmann H., Giorno L., Drioli E. (2011). Introduction to membrane science and technology, Wiley-VCH, Weinheim.
- [3] Buser D., Dula K., Belser U., Hirt H.P., Berthold H. (1993). Localized ridge augmentation using guided bone regeneration. 1. Surgical procedure in the maxilla. *International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry* 13(1):29–45.
- [4] Dahlin C., Linde A., Gottlow J., Nyman S. (1988). Healing of Bone Defects by Guided Tissue Regeneration. *Plastic and Reconstructive Surgery* 81(5):672–6.
- [5] Ziebart T. (2015). Membranen und Membrantechniken. *wissen kompakt* 9(4):189–200.
- [6] Caffesse R.G., Mota L.F., Quiñones C.R., Morrison E.C. (1997). Clinical comparison of resorbable and non-resorbable barriers for guided periodontal tissue regeneration. *J Clin Periodontol* 24(10):747–52.
- [7] Terriza A., Vilches-Pérez J.I., González-Caballero J.L., La Orden E.D., Yubero F., Barranco A. et al. (2014). Osteoblasts Interaction with PLGA Membranes Functionalized with Titanium Film Nanolayer by PECVD. In vitro Assessment of Surface Influence on Cell Adhesion during Initial Cell to Material Interaction. *Materials (Basel)* 7(3):1687–708.
- [8] Schmitt C.M., Moest T., Lutz R., Wehrhan F., Neukam F.W., Schlegel K.A. (2016). Long-term outcomes after vestibuloplasty with a porcine collagen matrix (Mucograft®) versus the free gingival graft: A comparative prospective clinical trial. *Clinical Oral Implants Research* 27(11):125-133.
- [9] Terheyden H. (2010). Knochenaugmentationen in der Implantologie. *Deutsche Zahnärztliche Zeitschrift* 65(6):320.
- [10] Woo I., Le B.T. (2004). Maxillary Sinus Floor Elevation: Review of Anatomy and Two Techniques. *Implant Dentistry* 13(1):28–32.
- [11] Cardaropoli D., Roffredo A., Cardaropoli G. (2012). Socket preservation using bovine bone mineral and collagen membrane: A randomized controlled clinical trial with histologic analysis. *International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry* 32(4):421–30.
- [12] Hoffmann O., Bartee B.K., Beaumont C., Kasaj A., Deli G., Zafiropoulos G.-G. (2008). Alveolar Bone Preservation in Extraction Sockets Using Non-Resorbable dPTFE Membranes: A Retrospective Non-Randomized Study. *Journal of Periodontology* 79(8):1355–69.
- [13] Bernabé P.F.E., Melo L.G.N., Cintra L.T.A., Gomes-Filho J.E., Dezan Jr E., Nagata M.J.H. (2012). Bone healing in critical-size defects treated with either bone graft, membrane, or

a combination of both materials: A histological and histometric study in rat tibiae. *Clinical Oral Implants Research* 23(3):384–8.

- [14] Schmitz J.P., Hollinger J.O. (1986). The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. *Clin Orthop Relat Res*(205):299–308.
- [15] Hämmelerle C.H.F., Karring T. (1998). Guided bone regeneration at oral implant sites. *Periodontology* 2000 17(1):151–75.
- [16] Schou S., Holmstrup P., Jørgensen T., Skovgaard L.T., Stoltze K., Hjørting-Hansen E. et al. (2003). Anorganic porous bovine-derived bone mineral (Bio-Oss®) and ePTFE membrane in the treatment of peri-implantitis in cynomolgus monkeys. *Clinical Oral Implants Research* 14(5):535–47.
- [17] Schou S., Holmstrup P., Jørgensen T., Skovgaard L.T., Stoltze K., Hjørting-Hansen E. et al. (2003). Implant surface preparation in the surgical treatment of experimental peri-implantitis with autogenous bone graft and ePTFE membrane in cynomolgus monkeys. *Clinical Oral Implants Research* 14(4):412–22.
- [18] Bernard J.-P., Belser U.C., Martinet J.-P., Borgis S.A. (1995). Osseointegration of Brånemark fixtures using a single-step operating technique. A preliminary prospective one-year study in the edentulous mandible. *Clinical Oral Implants Research* 6(2):122–9.
- [19] Nyman S., Lang N.P., Buser D., Brägger U. (1990). Bone regeneration adjacent to titanium dental implants using guided tissue regeneration: A report of two cases. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* 5(1):9–14.
- [20] Scantlebury T.V. (1993). 1982-1992: A Decade of Technology Development for Guided Tissue Regeneration. *Journal of Periodontology* 64(11S):1129–37.
- [21] Xu C., Lei C., Meng L., Wang C., Song Y. (2012). Chitosan as a barrier membrane material in periodontal tissue regeneration. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 100B(5):1435–43.
- [22] Singh A.K. (2013). GTR membranes: The barriers for periodontal regeneration. *DHR Int. J. Med. Sci* 4(1):31–8.
- [23] Polimeni G., Xiropaidis A.V., Wikesjö U.M.E. (2006). Biology and principles of periodontal wound healing/regeneration. *Periodontology* 2000 41(1):30–47.
- [24] Smeets R., Jung O., Hanken H., Hartjen P., Al Dam A., Gröbe A. et al. (2014). Was können regenerative Materialien in der Zahnmedizin leisten–und wo sind die Grenzen. *Deutsche Zahnärztliche Zeitschrift* 69(12):708–21.
- [25] Ziebart T., Kämmerer P.W. (2012). Membrantechniken in der Oralchirurgie. *wissen kompakt* 6(3):13–9.
- [26] An Y.H., Friedman R.J. (1998). Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterial surfaces. *Journal of Biomedical Materials Research* 43(3):338–48.
- [27] Milella E., Ramires P.A., Brescia E., La Sala G., Di Paola L., Bruno V. (2001). Physicochemical, mechanical, and biological properties of commercial membranes for GTR. *Journal of Biomedical Materials Research* 58(4):427–35.

- [28] Rakhmatia Y.D., Ayukawa Y., Furuhashi A., Koyano K. (2013). Current barrier membranes: Titanium mesh and other membranes for guided bone regeneration in dental applications. *Journal of Prosthodontic Research* 57(1):3–14.
- [29] Wang R.R., Fenton A. (1996). Titanium for prosthodontic applications: A review of the literature. *Quintessence international* 27(6):401–8.
- [30] Her S., Kang T., Fien M.J. (2012). Titanium Mesh as an Alternative to a Membrane for Ridge Augmentation. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 70(4):803–10.
- [31] Boyne P.J., Cole M.D., Stringer D., Shafqat J.P. (1985). A technique for osseous restoration of deficient edentulous maxillary ridges. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 43(2):87–91.
- [32] Degidi M., Scarano A., Piattelli A. (2003). Regeneration of the Alveolar Crest Using Titanium Micromesh with Autologous Bone and a Resorbable Membrane. *Journal of Oral Implantology* 29(2):86–90.
- [33] Lee J.-Y., Kim Y.-K., Yun P.-Y., Oh J.-S., Kim S.-G. (2010). Guided bone regeneration using two types of non-resorbable barrier membranes. *Journal of the Korean Association of Oral and Maxillofacial Surgeons* 36(4):275–9.
- [34] Zhang Y., Zhang X., Shi B., Miron R. (2013). Membranes for guided tissue and bone regeneration. *Annals of Oral & Maxillofacial Surgery* 1(1):10.
- [35] Windisch P., Orban K., Salvi G.E., Sculean A., Molnar B. (2021). Vertical-guided bone regeneration with a titanium-reinforced d-PTFE membrane utilizing a novel split-thickness flap design: A prospective case series. *Clinical Oral Investigations* 25(5):2969–80.
- [36] Dr. Tobias Feise, Svenja Kortus (2018). Rekонтstruktion von dreidimensionalen Knochendefekten; Available from: <https://www.zwp-online.info/fachgebiete/oralchirurgie/gtr-und-gbr/rekonstruktion-von-dreidimensionalen-knochendefekten>. [October 14, 2021].
- [37] McGinnis M., Larsen P., Miloro M., Beck F.M. (1998). Comparison of Resorbable and Nonresorbable Guided Bone Regeneration Materials: A Preliminary Study. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* 13(1):30–5.
- [38] Monteiro A.-S.-F., Macedo L.-G.-S., Macedo N.-L., Balducci I. (2010). Polyurethane and PTFE membranes for guided bone regeneration: Histopathological and ultrastructural evaluation. *Medicina oral, patologia oral y cirugia bucal* 15(2):401–6.
- [39] Patino M.G., Neiders M.E., Andreana S., Noble B., Cohen R.E. (2002). Collagen as an Implantable Material in Medicine and Dentistry. *Journal of Oral Implantology* 28(5):220–5.
- [40] Mano J.F., Silva G.A., Azevedo H.S., Malafaya P.B., Sousa R.A., Silva S.S. et al. (2007). Natural origin biodegradable systems in tissue engineering and regenerative medicine: Present status and some moving trends. *Journal of the Royal Society Interface* 4(17):999–1030.
- [41] Schwarz F., Rothamel D., Herten M., Wüstefeld M., Sager M., Ferrari D. et al. (2008). Immunohistochemical characterization of guided bone regeneration at a dehiscence-type

- defect using different barrier membranes: An experimental study in dogs. *Clinical Oral Implants Research* 19(4):402–15.
- [42] Friedmann A., Gissel K., Soudan M., Kleber B.-M., Pitaru S., Dietrich T. (2011). Randomized controlled trial on lateral augmentation using two collagen membranes: Morphometric results on mineralized tissue compound. *J Clin Periodontol* 38(7):677–85.
 - [43] Sanz M., Lorenzo R., Aranda J.J., Martin C., Orsini M. (2009). Clinical evaluation of a new collagen matrix (Mucograft® prototype) to enhance the width of keratinized tissue in patients with fixed prosthetic restorations: A randomized prospective clinical trial. *J Clin Periodontol* 36(10):868–76.
 - [44] Tan W.C., Tan W.L., Ong M.M.A., Lang N.P. (2017). Use of a collagen matrix for recession coverage in patients who received orthodontic therapy: A case series. *Journal of Investigative and Clinical Dentistry* 8(1):12182.
 - [45] Rothamel D., Schwarz F., Sager M., Hertel M., Sculean A., Becker J. (2005). Biodegradation of differently cross-linked collagen membranes: An experimental study in the rat. *Clinical Oral Implants Research* 16(3):369–78.
 - [46] Plagmann H.-C. (1998). *Lehrbuch der Parodontologie*, Hanser, München.
 - [47] Rodger D., Blackshaw B.P. (2019). Using animal-derived constituents in anaesthesia and surgery: The case for disclosing to patients. *BMC Medical Ethics* 20(1):14.
 - [48] Lee J., Kim S.Y., Hwang K.J., Ju Y.R., Woo H.-J. (2013). Prion Diseases as Transmissible Zoonotic Diseases. *Osong Public Health and Research Perspectives* 4(1):57–66.
 - [49] Goonoo N., Bhaw-Luximon A., Bowlin G.L., Jhurry D. (2013). An assessment of biopolymer- and synthetic polymer-based scaffolds for bone and vascular tissue engineering. *Polymer International* 62(4):523–33.
 - [50] Wang J., Wang L., Zhou Z., Lai H., Xu P., Liao L. et al. (2016). Biodegradable Polymer Membranes Applied in Guided Bone/Tissue Regeneration: A Review. *Polymers* 8(4):115.
 - [51] Xiao L., Wang B., Yang G., Gauthier M. (2011). Poly (lactic acid)-based biomaterials: Synthesis, modification and applications. In: Dhanjoo N. Ghista, editor. *Biomedical Science, Engineering and Technology: InTech*. Rijeka:247–82.
 - [52] Bulota M., Budtova T. (2015). PLA/algae composites: Morphology and mechanical properties. *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing* 73:109–15.
 - [53] Hertel M., Jung R.E., Ferrari D., Rothamel D., Golubovic V., Molenberg A. et al. (2009). Biodegradation of different synthetic hydrogels made of polyethylene glycol hydrogel/RGD-peptide modifications: An immunohistochemical study in rats. *Clinical Oral Implants Research* 20(2):116–25.
 - [54] Lutolf M.P., Weber F.E., Schmoekel H.G., Schense J.C., Kohler T., Müller R. et al. (2003). Repair of bone defects using synthetic mimetics of collagenous extracellular matrices. *Nature Biotechnology* 21(5):513–8.

- [55] Jung R.E., Hälg G.A., Thoma D.S., Hämmerle C.H.F. (2009). A randomized, controlled clinical trial to evaluate a new membrane for guided bone regeneration around dental implants. *Clinical Oral Implants Research* 20(2):162–8.
- [56] Joshi S., Kumari R., Upasani V.N. (2018). Applications of algae in cosmetics: An overview. *Int. J. Innov. Res. Sci. Eng. Technol* 7(2):1269.
- [57] Pulz O., Gross W. (2004). Valuable products from biotechnology of microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology* 65(6):635–48.
- [58] Morais M.G. de, Vaz B.d.S., Morais E.G. de, Costa J.A.V., Genilloud O. (2015). Biologically Active Metabolites Synthesized by Microalgae. *BioMed Research International* 2015:835761.
- [59] Lognone V. (2003). Algen in der Tierernährung. *Lohmann Information*(3):1–4.
- [60] Pooja S. (2014). Algae used as medicine and food-a short review. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* 6(1):33.
- [61] Anis M., Ahmed S., Hasan M. (2017). Algae as nutrition, medicine and cosmetic: The forgotten history, present status and future trends. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 6(6):1934–59.
- [62] Hallmann A. (2007). Algal transgenics and biotechnology. *Transgenic Plant J* 1(1):81–98.
- [63] Chapman R.L. (2013). Algae: The world's most important “plants”—an introduction. *Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change* 18(1):5–12.
- [64] Wolkers H., Barbosa M.J., Kleinegris D.M.M., Bosma R., Wijffels R.H., Harmsen P.F.H. (2011). Microalgae: The green gold of the future?: large-scale sustainable cultivation of microalgae for the production of bulk commodities, Wageningen.
- [65] Milledge J.J., Smith B., Dyer P.W., Harvey P. (2014). Macroalgae-Derived Biofuel: A Review of Methods of Energy Extraction from Seaweed Biomass. *Energies* 7(11):7194–222.
- [66] Taboada M.C., Millán R., Miguez M.I. (2013). Nutritional value of the marine algae wakame (*Undaria pinnatifida*) and nori (*Porphyra purpurea*) as food supplements. *Journal of Applied Phycology* 25(5):1271–6.
- [67] Zhao Y., Zheng Y., Wang J., Ma S., Yu Y., White W.L. et al. (2018). Fucoidan extracted from *Undaria pinnatifida*: Source for nutraceuticals/functional foods. *Mar Drugs* 16(9):321.
- [68] Pangestuti R., Kim S.-K. (2015). An Overview of Phycocolloids: The Principal Commercial Seaweed Extracts: 19. In: *Marine Algae Extracts*: John Wiley & Sons, Ltd:319–30.
- [69] Chandkrachang S. (1996). An overview of seaweed processing technology for *Gracilaria* with reference to agar yield and quality. In: *Food and Agriculture Organization (of the United Nations) Network of Aquaculture Centres in Asia-Pacific*, editor. *Report on Regional Study and Workshop on the Taxonomy, Ecology and Processing of Economically Important Red Seaweeds*. Bangkok, Thailand:319.
- [70] Harding S.E., Tombs M.P., Adams G.G., Paulsen B.S., Inngjerdigen K.T., Barsett H. (2017). *An introduction to polysaccharide biotechnology*, CRC Press, Boca Raton, Florida.

- [71] Silva T., Alves A., Popa E., Reys L., Gomes M., A Sousa R. et al. (2012). Marine algae sulfated polysaccharides for tissue engineering and drug delivery approaches. *Biomatter* 2(4):278–89.
- [72] Rasala B.A., Mayfield S.P. (2015). Photosynthetic biomanufacturing in green algae; production of recombinant proteins for industrial, nutritional, and medical uses. *Photosynthesis Research* 123(3):227–39.
- [73] Li Z.-y., Yu C.-H., Lin Y.-T., Su H.-L., Kan K.-W., Liu F.-C. et al. (2019). The Potential Application of Spring *Sargassum glaucescens* Extracts in the Moisture-Retention of Keratinocytes and Dermal Fibroblast Regeneration after UVA-Irradiation. *Cosmetics* 6(1):17.
- [74] Abdel-Raouf N., Al-Homaidan A.A., Ibraheem I.B.M. (2012). Microalgae and wastewater treatment. *Saudi Journal of Biological Sciences* 19(3):257–75.
- [75] Liu X., Clarens A.F., Colosi L.M. (2012). Algae biodiesel has potential despite inconclusive results to date. *Bioresource Technology* 104:803–6.
- [76] Dokulil M.T. (2003). Chapter 9 Algae as ecological bio-indicators. In: Markert B.A., Breure A.M., Zechmeister H.G., editors. *Bioindicators & Biomonitors*: Elsevier:285–327.
- [77] Safinaz A.F., Ragaa A.H. (2013). Effect of some red marine algae as biofertilizers on growth of maize (*Zea mayz* L.) plants. *International food research journal* 20(4):1629.
- [78] Hungerford J.J. (1988). Diatoms: The Ignored Alga in High School Biology. *The American Biology Teacher* 50(7):449.
- [79] Pan Y., Wang W., Liu L., Ge H., Song L., Hu Y. (2017). Influences of metal ions crosslinked alginate based coatings on thermal stability and fire resistance of cotton fabrics. *Carbohydrate Polymers* 170:133–9.
- [80] Zhang F.-Q., Wang B., Xu Y.-J., Li P., Liu Y., Zhu P. (2020). Convenient blending of alginate fibers with polyamide fibers for flame-retardant non-woven fabrics. *Cellulose* 27(14):8341–9.
- [81] Strub J.R., Kern M., Türp J.C., Witkowski S., Heydecke G., Wolfart S. (2019). *Curriculum Prothetik: Band 2*, Quintessenz Verlag, Berlin.
- [82] Cervino G., Fiorillo L., Herford A.S., Laino L., Troiano G., Amoroso G. et al. (2018). Alginate Materials and Dental Impression Technique: A Current State of the Art and Application to Dental Practice. *Mar Drugs* 17(1):18.
- [83] Barnett S.E., Varley S.J. (1987). The effects of calcium alginate on wound healing. *Ann R Coll Surg Engl* 69(4):153–5.
- [84] Mandel K.G., Daggy B.P., Brodie D.A., Jacoby H.I. (2000). Review article: Alginate-raft formulations in the treatment of heartburn and acid reflux. *Alimentary pharmacology & therapeutics* 14(6):669–90.
- [85] Pausch T., Wagner W., Nölken R. (2018). Neues biphasisches Knochenersatzmaterial zur periimplantären Defektaugmentation: Erste klinische, radiologische und histologische Ergebnisse. *Implantologie* 26(3):1–12.

- [86] Schopper C., Moser D., Sabbas A., Lagogiannis G., Spassova E., König F. et al. (2003). The Fluorohydroxyapatite (FHA) FRIOS Aligpore Is a Suitable Biomaterial for the Reconstruction of Severely Atrophic Human Maxillae. *Clinical Oral Implants Research* 14(6):743–9.
- [87] Galindo-Moreno P., Padial-Molina M., Lopez-Chaichio L., Gutiérrez-Garrido L., Martín-Morales N., O'Valle F. (2020). Algae-derived hydroxyapatite behavior as bone biomaterial in comparison with anorganic bovine bone: A split-mouth clinical, radiological, and histologic randomized study in humans. *Clinical Oral Implants Research* 31(6):536–48.
- [88] Hentati F., Delattre C., Ursu A.V., Desbrières J., Le Cerf D., Gardarin C. et al. (2018). Structural characterization and antioxidant activity of water-soluble polysaccharides from the Tunisian brown seaweed *Cystoseira compressa*. *Carbohydrate Polymers* 198:589–600.
- [89] Kosanić M., Ranković B., Stanojković T. (2015). Biological potential of marine macroalgae of the genus *Cystoseira*. *Acta Biologica Hungarica* 66(4):374–84.
- [90] Hadj Ammar H., Lajili S., Ben Said R., Le Cerf D., Bouraoui A., Majdoub H. (2015). Physico-chemical characterization and pharmacological evaluation of sulfated polysaccharides from three species of Mediterranean brown algae of the genus *Cystoseira*. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences* 23(1):1.
- [91] Güner A., Köksal Ç., Erel Ş.B., Kayalar H., Nalbantsoy A., Sukatar A. et al. (2015). Antimicrobial and antioxidant activities with acute toxicity, cytotoxicity and mutagenicity of *Cystoseira compressa* (Esper) Gerloff & Nizamuddin from the coast of Urla (Izmir, Turkey). *Cytotechnology* 67(1):135–43.
- [92] Shreadah M.A., Abd El Moneam N.M., Al-Assar S.A., Nabil-Adam A. (2018). Phytochemical and pharmacological screening of *Sargassum vulgare* from Suez Canal, Egypt. *Food science and biotechnology* 27(4):963–79.
- [93] Ozgun S., Turan F., Çinar M.E., Bakir K., Öztürk B., Katağan T. et al. (2015). Biochemical composition of some brown algae from Iskenderun Bay, the northeastern Mediterranean coast of Turkey. *Journal of Black Sea/Mediterranean Environment* 21(2):125–34.
- [94] Liu L., Heinrich M., Myers S., Dworjanyan S.A. (2012). Towards a better understanding of medicinal uses of the brown seaweed *Sargassum* in Traditional Chinese Medicine: A phytochemical and pharmacological review. *Journal of Ethnopharmacology* 142(3):591–619.
- [95] Dore C.M.P.G., Alves M.G.d.C.F., Will L.S.E.P., Costa T.G., Sabry D.A., Rêgo L.A.R.d.S. et al. (2013). A sulfated polysaccharide, fucans, isolated from brown algae *Sargassum vulgare* with anticoagulant, antithrombotic, antioxidant and anti-inflammatory effects. *Carbohydrate Polymers* 91(1):467–75.
- [96] Mhadhebi L., Mhadhebi A., Robert J., Bouraoui A. (2014). Antioxidant, Anti-inflammatory and Antiproliferative Effects of Aqueous Extracts of Three Mediterranean Brown Seaweeds of the Genus *Cystoseira*. *Iran J Pharm Res* 13(1):207–20.

- [97] López A., Rico M., Rivero A., Tangil M.S.d. (2014). A study of marine algae from Gran Canaria as source of polyphenols, IMEPA 2014, Las Palmas, Gran Canaria.
- [98] Oumaskour K., Boujaber N., Etahiri S., Assobhel O. (2013). Anti-Inflammatory and Antimicrobial Activities of Twenty-Three Marine Algae from the Coast of SidiBouزيد (El Jadida-Morocco). *Int. J. Pharm. Pharm. Sci* 5:145–9.
- [99] Kamenarska Z., Serkedjieva J., Najdenski H., Stefanov K., Tsvetkova I., Dimitrova-Konaklieva S. et al. (2009). Antibacterial, antiviral, and cytotoxic activities of some red and brown seaweeds from the Black Sea. *Botanica Marina* 52(2009):80–6.
- [100] Ghalem B.R., Zouaoui B. (2018). Antibacterial activity of diethyl ether and chloroform extracts of seaweeds against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Int J Avian & Wildlife Biol* 3(4):310–3.
- [101] Gheda S., Naby M.A., Mohamed T., Pereira L., Khamis A. (2021). Antidiabetic and antioxidant activity of phlorotannins extracted from the brown seaweed *Cystoseira compressa* in streptozotocin-induced diabetic rats. *Environmental Science and Pollution Research*.
- [102] Nabil-Adam A., Shreadah M.A. (2021). Anti-inflammatory, Antioxidant, Lung and Liver Protective Activity of *Galaxaura oblongata* as Antagonistic Efficacy against LPS using Hematological Parameters and Immunohistochemistry as Biomarkers. *Cardiovascular & Hematological Agents in Medicinal Chemistry*.
- [103] Payá M., Ferrándiz M.L., Sanz M.J., Bustos G., Blasco R., Rios J.L. et al. (1993). Study of the antioedema activity of some seaweed and sponge extracts from the mediterranean coast in mice. *Phytotherapy Research* 7(2):159–62.
- [104] Huang H.-L., Wu S.-L., Liao H.-F., Jiang C.-M., Huang R.-L., Chen Y.-Y. et al. (2005). Induction of Apoptosis by Three Marine Algae through Generation of Reactive Oxygen Species in Human Leukemic Cell Lines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53(5):1776–81.
- [105] Johnson P.T.J., Townsend A.R., Cleveland C.C., Glibert P.M., Howarth R.W., McKenzie V.J. et al. (2010). Linking environmental nutrient enrichment and disease emergence in humans and wildlife. *Ecological Applications* 20(1):16–29.
- [106] Bhadury P., Wright P.C. (2004). Exploitation of marine algae: Biogenic compounds for potential antifouling applications. *Planta* 219(4):561–78.
- [107] Sayin S., Kohlhaas T., Veziroglu S., Okudan E.Ş., Naz M., Schröder S. et al. (2020). Marine Algae-PLA composites as de novo alternative to porcine derived collagen membranes. *Materials Today Chemistry* 17:100276.
- [108] Lee M.W., Han S.O., Seo Y.B. (2008). Red algae fibre/poly(butylene succinate) biocomposites: The effect of fibre content on their mechanical and thermal properties. *Composites Science and Technology* 68(6):1266–72.
- [109] Sim K.J., Han S.O., Seo Y.B. (2010). Dynamic mechanical and thermal properties of red algae fiber reinforced poly(lactic acid) biocomposites. *Macromolecular Research* 18(5):489–95.

- [110]Wu T.-Y., Yang M.-C., Hsu Y.-C. (2015). Improvement of cytocompatibility of polylactide by filling with marine algae powder. *Materials Science and Engineering: C* 50:309–16.
- [111]Hebbar R.S., Isloor A.M., Ismail A.F. (2017). Chapter 12 - Contact Angle Measurements. In: Hilal N., Ismail A.F., Matsuura T., Oatley-Radcliffe D., editors. *Membrane Characterization*: Elsevier:219–55.
- [112]Schor S.L. (1979). The effects of EGTA and trypsin on the serum requirements for cell attachment to collagens. *Journal of Cell Science* 40(1):271–9.
- [113]Schlegel A.K., Möhler H., Busch F., Mehl A. (1997). Preclinical and clinical studies of a collagen membrane (Bio-Gide®). *Biomaterials* 18(7):535–8.
- [114]Tawil G., El-Ghoule G., Mawla M. (2001). Clinical evaluation of a bilayered collagen membrane (Bio-Gide) supported by autografts in the treatment of bone defects around implants. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* 16(6):857–63.
- [115]Zitzmann N.U., Naef R., Schärer P. (1997). Resorbable versus nonresorbable membranes in combination with Bio-Oss for guided bone regeneration. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* 12(6):844–52.
- [116]Fishman J.A. (2018). Infectious disease risks in xenotransplantation. *American Journal of Transplantation* 18(8):1857–64.
- [117]Calciolari E., Ravanetti F., Strange A., Mardas N., Bozec L., Cacchioli A. et al. (2018). Degradation pattern of a porcine collagen membrane in an in vivo model of guided bone regeneration. *Journal of Periodontal Research* 53(3):430–9.
- [118]Garlini G., Redemagni M., Canciani E., Dellavia C. (2014). Maxillary sinus floor augmentation with vegetal hydroxyapatite “versus” demineralized bovine bone: A randomized clinical study with a split-mouth design. *Journal of Dental Implants* 4(2):118–25.
- [119]Kim S.-K., Chojnacka K. (2015). *Marine algae extracts: Processes, products, and applications*, John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey.
- [120]Chiellini E., Cinelli P., Ilieva V.I., Martera M. (2008). Biodegradable Thermoplastic Composites Based on Polyvinyl Alcohol and Algae. *Biomacromolecules* 9(3):1007–13.
- [121]Balaji A.B., Pakalapati H., Khalid M., Walvekar R., Siddiqui H.). Natural and synthetic biocompatible and biodegradable polymers. In: Navinchandra Gopal Shimpi, editor. *Biodegradable and Biocompatible Polymer Composites: Processing, Properties and Applications*. A volume in Woodhead Publishing Series in Composites Science and Engineering:3–32.
- [122]Gogolewski S., Jovanovic M., Perren S.M., Dillon J.G., Hughes M.K. (1993). Tissue response and in vivo degradation of selected polyhydroxyacids: Polylactides (PLA), poly(3-hydroxybutyrate) (PHB), and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHB/VA). *Journal of Biomedical Materials Research* 27(9):1135–48.
- [123]Silva D.d., Kaduri M., Poley M., Adir O., Krinsky N., Shainsky-Roitman J. et al. (2018). Biocompatibility, biodegradation and excretion of polylactic acid (PLA) in medical implants and theranostic systems. *Chemical Engineering Journal* 340:9–14.

- [124]Pizzoferrato A., Ciapetti G., Stea S., Cenni E., Arciola C.R., Granchi D. et al. (1994). Cell culture methods for testing Biocompatibility. *Clinical Materials* 15(3):173–90.
- [125]Açıl Y., Arndt M.L., Gülses A., Wieker H., Naujokat H., Ayna M. et al. (2018). Cytotoxic and inflammatory effects of alendronate and zoledronate on human osteoblasts, gingival fibroblasts and osteosarcoma cells. *J Craniomaxillofac Surg* 46(4):538–46.
- [126]Arndt M.-L. (2019). Charakterisierung der Entzündungsreaktion und Apoptosemechanismen bei der bisphosphonatassoziierten Osteonekrose des Kiefers zur Therapieoptimierung. Med. Diss., Christian-Albrechts Universität Kiel.
- [127]Ignatius A.A., Claes L.E. (1996). In vitro biocompatibility of bioresorbable polymers: Poly(L, DL-lactide) and poly(L-lactide-co-glycolide). *Biomaterials* 17(8):831–9.
- [128]Grigoriev T.E., Bukharova T.B., Vasilyev A.V., Leonov G.E., Zagoskin Y.D., Kuznetsova V.S. et al. (2018). Effect of Molecular Characteristics and Morphology on Mechanical Performance and Biocompatibility of PLA-Based Spongy Scaffolds. *BioNanoScience* 8(4):977–83.
- [129]Kasaj A., Reichert C., Götz H., Röhrig B., Smeets R., Willershausen B. (2008). In vitro evaluation of various bioabsorbable and nonresorbable barrier membranes for guided tissue regeneration. *Head & Face Medicine* 4(1):22.
- [130]Wu C.-S. (2015). Preparation, characterisation, and controlled-release of biodegradable polyester and marine-algae composite. *Journal of Polymers and the Environment* 23(3):356–66.
- [131]Veziroglu S., Ayna M., Kohlhaas T., Sayin S., Fiutowski J., Mishra Y.K. et al. (2021). Marine Algae Incorporated Polylactide Acid Patch: Novel Candidate for Targeting Osteosarcoma Cells without Impairing the Osteoblastic Proliferation. *Polymers* 13(6):847.
- [132]Wei J., Igarashi T., Okumori N., Igarashi T., Maetani T., Liu B. et al. (2009). Influence of surface wettability on competitive protein adsorption and initial attachment of osteoblasts. *Biomedical Materials* 4(4):45002.
- [133]Lee J.H., Khang G., Lee J.W., Lee H.B. (1998). Interaction of Different Types of Cells on Polymer Surfaces with Wettability Gradient. *Journal of Colloid and Interface Science* 205(2):323–30.
- [134]Tamada Y., Ikada Y. (1994). Fibroblast growth on polymer surfaces and biosynthesis of collagen. *Journal of Biomedical Materials Research* 28(7):783–9.
- [135]Sheng Y.-J., Jiang S., Tsao H.-K. (2007). Effects of geometrical characteristics of surface roughness on droplet wetting. *The Journal of Chemical Physics* 127(23):234704.
- [136]Reichstein W., Sommer L., Veziroglu S., Sayin S., Schröder S., Mishra Y.K. et al. (2021). Initiated Chemical Vapor Deposition (iCVD) Functionalized Polylactic Acid–Marine Algae Composite Patch for Bone Tissue Engineering. *Polymers* 13(2):186.
- [137]Rochas C., Lahaye M., Yaphe W. (1986). Sulfate content of carrageenan and agar determined by infrared spectroscopy. *Bot. mar* 29(4):335–40.

- [138]Kačuráková M., Capek P., Sasinková V., Wellner N., Ebringerová A. (2000). FT-IR study of plant cell wall model compounds: Pectic polysaccharides and hemicelluloses. *Carbohydrate Polymers* 43(2):195–203.
- [139]Sekkal M., Legrand P., Huvenne J.P., Verdus M.C. (1993). The use of FTIR microspectrometry as a new tool for the identification in situ of polygalactanes in red seaweeds. *Journal of Molecular Structure* 294:227–30.
- [140]Chen H.-M., Gao Y., Yan X.-J. (2011). [Carrageenan oligosaccharides inhibit growth-factor binding and heparanase activity]. *Yao xue xue bao = Acta pharmaceutica Sinica* 46(3):280–4.
- [141]Cai Y., Lv J., Feng J. (2013). Spectral Characterization of Four Kinds of Biodegradable Plastics: Poly (Lactic Acid), Poly (Butylenes Adipate-Co-Terephthalate), Poly (Hydroxybutyrate-Co-Hydroxyvalerate) and Poly (Butylenes Succinate) with FTIR and Raman Spectroscopy. *Journal of Polymers and the Environment* 21(1):108–14.
- [142]Murdock J.N., Wetzel D.L. (2009). FT-IR Microspectroscopy Enhances Biological and Ecological Analysis of Algae. *Applied Spectroscopy Reviews* 44(4):335–61.
- [143]Gepp M.M., Fischer B., Schulz A., Dobringer J., Gentile L., Vásquez J.A. et al. (2017). Bioactive surfaces from seaweed-derived alginates for the cultivation of human stem cells. *Journal of Applied Phycology* 29(5):2451–61.
- [144]Clifford C.J., Downes S. (1996). A comparative study of the use of colorimetric assays in the assessment of biocompatibility. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 7(10):637–43.
- [145]Geckeler K.E., Wacker R., Aicher W.K. (2000). Biocompatibility correlation of polymeric materials using human osteosarcoma cells. *Naturwissenschaften* 87(8):351–4.
- [146]Broadhead M.L., Clark J.C.M., Myers D.E., Dass C.R., Choong P.F.M., Kovar H. (2011). The Molecular Pathogenesis of Osteosarcoma: A Review. *Sarcoma* 2011:959248.
- [147]Sousa A.P.A.d., Torres M.R., Pessoa C., Moraes M.O.d., Filho F.D.R., Alves A.P.N.N. et al. (2007). In vivo growth-inhibition of Sarcoma 180 tumor by alginates from brown seaweed *Sargassum vulgare*. *Carbohydrate Polymers* 69(1):7–13.
- [148]Tannoury M., Elia J.M., Am Saab, Makhlof H.Y., Abboud J.S., Daou-Chabo R.J. et al. (2016). Evaluation of cytotoxic activity of *Sargassum vulgare* from the Lebanese coast against Jurkat cancer cell line. *J App Pharm Sci* 6(6):108–12.
- [149]Minetti M., Bernardini G., Biazzo M., Gutierrez G., Geminiani M., Petrucci T. et al. (2019). Padina pavonica Extract Promotes In Vitro Differentiation and Functionality of Human Primary Osteoblasts. *Mar Drugs* 17(8):473.
- [150]Yoon W.-J., Heo S.-J., Han S.-C., Lee H.-J., Kang G.-J., Yang E.-J. et al. (2012). Sargachromanol G regulates the expression of osteoclastogenic factors in human osteoblast-like MG-63 cells. *Food and Chemical Toxicology* 50(9):3273–9.
- [151]Naddeo P., Laino L., La Noce M., Piattelli A., Rosa A.D., Iezzi G. et al. (2015). Surface biocompatibility of differently textured titanium implants with mesenchymal stem cells. *Dental Materials* 31(3):235–43.

- [152]Haghshenas V., Kafei R., Tahmasebi R., Dobaradaran S., Hashemi S., Sahebi S. et al. (2020). Potential of green/brown algae for monitoring of metal(loid)s pollution in the coastal seawater and sediments of the Persian Gulf: Ecological and health risk assessment. *Environmental Science and Pollution Research* 27(7):7463–75.
- [153]Su L., Shi W., Chen X., Meng L., Yuan L., Chen X. et al. (2021). Simultaneously and quantitatively analyze the heavy metals in *Sargassum fusiforme* by laser-induced breakdown spectroscopy. *Food Chemistry* 338:127797.

Danksagung

Mein Dank gilt PD Dr. Gülses für das Überlassen des Themas und die Möglichkeit der Durchführung dieser Arbeit. Sein Engagement, die gute Kommunikation und vor allem die schnellen Rückmeldungen waren sehr hilfreich bei dem Verfassen dieser Arbeit.

Prof. Dr. Açıllı danke ich für seine Unterstützung und die schnellen Korrekturen sowie die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Prof. Dr. Dr. Wiltfang möchte ich, für die Möglichkeit diese Arbeit wissenschaftlich an der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein Campus Kiel durchführen zu können, danken.

Darüber hinaus danke ich Prof Dr. Faupel, Prof. Dr. Aktas und ihrem Team (Abteilung: Chair for Multicomponent Materials) des Institute of Materials Science der Fakultät für Ingenieurwissenschaften der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel für Ihre gute Zusammenarbeit und die Durchführung der materialtechnischen Untersuchungen.

Ein besonderer Dank gilt den Mitarbeitern der wissenschaftlichen Abteilung der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie und der Zahnärztlichen Prothetik, Propädeutik und Werkstoffkunde des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein Campus Kiel. Frau Neßenius danke ich für Ihre Unterstützung bei der Einführung zur Benutzung der technischen Geräte, Ihre fachliche Anleitung für die Durchführung der Biokompatibilitätsuntersuchungen sowie Ihre hilfsbereite und freundschaftliche Unterstützung. Herrn Lehmann danke ich für die Einführung in die Rasterelektronenmikroskopie und Hilfsbereitschaft bei jeglichen Rückfragen.

Ebenso gilt mein Dank Herrn Dr. Johannes Spille, der die Zusammenarbeit mit PD Dr. Gülses möglich gemacht hat.

Ganz besonders danken möchte ich meinen Eltern für die bedingungslose Unterstützung, Ihre ehrlichen Meinungen und das Vertrauen in meine Entscheidungen.

Zum Schluss möchte ich mich bei meiner Schwester und meinen Freunden für Ihre mentale Unterstützung sowie das Korrekturlesen bedanken.

Aus dieser Dissertation hervorgegangene Publikationen

Sayin S., **Kohlhaas T.**, Veziroglu S., Okudan E.Ş., Naz M., Schröder S., Saygili E.I., Açil Y., Faupel F., Wiltfang J., Aktas O.C., Gülses A. (2020). Marine Algae-PLA composites as de novo alternative to porcine derived collagen membranes. *Materials Today Chemistry* 17:100276. (Impact Factor: 8.3)

Veziroglu S., Ayna M., **Kohlhaas T.**, Sayin S., Fiutowski J., Mishra Y.K., Karayürek F., Naujokat H., Saygili E.I., Açil Y., Wiltfang J., Faupel F., Aktas O.C., Gülses A. (2021). Marine Algae Incorporated Polylactide Acid Patch: Novel Candidate for Targeting Osteosarcoma Cells without Impairing the Osteoblastic Proliferation. *Polymers* 13(6):847. (Impact Factor: 4.329)

Eidesstattliche Versicherung

Ich, Theresa Ariadne Leoni Kohlhaas, geb. in Bonn, versichere hiermit an Eides Statt, dass meine Dissertation, abgesehen von Ratschlägen meines Betreuers und meiner sonstigen akademischen Lehrer, nach Form und Inhalt meine eigene Arbeit ist, dass ich keine anderen als die in der Arbeit aufgeführten Quellen und Hilfsmittel benutzt habe, und dass meine Arbeit bisher keiner anderen akademischen Stelle als Dissertation vorgelegen hat, weder ganz noch in Teilen.

Datum, Unterschrift Doktorand*in