

1 Einleitung

1.1 Hyaliner Knorpel

1.1.1 Allgemeines

Hyaliner Knorpel spielt durch seine druckelastischen Eigenschaften eine herausragende Rolle in der Beschaffenheit und Funktionalität des humanen Skelett- und Stützsystems. Hyaliner Knorpel ist die Knorpelart, welche im humanen Organismus überwiegt. In frischem Zustand nimmt er eine bläulich opaleszierende Erscheinung an. Der Gelenkknorpel des Menschen ist je nach Topografie unterschiedlich dick. Im Bereich der Patella kann er eine Schichtdicke von 7 bis 8 mm erreichen. Er ermöglicht ein reibungsfreies Gleiten der artikulierenden Gelenkkörper und eine Spannungsverteilung an den kraftaufnehmenden Flächen. Diese Eigenschaften beruhen auf einer besonderen Morphologie der Chondrozyten und der Produktion extrazellulärer Matrix. Die Belastungen dieses Gewebes sind speziell im Menschen durch den aufrechten Gang sehr hoch und führen sehr häufig zu degenerativen Erkrankungen des Gelenks und einer Zerstörung der Architektur des Knorpelgewebes⁶⁵. An Stellen des Knorpels, wo hohe Kräfte auftreten, zeigen kollagene Fasern besonders präzise und stetige Orientierungen, was die hohe Widerstandsfähigkeit, Zug- und Druckfestigkeit (1,5 kg/mm²) erklärt^{5,83}. Das ermöglicht diesem Gewebe Belastungskräfte zu tolerieren, die ein Vielfaches des Körpereigengewichts betragen können. Der Knorpel ist ein gefäßfreies Gewebe. Seine Ernährung erfolgt ausschließlich durch Diffusion mit Hilfe der in der Gelenkhöhle vorhandenen Synovia und dem gut durchbluteten subchondralen Knochen⁴⁸.

1.1.2 Extrazelluläre Matrix

Der Anteil der Knorpelzellen in den unterschiedlich strukturierten Zonen des Gelenkknorpels variiert und beträgt zwischen 1 bis 10% der gesamten Knorpelmasse. Knorpel ist somit ein relativ zellarmes Gewebe. Das Kollagengerüst, in welches vor allem hochmolekulare Proteoglykane, wie das knorpeltypische

Aggrekan, eingelagert sind, besteht zu über 90% aus Kollagen vom Typ II. In wesentlich geringerem Anteil sind auch Kollagene vom Typ III, VI, IX, X und XI zu finden. Von den Glykosaminoglykanen findet man Chondroitin-4-Sulfat und Keratansulfat im Knorpel⁸. Die Struktur dieser Matrix ermöglicht eine besondere Druckfestigkeit, vor allem durch die hohe Wasserbindungskapazität der Glykosaminoglykane⁹⁶. Etwa 15-25% des Trockengewichts beim Knorpel besteht aus Kollagen Typ II⁷¹. Eine biochemische Besonderheit dieses Kollagenmoleküls ist dessen Aufbau aus drei identischen α 1-Ketten. Die Primärstruktur dieser α -Ketten besteht häufig aus dem Triplett Glyzin (33,5%), Prolin (12%) und Hydroxyprolin (10%)⁵⁰. Kollagen Typ X wird nur in hypertrophen Chondrozyten gebildet, die für die Kalzifizierung bestimmt sind^{58,89}. Dieses Kollagen ist in der Lage Kalziumionen zu binden und begünstigt dadurch offenbar Kalkeinlagerungen im Knorpel bei der Ossifikation⁵⁴. Kollagen Typ IX kann selbst keine Fibrillen bilden, ist aber quervernetzt mit Typ II Kollagenfibrillen²⁸. Eine Besonderheit ist die große N-terminale globuläre Domäne. Sie ist möglicherweise Angriffspunkt von humoralen Immunreaktivitäten bei Knorpeltransplantationen¹⁵. Auch Kollagen Typ XI ist vermutlich ein integraler Bestandteil der Typ II Fibrillen⁶⁶. Die Fibrillen des Knorpelgewebes sind demnach ein Gemisch aus Typ II, Typ IX und Typ XI Kollagen.

Die Glykosaminoglykane Chondroitin-4-sulfat und Chondroitin-6-sulfat erhöhen die Bildung von Kristallisationskernen des Kollagens. Entlang der einzelnen Kollagenmoleküle befinden sich in periodischen Abständen von 67 nm geladene und hydrophobe Aminosäuren. Daraus ergibt sich die gestaffelte Anordnung in einer 67 nm Periodizität in den Kollagenfibrillen, wie sie im Elektronenmikroskop in Form einer Querstreifung sichtbar wird⁵⁰. Insgesamt erfordert die Kollagensynthese eine strenge Kontrolle hinsichtlich des Kollagentyps, der Menge und der Qualität der einzelnen Kollagenmoleküle, um die spezifischen Eigenschaften der Kollagenfasern zu erhalten⁷⁵.

Proteoglykane und Hyaluronsäure sind die Hauptbestandteile der extrazellulären Matrix⁶¹. Proteoglykane bestehen jeweils aus einem Kernprotein und meist über 100 Glykosaminoglykanen und können mit Hilfe von Linkproteinen über nichtkovalente

Bindung an die langkettige Hyaluronsäure riesige Aggregate mit Molekulargewichten von über 100 Millionen Dalton bilden (Abb. 2, siehe Anhang, Kapitel 6.1). Die Hyaluronsäure kann wiederum über das CD44 Glykoprotein an die Zelle binden³. In Abwesenheit der Linkproteine wären die Aggregate kleiner und weniger stabil⁷⁴. Neu synthetisierte Proteoglykane formen nicht sofort stabile Aggregate, sondern "reifen" erst einige Zeit, bevor sie derartige Strukturen bilden⁴. Die Aggregation schränkt die Beweglichkeit innerhalb des Fasernetzwerkes ein und sorgt für eine hohe Konzentration der Proteoglykane im Gewebe⁴⁰.

1.1.3 Differenzierung und Dedifferenzierung von Knorpelgewebe

Die mesenchymalen Vorläuferzellen der Chondrozyten ähneln ihrer Gestalt nach Fibroblasten und synthetisieren Typ I und Typ III Kollagen, Fibronectin und knorpelspezifische Proteoglykane²³. Die Differenzierung der Chondroblasten zeigt sich zunächst in einer hohen mRNA Synthese für Kollagen Typ II. Dieser Kollagentyp wird schließlich in großen Mengen im extrazellulären Raum abgelagert und trennt langsam die Zellen bzw. Chondrone räumlich voneinander, während Kollagen Typ I und Fibronectin allmählich verschwinden. Ein weiteres Stadium in der Entwicklungslinie der Chondrozyten ist gekennzeichnet durch hypertrophe Chondrozyten⁷⁹. In dieser späten Phase der Hypertrophie nimmt die Kollagen Typ II Synthese ab, stattdessen findet man vermehrt Kollagen Typ I (Abb. 3). Der Kollagen-Phänotyp gibt also zuverlässig Auskunft über den Differenzierungsgrad.

Chondrozyten sind im Knorpelgewebe der Gelenke in ihrer Differenzierungsstufe fixiert und zeigen deshalb nur eine sehr geringe Stoffwechselaktivität und kaum Zellteilung. Anders ist das Verhalten in Monolayer-Kulturen. Der Phänotyp der Chondrozyten erweist sich in Kultur sehr instabil. Die Zellen verlieren in kurzer Zeit ihre normale runde Form und gleichen dann morphologisch Fibroblasten. Ebenso verlieren sie die typische Eigenschaft der Knorpelzellen, nämlich die Synthese von Kollagen Typ II⁷. Statt dessen produzieren die Zellen dann die für Knorpel untypischen Kollagene Typ I und Typ III und Fibronectin²². Derart in vitro veränderte Knorpelzellen bezeichnet man als dedifferenzierte Chondrozyten (englisch: fibroblast

like cells). Es sind eine Reihe von Faktoren bekannt, durch die dieser Dedifferenzierungsprozess induziert oder beschleunigt wird. Dazu gehören insbesondere Fibronectin, Vitamin A und Interleukin 1^{33,41,105}. Andererseits kann man durch geeignete Kulturbedingungen diesen phänotypischen Veränderungen entgegenwirken. Die Synthese von Kollagen Typ II bleibt über lange Zeit erhalten, wenn die Chondrozyten in einem Gel, z.B. aus Agarose oder Kollagen, kultiviert werden^{44,53}.

1.1.4 Heilung und Regeneration von Knorpel

Das Potential zur Regeneration von beschädigtem Gelenkknorpel ist sehr limitiert und Defekte, die größer als 2-4 mm im Durchmesser sind, heilen selten⁴⁷. Bei Verletzungen des Knorpels proliferieren die Zellen des Perichondriums, die zur Läsion migrieren und sie ausfüllen. Eine Metaplasie dieser Mesenchymzellen zu Chondrozyten findet aber nur sehr langsam und in sehr geringem Umfang statt. Es gibt vier Möglichkeiten beschädigten oder untergegangenen Gelenkknorpel zu behandeln: Wiederherstellen, Ersetzen, Entlasten oder Entfernen. Knorpel wiederherzustellen, schließt seine Oberfläche, dessen hyaline Struktur und den subchondralen Knochen ein. Ihn zu ersetzen kann mit Hilfe von Transplantaten oder Prothesen erreicht werden. Mittels einer Osteotomie wird die Gelenkoberfläche entlastet und die Spannung auf sie sinkt¹. Für die Wiederherstellung des Knorpel gibt zwei grundsätzliche Möglichkeiten. Erstens durch Steigern der intrinsischen Kapazität des Knorpels oder alternativ durch Regenerieren einer neuen Gelenkoberfläche, durch das Transplantieren von Chondrozyten, chondrogenen Zellen oder Geweben, die das Potential zur Bildung neuen Knorpels haben. Eine Steigerung der intrinsischen Heilung kann durch Rekrutierung von pluripotenten Zellen aus dem Knochenmark, durch mechanische, elektrische, durch Laser oder andere Stimuli erreicht werden^{52,62,85}. Aktueller sind Untersuchungen mittels Einsatz von Wachstumsfaktoren und Zytokinen. Der Einsatz durch einfache Injektion solcher Faktoren führt aber auch zu Problemen, wie Osteophytenbildung und Synovitis, induziert durch TGF- β 1 und TGF- β 2^{27,99}. Eine andere Möglichkeit ist der Einsatz von Gerüsten und Materialien, um gezielt den Defekt zu behandeln. Diese können z.B.

mit Wachstumsfaktoren oder Zellen beladen sein⁸⁴. Gelenkplastiken, die mit Hilfe von Periost-Transplantaten am subchondralen Knochen von Kaninchen durchgeführt worden sind, erzielten eine gute Wiederherstellung der Defekte⁷⁸. Periost enthält pluripotente mesenchymale Stammzellen mit dem Potential entweder Knochen oder Knorpel zu bilden. Weil es als ganzes Gewebe transplantiert werden kann, besteht die Möglichkeit seine eigene Matrix als Träger für andere Zellen und Wachstumsfaktoren zu benutzen⁷⁷. Ebenso wurden Erfolge mit perichondralen Transplantaten erzielt⁴².

1.2 Knochenzemente

1.2.1 Historische Entwicklung

Bereits 1893 versuchte Stachow Knochendefekte mit einem formbaren und in situ aushärtenden Material auszufüllen⁹⁵. Dabei kamen unter anderem Zement, geschmolzenes Zinn, Gutapercha-Zahnkitt und Kupferamalgam im Tierversuch zum Einsatz. Zement erwies sich dabei als das beste Material. „Gips als Plombenmaterial“ beim Menschen wurde 1925 von S. Kofmann erfolgreich eingesetzt⁵⁵. Schließlich wurde auch Polymethylmetacrylat (PMMA) zur Verankerung von Gelenkimplantaten und Auffüllung von großen Defekten im Knochen entwickelt⁷².

Ein ideales Ersatzmaterial muss eine gute Verbindung zum vorhandenen Knochen eingehen, damit keine Lockerung auftritt. Unter diesen Bedingungen wurden in der Vergangenheit ionomere Zemente geprüft, die eine verbesserte Knochen-Zement-Verbindung herstellen sollen¹⁶. 1975 berichteten Brown und Chow¹³ von erfolgreichen Experimenten mit einem im Körper aushärtenden Calciumphosphatzement (CPC) und beantragten 1985 das Patent darauf¹⁴. Bei ihren Versuchen kamen Komposite aus Dicalciumphosphatdihydrat (DCPD) mit Tetracalciumphosphat (TTCP) und Dicalciumphosphat (DCP), TTCP und Hydroxylapatit (HA) zum Einsatz. Das Produkt daraus glich dem natürlichen HA. Ebenfalls 1985 wurde von Lemaitre⁵⁹ und seiner Arbeitsgruppe ein Dicalciumphosphatdihydratzement (DCPDC) hergestellt, indem sie α -

Tricalciumphosphat (α -TCP) und Monocalciumphosphatmonohydrat (MCPM) mischten. Zugleich machte Constantz¹⁸ Versuche mit über 1000 unterschiedlichen Calciumphosphatmischungen, und stellte dabei eine Mischung aus MCPM, α -TCP und Calciumcarbonat her. Nach weiterer chemischer Verarbeitung entstand so eine Paste, welche nur wenige Minuten Verarbeitungszeit hat und bei physiologischen Temperaturen und pH-Wert aushärtet. Es konnte gezeigt werden, dass es sich um einen teilcarbonisierten Hydroxylapatit (Dahllit) handelt, also eine Anordnung der Kristalle, wie sie auch im tierischen und menschlichen Knochen vorkommt. Diese Zementzusammensetzung ist seit 1997 unter dem Namen Norian[®] SRS[®] erhältlich.

1.2.2 Anforderungen an resorbierbare Knochenzemente

Ein resorbierbarer synthetischer Zement ist frei von organischen Bestandteilen, womit Probleme durch Übertragung viraler Erkrankungen bei allogener Knochentransplantation vermieden werden können^{32,32,35,55}. Die Substanz darf keine antigenen Eigenschaften haben, muss nachweislich frei von Kanzerogenität und resorbierbar sein. Die Resorption des Zements sollte ohne große zelluläre Reaktionen und chronische Entzündungsreaktionen ablaufen. Ebenso notwendig ist der Ausgleich, der durch Resorption verminderten mechanischen Stabilität, durch Bildung von neuem, körpereigenem Knochen. Nach vollständiger Resorption des Zementes sollte der ursprüngliche Defekt komplett durch neu gebildeten Knochen gefüllt sein. Die mechanische Belastbarkeit des Zementes sollte der des gesunden Knochens gleichen.

1.2.3 Calciumphosphatzemente

Die Entwicklung von Knochenzementen legt den Schwerpunkt auf Substanzen, welche im menschlichen Knochen vorkommen¹⁹. Dort finden sich an anorganischen Materialien Calciumphosphatapatite mit geringen Anteilen von Natrium, Magnesium, Fluoriden und anderen Spurenelementen. Calciumphosphate kommen somit natürlich im Menschen vor und sind am Stoffwechsel beteiligt. Sie können synthetisch hergestellt werden und sind nicht allergen. Seit den oben genannten

Versuchen von Brown und Chow zu in vivo aushärtenden Calciumphosphatzementen, wurden zahlreiche verschiedene Zusammensetzungen untersucht^{24,25}. Doch trotz der großen Zahl an Kompositionen, gibt es für Calciumphosphatzemente nur wenige verschiedene Produkte: Apatit (Biobon[®], BoneSource[®], Cementek[®], Mimix[®], Biopex[®]), Brushite (chronOS Inject[®]) oder amorphes Calciumphosphat (Norian[®] SRS[®]).

1.3 Tissue Engineering

1.3.1 Definition

Unter Tissue Engineering versteht man die in vitro Herstellung von Gewebe. Das Tissue Engineering stellt die Anwendung der Technik und der Naturwissenschaften in Richtung des grundlegenden Verständnisses von Struktur-Funktionsbeziehung normaler und pathologisch veränderter Gewebe und die Entwicklung von biologischen Substituten dar, um Gewebefunktionen wiederherzustellen, aufrecht zu erhalten oder zu verbessern. Diese in vielen Reviews zitierte Definition erfolgte auf einem Workshop der US-National Science Foundation 1988⁶⁰. Das Tissue Engineering erfordert also eine interdisziplinäre Zusammenarbeit der Bereiche Biomaterialforschung, Zellbiologie, Zellkulturtechnik und den jeweiligen medizinischen Fachrichtungen.

Der Bedarf an Ersatzmaterialien ist groß, um die unterschiedlichsten Defekte zu versorgen. Der Verlust von Organen oder Geweben ist einer der kostenintensivsten Punkte des Gesundheitssystems. Hohe Kosten, Immunreaktionen und aufwendige Logistik schränken Organ- und Gewebetransplantation ein. Die Verwendung von apparativ-mechanischem Ersatz und moderner Prothetik kann nicht alle Funktionen eines spezialisierten Gewebes oder Organs ersetzen. Deshalb wird intensiv an der in vitro Herstellung von fast allen menschlichen Geweben geforscht. Die autologe Chondrozytentransplantation kann bei strenger Indikation schon heute eine Alternative zu konservativen Methoden bieten¹².

1.3.2 Zell- und Gewebekultur

Die Zellkulturtechnik erfordert geeignete, definierte Umgebungsbedingungen für Zellen, um deren Leben und Funktion *in vitro* zu erhalten. Für die Zell- und Gewebekultur spielt das die Zellen umspülende Medium eine entscheidende Rolle. Es muss aus einer definierten Zusammensetzung aus Salzen, Nährstoffen, Aminosäuren und Vitaminen bestehen und hatte zu Beginn der Zellkulturforschung meist Serum als Zusatz. Mit Hilfe der Ham's F12 Zusammensetzung gelang es erstmals Ham 1965 auf Serum als Zusatz zu verzichten³⁸. Die bekannteste und am häufigsten verwendete Kulturmethode für humane und tierische Zellen ist die Monolayerkultur in Polystyrenflaschen. Die meisten Zellarten haften hierbei innerhalb eines Tages am Flaschenboden an und beginnen anschließend mit ihrem Wachstum. Mittlerweile gibt es eine ganze Reihe von Kulturmethoden, z.B. die Perfusionskultur⁶⁷.

1.3.3 Biomaterialien für das Tissue Engineering

Um die kultivierten Zellen wieder in einen gewebeähnlichen Zustand zu transformieren, entwickelten Vacanti et al.⁹⁸ eine Methode, Zellen in ein Polymerkonstrukt einzubeziehen. An diesen Polymerstrukturen sollen sich die Zellen verankern und damit schon *in vitro* genauere Strukturen herstellen, um sich an spezielle Gewebeeigenschaften anzupassen. Die eingesetzten Materialien können als Schutz- oder Trägerstruktur für die kultivierten Zellen dienen. Synthetische Materialien (organische Polymere) sind einfach und variabel herstellbar. Dagegen haben natürliche Materialien (Kollagen) gelegentlich eingeschränkte physikomechanische Kennwerte und eine spezifische biologische Aktivität. Dafür sind die immunologischen Reaktionen im Vergleich zu synthetischen Materialien geringer. Natürliche Materialien stimulieren zudem die Expression der extrazellulären Matrix⁵¹. Auch die Zusammensetzung der Polymere ist entscheidend für das Wachstumsverhalten von Chondrozyten. So wachsen Chondrozyten auf Polyglykolsäuregerüsten zweimal so schnell wie auf Polylaktatgerüsten³⁰.

1.3.4 Tissue Engineering chondraler Gewebe

Knorpelgewebe eignet sich aufgrund seiner physiologischen Eigenschaften für das Tissue Engineering und für die Zellkultur. Der zelluläre Stoffwechsel ist nicht sehr hoch und durch die fehlende Gefäßversorgung ist der Sauerstoffbedarf gering. Es gibt grundsätzlich zwei Möglichkeiten Zellen und Gewebe zu transplantieren. Allogene Knorpeltransplantate sind mit teilweiseem Erfolg in Kaninchen getestet worden^{29,102}. Allerdings besteht immer die Gefahr einer Abstoßung. Das Tissue Engineering zielt darauf ab, Zellen aus ihrer Matrix zu isolieren und danach in Monolayerkultur zu vermehren. Brittberg et al. behandelte Patienten mit 14 bis 21 Tagen vorkultivierten Chondrozyten, die direkt in den Defekt gespritzt wurden und mit einem Periostlappen gedeckt worden sind¹¹. Ein anderer Weg ist es, ein Transplantat herzustellen, welches sich gut weiterverarbeiten und operativ einfach handhaben lässt. Chondrozytentransplantationen, die nur isolierte Zellen benutzen, haben das Problem die Zellen im Defekt zu halten und zu stabilisieren⁶. Der Einsatz von speziellen Gerüsten erlaubt es, diesen Nachteil zu umgehen. Die Anforderung an ein solches Gerüst sind Stabilität und Elastizität. Die Oberfläche muss für eine schnelle Anhaftung der Zellen möglichst groß, das Volumen der Trägerstruktur aber klein und resorbierbar sein. Um eine gute und gleichmäßige Verteilung der Zellen zu erreichen, ist für das Trägermaterial eine homogene Mikrostruktur und Porosität erforderlich. Der Einsatz solcher Gerüste erlaubt es, formstabilen und leicht transplantierbaren Knorpel herzustellen, um auch größere Defekte damit zu decken. Mit einer natürlichen Zusammensetzung wird eine schnellere Einheilung in den Defekt erzielt. Freed et al. konnten zeigen, dass nach sechs Wochen die in vitro Implantate ein zelluläres Äquivalent zum ursprünglichen Knorpel, sowie Glykosaminoglykane und kollagene Fasern aufwiesen³¹. Wachstumsfaktoren, wie z.B. IGF1 und bFGF, welche die Matrixsynthese und Knorpelproliferation erhöhen²⁶ und TGF- β 1, der die Synthese von Kollagen I und II steigert¹⁰⁶, können dabei das in vitro Wachstum beeinflussen.

1.4 Die osteochondrale Biphase

Die bisherigen Bemühungen osteochondrale Defekte mit Hilfe des Tissue Engineerings zu therapieren, beschränken sich auf die Knorpelschicht. Dabei stellt

die Verankerung des künstlichen Materials häufig ein Problem dar. Die bisher übliche Methode ist die Verankerung des artifiziellen Gewebes mit Hilfe von Fibrinkleber oder press fit^{63,82}. Darüber hinaus bieten osteochondrale Transplantate die Möglichkeit, auch den beschädigten Knochen zu ersetzen und lassen sich gut im subchondralen Knochen verankern³⁹. Autologe Transplantate haben aber den Nachteil, große Mengen an Eigenspendermaterial zu benötigen, das von unbelasteten Stellen aus dem Gelenk gewonnen werden muss. Einen Lösungsansatz für dieses Problem bietet die Kombination aus dem Tissue Engineering der Knorpelphase und dem gleichzeitigen Einsatz eines bioaktiven Trägermaterials, das die Verankerung im subchondralen Knochen ermöglicht und nach der Transplantation kontinuierlich durch körpereigenen Knochen ersetzt wird. Die Herstellung und der Einsatz eines solchen biphasischen Implantats mit vitalen chondrozytären Zellen ist grundsätzlich möglich⁵⁶. Die Vorteile sind leichtes Handling, eine gute Verankerung und der Verzicht auf zusätzliche Materialien um das Implantat zu fixieren.

1.5 Aufgabenstellung und Ziele

In dieser Arbeit sollten osteochondrale Biphasen, bestehend aus einem Knochenzement und einem Polymergerüst, das mit in vitro gezüchteten Chondrozyten beimpft und anschließend in vitro kultiviert wurde, hergestellt werden. Um den Einfluss des Polymervlieses als Trägermaterial auf die Knorpelqualität zu untersuchen, wurde als Kontrolle ein Implantat ohne Vlies hergestellt, welches aber ebenfalls den Charakter eines osteochondralen Transplantates hatte. Als „Knochenphase“ wurde ein Material ausgewählt, das als Blockimplantat in seinen bioaktiven Eigenschaften bereits gut charakterisiert ist und mit dem Knochen im Sinne einer Verbundosteogenese verwächst¹⁷.

Die vorkultivierten osteochondralen Biphasen sollten anschließend in einen Versuchsaufbau, der sich zur weiteren Proliferation der Chondrozyten und Untersuchung der biologischen Eigenschaften der Transplantate eignete, transferiert werden. Da die integrative Gewebeantwort, das Degradationsverhalten und die Weiterentwicklung von in vitro hergestellten Chondrozyten unter Berücksichtigung

verschiedener Biomaterialien im Fokus der Untersuchungen standen, kam dafür nur ein in vivo Modell in Frage. Entscheidend für die Wahl dieses Modells ist der in vitro beobachtete Verlust der phänotypischen Eigenschaften der Chondrozyten¹⁰¹. Bei der Wahl der Tierspezies sind, bei möglichst naher phylogenetischer Verwandtschaft zur menschlichen Spezies, ethische und finanzielle Aspekte zu berücksichtigen. Da das vorliegende Implantat zum ersten Mal in einem Tiermodell untersucht wurde, wurde die Nacktmaus ausgewählt, um eine Immunreaktion gegen die mausfremden, bovinen Chondrozyten zu vermeiden^{80,87}. Durch die fehlende Behaarung dieser Tiere ist ein steriler Operationszugang zudem leichter und nach der Implantation eine gute Wundkontrolle möglich. Ebenso war es aus ethischen und finanziellen Gründen erstrebenswert, möglichst wenige Versuchstiere zu verwenden, ohne jedoch die Ergebnisse durch eine zu geringe Stichprobengröße in Frage stellen zu müssen. In vergangenen Versuchen hatte sich eine Gruppengröße von jeweils 6 bewährt, so dass sich auch in diesem Experiment für 6 Mäuse je Versuchsgruppe entschieden wurde. Die Biphasen wurden, aufgrund ihrer Größe im Vergleich zur Maus und des einfachen Zugangs, subkutan implantiert.

Die osteochondralen Biphasen wurden histologisch ausgewertet und untersucht. Beurteilt wurden die in vivo Biokompatibilität des eingesetzten Hydroxylapatits, des Polymervlieses und der Fibrin-Zellsuspension. Des Weiteren wurden die in vivo Stabilität des Zell-Biomaterial-Verbundes, sowie die Synthese knorpeltypischer extrazellulärer Matrix qualitativ, semiquantitativ und quantitativ mittels Histomorphometrie untersucht.